



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS

MECANISMOS MOLECULARES QUE PARTICIPAN EN
LA PROTECCIÓN MEDIADA POR DEXAMETASONA
CONTRA EL EFECTO CITOTÓXICO DEL $TNF\alpha$

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A :
CRISELDA MENDOZA MILLA



DIRECTOR DE TESIS: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

MÉXICO, D. F.

Junio 2008



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.

MECANISMOS MOLECULARES QUE PARTICIPAN EN LA
PROTECCIÓN MEDIADA POR DEXAMETASONA CONTRA
EL EFECTO CITOTÓXICO DEL TNF α

Criselda Mendoza Milla

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Alejandro Zentella Dehesa en el Departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular, de la UNAM.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo integrado por:

Dr. Alejandro Zentella Dehesa, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. Jorge Vázquez Ramos , Facultad de Química, UNAM

Dr. Jesús Adolfo García Sáinz, Instituto de Fisiología Celular, UNAM

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (3161PN) y DGAPA (IN223498). Durante los estudios de doctorado conté con el apoyo de becas para estudios de doctorado otorgadas por CONACYT (86422) y DGAPA.

Agradezco especialmente, el apoyo otorgado por las Unidades de Cómputo, Biología Molecular y Microscopía del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, en particular a Juan Manuel Barbosa, Gerardo Coello, Ivette Rosas y Laura Ongay,

Agradezco al Dr. Moisés Selman Lama del INER por el apoyo brindado para concluir este trabajo.

MIEMBROS DEL JURADO:

Presidente	Dr. Jesús Adolfo García Sáinz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Jorge Meléndez Zajgla	INMEGEN, SSA
Vocal	Dra. Lena Ruiz Azuara	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Marco Antonio Velasco Velázquez	Facultad de Medicina, UNAM
Secretario	Dr. Ignacio Camacho Arroyo	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dra. Vilma Maldonado Lagunas	INCAN, SSA
Suplente	Dr. Julio Morán Andrade	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

GRACIAS

A mis queridos papás, **Angel Mendoza y Many Milla**, porque esto también es suyo, por su amor incondicional, apoyo, enseñanzas y ejemplo. También por la insistencia... que ha sido decisiva.

A **Pepe Rojas**, con todo mi amor. Por la paciencia y la compañía en las horas de desvelo empleadas para consolidar este logro, por confiar en mí sin reservas cuando yo pensaba que no podía y por los bailes matutinos. Gracias amado compañero de mi vida, del camino...

A mis hermanos **Angel, Marcela y Angeles** con todo mi cariño.
Y también a **Olga, Miguel y Marco**.

A mis niñ@s **Juliana, Mariana, Miriam, Rodrigo, Sandrita y León** con muchísimo cariño, por la luz de su presencia.

A **Vivis y Ximena**, mis queridas pequeñas que ya crecieron.

A las familias **Rojas Ritter, Rojas Cano, Calvo Rojas, Torreblanca Rojas, Segura Rojas, Lomelí Rojas y Arellano Rojas**, en especial a **Fernando** y a **María** por todas las porras.

Al Dr. **Alejandro Zentella**, mi padre académico, por guiar mis pasos en este sendero de aprendizaje. Pero sobre todo por enseñarme que la excelencia académica no está reñida con ser un buen jefe y un excelente ser humano. Gracias por el ejemplo querido Dr.

A la **Dra. Irma Bernal**, por enseñarme enseñando, por las interesantes conversaciones y por motivarme a seguir.

A **mis maestros** de toda la vida y a la **UNAM** mi Universidad, con respeto y gratitud.

A los **miembros de mi comité tutorial**, por su asesoría durante el desarrollo de este trabajo.

A los **miembros del jurado de examen** que leyeron esta tesis y contribuyeron de manera determinante a la mejora del trabajo con sus observaciones y comentarios.

A **Lety García**, por el apoyo y la guía invaluable en la ruta de la tramitología necesaria para llegar a la meta.

Del INCMNSZ a **Araceli García, Irma, Carmita y la Sra. Manuela**

A mis amigos, y a los no tanto, a los que están y a los que andan lejos:

Del extinto 204S: **Erika, Cato, Rebe, Rafael Ernesto, Rafael Paredes, Salvador, Mayra, Emilio, Rocío Camarillo y el Enano** que ya no es enano, **Lucia, Adriana, PiliF, Ere, Nohemí, Melchor, Fernando, Francisco, Delina, Adriancito, Josué, Marco, Mina, Mary, Gina, José Luis, Martha, Susy, Ámbar, Omarcito** y a los que sin querer se me puedan olvidar y que pasaron por ahí. Por compartir las horas que ahora extraño entre hacer geles, poner agüitas y escuchar a Mariano.

De toda la vida aunque no los vea tan seguido como quisiera: **Gely, Octavio, Norma, Paty, Nora, Lalo, Rosa Elena, Rocío, Óscar, Mario, Ivonne y Felipe**. A **Oli**, que si la veo, por el I Ching y las galletas que compartimos, y por todo lo demás.

A los otros del IFC: **Lupita, Tamara, Ricardo, Enrique, Po, Pablo, Rocío Alcántara, Tere Lara y Juan sin miedo**.

A los queridos amigos “disidentes” que me dejó el CIENI: **Klintsy, Humberto, Oli B, Dany, Cristina, Maty, Sandoval, Veguita, Alfredo, Natalia, Caro García, Edgar, Joel, Teté, Gaby, Fernando, Juan, Claudita, Vequimo, Mini, Rosy, Lalo, Zeidy, Hannia, Murakami, Santiago, Renan, Aldo y Joaquín**. Y ¿por qué no?, también a **Gonzalo** y a **GRT**.

He who binds himself to a joy
Does the winged life destroy
But he who kisses it as it flies
Lives in eternity's sunrise

Aquel que se encadena a una alegría
Destruye la vida alada
Pero quien la besa cuando pasa al vuelo
Vive en el amanecer de la eternidad

William Blake

CONTENIDO

1...ÍNDICE DE FIGURAS	1
2. INDICE DE TABLAS.....	3
3. RESUMEN.....	4
4. ABSTRACT	5
5...INTRODUCCIÓN	6
5.1 El Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α).....	6
5.2 Familia del TNF α y de sus receptores	11
5.3 Receptores para el TNF α	15
5.4 Transducción de la señal inducida por TNF α	16
5.5 Los glucocortides y sus receptores	34
5.6 Muerte celular y ciclo, TNF α y dexametasona.....	41
6...ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....	43
7...HIPÓTESIS	45
8...OBJETIVOS	45
8.1 Objetivo general	45
8.2 Objetivos particulares.....	45
9...MATERIALES Y MÉTODOS	46
9.1 Células y condiciones de cultivo	46
9.2 Conteo celular por exclusión de azul de tripano	47
9.3 Ensayos de viabilidad celular.....	47
9.4 Purificación de plásmidos	47
9.5 Plásmidos.....	47
9.6 Generación de transfectantes estables por precipitación con fosfato de calcio.....	48
9.7 Extractos nucleares.....	48
9.8 Ensayo de retardo en la movilidad electroforética (EMSA).....	49
9.9 Preparación de extractos celulares de proteína total.....	49
9.10 Inmunoblots.....	50
9.11 Citometría de flujo para análisis de ciclo celular.	51
9.12 Análisis estadístico.....	52
10.RESULTADOS	53
10.1.....La dexametasona confiere protección contra el efecto citotóxico del TNF α .	

10.2 La vía de señalización de PI3K/Akt no está involucrada en la protección mediada por dexametasona contra el efecto citotóxico del TNF α	56
10.3 La vía de señalización de NF- κ B, se requiere para la protección mediada por dexametasona contra la citotoxicidad inducida por el TNF α en células L929.	61
10.4 La pérdida de la protección conferida por dexametasona por inactivación de NF- κ B, está asociada a una disminución de las proteínas IAP en células L929.....	65
10.5 Otros efectos de la dexametasona, ciclo celular.....	66
11. DISCUSIÓN	71
12. CONCLUSIONES	79
13. PERSPECTIVAS Y CONSIDERACIONES FINALES.....	81
14. ANEXOS	84
14.1 ANEXO 1: RESULTADOS PUBLICADOS	84
14.2 ANEXO 2: ABREVIATURAS	90
15. REFERENCIAS.....	92

1. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Superficie de Van der Waals del trímero del $TNF\alpha$	8
Figura 2. Vías de transducción de la señal del $TNF\alpha$	18
Figura 3. Proteínas NF- κ B e I κ B.	20
Figura 4. Las vías canónica y alternativa de NF- κ B.	22
Figura 5. Respuestas involucradas en la activación de PI3K.	25
Figura 6. Estructura general de las proteínas cinasas Akt/PKB.	29
Figura 7. Estructura funcional del receptor humano de glucocorticoides (hGR).	36
Figura 8. Señalización inducida por el receptor de hormonas esteroideas.	40
Figura 9. La dexametasona (Dex) previene la citotoxicidad del $TNF\alpha$ en células L929.	53
Figura 10. Efecto de la adición de dexametasona antes y después del tratamiento con $TNF\alpha$ en células L929.	54
Figura 11. La dexametasona (Dex) previene la citotoxicidad del $TNF\alpha$ en células L929.	55
Figura 12. La dexametasona (Dex) previene la citotoxicidad del $TNF\alpha$ en células L929 a tiempos largos.	56
Figura 13. El $TNF\alpha$ y la dexametasona inducen la fosforilación de Akt en células L929.	57
Figura 14. Tratamiento con wortmanina y expresión de una dominante negativa de PI3K ($\Delta p85$) y su efecto en la activación de Akt y NF- κ B.	58
Figura 15. La wortmanina no modifica la traslocación de NF- κ B promovida por $TNF\alpha$ o por $TNF\alpha$ en presencia de dexametasona en células L929.	59
Figura 16. La wortamina mantiene su efecto inhibitor sobre la PI3K durante los periodos de incubación utilizados en los ensayos de citotoxicidad.	60
Figura 17. Efecto del tratamiento con wortmanina en células parentales L929 y de la expresión de una dominante negativa de PI3K ($\Delta p85$), en la protección conferida por dexametasona contra la citotoxicidad inducida por el $TNF\alpha$	61

Figura 18. La dexametasona no afecta la traslocación nuclear de NF- κ B inducida por TNF α en células parentales L929. 63

Figura 19. La dexametasona no afecta la activación de NF- κ B ni la degradación de I κ B α en las células L929 transfectadas con I κ B α mutado (I κ B α m)..... 64

Figura 20. Supervivencia celular en células L929 parentales y células que sobreexpresan la forma mutada de I κ B α 65

Figura 21. La inactivación de la vía de NF- κ B reduce los niveles de proteínas c-IAP1 y XIAP. 66

Figura 22. Efecto de TNF α sobre la viabilidad en células L929 cultivadas bajo distintas condiciones. 67

Figura 23. La dexametasona no induce inhibición de la proliferación y arresto en el ciclo celular a tiempos cortos..... 68

Figura 24. La dexametasona inhibe la proliferación e induce arresto en el ciclo celular a tiempos largos..... 69

Figura 25. Representación esquemática del mecanismo propuesto para explicar la protección mediada por dexametasona contra el efecto citotóxico del TNF α 78

2. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción y presencia del TNF α en humanos.....	10
Tabla 2. Familia de ligandos del TNF α y sus receptores.....	14
Tabla 3. Clases de PI3K y características de las subunidades catalíticas y adaptadoras.....	26
Tabla 4. Ejemplos de proteínas que interactúan con Akt y sus efectos biológicos..	30
Tabla 5. Hormonas esteroides y ejemplos	34
Tabla 6. Anticuerpos utilizados para inmunoblots	51
Tabla 7. La dexametasona induce inhibición de la proliferación y arresto en el ciclo celular a tiempos largos	70

3. RESUMEN

El factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$) es uno de los principales promotores de muerte en distintas líneas celulares derivados de tumores. En la línea de fibroblastos murinos L929 derivados de tejido conectivo, el $\text{TNF}\alpha$ es capaz de activar una vía de muerte en la que se observa activación del Factor Nuclear kappa B ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) y de la Fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K). Se ha demostrado que ambas moléculas son reguladoras de varias vías de sobrevivencia. Por otra parte, se sabe que agonistas de glucocorticoides como la dexametasona, inhiben la muerte celular inducida por $\text{TNF}\alpha$ en células L929 a través de un mecanismo no del todo conocido hasta ahora. Se ha postulado que esta inhibición por dexametasona de la muerte inducida por $\text{TNF}\alpha$, podría estar mediada por la activación de factores de sobrevivencia o por la inhibición de factores de muerte.

En este trabajo exploramos la participación de PI3K y $\text{NF-}\kappa\text{B}$ en la protección mediada por dexametasona contra la muerte inducida por $\text{TNF}\alpha$, para lo cual sobreexpresamos una forma dominante negativa de PI3K y una forma mutada no degradable de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (el inhibidor citoplásmico de $\text{NF-}\kappa\text{B}$) en células L929.

Encontramos que la sobreexpresión de la mutante de $\text{I}\kappa\text{B}$ anula la protección mediada por dexametasona contra la muerte inducida por el $\text{TNF}\alpha$. Esta respuesta correlaciona con una alteración en la expresión de las proteínas inhibidoras de apoptosis XIAP y c-IAP1. Además, observamos que la presencia de la proteína $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ mutada, lo cual resulta en la inhibición de $\text{NF-}\kappa\text{B}$, conduce a la exacerbación de la citotoxicidad en respuesta al $\text{TNF}\alpha$. Sin embargo la sobreexpresión de la mutante de PI3K no altera el efecto protector de la dexametasona.

Los resultados observados, sugieren que $\text{NF-}\kappa\text{B}$ es un elemento esencial en la protección conferida por dexametasona contra el efecto citotóxico del $\text{TNF}\alpha$. La ausencia de activación de este factor transcripcional incapacita a la célula para contender contra el efecto citotóxico desencadenado en respuesta al $\text{TNF}\alpha$ en presencia de dexametasona. Además, el aumento en la citotoxicidad observado durante la inhibición de $\text{NF-}\kappa\text{B}$, sugiere la participación de este factor en otras vías de sobrevivencia.

4. ABSTRACT

Tumor necrosis factor alpha ($\text{TNF}\alpha$) is one of the main cell death promoters in different tumor-derived cell lines. In the L929 murine fibroblasts cell line $\text{TNF}\alpha$ activates a cell death through two factors involved in the regulation of several survival pathways: Nuclear Factor kappa B ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) and phosphatidil inositol 3 kinase (PI3K). On the other hand, it is known that glucocorticoid agonists like dexamethasone inhibit $\text{TNF}\alpha$ induced cell death in the L929 line through a not yet known mechanism. In fact, it has been proposed that dexamethasone protection against $\text{TNF}\alpha$ induced cytotoxicity could be mediated by the activation of survival factors or by the inhibition of cell death factors.

In this work we investigated both, the PI3K and $\text{NF-}\kappa\text{B}$ participation in the dexamethasone protection against the $\text{TNF}\alpha$ induced cytotoxicity. To this end we overexpressed a negative dominant form of PI3K and a non-degradable mutant $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ protein (the cytoplasmic $\text{NF-}\kappa\text{B}$ inhibitor) in L929 cells.

We found that $\text{I}\kappa\text{B}$ mutant overexpression abrogates the dexamethasone protection against $\text{TNF}\alpha$ induced cell death and that this response was correlated with the altered expression of the apoptosis inhibitor proteins XIAP and c-IAP1. Interestingly, we determined that in the presence of the mutant $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ protein, which leads to $\text{NF-}\kappa\text{B}$ inhibition, the $\text{TNF}\alpha$ induced cytotoxicity was increased. Also, overexpression of the mutant PI3K has no effect on the protection conferred by dexamethasone.

Taken together, these results suggest that $\text{NF-}\kappa\text{B}$, but not PI3K, is an essential element in the dexamethasone conferred protection against the $\text{TNF}\alpha$ cytotoxicity. Also, the augmented $\text{TNF}\alpha$ cytotoxicity effect observed during the $\text{NF-}\kappa\text{B}$ inhibition suggests the involvement of this factor in other survival pathways.

5. INTRODUCCIÓN

5.1 El Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α)

5.1.1 Historia

Hace más de un siglo, el médico alemán P. Bruns reportó la regresión de tumores en humanos después de una infección bacteriana. Esto llevó a W. Coley, un oncólogo norteamericano, a utilizar extractos bacterianos (llamados toxinas de Coley) para el tratamiento de cánceres humanos, con algunos éxitos. Gratia y sus colaboradores demostraron la regresión tumoral por extractos bacterianos en un modelo de cobayos. En 1944, Shear y sus colaboradores aislaron lipopolisacárido (LPS) de los extractos bacterianos y mostraron que éste era el responsable de la regresión tumoral (Creech et al., 1948b; Creech et al., 1948a). G. Algire, un investigador francés, demostró que el LPS induce necrosis hemorrágica de tumores al inducir hipotensión sistémica, colapso de la vasculatura tumoral, anorexia de las células tumorales y muerte celular (Algire et al., 1952).

Posteriormente, O'Malley y sus colaboradores (O'Malley et al., 1963) comprobaron que los efectos del LPS sobre la regresión tumoral no son directos, sino que se median a través de la inducción de un factor en el suero al que llamaron factor necrozante de tumores. Este factor fue renombrado por el grupo de Lloyd Old como factor de necrosis tumoral (TNF); este grupo reportó originalmente que los macrófagos eran la fuente celular del factor pero más tarde mostraron que células del linaje linfoblastoide también producen la citocina (Carswell et al., 1975).

En 1984 el TNF humano se purificó y su cDNA se clonó y expresó; el monómero consta de 157 aminoácidos. Poco tiempo después, el TNF de ratón se descubrió de forma independiente como un factor que media la caquexia inducida por LPS (Beutler et al., 1985), y como un factor de diferenciación mieloide (Takeda et al., 1986).

5.1.2 Estructura del gen y la molécula del TNF α

El gen del TNF α : El gen del TNF α se encuentra como copia única, en el brazo corto del cromosoma 6 en humanos y del 17 en murinos. Se encuentra dentro de la región de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad. El TNF α está

siempre hacia 3' del gen del TNF β y tiene cerca de 3 kb de DNA de longitud. Consiste de cuatro exones y más del 80% de la secuencia de la proteína madura soluble se codifica en el cuarto exon, mientras que los exones I y II contienen casi por completo la secuencia del péptido líder que se encuentra en la forma unida a la membrana.

La región que flanquea al gen en el extremo 5' contiene varios sitios κ B, un sitio SP1, un AP-1 y una "caja Y" similar a las del complejo mayor de histocompatibilidad clase II. El RNAm se traduce siempre en una proteína de 157 y 156 aminoácidos respectivamente en humanos y murinos. De los 157 aminoácidos de la secuencia humana, los primeros 76 corresponden a la presecuencia, que es altamente conservada y sirve para anclar la molécula a la membrana.

La molécula del TNF α : El TNF α se produce primariamente como una proteína de membrana tipo II; los aminoácidos -76 a -50 comprenden la región intracitoplásmica y los residuos del -44 al -26 corresponden a la región transmembranal hidrofóbica. La proteína sin procesar tiene una masa molecular de 26 kDa y se corta proteolíticamente para dar origen a la forma de 17 kDa. La forma soluble del TNF α no presenta ningún residuo de metionina y existe en solución como un homotrímero de masa molecular de 52 kDa y ésta es la forma que se une a los receptores. El trímero del TNF α se une a tres moléculas del receptor, una en cada una de las interfaces entre los monómeros del ligando. Cada una de las tres subunidades contiene un puente disulfuro (Figura 1), que no es esencial para su actividad. El TNF α humano se une con alta afinidad a sus receptores con una constante de disociación K_d de 0.5 y 0.1 nM para el TNFR1 y el TNFR2 respectivamente (Kramer et al., 1988; Stauber et al., 1988).

No se han reportado muchas modificaciones post-traduccionales sobre el TNF α . El TNF α humano no presenta glicosilaciones, pero la secuencia primaria muestra la presencia de varios sitios consensos de posible fosforilación, lo que ofrece un mecanismo potencial para la regulación de la formación del trímero y la unión al receptor. Además, se reportó la fosforilación del TNF α humano unido a membrana en monolitos (Pocsik et al., 1995).

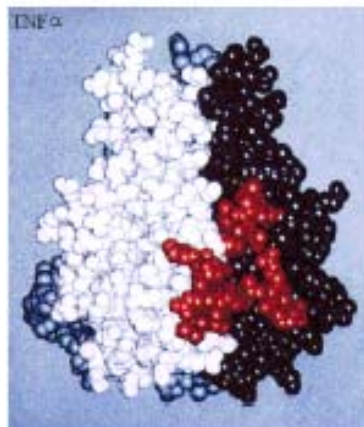


Figura 1. Superficie de Van der Waals del trímero del TNF α .

Las subunidades se indican por los colores blanco, gris y negro. En rojo se muestran las zonas de mutación que se asocian con cambios en la citotoxicidad o en la unión al receptor (Eck et al., 1992).

5.1.3 Producción

El TNF α es una citocina que se produce por muchos tipos celulares, como macrófagos, monocitos, linfocitos, keratinocitos y fibroblastos (Tabla 1), en respuesta a inflamación, infección, daño u otros cambios ambientales.

La producción del TNF α se regula en múltiples niveles que incluyen efectos transcripcionales, estabilización del RNAm, traducción y estabilidad de la proteína. La endotoxina (LPS) de las bacterias Gram negativas induce la producción de TNF α en macrófagos. El LPS se une al receptor de superficie CD14, el cual transmite una señal al receptor 4 similar a Toll (TLT-4). Esto resulta en la acumulación intracelular de un complejo que incluye el factor 88 de diferenciación mieloide, la proteína adaptadora que contiene un dominio Toll/IL-1R y la cinasa asociada a la IL-1R, lo que lleva a la activación de los factores de transcripción relacionados con inflamación, entre los que se encuentran NF- κ B y AP-1. Además, la exposición al LPS resulta en la activación de varias vías de señalización que se involucran en la estabilidad del RNAm de la citocina y en la traducción y estabilidad de la proteína.

La región 3' no traducida del RNAm del TNF α (UTR) contiene un elemento rico en AU (ARE), que inicialmente se implicó en control traduccional. Los AREs están presentes en los UTR 3' de los RNAm de muchas citocinas, genes relacionados con inflamación y oncogenes, y confieren inestabilidad (Caput et al., 1986). Ciertos RNAm de moléculas proinflamatorias, entre los que se incluyen los

RNA_m de ciclooxigenasa-2, Interleucina-6, Interleucina-8 y TNF α , se estabilizan por la activación de la vía de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) p38 (Dean et al., 1999). Los estudios con construcciones de RNA_m reportero muestran que la estabilización que media la p38 involucra directamente los AREs (Brook et al., 2000). De modo que, los AREs confieren inestabilidad a los RNA_m, sin embargo, después de la activación de la vía de p38, estos elementos permiten la estabilización del RNA_m y causan un aumento en la cantidad de proteína.

Se piensa que la estabilidad de los RNA_m ricos en AU se controla por proteínas que se unen a los AREs. Las proteínas que se unen al ARE del TNF α y regulan la estabilidad de su RNA_m en macrófagos no se conocen bien. Los primeros trabajos demostraron la formación de varios complejos entre una sonda del UTR 3' del RNA_m y proteínas en los compartimentos nuclear y citoplásmico. Después se demostró que existen proteínas de unión al ARE tanto inducibles por LPS como constitutivas. Se han identificado tres proteínas que se unen al ARE del TNF α . La tristetraprolina (TTP) es una proteína inducible por LPS que desestabiliza el RNA_m del TNF α (Carballo et al., 1998). Los ratones que no expresan TTP sobre expresan tanto el RNA_m como la proteína del TNF α en presencia o ausencia del estímulo con LPS. Tanto TIAR (Gueydan et al., 1999) como la proteína relacionada TIA-1 también se unen al ARE del TNF α . Los macrófagos de ratones que no expresan TIA-1 producen más proteína que los normales. Aunque la estabilidad del RNA_m del TNF α no varía, una proporción mayor de éste se asocia a los polisomas de estas células cuando se comparan con los macrófagos silvestres. Estos datos sugieren que TIA-1 es un silenciador específico de la traducción del TNF α (Piecyk et al., 2000).

5.1.4 El TNF α , fisiología y enfermedad

El TNF α dispara un amplio espectro de respuestas celulares que incluye la activación de linfocitos y leucocitos, proliferación, diferenciación y muerte. A pesar de su gran similitud, el TNF α y la LT han adquirido a lo largo de la evolución funciones diferentes. Mientras que la LT juega un papel muy importante en la hematopoyesis, el TNF α participa en procesos de activación de la respuesta inmune innata. Junto con la IL1 β que es el mediador central de la reacción inflamatoria, el

ligando de Fas y otras citocinas relacionadas del tipo TRAIL, el TNF α induce la muerte fisiológica de células alteradas, ya sea por infecciones virales o células tumorales. Es interesante notar que si bien todas las células primarias normales tienen receptores al TNF α , la muerte sólo se induce cuando el metabolismo basal se encuentra seriamente alterado, lo que experimentalmente se logra con inhibidores de la transcripción o de la traducción. Es igualmente importante notar que las únicas células en las que el TNF α induce muerte son de tipo tumoral, y que en muchos casos cuando las células son resistentes a la citocina, esto se debe a mutaciones que inhabilitan las vías de señalización de muerte. Por tanto, el TNF α se considera como parte de los mecanismos fisiológicos para la eliminación de células disfuncionales.

Tabla 1. Producción y presencia del TNF α en humanos

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

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

La producción inapropiada del TNF α o la activación sostenida de su señalización se implica en la patogénesis de un amplio espectro de enfermedades humanas que incluye sepsis (Acton et al., 1996), malaria cerebral, rechazo al trasplante (Couriel et al., 2000), diabetes (Hotamisligil et al., 1994), cáncer (Balkwill et al., 1990), osteoporosis y enfermedades autoinmunes tales como esclerosis múltiple, artritis reumatoide (Feldmann et al., 1996; Romas et al., 2002), enfermedad de Crohn (Beutler, 1999), artritis psoriática y enfermedades inflamatorias vasculares.

El $\text{TNF}\alpha$ desempeña diversos papeles en el cuerpo, que incluyen inmunoestimulación, resistencia a agentes infecciosos, resistencia a tumores, regulación del sueño y regulación del desarrollo embrionario. Sin embargo, en el caso de algunos tumores, su posible potencial terapéutico es contrarrestado por la toxicidad sistémica que implica en concentraciones efectivas.

5.2 Familia del $\text{TNF}\alpha$ y de sus receptores

La familia de ligandos del $\text{TNF}\alpha$ y sus correspondientes receptores (TNFR), son moléculas que interactúan de manera específica y con alta afinidad. Estas moléculas juegan un papel importante en diversos procesos biológicos que ocurren en células de mamífero, entre los que se encuentran inflamación, apoptosis, autoinmunidad, desarrollo y organogénesis del sistema inmune.

5.2.1 Familia de los ligandos

El $\text{TNF}\alpha$ es representativo de una familia creciente de citocinas triméricas que incluye entre otras a la linfotoxina α ($\text{LT}\alpha$), al ligando de Fas, al ligando del receptor activador del $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (RANKL), al ligando de CD40 y al ligando que induce apoptosis relacionado al TNF (TRAIL) (Tabla 2).

Todos los ligandos de la familia (20 a la fecha), reconocen a sus receptores a través de una estructura común compuesta de láminas β antiparalelas, arregladas en una topología característica denominada 'jelly roll' (Idriss and Naismith, 2000; Ware, 2003). Estas similitudes en la estructura se reflejan en mecanismos similares de reconocimiento y activación. La familia de ligandos presenta entre el 25 y el 30% de similitud en secuencia, sobre todo en los residuos responsables de su trimerización. En contraste, las superficies externas de los trímeros, importantes para la unión con sus respectivos receptores, muestran poca similitud (Baud and Karin, 2001).

A diferencia de los factores de crecimiento solubles clásicos como EGFs, PDGFs, FGFs o IGFs, los ligandos de la familia del $\text{TNF}\alpha$ no se sintetizan como proteínas de secreción. La mayoría de estos ligandos se producen como proteínas transmembranales tipo II de las que se derivan proteolíticamente las formas

solubles (Gruss and Dower, 1995). Las proteínas precursoras se sintetizan en el retículo endoplásmico y maduran durante su tránsito hacia el Golgi para finalmente llegar a la membrana celular por medio del sistema de transporte vesicular. Una vez en la membrana celular, y en respuesta a un estímulo de liberación, se activa una familia de proteasas de superficie relativamente inespecíficas que producen un corte en la región yuxtamembranal externa generando así a las formas solubles (Massague and Pandiella, 1993). Una característica común de la familia de ligandos del $\text{TNF}\alpha$ es que también pueden funcionar como ligandos asociados a la membrana de las células que los producen, en forma análoga al sistema de señalización de las ezrinas. Esta característica les permite servir como ligandos de fase sólida expuestos en la superficie de las células presentadoras mediando señales dependientes del contacto célula-célula (Hirao et al., 1996).

El $\text{TNF}\alpha$ y las linfotoxinas alfa y beta ($\text{LT } \alpha/\beta$) son los miembros más estudiados de esta familia. Los tres se sintetizan como proteínas precursoras de membrana y pueden servir como ligandos en fase sólida. En respuesta a un estímulo son procesadas para generar las formas maduras solubles. Mientras que el $\text{TNF}\alpha$ sólo forma homotrimeros, las $\text{LT}\alpha$ y $\text{LT}\beta$ pueden formar homo y heterotrimeros capaces de unirse a los mismos receptores (Androlewicz et al., 1992). Esta característica ha dificultado distinguir las funciones de cada una de estas citocinas *in vivo*.

5.2.2 Familia de los receptores de $\text{TNF}\alpha$

Los receptores de la familia del TNF son proteínas de membrana tipo I con un solo cruce transmembranal que se distinguen por la presencia de varios motivos y dominios proteicos característicos. Se han identificado algunos receptores para los que aún no se conoce el ligando (Tabla 2).

Dominio extracelular: Los hasta ahora 29 miembros de la familia de los receptores reconocen sus ligandos a través de un motivo compartido en la secuencia que presenta de una a cuatro repeticiones ricas en cisteínas que se encuentran en cantidad variable en sus dominios extracelulares. En contraste, las secuencias de aminoácidos de los dominios intracelulares no presentan tanta similitud. La homología de sus dominios extracelulares dio, inicialmente, origen a la falsa impresión de que los receptores poseen funciones y mecanismos de acción

relacionados. Experimentos de unión realizados *in vitro* empleando los dominios extracelulares han mostrado una inesperada promiscuidad. Por ejemplo, el ligando TRAIL puede unirse a 5 receptores: DR4, DR5, DCR1, DCR2 y OPG; o el ligando LIGHT a tres receptores diferentes HDVEM, LT β R y a DR3 (Aggarwal, 2003). Aún se desconoce si este comportamiento tiene un significado fisiológico. En todos los casos los receptores funcionan como trímeros, complementando así la simetría de los ligandos. Los receptores pueden formar homo o heterotrímeros, por ejemplo, el receptor de TNF α tipo I (TNFRI) puede formar heterotrímeros con el receptor de linfotóxina alfa (LT α R). Adicionalmente, un dominio que se conserva en las regiones extracelulares del TNFR1 y del TNFR2 media el ensamblaje específico de trímeros de receptores independientemente de la unión del ligando (Chan et al., 2000). Este dominio de preensamble (PLAD por pre-ligand-binding assembly domain) es distinto del dominio que contacta con el ligando pero se requiere para el preensamble de los complejos de los TNFR que unen TNF α y median la señalización.

Dominios transmembranal e intracelular: La región transmembranal no presenta patrones de aminoácidos conservados, y tampoco se han identificado motivos en la región yuxtamembranal externa que indiquen el sitio de procesamiento.

El dominio intracelular es menos homogéneo que el dominio extracelular, sin embargo, parece haber una similitud en la estructura tridimensional que no se refleja en la secuencia primaria. Los dominios intracelulares aparentemente diferentes por su secuencia de aminoácidos son capaces de unir las mismas moléculas de señalización. Además, parece haber entrecruzamientos entre los diferentes receptores a través de la interacción con moléculas de andamiaje que se unen a ellos.

Algunos de los receptores de esta familia, como el TNFR1 y Fas, contienen cerca de su extremo carboxilo terminal un dominio de interacción proteica conservado de aproximadamente 90 aminoácidos que se denomina dominio de muerte (DD, por death domain). Su nombre se deriva del hecho de que su eliminación causa la pérdida de la respuesta citotóxica (Itoh and Nagata, 1993; Tartaglia et al., 1993). Este dominio permite el reclutamiento y activación de los zimógenos de las caspasas activadoras (caspasa 8 y caspasa 10). La unión del

ligando promueve la formación de un complejo multiprotéico que en caso del $\text{TNF}\alpha$ se denomina DISC (descrito con más detalle en la sección 5.4). La trimerización del dominio intracelular es suficiente para disparar la transducción de señales de muerte celular y también otras respuestas, como la activación del factor de transcripción $\text{NF-}\kappa\text{B}$. Por análisis de la secuencia de los DD, no es posible asignar a alguna subregión una actividad enzimática que tuviera efecto directo sobre la muerte. Más aún, otras proteínas, algunas de ellas no relacionadas a la inducción de la muerte celular, contienen un dominio similar. Los DD ejercen sus efectos por la interacción con los DD de otras proteínas, ya sea homo o heterotriméricamente (Wajant et al., 2003).

Tabla 2. Familia de ligandos del $\text{TNF}\alpha$ y sus receptores

Ligandos	Receptores
RANKL	RANK, OPG
$\text{TNF}\alpha$	TNFR-I, TNFR-II
$\text{LT}\alpha$	TNFR-I, TNFR-II, HVEM
$\text{LT}\alpha 1\beta 2$	$\text{LT}\beta$ -R
CD95L	CD95 (Fas, Apo-1), DCR3
TRAIL (Apo2L)	DR4, DR5, DcR1, DcR2
BAFF	BAFF-R, BCMA, TACI
GITRL	GITR
APRIL	BCMA, TACI
CD40L	CD40
CD27L	CD27
?	DR6
	SOBa
	mSOB
EDA-A1	EDAR
EDA-A2	XEDAR
TWEAK	FN14
LIGHT	$\text{LT}\beta$ -R DR3 HDVEM
CD30L	CD30
4-1BBL	4-1BB
OX40L	OX40
?	TRDY RELT
VEGI	DR3, DCR3
?	CAR-1
TL1	

(Aggarwal, 2003; Bertazza and Mocellin, 2008; Bodmer et al., 2002)

5.3 Receptores para el TNF α

El TNF α ejerce sus funciones por la interacción con el receptor con dominio de muerte TNFR1 y el receptor sin dominio de muerte TNFR2. Ambos receptores se expresan en todos los tipos celulares conocidos, excepto en los eritrocitos y en los linfocitos T sin estimular (Idriss and Naismith, 2000), pero no todas las células manifiestan la misma respuesta al estímulo. El número de receptores por célula está en un rango entre 200 y 10 000 pero aparentemente no hay una correlación entre el número de receptores presentes sobre una célula y la magnitud o dirección de la respuesta que induce el TNF α .

El TNFR1 humano consiste de 434 aminoácidos mientras que el TNFR2 comprende 439 residuos. Estos receptores muestran una similitud limitada en la región extracelular y no se parecen en las regiones intracelulares (Dembic et al., 1990), lo que sugiere que activan distintas vías de señalización. Ambas moléculas contienen varios puentes disulfuro esenciales para su actividad.

Tanto el TNFR1 como el TNFR2 tienen N-glicosilaciones, pero sólo el TNFR2 tiene O-glicosilaciones. Ninguno tiene una actividad intrínseca de cinasa; y se ha encontrado que el TNFR1 murino se fosforila en la treonina 236 y la serina 270 por una proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), mientras que el TNFR1 humano se fosforila en la tirosina 331. La secuencia primaria del TNFR1 sugiere la presencia de sitios consenso de fosforilación potencial para la PKC o la CK II (Van Linden et al., 2000).

Se ha sugerido que el TNFR1 es el receptor para el ligando soluble y el TNFR2 media la señalización del ligando unido a membrana (Grell et al., 1995). Mientras algunos reportes indican que el TNFR1 media la apoptosis y el TNFR2 media la proliferación, otros sugieren que los dos receptores transducen sus señales cooperativamente. La delección de cualquiera de los dos receptores bloquea la mayoría de las señales que son transducidas por el TNF α (Mukhopadhyay et al., 2001).

En línea con la multiplicidad de funciones que media el TNF α , los dominios intracelulares de sus receptores, especialmente el DD del TNFR1, tienen la capacidad de unir varias moléculas que participan en la transducción de las diferentes señales. Después de su auto asociación, los DD del trímero reclutan y

unen otras proteínas que contienen DD, las que sirven como adaptadores en las cascadas de señalización (Hsu et al., 1996b).

El complejo del ligando y el receptor se internaliza rápidamente vía vesículas cubiertas con clatrina y finalmente se degrada en los lisosomas secundarios. Este proceso parece estar mediado por la proteína cinasa C. Por lo tanto, los TNFRs no se reciclan a la superficie celular y se requiere de síntesis de novo para mantener la densidad de los receptores sobre la membrana plasmática.

En la mayoría de las células, la inactivación del TNFR1 parece ocurrir principalmente por internalización, mientras que el TNFR2 es removido de la superficie celular por “rasuramiento”. Las formas solubles de los receptores quizá actúan como inhibidores de las respuestas celulares que media el $\text{TNF}\alpha$ uniéndose y neutralizando a la citocina circulante (Bemelmans et al., 1996).

5.4 Transducción de la señal inducida por $\text{TNF}\alpha$

En 1975 el Dr. Lloyd Old, del Sloan-Kettering Memorial Cancer Center en Nueva York, reportó una actividad citotóxica producida por macrófagos que llamó TNF; esta actividad fue descrita por su habilidad para matar las células de fibrosarcoma murino L929 (Carswell et al., 1975).

El $\text{TNF}\alpha$ puede inducir la muerte tanto necrótica como apoptóticamente. La necrosis se caracteriza por el aumento del volumen celular, la destrucción de los organelos y la lisis celular. La apoptosis se lleva a cabo por un proceso bioquímico controlado que puede tener distintas características morfológicas entre las que se encuentran la contracción celular, la formación de cuerpos apoptóticos y frecuentemente la fragmentación internucleosomal del DNA.

Varios reportes indican que el $\text{TNF}\alpha$ media la mayoría de sus efectos por alteración del estado redox de la célula. Tanto los efectos de muerte como de sobrevivencia del $\text{TNF}\alpha$ se median a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Bubici et al., 2006; Ventura et al., 2004).

5.4.1 Señales de muerte inducidas por TNF α

Estudios recientes indican que después de la unión del TNF α , el trímero de TNFR1 preensamblado se trasloca a microdominios de membrana ricos en colesterol y esfingolípidos, que se conocen como amontonamientos lipídicos, en los cuales se asocia con las proteínas adaptadoras (Legler et al., 2003).

La unión del ligando trimérico al receptor también trimérico, desenmascara los DD del TNFR1 que se encuentran bloqueados por la proteína silenciadora de dominios de muerte (SODD). Cuando SODD se disocia del trímero de TNFR1 se pueden reclutar distintas proteínas con el DD. La primera proteína reclutada al TNFR1 es la proteína con DD asociada al TNFR1 (TRADD por TNFR1-associated death domain protein), que sirve como plataforma para reclutar al menos tres mediadores adicionales: la proteína 1 de interacción con el receptor (RIP1, por receptor-interacting protein), el factor 2 asociado al receptor de TNF (TRAF2, por TNF-receptor-associated factor 2) (Figura 2) y la proteína asociada al dominio de muerte de Fas (FADD, por Fas-associated death domain protein) (Hsu et al., 1996b; Hsu et al., 1996a).

Aunque la procaspasa 8 y la proteína FADD son requisitos para la apoptosis mediada por TNF α , no se reclutan al complejo de señalización que se une a la membrana y deben activarse en algún sitio en el interior de la célula (Harper et al., 2003).

Esta cascada de señalización no explica el papel de la ceramida, los ROS, las fosfolipasas, las proteasas de serina, las fosfatasa de tirosina y las cinasas que también se implican en la señalización del TNF α . La importancia del estrés oxidativo para la muerte que causa el TNF α queda clara a la luz de los experimentos con inhibidores de la cadena de transporte mitocondrial de electrones y con agentes que aumentan los niveles extracelulares de glutatión reducido (GSH). Los resultados indican que en ambos casos las células se protegen de la muerte inducida por TNF α (Satomi et al., 1988; Torti et al., 1988).

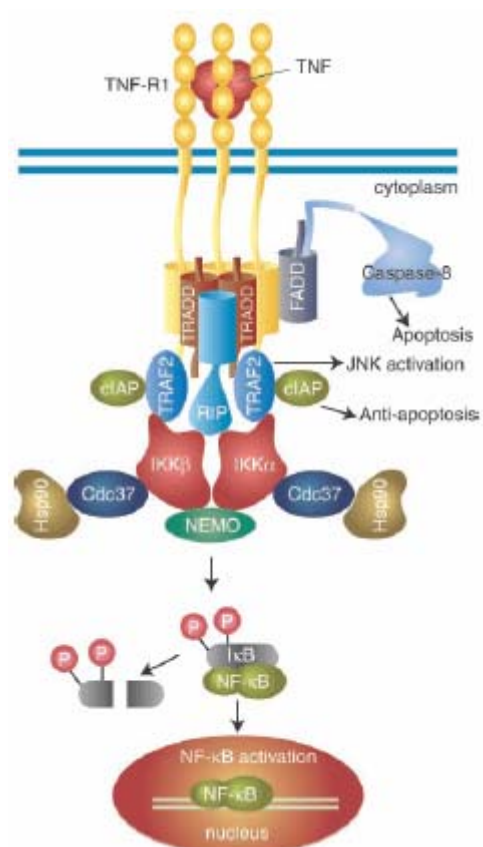


Figura 2. Vías de transducción de la señal del TNF α .

La unión de TNF α al receptor R1, resulta en la liberación de SODD y formación de un complejo que contiene a las proteínas adaptadoras TRADD, TRAF2, RIP, and FADD. Estos adaptadores reclutan a enzimas específicas de la vía (como caspasa 8 e IKK β) resultando en la activación de una cascada que conduce a muerte (tomada de Chen, G. y Goeddel, D. V., 2002).

5.4.2 Señales de supervivencia inducidas por TNF α

Las células de los organismos multicelulares, son forzadas frecuentemente a escoger entre vivir o morir. Existen varios ejemplos que ilustran claramente esta necesidad: las células T inmaduras que reconocen proteínas propias, son obligadas a morir a través de un proceso en el que la célula participa activamente en su propia muerte ("suicidio"). En contraste, las células del sistema inmune que poseen la capacidad de lidiar contra agentes patógenos durante una infección, son estimuladas para sobrevivir y proliferar hasta el momento en el cual la infección ha cedido, entonces resultan innecesarias y son inducidas a morir. En TNF α es capaz, como ya se mencionó antes, de activar tanto señales de muerte celular como señales de supervivencia. A continuación se revisarán algunos de los elementos que se han relacionado fuertemente con vías de supervivencia.

5.4.3 NF- κ B

El Factor Nuclear- κ B (NF- κ B) es un factor transcripcional ubicuo que juega un papel crucial en la expresión de varios genes blanco que regulan apoptosis, oncogenesis y progresión de cáncer, entre otras funciones de importancia (Ghosh et al., 1998). Numerosos reportes han demostrado que algunos tipos de células tumorales se vuelven resistentes a fármacos proapoptóticos a través de la activación constitutiva de NF- κ B (Kim et al., 2006). Adicionalmente, NF- κ B participa en el control de la proliferación, la angiogénesis y la metástasis (Braun et al., 2006; Coquelle et al., 2006). Sin embargo, la activación de NF- κ B es altamente compleja, ya que el punto de control sobre el que tendrá efecto y la decisión de la célula de vivir y proliferar o morir, dependerá de la señal inductora, su duración e intensidad y el tipo celular.

La actividad de unión al DNA del NF- κ B se induce rápidamente en todos los tipos celulares en respuesta a las citocinas proinflamatorias y por los productos colaterales de las infecciones microbianas y virales.

Los factores de transcripción diméricos que pertenecen a la familia Rel y que se regulan por su transporte desde el citoplasma al núcleo en respuesta al estímulo celular, se denominan colectivamente como factores NF- κ B.

Los mamíferos expresan cinco proteínas de la familia NF κ B/Rel que pertenecen a dos clases (Figura 3). El primer tipo incluye RelA, c-Rel y RelB, proteínas que son sintetizadas como productos maduros y no requieren procesamiento proteolítico. El segundo grupo se codifica por los genes *Nfkb1* y *Nfkb2*, cuyos productos son sintetizados primero como precursores grandes, p105 y p100 respectivamente, y requieren procesamiento proteolítico para producir las proteínas maduras p50 y p52.

El NF- κ B se regula primariamente por la fosforilación de sus proteínas inhibitoras, las I κ Bs, que lo retienen en el citoplasma de las células sin estimular. En respuesta al TNF α , las I κ Bs son fosforiladas por el complejo de cinasas de I κ B (IKK), principalmente por la subunidad catalítica IKK β (Li et al., 1999) que requiere de la subunidad reguladora IKK γ (también conocida como NEMO). Esta fosforilación resulta en la posterior ubiquitinación y degradación de los I κ B y en la translocación al núcleo del NF- κ B liberado. Una vez en el núcleo, la actividad transcripcional del

NF- κ B puede ser modulada a través de la fosforilación debida a varias cinasas que responden al TNF α (Jijon et al., 2004), como el subgrupo p38 de las cinasas activadas por mitógeno (MAPKs).

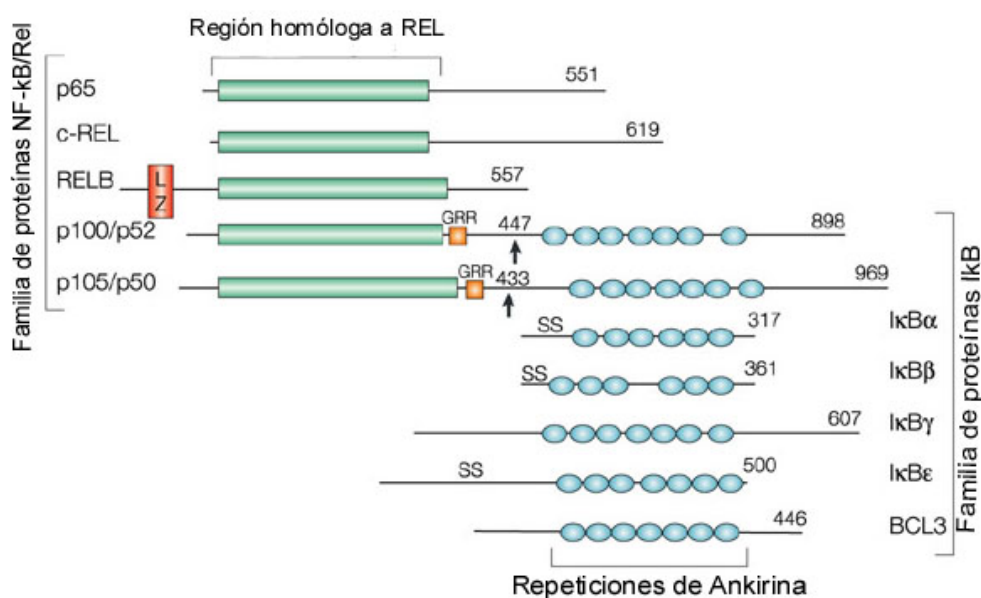


Figura 3. Proteínas NF- κ B e I κ B.

Todas las proteínas NF- κ B presentan un dominio homólogo llamado REL (RHD), el cual regula la dimerización y la unión al DNA. En este dominio también se localiza la señal de localización nuclear (NLS), la cual es reconocida por las proteínas I κ B. Todas las proteínas I κ B contienen 6-7 repeticiones de ankirina, las cuales regulan su unión con el RHD. I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ contienen un dominio regulatorio en el extremo amino en el cual se encuentran dos serinas conservadas (SS). La fosforilación en estos sitios marca a los I κ B para su degradación dependiente de ubiquitinización. Los extremos carboxilos de p105 y p100 son similares en secuencia, estructura y función a los I κ Bs, estas porciones previenen la entrada de estas proteínas al núcleo y son eliminadas por degradación dependiente de ubiquitinización. GRR: región rica en glicina; LZ: cierre de leucina. La flecha señala los residuos del extremo carboxilo de p50 y p52 (después del procesamiento de p105 y p100 respectivamente) (Karin et al., 2002).

Las proteínas NF- κ B/Rel comparten la región de homología Rel (RHD), que está compuesta por dos dominios similares a inmunoglobulina unidos por una región flexible, que media dimerización, unión a DNA, localización nuclear e interacción con miembros de la familia de las proteínas I κ B (las proteínas inhibitoras de las NF- κ B/Rel). La familia de I κ B incluye a I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ ,

Bcl-3 y los precursores del NF- κ B1 y NF- κ B2, p105 y p100 respectivamente y se caracteriza por seis o siete repeticiones de ankirina que median la unión al RHD y enmascaran la señal de localización nuclear (NLS) del NF- κ B (Karin and Lin, 2002). Las proteínas I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ también contienen un dominio regulador en el extremo amino que permite la degradación de estas proteínas dependiente de estímulo (Figura 3).

La investigación durante los últimos veinte años, ha revelado la existencia de al menos tres vías de activación de NF- κ B (Hayden and Ghosh, 2004; Viatour et al., 2005; Yamamoto and Gaynor, 2004) y que se describen a continuación:

Vía canónica. El dímero prototipo de NF- κ B formado por Rel A/p50 es activado después de la liberación de su inhibidor I κ B α a través de la acción del complejo cinasa de I κ B (IKK). El complejo IKK o signalosoma consiste de dos subunidades catalíticas, IKK α e IKK β , y una subunidad reguladora, IKK γ o NEMO. Además el complejo contiene una chaperona específica de cinasas que consiste de Cdc37 y Hsp90, que juegan un papel en transportar el complejo del citoplasma a la membrana. La activación del complejo resulta en la fosforilación, ubiquitinación y degradación de I κ B α , exponiendo las NLS de NF- κ B y permitiendo su acumulación en el núcleo (Figura 4). La evidencia indica que la regulación del IKK depende de su fosforilación (Delhase et al., 1999).

Vía alternativa. Esta vía se describió más recientemente, y depende de la activación de un complejo alternativo de IKK formado exclusivamente por homodímeros IKK α (Figura 4). Es decir, en este caso, IKK α funciona completamente independiente de IKK β y NEMO. Esta vía se activa predominantemente en células B por un subgrupo de los miembros de la familia de ligandos del TNF tales como BAFF, CD40 y LT β . Después de la activación del receptor, las proteínas adaptadoras de la familia de TRAF, permiten el reclutamiento de NIK (cinasa inductora de NF- κ B). Esta cinasa fosforila a IKK α , que a su vez fosforila a p100 y lo marca para ubiquitinación y proteólisis limitada de los dominios de ankirina en el extremo carboxilo terminal. Esto permite la liberación de la subunidad p52 que forma el heterodímero con Rel que promoverá la transcripción de un subgrupo específico de genes.

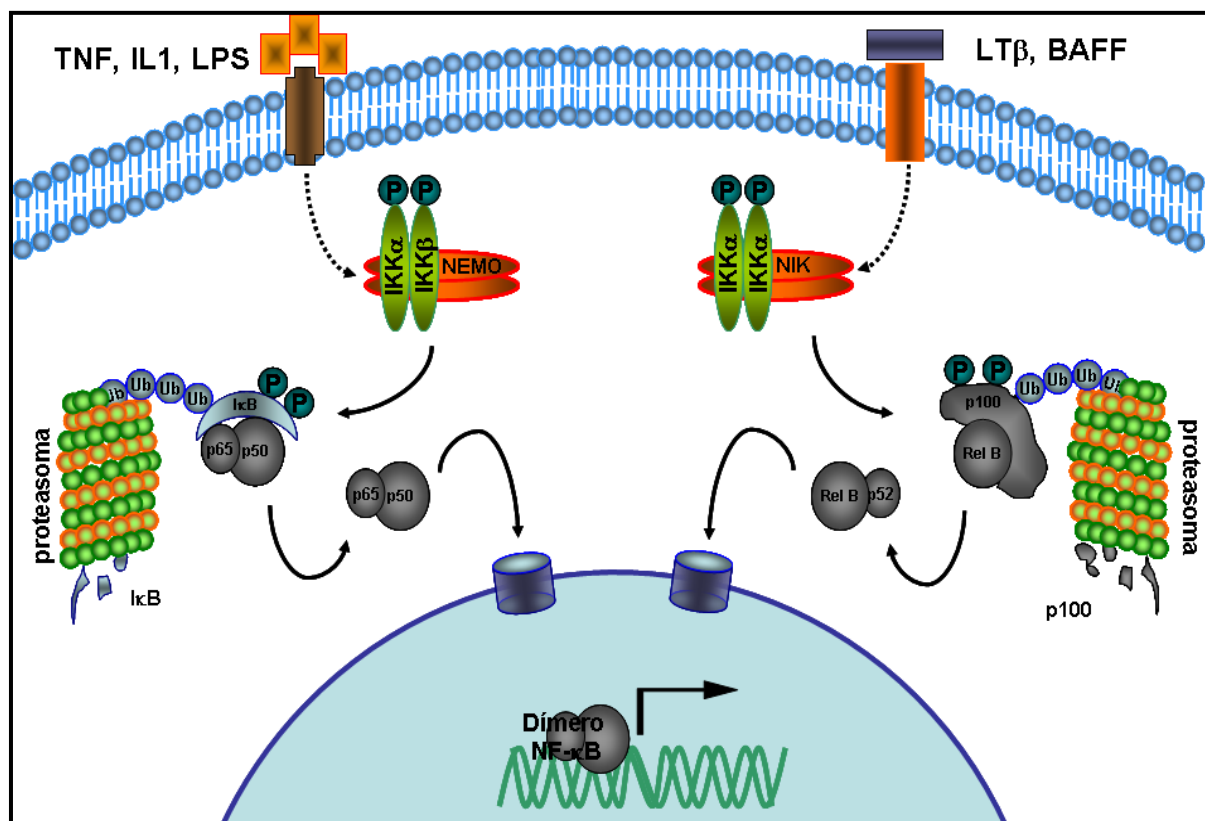


Figura 4. Las vías canónica y alternativa de NF-κB.

Izquierda: la vía clásica activada por $\text{TNF}\alpha$, IL1 o productos de bacterias o de origen viral, requiere la presencia de $\text{IKK}\beta$ y NEMO y conduce a la fosforilación de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, liberando al heterodímero p65/p50. Derecha: la vía alternativa es disparada por miembros de la familia de TNF, como $\text{LT}\beta$ o BAFF, e involucra a $\text{IKK}\alpha$ y NIK. La fosforilación y procesamiento de p100, genera un heterodímero funcional Rel/p52 (Janssens and Tschopp, 2006).

Vías atípicas. Se agrupan aquí colectivamente, a las vías que no caen en las categorías ya descritas. Existe controversia acerca de la clasificación en este grupo, pero originalmente, se incluyeron a todas las cascadas activadas por estímulos atípicos, como daño a ADN o estrés oxidativo, ya que todas inducen NF-κB lenta o débilmente, mientras que la luz ultravioleta activa NF-κB de manera independiente de IKK y los radicales de oxígeno probablemente requieren la fosforilación en citocina de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$.

NF- κ B y TNF α . Una vez que se ha activado NF- κ B por la vía clásica, y ya en el núcleo, los dímeros del NF- κ B se regulan principalmente a través de la fosforilación de las proteínas Rel, lo que se requiere para la inducción completa de los genes blanco del NF- κ B. Varias vías de señalización participan en este proceso, e inducen la activación de la cascada de la cinasa de 3 fosfatidil inositol (PI3K)→Akt (Madrid et al., 2000).

El I κ B α juega un papel importante en la terminación de la activación del NF- κ B, ya que la proteína I κ B α recién sintetizada entra al núcleo y se une al NF- κ B, lo que potencia su disociación del DNA y causa su reexportación al citoplasma, para lo cual se requiere de una secuencia de exportación nuclear (NES) presente en I κ B α .

La activación de NF- κ B por el TNF α causa la inducción de genes que participan en la supresión de la muerte. Esta activación se media a través del reclutamiento del TRAF2 aunque se desconoce cómo ocurre; por estudios en células que presentan una delección del gen del TRAF2 se sabe que esta mediación es dispensable y la molécula puede ser sustituida por TRAF5 (Tada et al., 2001).

Además del reclutamiento de TRAF2 mediado por TRADD, la ocupación del TNFR2 por el ligando resulta en el reclutamiento directo del TRAF2, que a su vez recluta al TRAF1. El TRAF2, como todos los TRAFs excepto TRAF1, comprende un dominio TRAF altamente conservado en el extremo carboxilo y un dominio amino terminal más variable que contiene un anillo de dedo y varios dedos de zinc. La sobreexpresión del TRAF2 es suficiente para activar las vías de señalización que llevan a la activación del NF- κ B en ausencia de estímulo extracelular. La activación del IKK requiere de los motivos anillo y dedo de zinc, y depende del agrupamiento del dominio de señalización amino terminal que estabiliza las interacciones del TRAF2 con proteínas de señalización que se encuentran más adelante en la cascada de señalización. El análisis estructural de TRAF2 reveló una autoasociación trimérica a través del dominio conservado en el extremo carboxilo. Se postula que el TRAF2 actúa como un adaptador que recluta al IKK al complejo de señalización del TNFR1 (Devin et al., 2001; Jackson-Bernitsas et al., 2007).

Por experimentos de delección del gen, se sabe que RIP1 es esencial para la activación del NF- κ B por el TNFR1. De sus tres dominios, solo el DD y la región intermedia parecen contribuir a la activación del factor de transcripción (Kelliher et

al., 1998). Sorpresivamente, la actividad de cinasa de RIP1 no se requiere para la activación de esta vía, pero es posible que otras proteínas RIP suplan la actividad de cinasa en la ausencia de RIP1. Al parecer RIP activa al complejo IKK asociado al complejo de señalización anclado en la membrana.

Entre los genes activados por el NF- κ B se incluyen los inhibidores de apoptosis (c-IAPs), caspasa 8, c-FLIP (proteína inhibidora de FLICE), A1, TRAF1 y TRAF2. Por ejemplo, c-FLIP contiene dos dominios efectores de muerte (DED por death effector domain) y un dominio similar al de caspasa catalíticamente inactiva (Kreuz et al., 2001); puede interactuar con FADD y con procaspasa 8 a través de interacciones homotípicas que median los DED, de modo la inhibición de la apoptosis podría ocurrir al interferir con la activación de la procaspasa 8. El NF- κ B puede inducir la expresión de un inhibidor de la JNK, lo que aumenta la posibilidad de que este inhibidor contribuya a la función antiapoptótica del NF- κ B (Sethi et al., 2008). El TRAF2 recluta las proteínas celulares inhibidoras de apoptosis 1 y 2 (c-IAP1 y c-IAP2), dos proteínas antiapoptóticas que también tienen actividad de ubiquitina proteína ligasa y que se describen en la sección 5.4.5.

5.4.4 Fosfatidil Inositol 3 Cinasa (PI3K)/Akt

PI3K

Las fosfatidilinositol-3-cinasas, son una clase de enzimas que fosforilan al fosfatidilinositol y sus derivados. El fosfatidilinositol juega un papel importante en la transducción de señales de diversas vías y es precursor de diversos mensajeros secundarios. Datos recientes, han demostrado que los estímulos extracelulares que inducen a las cinasas de la familia de PI3K y a los fosfolípidos producto de su actividad, y que son dependientes de la activación de un receptor membranal, conducen a cambios en las propiedades promotoras de la sobrevivencia celular, cambios de adhesión en citoesqueleto y motilidad, y a efectos mitogénicos (Figura 5).

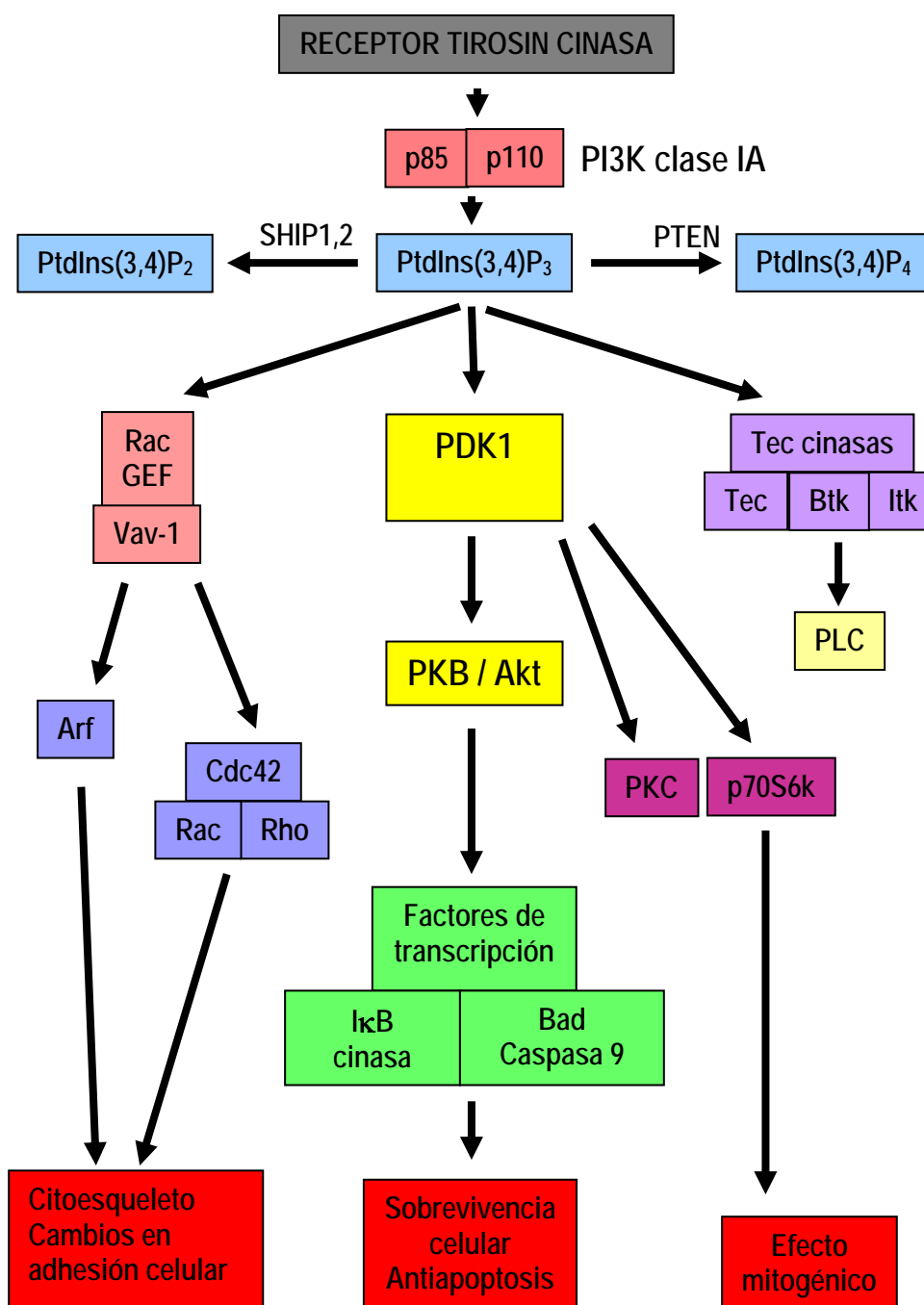





Figura 5. Respuestas involucradas en la activación de PI3K.






La activación comienza vía un receptor con actividad de cinasa de tirosina, se muestra una PI3K clase IA. p85: subunidad reguladora, p110: subunidad catalítica, GEF: factor intercambiador de nucleótidos de guanina, PDK1: cinasa 1 dependiente de 3'-fosfoinosítido, PKB/AKT: proteína cinasa B/proteína cinasa Akt, PKC: proteína cinasa C, PLC γ : fosfolipasa C gamma, SHIP: Src homology 2-containing inositol-5-phosphate, Tec cinasa: cinasa de tirosina Tec/BTK, vav-1: proteína adaptadora con múltiples dominios de interacción proteica, Bad: proteína proapoptótica, I κ B cinasa: cinasa del inhibidor de NF- κ B, Rac, Rho y Cdc42: proteínas G pequeñas, p70S6K: cinasa de la subunidad S6 del ribosoma. (Golden and Insogna, 2004).

Se ha reportado que la activación de la PI3K, puede ocurrir a través de varios receptores: a) Receptores con actividad intrínseca de cinasa de tirosina (insulin-like growth factor I receptor), b) Receptores acoplados a cinasa de tirosina de la familia de src (integrinas), c) Receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (receptor del ácido lisofosfatídico LP_{A1}/VZG-1) y d) Receptores de la familia de TNF α (Clark and Brugge, 1995; Segal and Greenberg, 1996; Weiner and Chun, 1999).

Una vez localizadas en la membrana citoplásmica, las PI3Ks catalizan la transferencia de un grupo fosfato del ATP a la posición D-3 del anillo de inositol de los fosfoinosítidos localizados en la membrana, produciendo además, fosfoinosítidos fosforilados en posición 3'. Estos productos funcionan como intermediarios reguladores en la señalización. Existen varias isoformas que difieren en su estructura modular, las características de las PI3Ks identificadas en mamíferos se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Clases de PI3K y características de las subunidades catalíticas y adaptadoras

Clase	Características estructurales de la subunidad catalítica	Subunidades		Regulación	Sustratos lipídicos	
		Catalítica	Adaptadora		<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
I		p110 α, β, δ	p85 α p85 β p85 γ	Tirosin cinasas & Ras	PtdIns PtdIns(4)P PtdIns(4,5)P ₂	PtdIns(4,5)P ₂
		p 110 γ	p101	Proteínas G heterotriméricas & Ras		
II		PI3K-C2 α, β, δ	?	Tirosin cinasas Proteínas G heterotriméricas	PtdIns PtdIns(4)P PtdIns(4,5)P ₂	?
III		Análogos de Vps34p	p150	Constitutiva ?	PtdIns	PtdIns

 Unión al adaptador
  Unión a Ras
  Dominio C2
  Dominio de PI3K
  Dominio central de cinasa

(Vanhaesebroeck and Waterfield, 1999).

Las PI3Ks se han categorizado en tres clases con base en su estructura, especificidad por sustrato y forma de regulación. A continuación se describen las características globales de cada clase.

Clase I. Estructura. Son proteínas heterodiméricas que contienen una subunidad catalítica p110-120 kDa, y un adaptador o subunidad reguladora, siendo la más común la p85. La subunidad adaptadora no tiene actividad enzimática. Las clases IA y IB se distinguen por el tipo de subunidad adaptadora (Tabla 3). Especificidad por sustrato. Estudios *in vitro* sugieren que no son muy selectivas con respecto a su sustrato, sin embargo se considera que *in vivo* el fosfatidil inositol bifosfato (PtdIns(4,5)P₂) es el sustrato fisiológico de esta clase, por lo cual el producto predominante es el fosfatidil inositol trifosfato (PtdIns(4,5,6)P₃). Además de su actividad de cinasa de fosfoinosítidos, los miembros de esta clase tienen actividad intrínseca de proteína cinasa sobre residuos de serina. Esta actividad de cinasa está restringida a las subunidades catalíticas o reguladoras, el resultado de esta fosforilación es una regulación negativa de la actividad de cinasa sobre fosfoinosítidos. Los miembros de esta clase son los que predominantemente se han relacionado con sobrevivencia, diferenciación, remodelación de actina y motilidad en diversos tipos celulares. Regulación. La regulación se lleva a cabo por dos vías que conducen a la conformación del dímero formado por las subunidades catalítica (p110) y reguladora (p85). En el primer mecanismo, las fosfatasas que desfosforilan a los fosfoinosítidos producidos por la actividad de esta enzima, atenúan la señalización mediada por PI3K. En el caso de la clase IA, la subunidad catalítica p110 interacciona constitutivamente con la subunidad reguladora p85 que se fosforila en serina 608 resultando en una disminución de su actividad. En el caso de la clase IB, se sabe que son activadas directamente por la subunidades $\beta\gamma$ de proteínas G, que se asocian a la subunidad reguladora p101. El papel de p101 en la activación de p110 γ permanece todavía bajo estudio. Existen varios inhibidores de la actividad de estas enzimas que se han empleado como herramientas en la caracterización de las vías en las que intervienen: i) las proteínas de la clase I, se inhiben irreversiblemente por el metabolito fúngico wortmanina, el cual se une covalentemente a la lisina 802 de la subunidad catalítica (p110), un residuo que se ha visto es esencial para su actividad, ii) el LY294002 es un inhibidor reversible de la enzima.

La actividad de estas enzimas se atenúa también por desfosforilación de sus productos por las fosfatasas PTEN (Phosphatase and tensin homolog delete from chromosome 10), y SHIP (Src homology 2-containing inositol-5-phosphate). PTEN

tiene actividad de fosfatasa de lípidos y de proteínas, por lo que limita la actividad de PI3K, mientras que SHIP funciona como regulador negativo.

Clase II. Estructura. Son proteínas grandes (170-210 kDa) que contienen un dominio de fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) y un dominio catalítico que se distingue por la presencia de un dominio C2 en el extremo carboxilo terminal (Tabla 3). Hasta ahora se desconoce la existencia de subunidades reguladoras asociadas a esta clase. Especificidad por sustrato. Su especificidad es más limitada que la de la clase I, fosforilando PtdIns y PtdIns(4)P, pero no PtdIns(4,5)P₂. Regulación. Los mecanismos exactos de regulación de esta familia no se conocen del todo, sin embargo, se sabe que también se inhibe por fármacos como la wortmanina.

Clase III. Estructura. Agrupa a proteínas que contienen una subunidad catalítica que comparte homología con PI3K de levadura (Vps34p). Los miembros de esta clase existen *in vivo* como dímeros constituidos por subunidades catalítica y adaptadora. El homólogo de humanos (PtdIns3K) se asocia con p150. Especificidad por sustrato. Su especificidad se restringe solo a PtdIns produciendo PtdIns(3)P por lo que se conocen como Fosfatidil inositol 3 cinasas (PtdIns3Ks). Estas enzimas se asocian a la proteína transferidora de fosfatidil inositol, lo cual estimula su actividad de cinasa de fosfoinosítidos. Regulación. Se asocian con p150, un homólogo de Vps15p que funciona como molécula adaptadora, las proteínas de esta clase aparentemente son constitutivamente activas, y juegan un papel importante en el tráfico de proteínas a través de membranas y en el tráfico vesicular.

Akt

Esta enzima, conocida también como proteína cinasa B (PKB), es una cinasa de serina/treonina que es sustrato de la PI3K (Figura 5) y que se ha asociado a la supresión de muerte y a la proliferación inducidas por diversos estímulos (Datta et al., 1997; Datta et al., 1999; Madrid et al., 2000). Esta proteína es un homólogo celular del oncogen transformante v-akt identificado en el retrovirus AKT8 (Bellacosa et al., 1991), y pertenece a la superfamilia de proteínas cinasas A/G/C (AGC), dependientes de AMPc que comparten homología estructural dentro de sus dominios catalíticos y tienen mecanismos similares de activación. En mamíferos se han identificado tres genes de Akt/PKB, denominados: Akt1, también llamado

PKB α /RAC-PK α , Akt2 también llamado PKB β /RAC-PK β y Akt3 también llamado RAC-PK γ .

Las tres isoformas de Akt contienen dominios conservados en su estructura: un dominio amino terminal con homología a la plekstrina (PH) que media las interacciones proteína/ proteína o lípidos/ proteína, un dominio central de cinasa de serina/treonina y un dominio regulador carboxilo terminal (Figura 6).

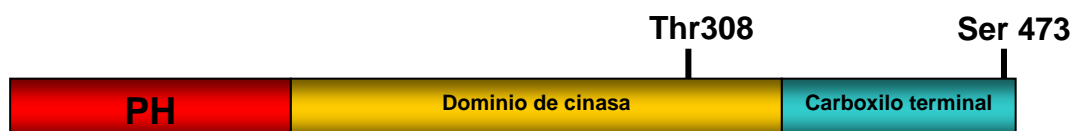


Figura 6. Estructura general de las proteínas cinasas Akt/PKB.

PH, dominio de plekstrina. Se muestran los residuos de aminoácidos importantes para la activación y regulación, modificado de (Song et al., 2005).

El dominio PH de aproximadamente 100 aminoácidos fue encontrado originalmente en plekstrina, el principal sustrato de fosforilación en plaquetas. Este dominio interactúa con productos de la degradación de lípidos de membrana generados por la PI3K tales como PtdIns(3, 4, 5)-trifosfato o con PtdIns(4, 5)-bifosfato. El dominio catalítico de Akt/PKB, localizado en la región central de la molécula contiene un residuo de treonina (T308 en el caso de Akt1) cuya fosforilación puede activar parcialmente a Akt (Alessi et al., 1996). Después del dominio de cinasa, se encuentra el extremo carboxilo de aproximadamente 40 aminoácidos, que contiene un dominio hidrofóbico característico de las cinasas de la familia AGC. La fosforilación del residuo de serina 473 aunada a la fosforilación en el residuo de treonina del dominio de cinasa produce la activación total de la enzima.

Akt se encuentra en diversos tejidos y se localiza en el citoplasma de células no estimuladas. La activación de PI-3K induce la traslocación de Akt a la membrana plasmática, en donde es fosforilada en dos sitios, uno correspondiente al loop de activación (treonina 308) y el otro en el extremo carboxilo (serina 473). Aparentemente, la fosforilación de la serina 473 por la PDK1 (cinasa dependiente de PI3K) (Chan et al., 1999) precede y favorece la fosforilación de la treonina 308 por la PDK2. Akt fosforilado puede traslocar de la membrana citoplásmica al núcleo

(Andjelkovic et al., 1997; Vanhaesebroeck and Alessi, 2000), en donde finalmente regresa a su estado inactivo a través de su desfosforilación. Se han identificado varias proteínas que interactúan con Akt y que podrían regular su actividad. La asociación de Akt con diferentes proteínas se traduce en respuestas de diverso significado biológico, algunas de las cuales se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Ejemplos de proteínas que interactúan con Akt y sus efectos biológicos

PROTEÍNA	INTERACCIÓN	EFECTO BIOLÓGICO
CTMP (proteína moduladora carboxilo-terminal)	Extremo C-terminal de Akt	Bloquea fosforilación y activación de Akt
Erk 1 / 2	Akt se une al complejo de Erk 1/2 Rsk y PDK1	Regula apoptosis
Trb3 (Tribbles)	Región central de cinasa de Akt	Bloquea activación de Akt en hepatocitos
K10 (Queratina 10)	Se une a Akt y lo secuestra uniéndolo al citoesqueleto	Inhibe proliferación celular
Hsp27 (proteína de choque térmico)	?	Inhibición de apoptosis en neutrófilos
Ft1	Incrementa la fosforilación de Akt, promueve interacción con PDK1	Modifica la susceptibilidad a apoptosis en linfocitos tratados con glucocorticoides

Las proteínas Akt establecen interacciones con otras proteínas induciendo diversos efectos biológicos (Song et al., 2005).

Se ha sugerido que las respuestas de supervivencia y proliferación mediados por Akt, podrían deberse básicamente a tres mecanismos: I) Regulación directa, II) Control Transcripcional y III) Regulación del metabolismo.

I) Regulación directa. Existe evidencia que demuestra que Akt promueve la supervivencia e inhibe la apoptosis a través de la interacción directa con algunos reguladores críticos de las vías que conducen a muerte celular.

Bad. Es un miembro proapoptótico de la familia Bcl-2, que se une a Bcl-2 o a Bcl-X_L e inhibe sus efectos antiapoptóticos promoviendo la liberación de citocromo c y en consecuencia la activación de caspasa-9. La fosforilación de Bad (Ser 136) mediada por Akt, permite mantener a Bad secuestrado en el citoplasma anulando sus efectos proapoptóticos (Datta et al., 1999).

Caspasa-9. Es la iniciadora y efectora de apoptosis (Donepudi and Grutter, 2002). Se ha reportado que la caspasa-9 humana es susceptible de ser fosforilada (Ser196) por Akt, resultando en atenuación de su actividad. Sin embargo, dado que el sitio de fosforilación no está conservado entre especies, es poco probable que se trate de una vía fisiológica de regulación.

SAPK. La vía de la proteína cinasa activada por estrés o SAPK, regula respuestas celulares a estrés o citocinas. Consiste de dos grupos de cinasas: JNK y MAPK p38 (Johnson and Lapadat, 2002). Akt es capaz de fosforilar a tres cinasas que se encuentran antes de la activación de SAPK: 1) Cinasa 1 reguladora de señales de apoptosis (ASK1) de la familia de las MKKK (Ser38), lo cual resulta en inhibición de apoptosis inducida por ASK1, 2) Cinasa 3 de linaje mixto (MLK3) (Ser674), lo cual resulta en promoción de la sobrevivencia celular, y 3) SEK1/MKKK4 (Ser78), resultando en inactivación de SEK1 e inhibición de apoptosis inducida por luz UV (Park et al., 2002).

II) Control transcripcional. Estudios recientes han demostrado que Akt es capaz de regular la sobrevivencia celular a través de factores transcripcionales que son responsables de la regulación de la expresión de genes pro y anti-apoptóticos, algunos de los cuales se describen a continuación.

FoxO Forkhead. La familia de factores de transcripción Forkhead (FoxO o FH) está integrada por cuatro isoformas (FoxO1, FoxO2, FoxO3 y FoxO4) que pueden ser fosforiladas por Akt directamente. FoxO fosforilado es retenido en el citoplasma y por tanto se encuentra inactivo transcripcionalmente. Las proteínas FoxO afectan negativamente la sobrevivencia celular a través de sus genes blanco, entre los que se encuentran algunos ligandos extracelulares como FasL, TRAIL y TRADD, y componentes intracelulares como Bim (mediador de muerte celular de interacción con Bcl-2), un miembro proapoptótico de la familia Bcl-2 (Burgering and Medema, 2003).

NF-κB. Se ha demostrado que Akt puede regular la actividad de IKK, tanto de manera directa como indirecta. Esto conduce a la activación y traslocación de NF-κB resultando en la transcripción de genes promotores de la supervivencia celular tales como Bcl-X_L, inhibidores de caspasas y c-myc (Barkett and Gilmore, 1999).

CREB. La proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc (CREB), es un factor de transcripción fosforilable por Akt (Ser133). La fosforilación resulta en el incremento de la actividad transcripcional de CREB y aumento de la afinidad hacia su co-activador CRB. Se ha demostrado que CREB media la expresión inducida por Akt, de algunos genes antipoptóticos como Bcl-2 (Wang et al., 1999).

YAP. La proteína asociada a Yes, se ha identificado recientemente como sustrato de Akt, que es capaz de fosforilarlo (Ser127) de manera dependiente de PI3K. YAP fosforilado actúa como un supresor de apoptosis mediada por la actividad transcripcional de p73 (Basu et al., 2003).

Mdm2. “Murine double minute” 2 es un oncogen inducido por p53, que a su vez es regulador de muerte celular en respuesta a estrés, especialmente aquel que involucra daño al DNA. Se ha reportado que Akt se une a Mdm2 y la fosforila en dos residuos (Ser166 y 186), resultando en la inducción de su importación al núcleo. Es posible que Akt promueva la activación y degradación de p53, reduciendo así la respuesta transcripcional proapoptótica inducida por p53.

III) Regulación del metabolismo. Una de las principales funciones de Akt es la regulación del metabolismo. Cuando en el organismo se encuentran altos niveles de insulina, la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3) se inhibe debido a fosforilación por Akt, lo cual resulta en la síntesis de glucógeno a partir de glucosa (Cross et al., 1995). La vía PI3K/Akt también juega un papel central en la fusión de las vesículas que contienen al transportador Glut4 dependiente de insulina (Gonzalez and McGraw, 2006). Se ha demostrado que la inhibición de GSK3 protege contra apoptosis, pero aun no se comprenden completamente las bases moleculares de tal efecto. Se ha propuesto que la privación de factores de crecimiento conduce a la incapacidad de las células para utilizar nutrientes del medio, resultando en la depleción de ATP y metabolitos derivados de glucosa

dentro de la célula. La activación de Akt permite a las células continuar importando glucosa y aminoácidos, y esto se ha asociado a la inhibición de la activación de Bax y subsecuente inducción de apoptosis.

5.4.5 Las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs)

La familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) comprende un grupo de proteínas que se relacionan estructuralmente y se caracterizan por la presencia de una a tres copias del motivo repetición de IAP de baculovirus (BIR) y muchas tienen también un dominio de anillo de dedo en su extremo carboxilo. Además de su habilidad para suprimir la muerte celular, se involucran en un número cada vez mayor de funciones celulares aparentemente no relacionadas con este proceso (Li et al., 1998).

Las IAPs se identificaron originalmente en los baculovirus, donde proveen un mecanismo que potencia la propagación viral a través de la inhibición de la apoptosis en las células de insecto (Crook et al., 1993).

Las c-IAPs son las proteínas antiapoptóticas mejor estudiadas inducidas por el NF- κ B, estas proteínas se unen e inhiben las caspasas efectoras, como la caspasa 3 y la caspasa 7 (Roy et al., 1997), y también previenen la activación de las procaspasas 6 y 9 (Deveraux et al., 1998). La participación de las c-IAPs en la actividad antiapoptótica del NF- κ B se sugiere por el hallazgo de que la inducción de c-IAP2 por el TNF α se bloquea completamente en células que expresan de forma estable una forma de I κ B α resistente a la degradación (Chu et al., 1997). Además, se encuentran dos sitios κ B funcionales en el promotor de *clap2*. La expresión de c-IAP1 también parece ser dependiente del NF- κ B y la inducción de c-IAP1 y c-IAP2 por el NF- κ B, junto con los TRAF1 y TRAF2, suprimen la muerte que media el TNF α a través de la inhibición de la caspasa 8 (Wang et al., 1998). Otra c-IAP que regula el NF- κ B es la IAP ligada al cromosoma X (XIAP). XIAP inhibe a las caspasas 3 y 7 a través de su segunda repetición baculoviral de IAP (BIR2) (Takahashi et al., 1998) y el ligador del extremo amino, y previene la activación de la procaspasa 9 a través de una región que contiene el tercer dominio BIR (BIR3). Los análisis estructurales mostraron que el ligador del extremo amino bloquea directamente la hendidura

catalítica de las caspasas 3 y 7, mientras que la región BIR2 facilita la unión a las caspasas.

Las proteínas c-IAP1 y c-IAP2 se identificaron inicialmente en un complejo con el TNFR2. La asociación indirecta de las IAPs con este receptor es el resultado de una interacción directa entre las IAPs y los TRAFs 1 y 2 que involucra los dominios BIR y TRAF de las proteínas respectivas.

Tanto c-IAP1 como c-IAP2 son proteínas que se transportan al núcleo y cuya localización subcelular se media por la vía de exportación nuclear dependiente de CRM1. Las IAPs se regulan negativamente por las proteínas que unen IAP, como la proteína de mamífero DIABLO/Smac (Du et al., 2000;Verhagen et al., 2000).

5.5 Los glucocortoides y sus receptores

Una característica importante de la respuesta inmune es el incremento en la síntesis de citocinas que activan el eje hipotalámico-pituitario-adrenal, causando una elevación de los glucocorticoides sistémicos (Besedovsky et al., 1986). Los glucocorticoides son hormonas esteroides que se sintetizan a partir del colesterol y que pertenecen a una familia en la que también de encuentran las hormonas sexuales y otras (Tabla 5).

Tabla 5. Hormonas esteroides y ejemplos

HORMONA	EJEMPLO	LUGAR DE SINTESIS
Andrógenos	Testosterona	Testículos
Estrógenos	Estradiol	Ovarios
Progestágenos	Progesterona	Ovarios
Glucocorticoides	Cortisol Hidrocortisona	Corteza suprarrenal
Mineralocorticoides	Aldosterona	Corteza suprarrenal

Los glucocorticoides son hormonas esteroides producidas y liberadas a la circulación sanguínea por células de la capa fasciculada de la glándula adrenal, que están bajo el control del sistema hipotálamo-pituitaria CRH-ACTH (Hormona Liberadora de Corticotropina-Hormona Adrenocorticotrópica) y participan en la

regulación del sistema inmune, del sistema nervioso central y del metabolismo. Estas hormonas también son sintetizadas localmente por el timo, en donde tienen efecto sobre la maduración de timocitos, y por las glándulas sexuales (ovarios y testículos) (Vacchio et al., 1994).

5.5.1 Respuestas fisiológicas a la activación de los receptores de glucocorticoides

Los principales glucocorticoides endógenos son el cortisol y la corticosterona, que son producidos por muchas especies de mamíferos. Los glucocorticoides afectan la actividad de casi todas las células del cuerpo, y modulan la expresión de aproximadamente el 10% de los genes. Son esenciales para la vida, pero también se asocian a la patogénesis de diversas enfermedades caracterizadas por su aumento o disminución, entre las que se encuentran el Síndrome de Cushing (aumento), la enfermedad de Addison (disminución) y el síndrome adrenogenital (disminución). Las alteraciones en la secreción y funcionalidad de glucocorticoides, se han asociado también a padecimientos comunes como hipertensión, resistencia a la insulina, obesidad, diabetes tipo II y disfunciones reproductivas (Gold et al., 2002; Seckl, 2004)

Dentro de sus efectos fisiológicos, los glucocorticoides inhiben la secreción de citocinas y sus efectos pleiotrópicos actuando como inmunosupresores y anti-inflamatorios. Por tanto, las citocinas y los glucocorticoides actúan como dos mecanismos antagónicos sobre una gran variedad de tipos celulares del sistema inmune como timocitos, células B maduras, células Th1 y Th2, macrófagos, y en células de otros linajes como fibroblastos, neuronas y células de la pituitaria. Esto explica por qué, los efectos de los glucocorticoides son esenciales para mantener la homeostasis y preparar al organismo para responder a estímulos de estrés físico y emocional (Sapolsky et al., 2000).

5.5.2 Receptores de glucocorticoides

Los glucocorticoides manifiestan sus efectos principalmente a través de receptores intracelulares que pertenecen a la gran familia de receptores nucleares y que regulan la transcripción de sus genes blanco. Esta familia incluye a los receptores para glucocorticoides, mineralocorticoides, estrógenos, progesterona, andrógenos,

vitamina D, ácido retinoico (Robinson-Rechavi et al., 2001) y el recientemente descrito receptor activado por peroxisoma proliferador o PPR (Wolf, 2003). Aunque solamente se ha identificado un gen, existen varias isoformas del receptor como resultado de splicing alternativo y del uso de múltiples promotores (Yudt and Cidlowski, 2002). GR α es la principal isoforma, de la cual existen a su vez isoformas denominadas GR α -A a la D (A, B, C1, C2, C3, D1 Y D3) (Lu and Cidlowski, 2005).

Los miembros de la familia constan de tres dominios (Figura 7): 1) Un dominio altamente conservado de transactivación en la región amino Terminal, 2) Una región central de unión a ADN que contiene dos dedos de zinc involucrados en la dimerización del receptor y 3) Un dominio de unión a ligando (LBD) en la región carboxilo terminal (Giguere et al., 1986). El LBD también juega un importante papel en la traslocación nuclear, unión de chaperonas, dimerización del receptor y coregulación a través del dominio de transactivación dependiente de ligando (AF-2). El dominio de transactivación AF-1 es independiente de ligando. Estos receptores son susceptibles de sufrir modificaciones post-transcripcionales como fosforilación y sumoilación, las cuales reeditúan en la modificación de su activación.

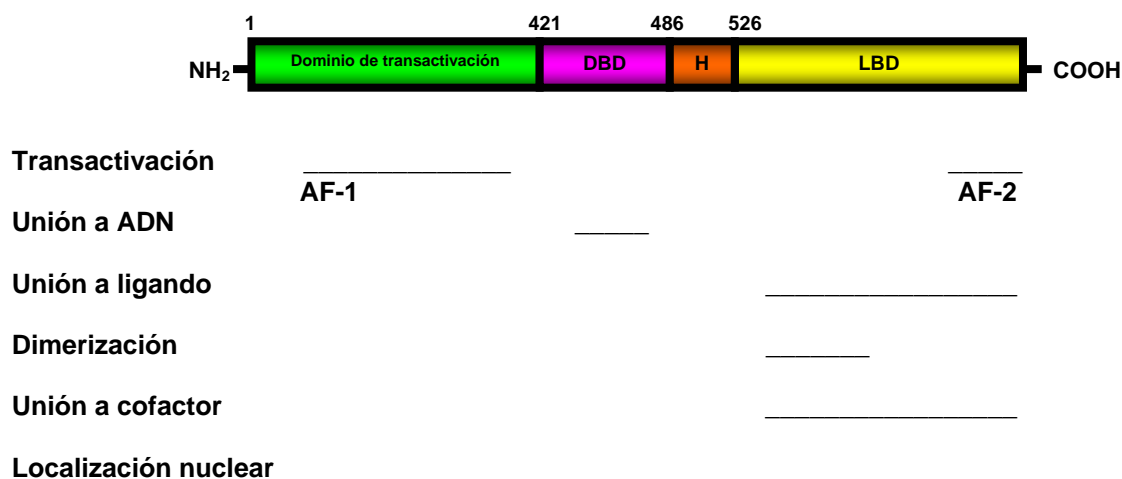


Figura 7. Estructura funcional del receptor humano de glucocorticoides (hGR).

El amino terminal (NH₂) representa la función 1 de activación transcripcional constitutiva (AF1), mientras que el carboxilo terminal (COOH) contiene el dominio de unión a ligando (LBD) y una función 2 de activación dependiente de ligando (AF2). Los dominios de unión a ADN (DBD) altamente conservados se encuentran en la región central de la proteína. Además, los dominios involucrados en la localización nuclear, dimerización del receptor y unión al cofactor, se encuentran localizados principalmente en el motivo de unión a ligando en el extremo carboxilo. H, región bisagra. (Zhou and Cidlowski, 2005)

5.5.3 Efectos nucleares de los receptores de glucocorticoides

El modo clásico de acción de los glucocorticoides ocurre a través de la regulación directa de la transcripción. En ausencia del ligando, el receptor reside principalmente en el citoplasma de las células, integrado en un gran complejo multiproteico en el que también se encuentran varias proteínas como hsp90, hsp70, inmunofilinas, FKBP, Cyp-40, p23 y algunas otras (Pratt and Toft, 1997). Después de la unión de la hormona, el receptor sufre cambios conformacionales que determinan la disociación de las chaperonas citoplásmicas y exponen la señal de localización nuclear en el receptor. Con la nueva conformación, el ligando unido al receptor, trasloca al núcleo, en donde los homodímeros del RG reconocen e interactúan con elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs) localizados en las regiones reguladoras de los genes blanco. El receptor unido a ADN, puede entonces interactuar directa o indirectamente con componentes de la maquinaria de transcripción, conduciendo a un aumento o represión de la expresión génica, dependiendo de la secuencia GRE y del promotor (Figura 8). Además, la unión del RG a las secuencias GRE, resulta en un cambio conformacional que promueve el reclutamiento de moléculas co-activadoras y co-represoras en el complejo RG-DNA, que modulan el grado de relajamiento o compactación de la cromatina. La expresión de estos moduladores de la transcripción es tejido y linaje celular específico, por lo que la activación de RG en un tipo celular puede tener un efecto positivo sobre la actividad transcripcional, al interactuar con un co-activador expresado localmente. Por el contrario, en una célula que expresa un co-represor, el mismo estímulo puede tener un efecto negativo sobre la actividad transcripcional.

Los co-represores y co-activadores median el reclutamiento de complejos de remodelación de la cromatina y de acetilasas y desacetilasas de histonas que en su conjunto regulan el estado de compactación de la cromatina. Estos cambios determinan la accesibilidad de los TAFs (Factores de la transcripción basal), la RNA pol II y de los factores de transcripción inducibles al promotor de sus genes blanco (McKenna et al., 1999b; McKenna et al., 1999a).

5.5.4 Interacciones con factores de transcripción

Además del efecto ya mencionado en la sección anterior, los RG tienen la capacidad de acoplarse a factores transcripcionales que modulan positiva o negativamente la actividad transcripcional. Las interacciones funcionales entre citocinas y glucocorticoides, requieren la presencia en el núcleo del receptor de glucocorticoides activado (RG) y factores de transcripción que controlan la síntesis y acción de citocinas. La interacción entre el receptor y el factor transcripcional involucrado, así como la inducción o represión de la transcripción, dependerán estrictamente del tipo celular en el cual ocurre. Entre los factores transcripcionales con los cuales el RG interactúa se encuentran: NF- κ B, AP-1, Proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP y el Factor Nuclear de células T activadas (Barnes and Adcock, 2003; Reichardt et al., 1998; Wintermantel et al., 2005). Muchos de los efectos anti-inflamatorios de los glucocorticoides, parecen ser el resultado de la interacción proteína-proteína entre el RG y los factores transcripcionales, principalmente NF- κ B y AP-1, mismos que son activados en respuesta a citocinas proinflamatorias, bacterias y agentes virales. Los glucocorticoides pueden atenuar el efecto de la maquinaria proinflamatoria, reprimiendo la actividad transcripcional de NF- κ B o de AP-1. Se ha postulado que el RG también interactúa con factores transcripcionales en el citoplasma y el núcleo. Curiosamente, el efecto represor del receptor en la regulación de NF- κ B, parece ser mutuo, ya que NF- κ B, también regula negativamente la transcripción mediada por el RG (McKay and Cidlowski, 1998). Sin embargo, el mecanismo que explica este antagonismo aun se desconoce.

5.5.5 Señalización citoplásmica

Aunque los efectos de los glucocorticoides son determinados principalmente por cambios en la transcripción (genómicos o transcripcionales), se ha demostrado que también ocurren algunos otros que solamente se podrían explicar por efectos de los glucocorticoides a nivel no genómico (no transcripcional) (Wehling, 1997; Wehling and Losel, 2006), y que involucran la activación de una cascada de cinasas a través de RG intracelulares. Una de las evidencias que apoyan esta teoría, es el hecho de que las respuestas no genómicas, no se ven afectadas por la presencia de

inhibidores de la transcripción y traducción de proteínas (actinomicina D y cicloheximida) (Groner et al., 1983).

De acuerdo a la clasificación de Mannheim (Falkenstein et al., 2000a), las respuestas genómicas se asocian a apoptosis, mientras que, las respuestas no genómicas se asocian a fenómenos de sobrevivencia e inhibición de la muerte celular. Un ejemplo de ello, es la protección de los tejidos observada en el infarto a miocardio a través de la activación de la sintasa de óxido nítrico (eNOS) mediada por la vía de PI3K/Akt (Hafezi-Moghadam et al., 2002; Limbourg et al., 2002). Así, este nivel de acción de los RG, implica la activación o inactivación de varios segundos mensajeros en respuestas que tienen lugar a tiempos cortos (segundos a minutos), a diferencia de lo observado en los efectos genómicos (Figura 8). Sin embargo, es importante no perder de vista, que este concepto no excluye la posibilidad de que ocurra una modulación transcripcional indirecta y secundaria a la vía de señalización primaria activada a tiempos cortos.

Entre los mediadores identificados que se modulan por glucocorticoides, se encuentra la proteína Akt (Hafezi-Moghadam et al., 2002; Langdown et al., 2001; Limbourg and Liao, 2003; Simoncini et al., 2000). Esta proteína, como ya se mencionó antes, es una cinasa de treoninas y serinas que juega un papel importante como regulador de la progresión del ciclo celular y mediador de la sobrevivencia celular observada asociada a la PI3K. La actividad de PI3K, es susceptible de ser bloqueada por inhibidores como la wortmanina, el LY2940002 y el RU486, pero no lo es por inhibidores de la transcripción (Hafezi-Moghadam et al., 2002; Limbourg et al., 2002). El mecanismo a través del cual el RG activa a la PI3K no se conoce del todo, pero aparentemente requiere de la asociación del RG con la subunidad p85 α de la PI3K (Limbourg et al., 2002). Un modelo para explicar este mecanismo se muestra en la Figura 8.

Por otra parte, se sabe que el RG, es capaz de afectar la activación de algunos factores de transcripción como NF- κ B. En este caso, el efecto puede ocurrir básicamente a dos niveles: uno induciendo la síntesis de I κ B (Auphan et al., 1995), y otro a través de un efecto represor por interacción proteína-proteína entre el RG y la región unidora de DNA de las subunidades p50 y p65 de NF- κ B (Widen et al., 2003) en el citoplasma (Figura 8).

Es importante considerar que el efecto final y la activación o inactivación de las cascadas de señalización involucradas en respuesta a los glucocorticoides, dependerá en gran medida del tipo celular del que se trate.

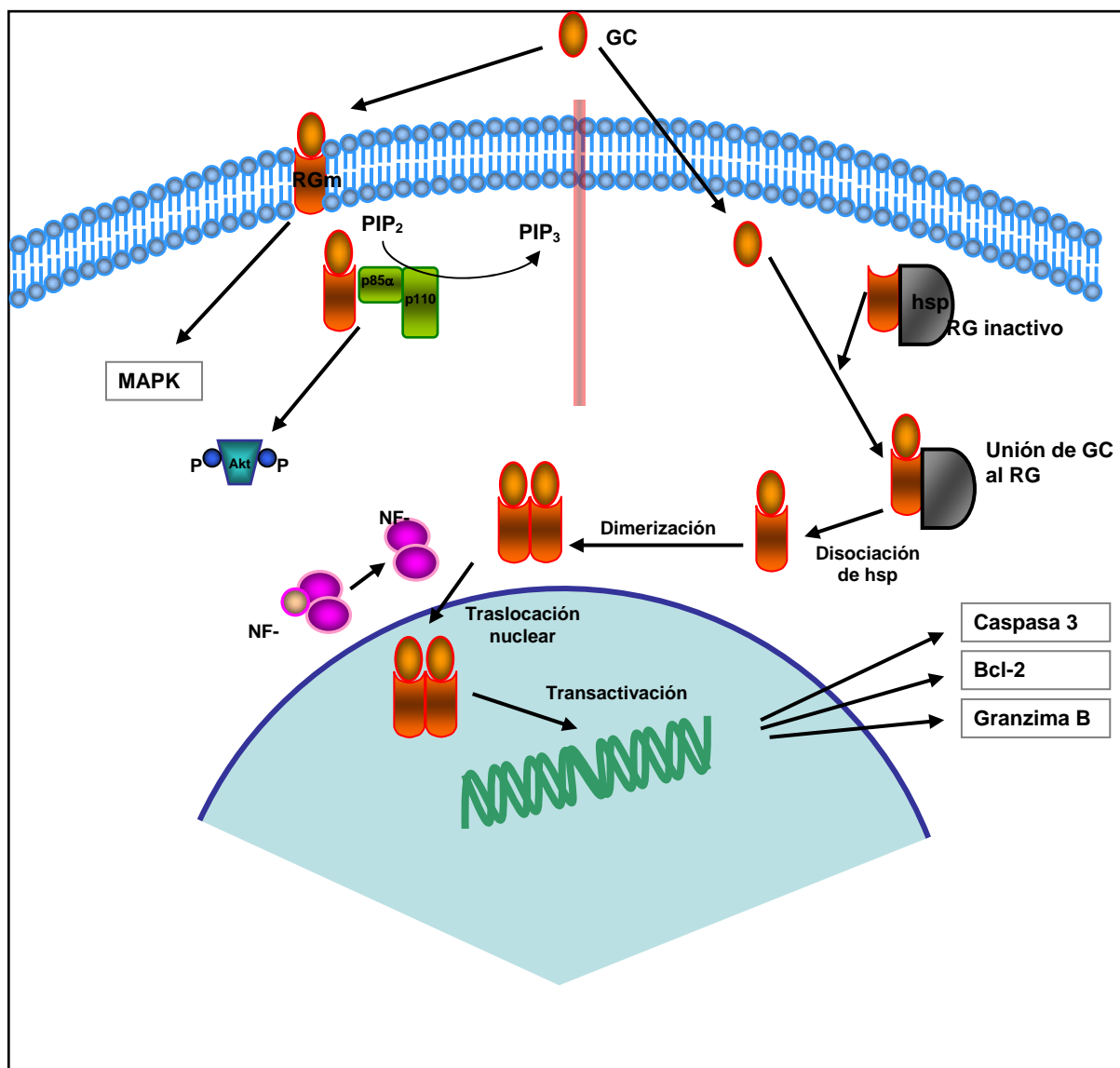


Figura 8. Señalización inducida por el receptor de hormonas esteroides.

Del lado izquierdo se muestran las respuestas no genómicas que ocurren en tiempos cortos (menores de 10 minutos) y que se asocian a supervivencia e inhibición de la muerte celular. Del lado derecho se muestran las respuestas genómicas que se asocian a apoptosis y que requieren de tiempos mayores para ocurrir (más de 10 minutos). Se muestran también las posibles interacciones con NF-κB. GC, glucocorticoide; RG, receptor de glucocorticoides; RG, receptor de membrana de glucocorticoides; hsp, proteína de choque térmico.

5.5.6 Los glucocorticoides inhiben la muerte celular inducida por $\text{TNF}\alpha$

Los glucocorticoides como la dexametasona, han sido de gran valor en el tratamiento de diversos desórdenes inflamatorios tales como las enfermedades autoinmunes, la artritis reumatoide y el asma. También han sido usados para la inducción terapéutica de muerte celular apoptótica en células linfoides malignas (Kofler, 2000). En contraste, la dexametsona tiene un fuerte efecto antiapoptótico en células de carcinoma, previene la reducción de los tumores sometidos al tratamiento y la apoptosis de las células tumorales. Este fenómeno podría explicarse por la inhibición de moléculas clave en la señalización de la muerte celular, tales como las caspasas (Herr and Debatin, 2001; Herr et al., 2003). Adicionalmente, existen evidencias que indican que los glucocorticoides también son capaces de inhibir el efecto citotóxico inducido por el $\text{TNF}\alpha$ en diversos tipos celulares (Kull, Jr., 1988; Messmer et al., 1999; Messmer et al., 2000; Weller et al., 1997). El efecto antiapoptótico de la dexametasona es regulado por varios grupos de genes, de los cuales los mejor caracterizados son los miembros de la familia de Bcl-2. Se ha demostrado que la dexametasona suprime la expresión de Bcl-x_S y Bak y aumenta la expresión de Bcl-x_L (Messmer et al., 2000; Sakamoto et al., 1995). Sin embargo, el mecanismo a través del cual la dexametasona promueve la inhibición de la muerte inducida por $\text{TNF}\alpha$ no se conoce completamente.

5.6 Muerte celular y ciclo, $\text{TNF}\alpha$ y dexametasona

Dado que la apoptosis es una vía que conduce a resultados opuestos a la mitosis, es importante considerar su relación con el ciclo celular. El ciclo celular está integrado por cuatro fases: mitosis, fase de control celular G₁, síntesis de ADN y fase de control G₂. Las células son susceptibles a la muerte celular durante el tercio final de G₁, lo cual impide que una célula dañada ingrese a la fase de síntesis. De este modo es posible evitar que las mutaciones se reproduzcan durante la duplicación del DNA (Sherr, 1996). A lo largo del ciclo celular se requieren complejos proteicos, formados por subunidades llamadas ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), sintetizadas por genes específicos. La cantidad de ciclinas varía de acuerdo al momento del ciclo en el cual se encuentre la célula, y su síntesis es continua debido a la inestabilidad de los complejos. Además, la

progresión del ciclo celular depende en gran medida de que se logren niveles adecuados de las ciclinas D, E, B y A.

En el paso de la fase G_1 a la de síntesis actúa la ciclina D asociada a las CDK 2, 4 y 6. En la segunda mitad del G_1 aumenta la presencia de ciclina E con la CDK2. En la fase de síntesis actúa la ciclina A con CDK 2 y en la fase G_2 , la ciclina B con CDK 2.

En la fase G_0 es en la cual el ciclo celular puede detenerse y por lo tanto permitir un período en el cual la célula es capaz de reparar errores en el DNA; los errores no reparados conducirán a la muerte de la célula.

Ambos procesos (ciclo celular y muerte), están involucrados de manera simultánea durante las respuestas al $TNF\alpha$ (Warzocha and Salles, 1998). Las células que se encuentran arrestadas no son susceptibles a la muerte celular y los efectos inhibitorios del crecimiento en respuesta a esta citocina en células normales y tumorales, se han asociado al arresto en la fase G_1 . Además, se ha observado disminución de CDKs e inhibición de la expresión de ciclinas A y B (Belizario et al., 1999; Jeoung et al., 1995), así como un aumento concomitante de la proteína supresora de tumores p53 y de la proteína p21 inhibidora de CDK (Yin et al., 1995).

Por otra parte, existen evidencias que indican que los glucocorticoides inducen activación de p53 y de p21, y promueven arresto en la fase G_1 del ciclo celular en diversos tipos celulares (Sundberg et al., 2006; Urban et al., 2003), al igual que modificaciones en el contenido de ciclinas a lo largo del ciclo celular. Estos antecedentes sugieren que la inhibición de la muerte celular promovida por dexametasona, podría deberse a un arresto en el ciclo celular, ya que, como se mencionó antes, las células que se encuentran detenidas en el ciclo, son insensibles a la muerte celular.

6. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

El $\text{TNF}\alpha$ es una citocina capaz de inducir activación, sobrevivencia o muerte celular a través de los receptores específicos TNFR1 y a la fecha se desconocen los mecanismos moleculares que conducen a una u otra respuesta. En el caso de muerte, se activan los zimógenos de las caspasas 8 y 10 (Gupta, 2002a) y otras moléculas relacionadas con el efecto citotóxico (Gupta, 2002b). En la respuesta de activación y de sobrevivencia se requiere de la activación del sistema $\text{NF-}\kappa\text{B}$. La visión actual sobre esta dualidad sugiere que el balance final entre el sistema de caspasas y el de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ determina el destino de las células ante el $\text{TNF}\alpha$.

Entre las principales vías de sobrevivencia que se han descrito se encuentran las reguladas por $\text{NF-}\kappa\text{B}$ y por PI3K/Akt . $\text{NF-}\kappa\text{B}$ promueve la transcripción de diversas proteínas entre las que se encuentran algunos factores de sobrevivencia como las proteínas antiapoptóticas c-IAP1 , c-IAP2 y XIAP (Karin and Delhase, 2000; Wang et al., 1998). Se considera que las deficiencias en la activación de este factor conducen a un aumento en la susceptibilidad al $\text{TNF}\alpha$ (Beg and Baltimore, 1996; Li et al., 1999; Van Antwerp et al., 1996; Wang et al., 1996).

Por otro lado, la activación del sistema PI3K/Akt tiene un efecto antiapoptótico atribuido a la fosforilación mediada por Akt de proteínas proapoptóticas como Bad y la caspasa 9 que en su estado fosforilado son inactivas (Datta et al., 1997; Sastry et al., 2006). Además, PI3K/Akt se encuentran antes de la activación de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ en la cascada de señalización, por lo que la activación de Akt por $\text{TNF}\alpha$, lo ubica como un posible elemento importante en la sobrevivencia celular dependiente $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (Ozes et al., 1999).

La importancia de la relación entre la activación de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ por PI3K/Akt y la sobrevivencia se apoya en el hecho de que la sobreexpresión de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ y la expresión de PI3K o Akt constitutivamente activas, son capaces de suprimir la apoptosis dependiente de $\text{TNF}\alpha$ en varios tipos celulares (Burow et al., 2000).

Algunos grupos han demostrado que es posible interferir con el efecto citotóxico del $\text{TNF}\alpha$ a través de la sobreexpresión de moléculas antiapoptóticas como Bcl2, sin embargo, esto solamente retrasa temporalmente la muerte y no confiere una suspensión del proceso (Sun et al., 2001). En contraposición, los

glucocorticoides sintéticos como la dexametasona, confieren una protección completa contra la citotoxicidad del $\text{TNF}\alpha$ (Bailly-Maitre et al., 2001; Gorman et al., 2000; Messmer et al., 2000). Como ya se describió, los efectos de la dexametasona ocurren tanto a nivel nuclear a través de la formación de un complejo con el receptor citoplásmico de glucocorticoides que modula la actividad transcripcional, como a nivel citoplásmico promoviendo la activación de PI3K/Akt. A la fecha no se conoce la contribución relativa de las vías citoplásmica y nuclear activadas por la dexametasona en su efecto protector contra el $\text{TNF}\alpha$.

El $\text{TNF}\alpha$ se aisló por su capacidad de inducir muerte en los fibroblastos murinos L929 (Desch et al., 1990), desde entonces ha sido uno de los principales modelos experimentales del efecto citotóxico del $\text{TNF}\alpha$ dada su alta sensibilidad al factor. La citotoxicidad en células L929 sigue siendo empleada hoy en día como el bioensayo de referencia para la actividad de muerte medida por el $\text{TNF}\alpha$ (Kramer and Carver, 1986; Lopez-Bojorquez et al., 2004). Por tanto, en este trabajo, decidimos interferir con las vías de PI3K/Akt y NF- κ B con la finalidad de determinar la medida en la que estas vías contribuyen a la protección conferida por dexametasona contra la citotoxicidad inducida por $\text{TNF}\alpha$ en células L929.

7. HIPÓTESIS

Dado que NF- κ B y PI3K son moléculas asociadas a supervivencia y proliferación, suponemos que la protección conferida por dexametasona contra la citotoxicidad inducida por TNF α involucra la participación de dichas moléculas.

8. OBJETIVOS

8.1 Objetivo general

- Estudiar la participación de las vías PI3K/Akt y NF- κ B en la protección mediada por dexametasona contra el efecto citotóxico del TNF α , así como el efecto del glucocorticoide en el ciclo celular.

8.2 Objetivos particulares

- Determinar la participación de Akt/PI3K en la protección mediada por dexametasona contra el efecto citotóxico del TNF α
- Determinar la participación de NF- κ B en la protección mediada por dexametasona contra el efecto citotóxico del TNF α
- Evaluar la expresión de proteínas antiapoptóticas (c-IAP1 y XIAP) durante la protección mediada por dexametasona contra el efecto citotóxico del TNF α
- Evaluar el efecto de la dexametasona sobre la proliferación y el ciclo celular en presencia de TNF α

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 Células y condiciones de cultivo

Los fibroblastos murinos L929 fueron adquiridos de la compañía American Type Culture Collection (ATCC) y fueron subclonadas por dilución limitante en el laboratorio por la Dra. Erika Gómez. La subclonación se realizó con la finalidad de obtener una clona con alta sensibilidad al efecto citotóxico del TNF α que se usó en todos los experimentos subsecuentes. Las células se crecieron en medio mínimo esencial (MEM) suplementado con 1 mM de glutamina (ambos de GIBCO, USA), 1% de mezcla de penicilina/estreptomicina (penicilina 100 U/ml; estreptomicina 100 μ g/ml. GIBCO, USA) y 10% de suero fetal bovino inactivado (SFBI) (In vitro, México). Los cultivos se mantuvieron en incubadora a temperatura de 37°C con 85% de humedad relativa y 5% de CO₂. Se utilizaron frascos de cultivo 25 y 75 cm² (Corning, USA) para mantener los acarreadores celulares y cajas de 16, 24, 48 y 96 pozos (Corning, USA) para los diferentes experimentos. Para los experimentos de citotoxicidad, las células se sembraron a una densidad de 20x10³ células/cm² en placas de 100 mm de diámetro o en placas de 24 pozos; y para la obtención de extractos totales o nucleares a 70% de confluencia. En todos los casos, a menos que se indique algo diferente, las células fueron tratadas con 1 ng/ml de TNF α recombinante murino (R&D, USA) durante 24 o 48 h para los ensayos de citotoxicidad o durante 15 minutos para los ensayos de retardo (EMSA) y los inmunoblots.

9.2 Conteo celular por exclusión de azul de tripano

Se aspiró el medio de cultivo, se añadieron 100 ml de tripsina 0.1% (pozos de 1 cm²). Al desprenderse el 100% de las células se añadieron 100 μ l de azul de tripano (Sigma, USA), se mezcló con micropipeta varias veces y se contó en la cámara de Neubauer. Para los experimentos de viabilidad se contaron 10 campos para cada pozo. Se obtuvieron los promedios y desviaciones estándar a partir de los duplicados o triplicados.

9.3 Ensayos de viabilidad celular

La viabilidad celular fue evaluada por tinción con cristal violeta. Al final de cada experimento las células se fijaron durante 20 min a temperatura ambiente con glutaraldehído (Merck, USA) al 1.1% en medio de cultivo. Se aspiró el glutaraldehído y se adicionó el cristal violeta al 0.1% en una solución amortiguadora de ácido fórmico (Merck, USA) 200 mM, pH 6.0. Después de 15 min en agitación se retiró en cristal violeta y se lavó exhaustivamente con agua corriente. Se dejó secar y posteriormente el colorante unido a la proteína celular fue solubilizado en 1 ml de ácido acético (Merck) al 10% (pozos de 1 cm²) y cuantificado a 590 nm en espectrofotómetro (Bio-Tec Instruments, USA).

9.4 Purificación de plásmidos

Todos los plásmidos utilizados en las transfecciones se purificaron con el Plasmid Maxi Kit (Qiagen, USA) y se desalaron con columnas Elutip-D (Schleicher & Schuell, Alemania). Todas las enzimas de restricción y reactivos asociados se adquirieron de Gibco BRL, Grand Island, NY. Los ácidos nucleicos se visualizaron con luz ultravioleta luego de una electroforesis en geles de agarosa (Gibco, Grand Island, NY) teñidos con bromuro de etidio (Sigma, St. Louis, MO).

9.5 Plásmidos

El plásmido SR α - Δ p85 fue donado por los Dres. W. Ogawa y M. Kasuga (Kotani et al., 1999), y contiene el cDNA mutado de la subunidad regulatoria p85 α de la PI3K, esta dominante negativa carece de la región de unión a la subunidad catalítica p110 (ver sección **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). El plásmido pCMV4-I κ B α mutado fue donado por los Dres. Dean Ballard y Goeddel (Brockman et al., 1995), y contiene un I κ B α con una doble mutación puntual que sustituye serinas por alaninas en los sitios de fosforilación (S32/36-A32/36). Ambos plásmidos fueron usados para extraer los insertos Δ p85 e I κ B α que fueron subclonados en el plásmido pCLNX-GFPN que además expresa proteína verde fluorescente (GFP) y que permite la selección con G418 (reconstruido por la Dra.

Cárdenas Aguayo, CINVESTAV, México y el Dr. Luis Covarrubias Robles IBT, UNAM). Ambas reconstrucciones fueron secuenciadas para asegurar que durante el proceso de clonación no se introdujeron cambios de bases no deseados, confirmar su orientación y que se encontraban en un marco abierto de lectura.

9.6 Generación de transfectantes estables por precipitación con fosfato de calcio

Las células L929 fueron sembradas a una densidad de 30×10^3 células /cm² en placas de 6 pozos 24 h antes de la transfección con 1 µg de DNA plasmídico, utilizando un kit de transfección con fosfato de calcio (Invitrogen Co., CA) y de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las clonas fueron seleccionadas con 2.5 mg/ml de G418 (GIBCO, USA), las células transfectadas que sobrevivieron a esta selección se recuperaron con anillos de clonación y se expandieron siempre en presencia de G418 en el medio de cultivo. Para ambos plásmidos la expresión de la proteína recombinante fue confirmada por inmunoblot. Al menos dos clonas estables y una clona control con el vector vacío fueron usadas en todos los experimentos. La eficiencia de transfección fue estandarizada de acuerdo a la intensidad de fluorescencia de GFP detectada por microscopía de epifluorescencia.

9.7 Extractos nucleares

Las células L929 fueron lavadas con PBS a 4°C y despegadas en 1 ml de PBS utilizando una espátula de plástico o “gendarme”, posteriormente, se centrifugaron en refrigeración por 5 min a 800xg. La pastilla fue congelada utilizando un baño de hielo seco y etanol por 1 min, después fue resuspendida en 100 µl de solución hipotónica amortiguadora A [10 mM HEPES (pH 8.0), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM DTT]. El lisado se centrifugó a 800xg por 10 min. La pastilla constituida por los núcleos celulares se resuspendió en 30 µl de una solución amortiguadora de alta fuerza iónica o amortiguador C [10 mM HEPES (pH 7.9), 0.4 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 25% glicerol, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF]) y fue incubada a 4°C por 30 min con agitación constante para extraer las proteínas nucleares unidas al ADN. La muestra fue centrifugada en refrigeración (4°C) por 20 min a 14000 xg. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un nuevo tubo en el que se mezcló en

proporción 1:1 (v/v) con el amortiguador D [20 mM HEPES (pH 7.9), 50 mM KCl, 25% glicerol, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF]. La concentración de proteína en los extractos nucleares fue determinada por el método de Bradford (Biorad, Hercules, CA).

9.8 Ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSA)

Se utilizó un oligonucleótido comercial de doble cadena de 21 bases, en el cual se encuentran 10 bases con una secuencia consenso para el sitio de unión de NF- κ B: 5'-AGT-TGA-GGG-GAC-TTT-CCC-AGG (subrayada aparece la secuencia consenso) (Santa Cruz Biotech, CA). Este ADN de doble cadena fue marcado con [γ - 32 P]ATP (NEN) usando cinasa T4 (Boehringer Mannheim, Germany) siguiendo las recomendaciones de la empresa. Las reacciones de unión entre el oligonucleótido marcado y las proteínas nucleares se realizaron en un volumen total de 20 μ l que contenían: 10 μ g de la proteína nuclear, solución amortiguadora de unión (HDKE) [20 mM

HEPES (pH 7.9), 50 mM KCl, 25% glicerol, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1 μ g/ μ l polydI-dC, 10 μ g/ml BSA, 1 mM DTT] y el oligonucleótido marcado (0.5 ng). Después de incubar la reacción por 20 min a temperatura ambiente los complejos de ADN-proteína y el oligonucleótido libre se separaron en un gel de poliacrilamida/bisacrilamida (19:1) al 4% bajo condiciones no desnaturalizantes. Los geles fueron secados y colocados en un cassette con pantalla intensificadora de flúor y se visualizaron con la ayuda de un analizador de imágenes Phosphoimager, la intensidad de la señal fue evaluada por el programa Image Quant (Molecular Dynamics, CA).

9.9 Preparación de extractos celulares de proteína total

Las células se lavaron dos veces con PBS a 4°C, se aspiró totalmente el amortiguador y se añadieron 200 μ l (para placa de 60 mm de diámetro) de amortiguador de lisis (50 mM Tris pH 8.0, 120 mM NaCl, 0.5% NP-40, 100 mM NaF, 5 μ g/ml aprotinina, 1 mM PMSF, 10 μ g/ml leupeptina) (Sigma, St. Louis, MO). Se incubó 20 min a 4°C, se recolectó el lisado en microtubos y se centrifugó a 4°C

durante 15 min a 14,000xg. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la concentración de proteína por el método de Bradford (reactivo de Biorad, Hercules, CA).

9.10 Inmunoblots

Los extractos celulares totales a los que se les cuantificó la concentración de proteína fueron utilizados para realizar los inmunoblots. Se utilizaron 30 μ g de proteína para correr en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12%. Al finalizar la electroforesis el gel se electrotransfirió durante 3 h a 400 mA entre dos pares de papel filtro a una membrana de nitrocelulosa (Osmonics, Westborough, MA) en amortiguador para transferencia (16.7 mM de Tris, 1.9 M de glicina y 20% de metanol). Después de la transferencia la membrana se tiñó con solución de Ponceau (Sigma, St. Louis, MO) para corroborar que la transferencia hubiera ocurrido de forma homogénea en toda la superficie y que el cargado en los pozos hubiera sido homogéneo. La membrana se lavó con agua bidestilada y se bloqueó con leche libre de grasa (Svelty) al 5% en TBS/Tween (TBS: 150 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 20 mM Tris; pH 8.0, suplementado con 0.1 % Tween) durante 1 h a temperatura ambiente con agitación continua y realizando un cambio de solución a los 30 min. Se retiró la solución bloqueadora y se enjuagó la membrana con TBS/Tween 0.1%. La membrana se incubó con el anticuerpo primario diluido (1:1000) en TBS/Tween 0.1%/BSA 1% por 2 h o toda la noche en algunos casos. Se lavaron tres veces las membranas durante 5 min cada vez, con TBS/Tween 0.1% y se incubó el anticuerpo secundario unido a peroxidasa (Pierce, Rockford, IL) a una dilución de 1:1000 en TBS/Tween 0.1%/BSA 1% por 2 h a temperatura ambiente en agitación continua. Nuevamente, se realizaron tres lavados de 5 min cada uno con TBS/Tween 0.1%. Las bandas de las proteínas se visualizaron por quimioluminiscencia con un kit comercial (Pierce) después de incubar 1 min en la oscuridad. Las membranas se expusieron a una placa de autoradiografía (Kodak, USA) durante 30 seg, se reveló y fijó con las soluciones recomendadas (Kodak, USA). Todas las señales fueron normalizadas realizando inmunoblots contra β -actina siguiendo el mismo protocolo descrito antes.

Los anticuerpos utilizados se enlistan en la Tabla 1.

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para inmunoblots

Anticuerpos primarios	Fabricante
Anti-c-IAP1 humana y murina de conejo	R&D Systems
Anti-XIAP humana y murina de conejo	R&D Systems
Anti-Akt total humano y murino de conejo	Pharmingen, San Diego, CA
Anti-Akt fosforilado humana y murina de conejo	Pharmingen, San Diego, CA
Anti-I κ B α humano y murino de conejo	Santa Cruz, Biotech, CA
Anti- β -actina humana y murina de conejo	R&D Systems
Anticuerpos secundarios	
IgG anti-conejo de oveja conjugado a HRP	Zymed, San Fco, CA
IgG anti-oveja de conejo conjugado a HRP	Zymed, San Fco, CA
IgG anti-ratón de oveja conjugado a HRP	Pierce, Rockford, IL

HRP: peroxidasa de rábano picante

9.11 Citometría de flujo para análisis de ciclo celular.

Las células L929 fueron crecidas a 80% de confluencia en cajas petri de 100 mm de diámetro y tratadas por los tiempos indicados en cada figura. Los cultivos fueron lavados con PBS suplementado con CaCl₂ (0.9 mM) y MgCl₂ (0.4 mM) para remover los componentes del suero. Las células se tripsinizaron, se centrifugaron a 800xg, se lavaron con PBS y se volvieron a centrifugar a 800xg. Posteriormente, se resuspendieron en 500 μ l de metanol (J. T. Baker, Xalostoc, México) al 95% en PBS, se incubaron 15 min en hielo y se volvieron a centrifugar a 800xg. Finalmente, se resuspendieron en 1 ml de PBS que contenía RNAasa IV (Gibco BRL, Grand Island, NY) a una actividad final de 5 U/ml y se incubaron 30 min a 37°C. Al término de la incubación se adicionó yoduro de propidio a una concentración final de 50 μ g/ml. El análisis se realizó utilizando el citofluorómetro modelo FACScalibur, Beckton Dickinson, San Jose, CA. Los datos se presentan como histogramas de la intensidad de fluorescencia a 560 nm; el valor de la intensidad de fluorescencia relativa (FI) es presentado en cada histograma. Utilizando un cultivo asincrónico de células L929 se fijaron los parámetros de voltaje y corriente del fotomultiplicador PMT2 para que la FI correspondiente a la fase G₁ cayera en un valor de 200, en todos los casos los valores máximos de FI correspondieron a un valor de 400 y equivale a G₂/M. El análisis de ciclo celular se restringió a las células individuales,

evitando considerar agregados por medio de una región definida en un gráfico de puntos (dot plot) de tiempo de vuelo (FL2-W) contra intensidad de la fluorescencia (FL2-A).

9.12 Análisis estadístico.

Todos los ensayos se reportan como el promedio de al menos tres experimentos realizados independientemente. Cada uno de los ensayos de citotoxicidad se realizó por triplicado. Las barras de error en las gráficas representan la desviación estándar, en algunos casos se realizó una prueba de t de student para determinar la significancia estadística.

Los ensayos de EMSA y los inmunoblots fueron realizados al menos tres veces de manera independiente y se muestran las imágenes representativas.

10. RESULTADOS

10.1 La dexametasona confiere protección contra el efecto citotóxico del TNF α .

Como primer paso se corroboró la respuesta de las células L929 a la dexametasona y al TNF α , misma que ya ha sido descrita previamente (Abe et al., 1988). Estos experimentos se realizaron con el propósito de establecer las concentraciones y tiempos del estímulo a los cuales el TNF α muestra un efecto citotóxico, y la concentración mínima a la cual la dexametasona es capaz de inhibir el dicho efecto citotóxico del TNF α . Se evaluó el efecto de la dexametasona en concentraciones bajas hasta de 0.0001 μ M, en las cuales no se observó ningún efecto protector, y concentraciones mayores a 100 μ M que resultaron tóxicas para las células. Dado que la dexametasona es soluble en etanol, todos los experimentos control de dexametasona fueron tratados con etanol 0.1%. En experimentos que no se muestran, aseguramos que esta concentración de etanol no afecta la viabilidad celular.

Morfológicamente observamos que el TNF α induce muerte celular a una concentración de 1 ng/ml, efecto que se anula al tratar simultáneamente con 10 μ M de dexametasona durante 24 horas (Figura 1).

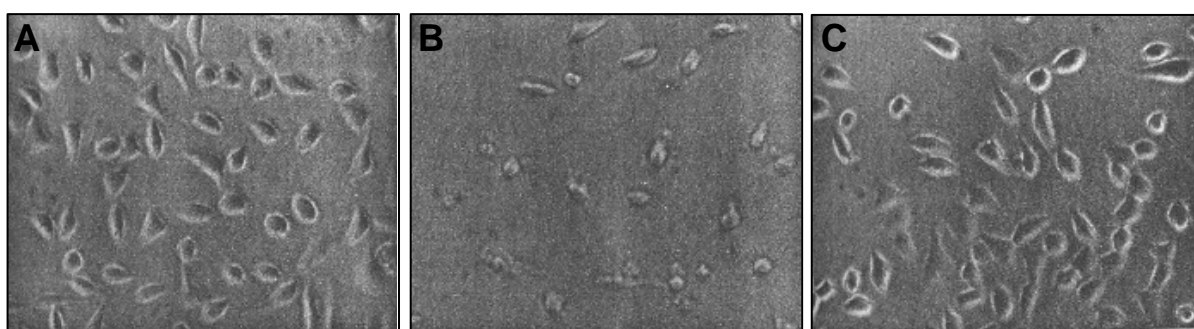


Figura 1. La dexametasona (Dex) previene la citotoxicidad del TNF α en células L929.

A) Células L929 sin tratamiento. B) Células L929 tratadas con TNF α (1 ng/ml) durante 24 h. C) Células L929 tratadas con TNF α (1 ng/ml) y dexametasona (10 μ M) durante 24 h.

También analizamos la conveniencia de adicionar la dexametasona antes, al mismo tiempo o después del TNF α . Determinamos que el efecto protector conferido

por la dexametasona no se modifica (con respecto a la adición simultánea), si las células son pretratadas con el glucocorticoide hasta por 24 horas antes del $\text{TNF}\alpha$ (Figura 2A). Sin embargo, la protección se pierde a medida que se aumenta el tiempo al cual se adiciona la dexametasona después del $\text{TNF}\alpha$ (Figura 2B), por lo que decidimos descartar el uso de este protocolo.

Dado que la protección conferida por la dexametasona adicionada antes del $\text{TNF}\alpha$, fue similar a la observada cuando se adicionan simultáneamente (Figuras 9C y 10A), se decidió emplear un protocolo de adición simultánea. Este protocolo considera entonces, que los procesos de transducción ya sea del $\text{TNF}\alpha$ o de la dexametasona, no anteceden uno al otro.

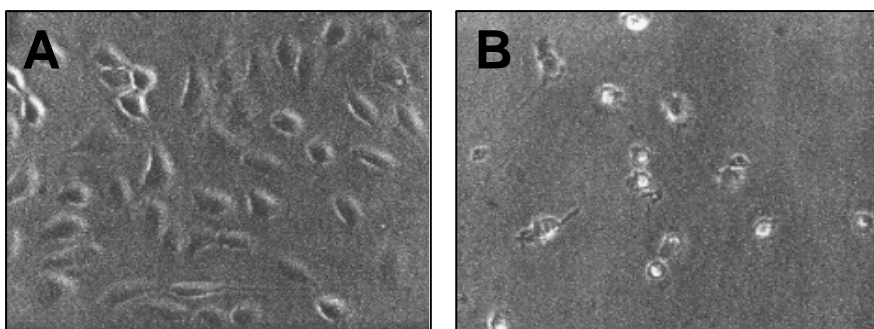


Figura 2. Efecto de la adición de dexametasona antes y después del tratamiento con $\text{TNF}\alpha$ en células L929.

Se muestran experimentos de citotoxicidad evaluados a las 24 horas a partir de la adición del $\text{TNF}\alpha$. A) Células L929 pretratadas durante 24 horas con dexametasona ($10\ \mu\text{M}$) previamente a la adición de $\text{TNF}\alpha$ ($1\ \text{ng/ml}$). B) Células L929 tratadas con $\text{TNF}\alpha$ ($1\ \text{ng/ml}$) durante 6 horas antes de la adición de dexametasona ($10\ \mu\text{M}$).

En células L929, el $\text{TNF}\alpha$ induce muerte celular de manera tiempo y dosis dependiente. Después de 24 horas de tratamiento con $1\ \text{ng/ml}$ de $\text{TNF}\alpha$, la viabilidad celular se reduce a 16% con respecto al control sin tratamiento, y a las 48 horas disminuye hasta 2%. Utilizando dosis mayores ($5\ \text{ng/ml}$), observamos que la viabilidad se reduce hasta 4% a las 24 horas y cae prácticamente hasta 0% en 48 horas (Figura 3A). Estos resultados nos permitieron estandarizar los experimentos a una concentración de $1\ \text{ng/ml}$ de $\text{TNF}\alpha$ durante 24 horas. Todos los experimentos que se muestran a lo largo de este trabajo fueron realizados bajo estas condiciones.

El tratamiento de las células con 1 ng/ml de $\text{TNF}\alpha$ y concentraciones crecientes de dexametasona (0.01-10 μM) durante 24 h, muestra una supresión dosis dependiente de la muerte inducida por la citocina (Figura 3B). A pesar de que se observa protección incluso con concentraciones de dexametasona menores a 10 μM , se decidió utilizar esta concentración porque se observa el efecto protector máximo contra la muerte inducida por el $\text{TNF}\alpha$ sin efectos tóxicos por sí misma. Además observamos que la protección con dexametasona 10 μM es completa incluso a tiempos tan largos como 72 horas de tratamiento en presencia de la citocina (Figura 4C). Estos resultados permiten concluir que el tratamiento con dexametasona confiere un efecto protector contra la citotoxicidad del $\text{TNF}\alpha$ prácticamente completa (100%), a diferencia de otros tratamientos que solamente retrasan el proceso de muerte pero que no son capaces de anularlo, tales como la sobreexpresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (resultados previos obtenidos en el laboratorio por la Dra. Erika Gómez).

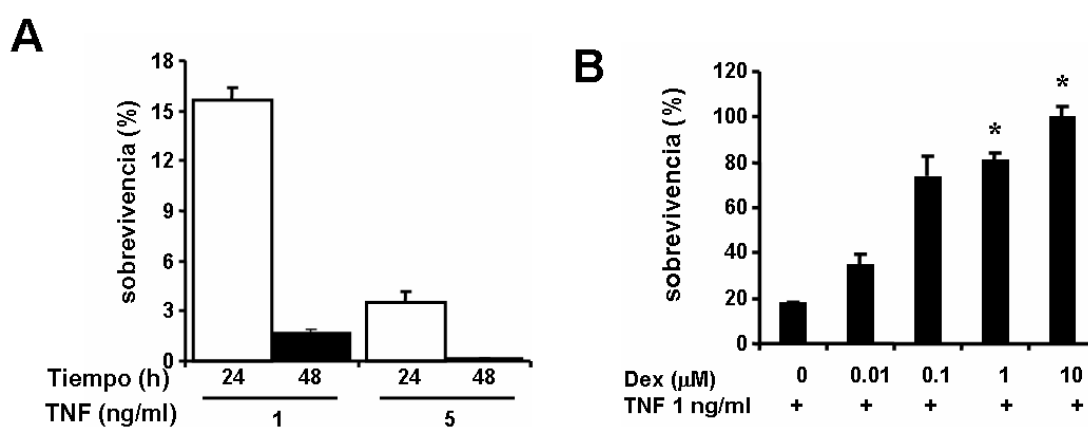


Figura 3. La dexametasona (Dex) previene la citotoxicidad del $\text{TNF}\alpha$ en células L929.

A) Supervivencia celular de cultivos estimulados 24 o 48 h con $\text{TNF}\alpha$ (1 o 5 ng/ml). B) Dosis-respuesta de dexametasona sobre la citotoxicidad inducida por $\text{TNF}\alpha$ (1 ng/ml) a las 24 h. Los porcentajes se calcularon con respecto al control. Se muestran los resultados de 5 experimentos independientes realizados por triplicado. * $P < 0.05$ vs control.

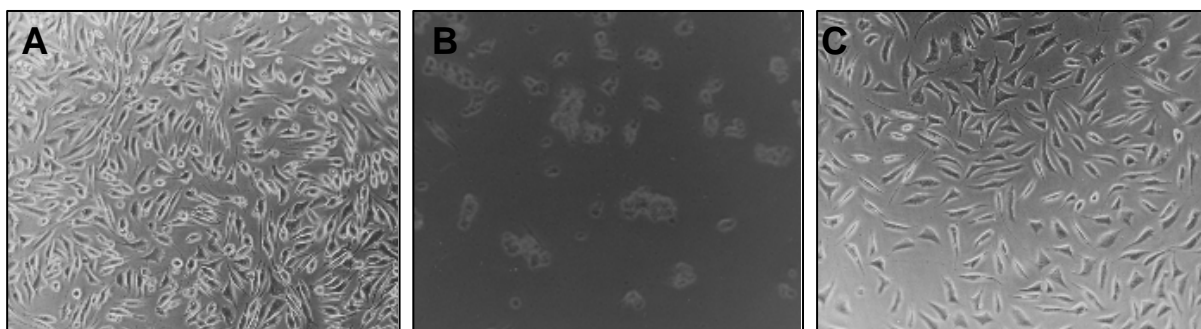


Figura 4. La dexametasona (Dex) previene la citotoxicidad del $\text{TNF}\alpha$ en células L929 a tiempos largos.

Cultivos de células L929 fueron se trataron de la siguiente manera: A) Control sin tratamiento. B) Tratadas con $\text{TNF}\alpha$ (1 ng/ml) durante 24 horas y C) Tratadas con $\text{TNF}\alpha$ (1 ng/ml) y dexametasona (10 μM) durante 72 horas.

10.2 La vía de señalización de PI3K/Akt no está involucrada en la protección mediada por dexametasona contra el efecto citotóxico del $\text{TNF}\alpha$.

Dado que los receptores de glucocorticoides pueden activar cascadas de señalización citoplásmica que implican la activación de la vía PI3K/Akt se evaluó el papel de esta vía en la protección conferida por dexametasona contra la muerte inducida por $\text{TNF}\alpha$. Con este fin se siguieron dos estrategias independientes, una farmacológica y otra basada en el uso de una forma dominante negativa de PI3K. Se inhibió la vía de PI3K/Akt mediante wortmanina (un inhibidor específico de la PI3K), y se generaron células establemente transfectadas con una forma dominante negativa de PI3K (Δp85), que no puede ser activada y que por lo tanto carece de la capacidad de fosforilar al sustrato Akt. En ambas estrategias se consideró la presencia de Akt en su forma fosforilada como un indicador de la actividad de la PI3K. La proteína Akt fosforilada fue detectada por medio de inmunoblots con anticuerpos que reconocen los residuos de serina 472 y 473 en su forma fosforilada.

10.2.1 El TNF α y la dexametasona inducen un aumento en la fosforilación de Akt en células L929.

En las células L929 parentales, el TNF α (1 ng/ml) induce un aumento transitorio en la fosforilación de Akt, observándose un pico de activación que se encuentra 6 veces por encima del control a los 10 min (Figura 5, panel A). El tratamiento con dexametasona sola o en presencia de TNF α , induce niveles similares de Akt fosforilado (Figura 5, paneles B y C), que son menores a los inducidos cuando solo se trata con TNF α . Estos experimentos nos permitieron establecer el tiempo al cual se evaluó la fosforilación de Akt para los siguientes experimentos, es decir, entre 10 y 20 minutos. También pudimos observar, que existen diferencias en cuanto al nivel de fosforilación de Akt bajo los distintos estímulos, sin embargo, en este punto no podíamos atribuir el efecto protector conferido por la dexametasona contra la citotoxicidad del TNF α a este aspecto.

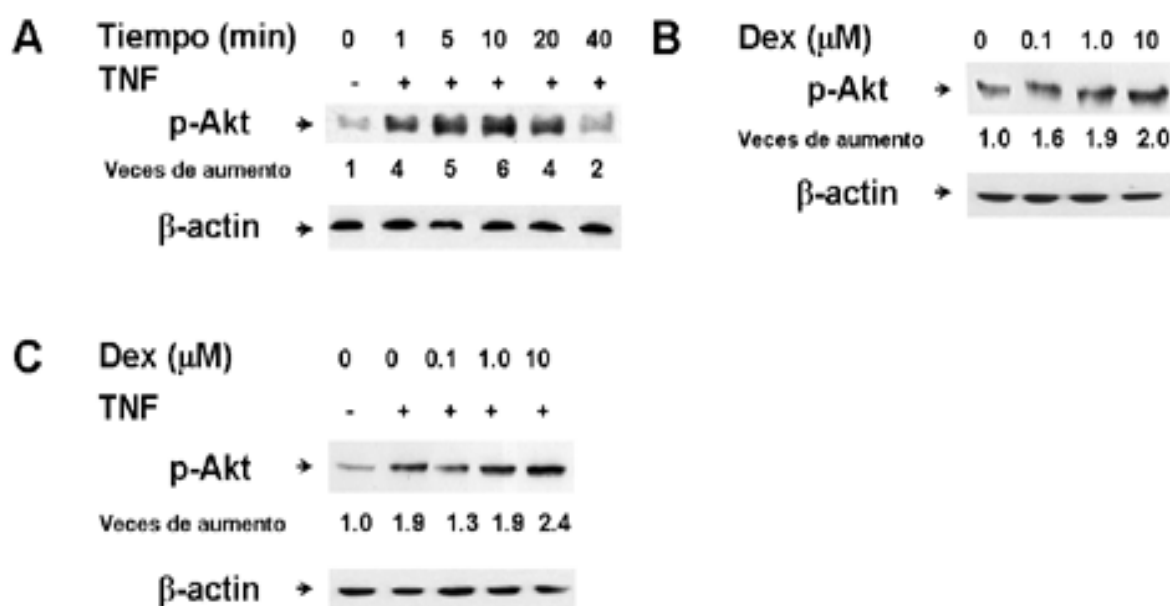


Figura 5. El TNF α y la dexametasona inducen la fosforilación de Akt en células L929.

Inmunoblot de proteína Akt fosforilado o β -actina como control de cargado en extractos totales de células L929. A) tratadas con TNF α (1 ng/ml) durante los tiempos indicados. B) Tratadas con dexametasona (10 μ M) durante los tiempos indicados. C) Tratadas con TNF α (1 ng/ml) y dexametasona a las concentraciones indicadas durante 15 minutos. Se indica el número de veces de aumento comparado contra el control sin tratamiento.

10.2.2 La fosforilación de Akt inducida por $\text{TNF}\alpha$ y dexametasona, se bloquea por wortmanina y por la expresión de una dominante negativa de PI3K (Δp85) en células L929.

Las células parentales tratadas con wortmanina y las células transfectadas Δp85 , pierden su capacidad para fosforilar Akt en respuesta a $\text{TNF}\alpha$ (Figura 6), dexametasona o ambas. Como era de esperarse, el nivel de Akt total no se modifica por la presencia de una forma dominante negativa de PI3K (Figura 6B, tAkt).

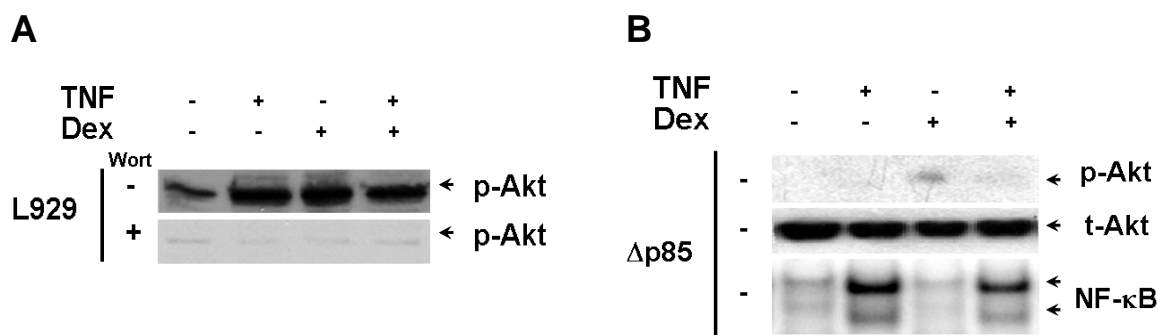


Figura 6. Tratamiento con wortmanina y expresión de una dominante negativa de PI3K (Δp85) y su efecto en la activación de Akt y NF- κ B.

A) Inmunoblot contra Akt fosforilado (pAkt) o Akt total (tAkt) en extractos totales de células parentales (L929) tratadas simultáneamente a lo indicado con 1 μM de wortmanina (Wort). B) Inmunoblot contra Akt fosforilado (pAkt) o Akt total (tAkt) en extractos totales de células que expresan la dominante negativa de PI3K (Δp85). El panel inferior muestra un EMSA de NF- κ B en células Δp85 tratadas como se indica. Las células fueron incubadas durante 15 min con 1 ng/ml de $\text{TNF}\alpha$, 10 μM de dexametasona o ambas de acuerdo a lo indicado en cada carril.

Posteriormente decidimos evaluar la activación de NF- κ B, dado que la activación de este factor es posterior a la activación de PI3K/Akt. Además se ha postulado que es esencial para muchos de los efectos transcripcionales dependientes de PI3K/Akt. Medimos la activación de NF- κ B a través de un ensayo de EMSA (ver capítulo de materiales y métodos). Observamos que la inhibición de la vía PI3K/Akt por medio de la expresión de la forma dominante negativa de PI3K, no afecta la capacidad de traslocar NF- κ B en respuesta $\text{TNF}\alpha$ (Figura 6B, NF- κ B),

la cual ocurre de manera similar a la observada en las células L929 parentales (Figura 7, carriles 1 y 2).

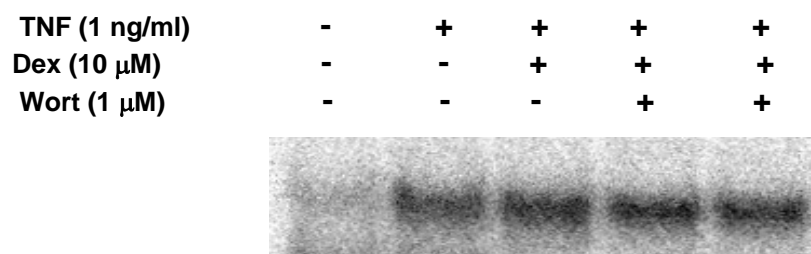


Figura 7. La wortmanina no modifica la traslocación de NF- κ B promovida por TNF α o por TNF α en presencia de dexametasona en células L929.

EMSA de NF- κ B de extractos nucleares de células L929 tratadas durante 15 minutos como se indica en la figura. La wortmanina 1 μ M fue adicionada simultáneamente a los tratamientos con TNF α y dexametasona.

Además, la inhibición farmacológica de la PI3K con wortmanina (1 μ M), tampoco afecta la traslocación nuclear de NF- κ B inducida por TNF α o por TNF α en presencia de dexametasona en células parentales L929 (Figura 7, carriles 4 y 5).

10.2.3 La inhibición de la PI3K/Akt a través de wortmanina y por la expresión de una dominante negativa de PI3K (Δ p85), no afecta la protección conferida por dexametasona contra el efecto citotóxico del TNF α en células L929.

Con el propósito de asegurar que la ausencia de efecto de la wortmanina sobre la protección mediada por dexametasona en caso de presentarse, no pudiera deberse a la degradación del fármaco durante los tiempos prolongados requeridos para los ensayos de citotoxicidad, se trataron varios cultivos de células L929 con wortmanina durante distintos tiempos (desde 15 minutos hasta 24 horas). Posteriormente los cultivos fueron estimulados con TNF α durante 15 minutos para inducir la fosforilación de Akt, después de lo cual se lisaron las células para obtener extractos totales que se utilizaron para realizar inmunoblots de Akt fosforilado. Observamos que la wortmanina inhibe por completo la fosforilación de Akt promovida por TNF α a lo largo del ensayo y a tiempos tan largos como 24 horas (Figura 8). Estos

resultados permiten asegurar que el inhibidor mantiene su actividad farmacológica a lo largo de todo el ensayo de citotoxicidad, y no sufre algún deterioro durante el experimento que pudiera repercutir en su capacidad para mantener inhibida a la PI3K, misma que es la encargada de fosforilar a Akt.

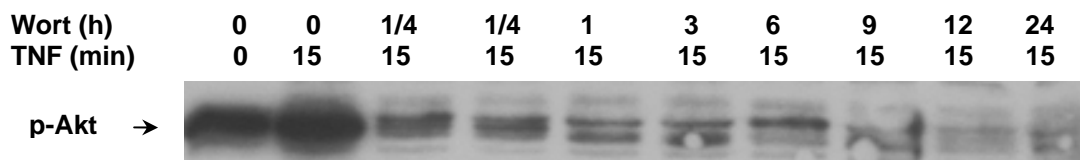


Figura 8. La wortamina mantiene su efecto inhibitor sobre la PI3K durante los periodos de incubación utilizados en los ensayos de citotoxicidad.

Inmunoblot de Akt en su forma fosforilada en extractos totales provenientes de cultivos de células L929 estimulados durante los tiempos indicados con wortmanina 1 μ M. Posteriormente los cultivos fueron estimulados con 1 ng/ml de TNF α durante 15 minutos, después de lo cual se realizaron extractos totales.

Ni la intervención farmacológica con wortmanina, ni la expresión de la forma dominante negativa de PI3K (Δ p85) tienen efecto significativo sobre la protección conferida por dexametasona contra la citotoxicidad del TNF α (Figura 9). La ligera disminución de la sobrevivencia observada en las células Δ p85, en presencia del TNF α y la dexametasona, no es estadísticamente significativa, y es muy similar al valor observado en las células parentales L929 tratadas con wortmanina. Los resultados mostrados en conjunto, permiten sugerir que la vía de PI3K/Akt, no es relevante para la protección mediada por dexametasona contra el efecto citotóxico inducido por TNF α .

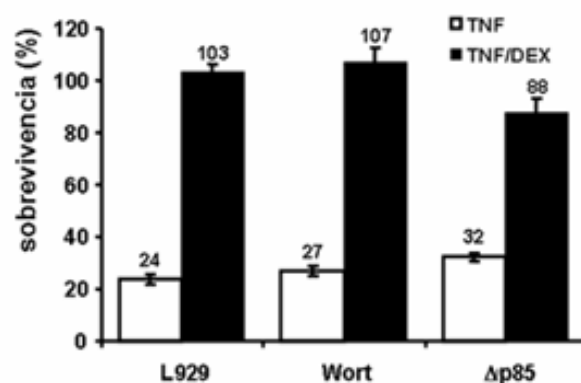


Figura 9. Efecto del tratamiento con wortmanina en células parentales L929 y de la expresión de una dominante negativa de PI3K ($\Delta p85$), en la protección conferida por dexametasona contra la citotoxicidad inducida por el $TNF\alpha$.

Sobrevivencia celular a las 24 horas en presencia de 1 ng/ml de $TNF\alpha$ (barras claras) o 1 ng/ml de $TNF\alpha$ más 10 μM de dexametasona (barras negras) en la línea parental (L929), en presencia de 1 μM de wortmanina (Wort) o en la dominante negativa ($\Delta p85$). En la parte superior de cada barra se indica el porcentaje promedio obtenido de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado.

10.3 La vía de señalización de $NF-\kappa B$, se requiere para la protección mediada por dexametasona contra la citotoxicidad inducida por el $TNF\alpha$ en células L929.

Para evaluar la participación de la vía de $NF-\kappa B$ en la protección conferida por dexametasona contra la citotoxicidad del $TNF\alpha$, decidimos bloquear la traslocación del factor nuclear mediante la sobreexpresión de una forma mutante de $I\kappa B$ no degradable ($I\kappa B\alpha_m$) y evaluar la activación de $NF-\kappa B$, y la degradación de $I\kappa B\alpha$, así como el efecto de la expresión de esta proteína mutada sobre la protección conferida por la dexametasona contra la citotoxicidad del $TNF\alpha$.

10.3.1 La dexametasona no afecta la activación de NF- κ B ni la degradación de I κ B α en las células L929 parentales.

Inicialmente, valoramos los posibles efectos de la dexametasona sobre la degradación de I κ B α y la traslocación de NF- κ B en respuesta al TNF α en células L929 parentales. En estas células, la dexametasona no afecta la traslocación nuclear de NF- κ B inducida por 1 ng/ml de TNF α (Figura 10, carril 4), ya que ésta ocurre de manera similar a la observada en respuesta al TNF α (Figura 10, carril 2). La dexametasona (10 μ M) por sí misma no induce la traslocación del factor (Figura 10, carril 3). Tal y como se esperaba, la degradación de I κ B α inducida por TNF α no se ve afectada por la presencia de la dexametasona, lo cual se muestra en los inmunoblots (Figura 10, panel superior) y confirma lo observado para el caso de NF- κ B.

10.3.2 La dexametasona no afecta la activación de NF- κ B ni la degradación de I κ B α en las células L929 transfectadas con I κ B α m.

En contraste con lo observado en las células parentales y como se esperaba, en las células transfectadas con la mutante de I κ B α (I κ B α m) no se observa degradación de I κ B α (Figura 11A) ni traslocación de NF- κ B al núcleo (Figura 11B) después del estímulo con TNF α . Esto nos asegura que en las células transfectadas la forma dominante negativa de I κ B α anula la capacidad de activar a NF- κ B en respuesta a TNF α a pesar de la presencia de las formas endógenas de I κ B. En la Figura 11A se puede observar que, en tanto que la forma dominante negativa de I κ B α se sobreexpresa significativamente comparada con la forma silvestre endógena (carril 1), la primera no se degrada en respuesta a TNF α (I κ B α m), mientras que la endógena se sigue degradando en respuesta a este tratamiento (I κ B α).

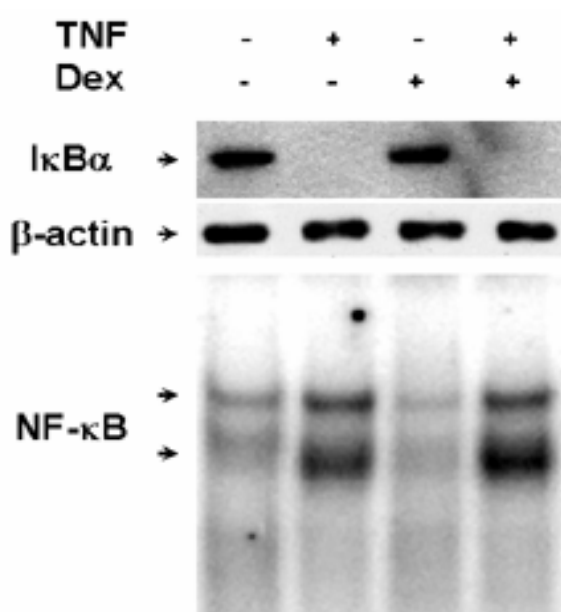


Figura 10. La dexametasona no afecta la traslocación nuclear de NF- κ B inducida por TNF α en células parentales L929.

Se muestra el inmunoblot de I κ B α (panel superior) o β -actina (panel central) de extractos totales de células L929 estimuladas como se indica; y la traslocación nuclear de NF- κ B por ensayo de EMSA (panel inferior) en extractos nucleares de células L929 estimuladas como se indica. TNF α 1ng/ml y dexametasona 10 μ M.

10.3.3 La sobreexpresión de I κ B α m en células L929, anula la protección conferida por la dexametasona contra el efecto citotóxico del TNF α .

La sobreexpresión de I κ B α m, disminuye dramáticamente la protección conferida por la dexametasona contra el efecto citotóxico del TNF α , reduciendo la sobrevivencia desde 100% hasta 22% a las 24 horas (Figura 12, barras oscuras), sugiriendo que NF- κ B participa en la protección por dexametasona. Cabe mencionar, que la sobreexpresión de la proteína mutante I κ B α m, incrementa la muerte celular inducida sólo por TNF α de manera significativa, disminuyendo la viabilidad de 19% a 11% (Figura 12, barras claras). Ya que la dexametasona por sí misma no tiene efecto sobre la activación de NF- κ B (Figura 11, panel inferior carriles 3 y 4), ni afecta los niveles de activación durante el estímulo con TNF α (Figura 11, panel

inferior carril 2), suponemos que la activación de NF- κ B requerida durante la protección mediada por la dexametasona es aportada por el estímulo del TNF α .

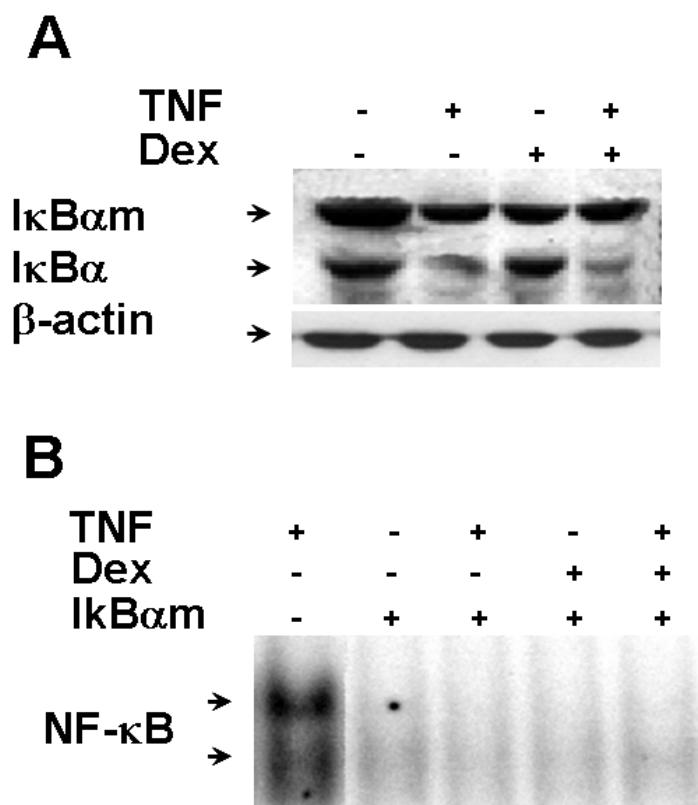


Figura 11. La dexametasona no afecta la activación de NF- κ B ni la degradación de I κ B α en las células L929 transfectadas con I κ B α mutado (I κ B α m).

A) Inmunoblot de I κ B α o β -actina en las células L929 que sobreexpresan la forma mutante de I κ B α (I κ B α m). Las formas endógena (I κ B α) y mutante (I κ B α m) de la proteína I κ B α se indican con flechas.

B) Traslocación nuclear de NF- κ B en células parentales (primer carril) y en las células I κ B α m (carriles 2-5). Las células fueron tratadas con 1 ng/ml de TNF α , o 10 μ M de dexametasona o ambas durante 15 minutos.

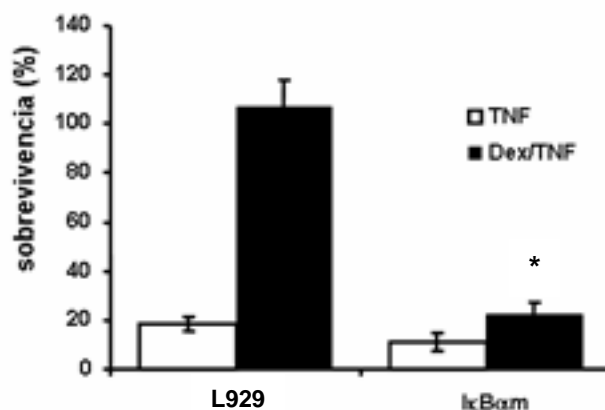


Figura 12. Supervivencia celular en células L929 parentales y células que sobreexpresan la forma mutada de IκBα.

En células parentales L929 y células IκBαm tratadas durante 24 horas con 1 ng/ml de TNFα (barras blancas) o TNFα en presencia de 10 μM de dexametasona (barras oscuras). *P<0.01 vs células parentales tratadas con TNFα y dexametasona.

10.4 La pérdida de la protección conferida por dexametasona por inactivación de NF-κB, está asociada a una disminución de las proteínas IAP en células L929.

Dado que la acción de NF-κB implica un efecto transcripcional, quedaba por identificar los posibles genes cuya expresión se asocia a la protección contra el TNFα. Además, la expresión de estos genes se debe afectar cuando se interfiere con la activación de NF-κB. En un intento por aproximarnos a determinar el efecto de la expresión de la mutante IκBαm sobre otras moléculas asociadas a inhibición de muerte, decidimos medir las proteínas c-IAP1 y XIAP en las células transfectadas, cuya expresión aumenta en respuesta a dexametasona (Wu et al., 2004).

Los inmuno ensayos tipo western analizando el contenido de estas proteínas a lo largo de 18 h de tratamiento muestran que el TNFα induce una reducción dependiente del tiempo en la cantidad de éstas proteínas, (Figura 13, L929). Esta disminución que correlaciona temporalmente (en el caso de c-IAP1) con el punto en el cual las células comienzan a morir (9-14 horas). Si bien ambas proteínas son sensibles al tratamiento con TNFα, XIAP mostró una mayor disminución comparada con c-IAP1 (Figura 13, L929). La dexametasona previene la reducción en la

cantidad de proteína IAP inducida por $\text{TNF}\alpha$ (Figura 13, L929, TNF/Dex). En contraste, en las células $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\text{m}$ el nivel basal de c-IAP1 es menor al de las células parentales (Figura 13, $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\text{m}$, carril 1), y el tratamiento combinado de $\text{TNF}\alpha$ + Dexametasona provocó la desaparición de c-IAP1 casi por completo (Figura 13, $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\text{m}$, TNF/Dex).

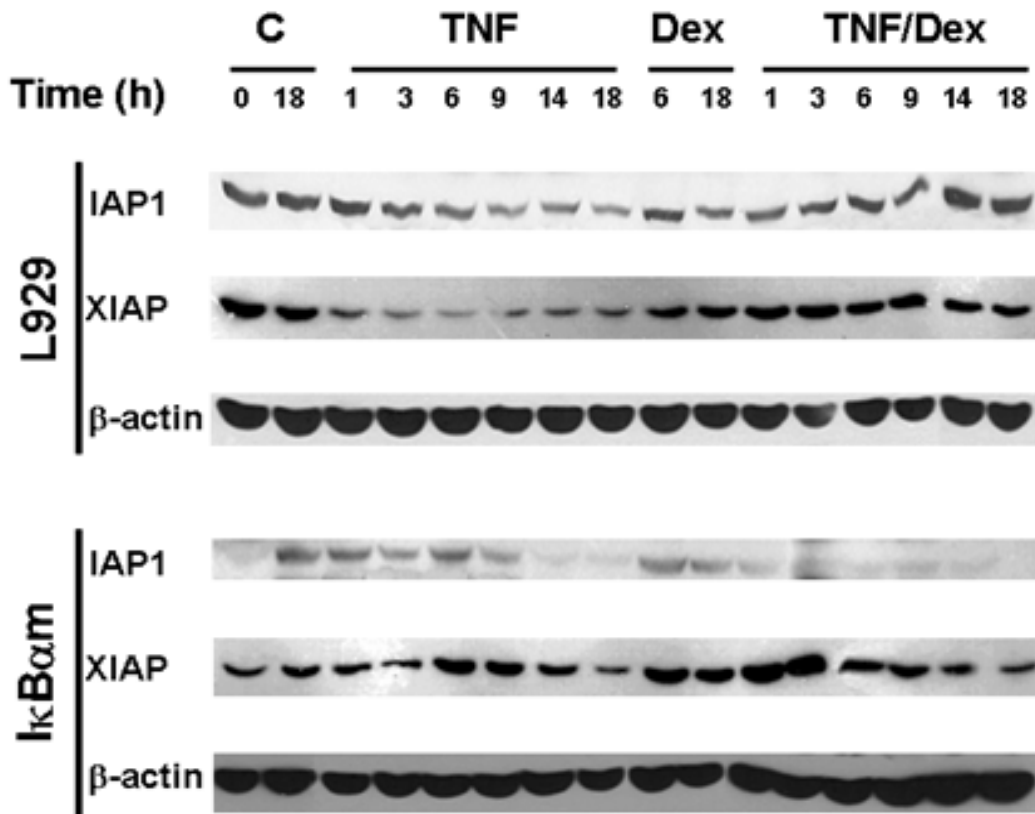


Figura 13. La inactivación de la vía de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ reduce los niveles de proteínas c-IAP1 y XIAP. Se muestran inmunoblots de c-IAP1, XIAP o β -actina en células parentales L929 o $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\text{m}$ tratadas con 1 ng/ml de $\text{TNF}\alpha$, 10 μM de dexametasona o ambas durante los tiempos indicados.

10.5 Otros efectos de la dexametasona, ciclo celular.

Estudios previos de otros grupos de trabajo y de nuestro laboratorio realizados por la Dra. Erika Gómez, revelan que existe una relación entre la muerte que causa el $\text{TNF}\alpha$ y el ciclo celular. Una de las evidencias que apoyan esta idea, es el hecho de que moléculas que bloquean el ciclo celular, como el $\text{TGF}\beta$, son capaces de proteger de la muerte (Belizario and Dinarello, 1991). Además, en

nuestro laboratorio, también observamos que las células que no proliferan, que son detenidas en el ciclo celular por confluencia o por privación de suero en el medio de cultivo, son insensibles al efecto citotóxico del $\text{TNF}\alpha$ aun después de 24 horas de tratamiento con la citocina, similar al efecto protector observado en las células tratadas con dexametasona (Figura 14).

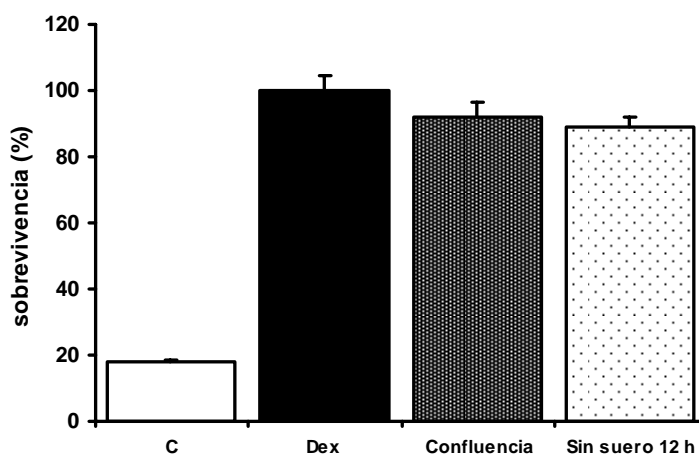


Figura 14. Efecto de $\text{TNF}\alpha$ sobre la viabilidad en células L929 cultivadas bajo distintas condiciones.

Cultivos proliferantes (C y Dex) y no proliferantes (confluentes y sin suero durante 12 horas) de fibroblastos murinos L929, fueron estimulados con 1 ng/ml de $\text{TNF}\alpha$ y/o dexametasona 10 μM durante 24 horas. La sobrevivencia fue evaluada por tinción con azul tripano. Cada condición fue normalizada con respecto a su propio control sin tratamiento. Se indica la desviación estándar de triplicados de cada experimento.

Basándonos en estas evidencias y con la finalidad de determinar el efecto de la dexametasona en el ciclo celular durante la protección contra el efecto citotóxico del $\text{TNF}\alpha$, decidimos examinar la distribución en el ciclo celular de los cultivos después de la exposición a la citocina o al glucocorticoide o ambos. Esto se llevó a cabo a través de la medición del contenido de DNA por citometría de flujo (ver materiales y métodos). Se analizaron cultivos tratados con la citocina y el glucocorticoide a tiempos cortos antes de que se presente la muerte celular (4 y 6 horas), y tiempos largos a partir del momento en el que comienzan a aparecer células muertas por efecto del $\text{TNF}\alpha$ (16, 24 y 48 horas). En la Figura 15 se muestran los histogramas obtenidos a tiempos cortos, y en la Figura 16 se muestran

los obtenidos a tiempos largos. En la Tabla 1 se muestra el resumen de ambos experimentos.

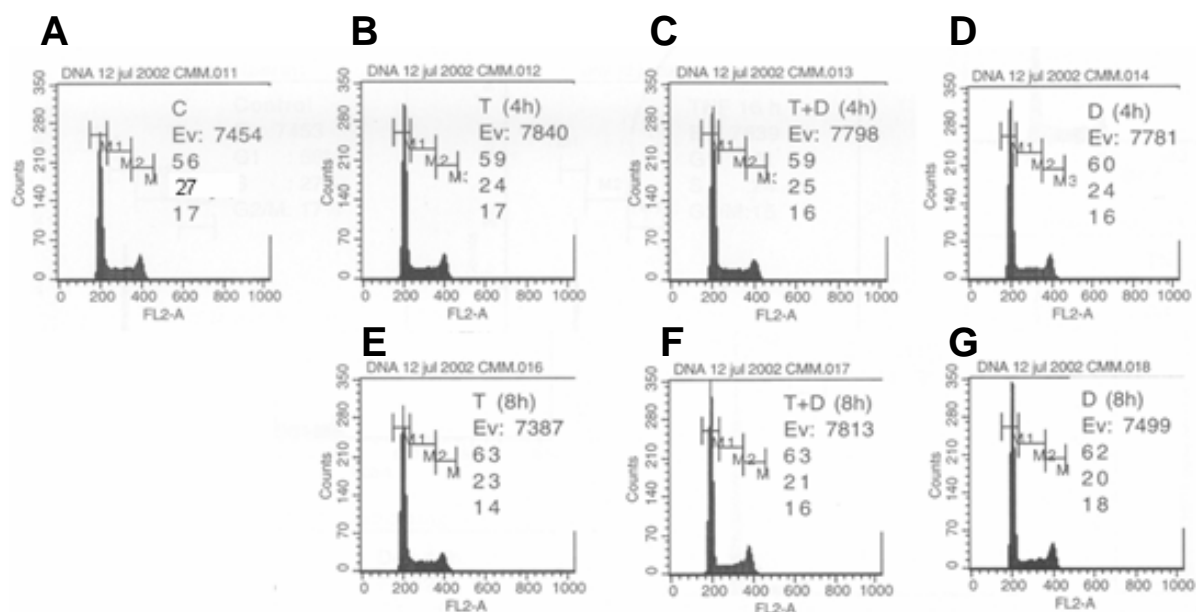


Figura 15. La dexametasona no induce inhibición de la proliferación y arresto en el ciclo celular a tiempos cortos

Cultivos proliferantes de fibroblastos L929 fueron crecidos en ausencia (A) o presencia de 1 ng/ml de TNF α (B y E), TNF α y dexametasona 10 μ M (C y F) o dexametasona 10 μ M (D y G) durante 4 (B, C y D) y 8 horas (E, F y G). Las células fueron fijadas con etanol para ser evaluadas por citometría de flujo. M1, M2 y M3 se asignaron para agrupar las células en fase G₀/G₁, S y G₂/M respectivamente, y se muestran enlistados los porcentajes correspondientes. Se indica el número de eventos analizados (Ev).

Las células control presentaron el patrón característico de las células proliferantes (Figura 15 A) y podemos ver que el 56% de las células proliferantes se encuentran en fase G₁ (Tabla 1), esta proporción tiende a mantenerse en presencia tanto de TNF α como de dexametasona hasta las 8 h. Sin embargo, a partir de las 16 horas (Figura 16), comienza a observarse un incremento en el porcentaje de células en G₁ en presencia de dexametasona (de 56 a 95%). Al mismo tiempo, observamos una menor cantidad de células en fase S en presencia de dexametasona (de 27 a 2 % a las 0 y 48 horas respectivamente). En el caso de TNF α y dexametasona, este incremento se observa claramente a partir de las 24 horas y continúa hasta las 48 horas (78%).

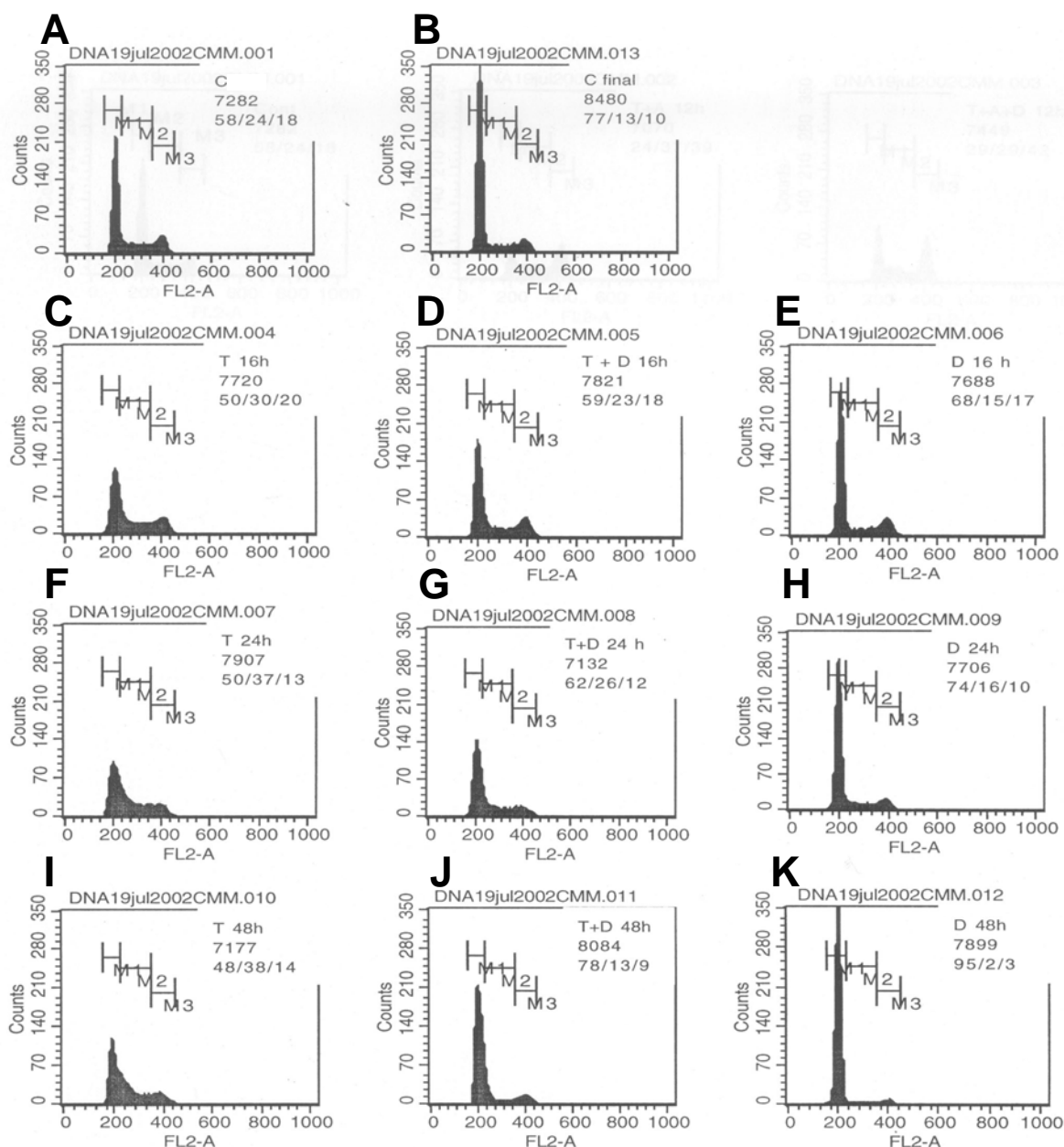


Figura 16. La dexametasona inhibe la proliferación e induce arresto en el ciclo celular a tiempos largos.

Cultivos proliferantes de fibroblastos L929 fueron crecidos en ausencia (A y B) o presencia de 1 ng/ml de $TNF\alpha$ (C, F e I), 1 ng/ml de $TNF\alpha$ y 10 μM de dexametasona (D, G y J) o 10 μM dexametasona (E, H y K) durante 16 (C, D y E), 24 (F, G y H) o 48 horas (I, J y K). Las células L929 sin tratamiento al tiempo cero (A) fueron utilizadas como control, y a células de otro cultivo similar (B), se les permitió proliferar hasta alcanzar confluencia (aproximadamente 72 horas) y por lo tanto arresto del ciclo celular (C final). Las células fueron fijadas con etanol para ser evaluadas por citometría de flujo. M1, M2 y M3 se asignaron para agrupar las células en fase G_0/G_1 , S y G_2/M respectivamente, y se muestran los porcentajes correspondientes. Se indica el número de eventos analizados (Ev).

Por el contrario, en el caso del tratamiento únicamente con $TNF\alpha$, no se observa un cambio en la distribución de las células en el ciclo celular. En ausencia de estímulo (Figura 16 B) se observa que al alcanzar confluencia las células se están deteniendo en la fase G_1 (77/13/10). Estos resultados en conjunto, muestran que el ciclo celular se está interrumpiendo en presencia de dexametasona. En presencia de $TNF\alpha$ y dexametasona el arresto en el ciclo celular se manifiesta de manera menos sensible, sin embargo, estos resultados no son concluyentes debido a que era de esperarse un efecto aditivo de la inhibición de la proliferación promovida por los estímulos independientes.

Tabla 1. La dexametasona induce inhibición de la proliferación y arresto en el ciclo celular a tiempos largos

Tiempo (h)	$TNF\alpha$	$TNF\alpha/Dex$	Dex
0 (Ctrl)	56/27/17	56/27/17	56/27/17
4	59/24/17	59/25/16	60/24/16
8	63/23/14	63/21/16	62/20/18
16	50/30/20	59/23/18	68/15/17
24	50/37/13	62/26/12	74/16/10
48	48/38/14	78/13/9	95/2/3

Cultivos de células L929 proliferantes se analizaron por citometría de flujo después de ser estimulados con 1 ng/ml de $TNF\alpha$ y/o 10 μ M de dexametasona durante el tiempo indicado. El cultivo control (Ctrl) no recibió tratamiento y es el mismo para todas las condiciones analizadas. Se muestran los porcentajes de células distribuidas en el ciclo celular separadas por una diagonal (G_0/G_1 , S y G_2/M).

11. DISCUSIÓN

Se ha demostrado que Akt promueve la sobrevivencia celular, y protege contra apoptosis a través de mecanismos que aún no se han clarificado completamente. Esta vía de señalización se activa rápidamente en respuesta a una variedad de hormonas esteroideas incluyendo los glucocorticoides (Falkenstein et al., 2000a; Falkenstein et al., 2000b; Falkenstein and Wehling, 2000). Por tanto, el efecto protector de la dexametasona contra la citotoxicidad del TNF- α en células L929 podría resultar de la activación de estos procesos. El uso de inhibidores farmacológicos como la wortmanina o formas dominantes negativas contra PI3K que carecen del sitio de unión a su subunidad reguladora p85 (Δ p85), nos permitió demostrar que al interferir con la vía de señalización de PI3K/Akt no se afecta la protección conferida por la dexametasona contra el efecto citotóxico inducido por el TNF α en células L929. Sin embargo, al interferir con la vía de señalización de NF- κ B a través de la sobreexpresión de una mutante de I κ B α (I κ B α m) que no puede ser degradada por carecer de los residuos de serina 32 y 36 donde normalmente se fosforila, se elimina completamente el efecto protector de la dexametasona.

Nuestros resultados son congruentes con lo ya reportado respecto a las concentraciones de TNF α utilizadas para observar efectos citotóxicos. En general, las concentraciones utilizadas oscilan entre 0.1 y 10 ng/ml dependiendo del linaje celular. En cuanto a la concentración de dexametasona utilizada, hay autores que reportan efectos protectores desde 0.1 hasta 50 μ M dependiendo, nuevamente, del tipo celular (Gorman et al., 2000; Messmer et al., 2001; Oh et al., 2006; Sasson and Amsterdam, 2003; Sasson et al., 2003; Webster et al., 2002b). Al igual que en este trabajo, otros autores reportan protección del 100% en presencia de dexametasona contra el efecto del TNF α en otros tipos celulares (Webster et al., 2002a).

Un hallazgo inesperado fue el hecho de que la protección conferida por dexametasona sea dependiente de la activación de NF- κ B, aun cuando la dexametasona por si misma no activa a este factor transcripcional (Figura 10, carril 3). Nuestros resultados sugieren que es la vía de señalización del TNF α la que

provee del NF- κ B activo necesario para la protección por dexametasona dado que la dexametasona no promueve la activación de NF- κ B. Esta visión refuerza la idea dentro del campo de TNF α , de que esta citocina activa simultáneamente señales antagonistas de sobrevivencia y muerte, y que el contexto celular es el que determina el balance final entre sobrevivencia y muerte.

La ausencia en la activación de NF- κ B, correlaciona notablemente con una disminución en el contenido de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs), sugiriendo su participación en la protección conferida por la dexametasona. Con los resultados obtenidos, sin embargo, no podemos distinguir en que medida el efecto protector depende de las IAPs, y si no hay participación de otros genes antiapoptóticos. Más aún, tampoco podemos distinguir si este efecto protector es dependiente de los efectos genómicos o de los no genómicos del receptor de glucocorticoides, en este momento no podemos descartar la participación de cualquiera de los dos o ambos.

La relevancia de la vía de PI3K/Akt en la activación de NF- κ B inducida por TNF α es todavía materia de controversia. Mientras que en algunos tipos celulares la vía de PI3K/Akt resulta esencial para la activación de NF- κ B (Ozes et al., 1999), en otros no es requerida (Madge and Pober, 2000). Por otra parte, en cultivos primarios de queratinocitos humanos la activación de PI3K/Akt ocurre sin la traslocación nuclear de NF- κ B (Liu et al., 2001), sugiriendo que la señalización de esta vía no necesariamente conduce a la activación de NF- κ B. Esta heterogeneidad podría incluir variaciones en la disponibilidad de los elementos de la vía de PI3K/Akt, por ejemplo, diferentes isoformas de las proteínas o vías alternas de la activación de NF- κ B. Como ya se mencionó en la introducción (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Estas diferencias observadas en la participación de la vía de PI3K/Akt en la activación de NF- κ B, podrían también deberse a diferencias de expresión y regulación inherentes al tipo o linaje celular.

A partir de los trabajos en los cuales se reconoció la activación de vías citoplásmicas de señalización inducidas por glucocorticoides que involucran a

PI3K/Akt (Buttgereit and Scheffold, 2002; Cato et al., 2002; Croxtall et al., 2000), se hizo necesario considerar su participación en las respuestas mediadas por esta hormona. En nuestro caso, era importante determinar la importancia del sistema PI3K/Akt en la protección conferida contra el $\text{TNF}\alpha$. En este trabajo, demostramos que la activación de NF- κ B y la protección mediada por dexametasona, son vías independientes de la vía de PI3K/Akt (Figura 6A) en células L929.

La ausencia de efecto por parte de la dominante negativa Δ p85 o la wortmanina, sobre la protección conferida por la dexametasona, indica que eventos posteriores, tales como la fosforilación de la proteína proapoptótica Bax (Datta et al., 1997) que se consideran la base de la protección asociada a PI3K, no son relevantes en el mecanismo de protección analizado en este trabajo. Se ha demostrado que la proporción de IKK α e IKK β , es un factor determinante para la activación de NF- κ B dependiente de PI3K/Akt en diferentes tipos celulares (Gustin et al., 2004b). En las células L929, la falta de interferencia en la activación de NF- κ B dependiente de $\text{TNF}\alpha$, podría ser explicada por una alta proporción de IKK α contra IKK β (Gustin et al., 2004a), lo cual redundaría en una mayor cantidad de NF- κ B traslocado al núcleo. En las células L929 se desconoce la proporción de los tres componentes del complejo IKK (IKK α , IKK β y la subunidad reguladora IKK γ /NEMO), por lo que se abre la posibilidad de estudios posteriores en este campo.

Tal y como se mencionó antes, los resultados obtenidos indican que la activación de NF- κ B es requerida para la protección mediada por dexametasona (Figura 12). Por esta razón, decidimos analizar la vía de señalización de NF- κ B. Nuestros resultados muestran que, durante la protección, el sistema I κ B/NF- κ B se activa por la vía canónica, que implica la fosforilación de I κ B en los residuos de serina 32 y 36, seguida de su degradación, lo que permite la traslocación de NF- κ B al núcleo. En apoyo a esta idea, observamos que la degradación de I κ B α endógeno y el nivel de activación de NF- κ B en las células parentales L929 en respuesta a $\text{TNF}\alpha$ y dexametasona, es marcadamente similar al observado cuando se trató a las células exclusivamente con $\text{TNF}\alpha$ (Figura 10, línea 2 panel superior y línea 4 panel inferior). Aunque se ha reportado que la dexametasona regula la expresión de los

receptores de $\text{TNF}\alpha$ en algunos tipos celulares (Kull, Jr., 1988; Monick et al., 1994), nuestros resultados muestran que la dexametasona no afecta la intensidad de la señalización inducida por los receptores de $\text{TNF}\alpha$ si consideramos que la cantidad de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ traslocado al núcleo es similar cuando se da el tratamiento combinado de $\text{TNF}\alpha$ y dexametasona (Figura 10, panel inferior).

Nosotros encontramos una relación entre la protección mediada por dexametasona contra el $\text{TNF}\alpha$ y la activación de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ dependiente de $\text{TNF}\alpha$ que podría representar por si mismo un mecanismo de protección, independientemente de los posibles mecanismos de regulación de los receptores de $\text{TNF}\alpha$. En cualquier caso queda por cuantificar la cantidad de receptores de $\text{TNF}\alpha$ durante el tratamiento combinado.

La falta de protección promovida por dexametasona contra la citotoxicidad inducida por $\text{TNF}\alpha$ en presencia de la mutante de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, correlaciona con la ausencia de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ en el núcleo (Figura 11). Si el papel de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ es relevante en la protección, sería de esperarse que al interferir con su activación, aun en ausencia de dexametasona, las células fueran más sensibles al efecto citotóxico del $\text{TNF}\alpha$. Apoyando esta idea, nuestros resultados muestran que las células L929 establemente transfectadas con $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ mutado son más sensibles de manera estadísticamente significativa al efecto citotóxico de la citocina (Figura 11). Comparando la cinética de muerte celular entre la línea parental y la transfectante que expresa la mutante de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, observamos que ésta última muere mucho más rápidamente y de manera más acentuada que la parental. Los resultados en conjunto, sugieren que la protección por dexametasona es dependiente de la activación de la vía de señalización de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ mediada por $\text{TNF}\alpha$.

Un probable mecanismo de la dexametasona para promover la protección es a través del fortalecimiento de las señales de sobrevivencia. Algunos estudios en los que se han realizado microarreglos de células tratadas con dexametasona, muestran la expresión de una gran variedad de genes (Deregowski et al., 2002b). Llama la atención que las proteínas antipoptóticas c-IAP1 y XIAP son inducidas en presencia del glucocorticoide en diferentes tipos celulares (Yoshida et al., 2002). La correlación que observamos entre el contenido celular de IAPs y el grado de

protección en presencia de dexametasona, sugiere que en este modelo, la activación de NF- κ B es requerida para la expresión dependiente de dexametasona de moléculas antiapoptóticas específicas. De hecho, se han identificado sitios κ B en los promotores de c-IAP1, c-IAP2 y XIAP (Deregowski et al., 2002a). En las células que expresan I κ B α mutado, la disminución acentuada de c-IAP1 y XIAP, que persiste incluso en presencia de dexametasona, correlaciona con un incremento en la susceptibilidad al TNF α . Queda por determinar si los transcritos de estas proteínas antiapoptóticas muestran el comportamiento esperado, lo cual reflejaría un efecto transcripcional directo.

La protección conferida por la dexametasona contra la citotoxicidad del TNF α en células L929, podría ser usada como un modelo para estudiar los mecanismos protectores involucrados en la resistencia a la remisión de tumores dependientes de hormonas esteroides, la cual es una característica frecuente en algunas formas agresivas de cáncer de mama y de próstata. En el caso de cáncer de glándula mamaria, la protección se asocia a la presencia del receptor de estrógenos. La activación del receptor está asociada a una progresión maligna y al desarrollo de metástasis, lo que condujo a terapias basadas en la interferencia con los estrógenos: la remoción quirúrgica de los ovarios que posteriormente fue sustituida por el uso de antagonistas del receptor de estrógenos (como el tamoxifen). Sería interesante evaluar la importancia del sistema NF- κ B en las células de cáncer de glándula mamaria dependiente de estrógenos, con el fin de corroborar si nuestros hallazgos se pueden extrapolar a un modelo de cáncer humano.

La necesidad de NF- κ B para la protección conferida por dexametasona contra la muerte celular dependiente de TNF α , apunta hacia NF- κ B como un posible blanco terapéutico. De hecho, existen reportes recientes en los que se propone a NF- κ B como posible blanco terapéutico en diversos tipos de cáncer (Fan et al., 2008; Holcomb et al., 2008; Sebens et al., 2008; Sethi et al., 2008). La interferencia con esta vía de señalización podría tener un efecto benéfico en el tratamiento de tumores dependientes de hormonas al hacerlos más sensibles al efecto de citocinas citotóxicas endógenas. Sin embargo, es importante no perder de vista que la

estrategia de inhibición de este factor, debe de estar enfocada a lograr una inhibición localizada y no sistémica.

Los resultados obtenidos con la mutante negativa en sistemas *in vitro*, son altamente específicos al interferir con la función de una sola proteína, en contraste con los estudios farmacológicos que pueden estar contaminados con interacciones imprevistas del fármaco. Desafortunadamente *in vivo*, aún no existen terapias génicas aplicables a ninguna enfermedad humana, por lo que sigue siendo necesario considerar las intervenciones farmacológicas. En este caso, los inhibidores de las IKKs como Bay117085, que *in vitro* es un inhibidor eficaz de la activación de NF- κ B, no son aplicables *in vivo* debido a su alta toxicidad (Pierce et al., 1997). La nueva generación de péptidos análogos a IKK γ , podría ser aplicable *in vivo*, sin embargo aún faltan estudios que garanticen su uso de manera segura en humanos. Por el momento, queda el uso de la aspirina (ácido acetilsalicílico) que al acetilar a las IKKs también se ha reconocido como un potente inhibidor de NF- κ B. Estudios retrospectivos con este fármaco, han mostrado un efecto favorable en la progresión de cáncer de colón (Din et al., 2004; Kim et al., 2006; Wong et al., 2003), y los efectos observados son atribuibles a la inhibición de NF- κ B.

Por otra parte, nosotros determinamos en experimentos preeliminares, que la dexametasona afecta el ciclo celular promoviendo arresto de las células en G₁, y en menor proporción en presencia de la citocina además de la dexametasona. También observamos que la dexametasona provoca una disminución considerable del porcentaje de células en fase S, lo cual correlaciona con lo observado en experimentos de conteo celular en los que observamos que ocurre una disminución del número celular sin presencia de células muertas, sugiriendo esto un efecto inhibitorio de la proliferación celular por parte de la dexametasona. Considerando los antecedentes, suponemos que el arresto en el ciclo celular promovido por la dexametasona podría tener un efecto cooperador (junto con los efectos promovidos por NF- κ B) en la ausencia de respuesta a la muerte por TNF α . Hasta ahora, con los resultados obtenidos no podemos determinar la medida en la que el ciclo celular contribuye al fenómeno que estudiamos. La búsqueda de ciclinas y de marcadores de ciclo celular, aportaría información que permita establecer la participación del

arresto del ciclo celular durante la protección mediada por dexametasona contra el efecto citotóxico del $\text{TNF}\alpha$.

Finalmente, reuniendo los datos generados en este estudio podemos sugerir un modelo para explicar la protección conferida por la dexametasona contra el efecto citotóxico del $\text{TNF}\alpha$, y en el cual $\text{NF-}\kappa\text{B}$ es un elemento esencial (Figura 17). Al unirse el $\text{TNF}\alpha$ a sus receptores de membrana, activa una cascada de señalización que involucra el acoplamiento de varias proteínas a la región citoplásmica del receptor. Esta cascada, tal y como ya se ha reportado, conduce a la activación tanto de señales de muerte celular (caspasas), como de sobrevivencia ($\text{NF-}\kappa\text{B}$ y PI3K). Sin embargo, a pesar de la activación de estas señales de sobrevivencia, el balance final en la activación de esta cascada conduce a muerte celular. En presencia de dexametasona, el destino de las células se dirige a sobrevivencia, y esta cascada, curiosamente, requiere del $\text{NF-}\kappa\text{B}$ activado por $\text{TNF}\alpha$ para que la dexametasona lleve a cabo sus efectos protectores contra la citotoxicidad de la citocina. Es importante considerar que la dexametasona por sí misma no induce la activación del factor transcripcional. En nuestro sistema, PI3K no contribuye a la protección conferida por dexametasona.

Por último, podríamos atribuir el efecto inhibitor de la citotoxicidad del $\text{TNF}\alpha$, a una combinación de mecanismos entre los que claramente, el factor transcripcional $\text{NF-}\kappa\text{B}$ es un elemento necesario, y la inhibición del ciclo celular podría estar contribuyendo al fenómeno de alguna manera hasta ahora no del todo clara.

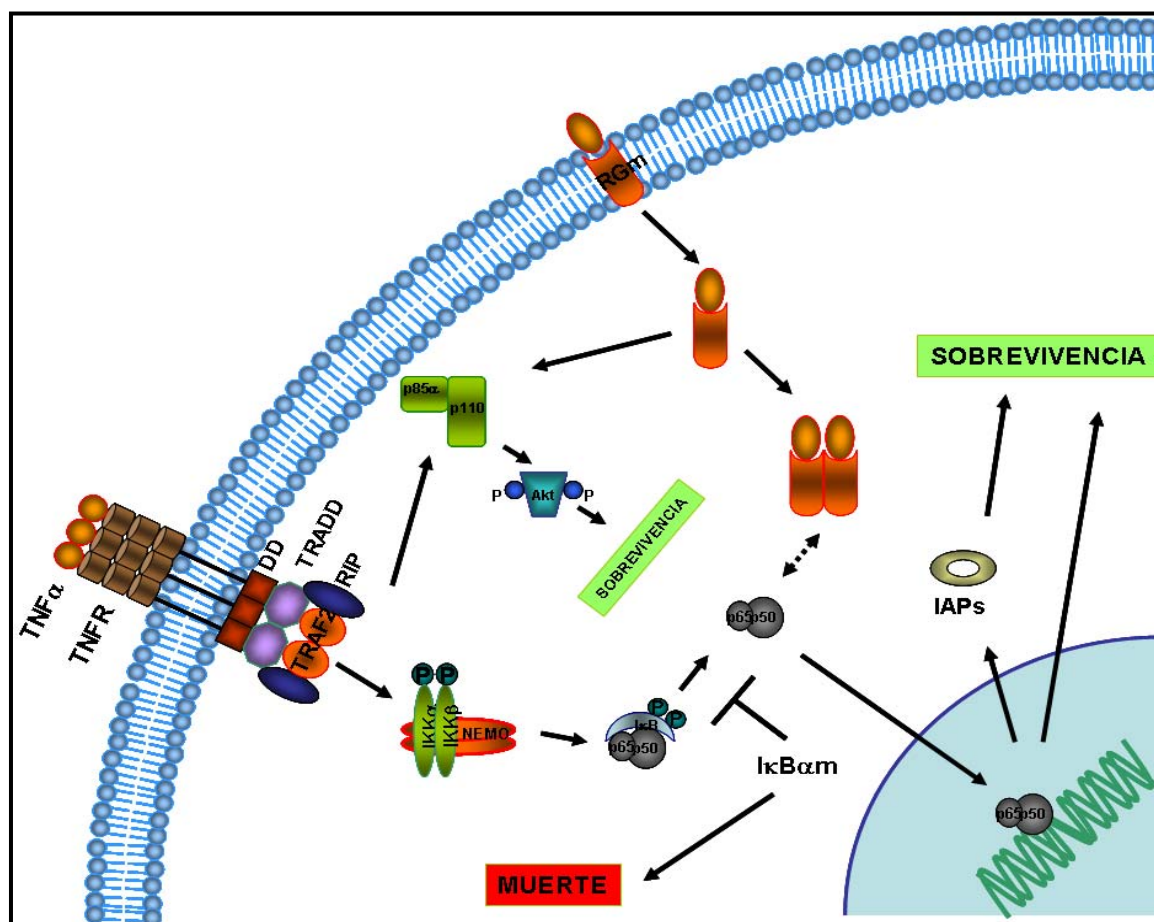


Figura 17. Representación esquemática del mecanismo propuesto para explicar la protección mediada por dexametasona contra el efecto citotóxico del $TNF\alpha$.

TNFR, receptor para $TNF\alpha$; DD, dominio de muerte; TRADD, proteína asociada al dominio de muerte del R-I ; RIP, proteína 1 de interacción con el receptor; TRAF2, factor 2 asociado al receptor de $TNF\alpha$; IKK, complejo de cinasas de κB ; p65/p50, heterodímero de $NF-\kappa B$; κB , inhibidor citoplásmico de $NF-\kappa B$; $\kappa B\alpha m$, inhibidor citoplásmico mutado de $NF-\kappa B$, no fosforilable; p85/p110, fosfatidil inositol 3 cinasa o PI3K; Akt, sustrato de la PI3K ; RGM, receptor de glucocorticoides membranaral; IAPs, proteínas inhibidoras de apoptosis.

12. CONCLUSIONES

1. La dexametasona confiere una protección completa (dependiente de la dosis) contra la citotoxicidad del $\text{TNF}\alpha$, a diferencia de otros mecanismos que solamente protegen transitoriamente.
2. La vía de PI3K/Akt, no parece ser relevante en el fenómeno de protección observado en presencia de dexametasona. Además, la inhibición de la vía de PI3K/Akt no interfiere con la activación normal de NF- κ B, por lo que en este modelo suponemos que no hay interrelación entre ambas vías.
3. La vía de NF- κ B es relevante en el fenómeno de protección contra la citotoxicidad del $\text{TNF}\alpha$ observado en presencia de dexametasona.
4. La ausencia de activación de NF- κ B en las células que sobreexpresan la forma mutada de I κ B, correlaciona con una exacerbación de la citotoxicidad en respuesta a $\text{TNF}\alpha$.
5. Las proteínas IAPs son un blanco importante posterior a la activación de NF- κ B, cuya cantidad correlaciona con la supervivencia en presencia de dexametasona.
6. La dexametasona provoca un arresto de las células en la fase G₁ del ciclo celular, que podría contribuir a la insensibilidad al efecto citotóxico del $\text{TNF}\alpha$ debido a la ausencia de ciclinas propias de dicha fase.
7. Las respuestas inducidas por $\text{TNF}\alpha$ son consecuencia de un balance entre señales proapoptóticas y antiapoptóticas que favorece a la muerte celular.

8. La presencia de dexametasona y $\text{TNF}\alpha$, determina que las señales inducidas por la citocina favorezcan las respuestas asociadas a supervivencia, en particular, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ y los blancos posteriores a este factor, tales como las IAPs.

9. Los resultados obtenidos, en conjunto, sugieren que $\text{NF-}\kappa\text{B}$ es un elemento esencial en la protección conferida por dexametasona contra el efecto citotóxico del $\text{TNF}\alpha$. La ausencia de activación de este factor transcripcional, incapacita a la célula para contener contra el efecto citotóxico desencadenado en respuesta al $\text{TNF}\alpha$ en presencia de dexametasona. Además, el aumento en la citotoxicidad observado durante la inhibición de $\text{NF-}\kappa\text{B}$, sugiere la participación de este factor en otras vías de supervivencia.

13. PERPECTIVAS Y CONSIDERACIONES FINALES

Los datos presentados en este trabajo, muestran que en nuestro sistema, la protección conferida por dexametasona contra el efecto citotóxico del $\text{TNF}\alpha$ requiere la participación de $\text{NF-}\kappa\text{B}$, y no así de PI3K/Akt . Nuestros resultados apoyan reportes previos, y abren la posibilidad de abordar nuevas preguntas que se derivan del mismo y que permitirían fortalecer la hipótesis que nos planteamos.

1. En este trabajo, estudiamos la participación de dos moléculas que se asocian a procesos de supervivencia y proliferación, durante la protección mediada por dexametasona contra la citotoxicidad del $\text{TNF}\alpha$. Sería interesante abordar la pregunta desde la perspectiva de las moléculas proapoptóticas. ¿Cómo se comportan las moléculas proapoptóticas, tales como los miembros de la familia Bcl-2 cuando se bloquea la muerte por dexametasona?, ¿Se lleva a cabo y cómo es la activación de caspasas durante la protección mediada por dexametasona contra el $\text{TNF}\alpha$?
2. Cuando se bloquea la activación de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ y por lo tanto la protección conferida por dexametasona (en las células que sobreexpresan la mutante de $\text{I}\kappa\text{B}$), ¿Cómo se comportan las moléculas proapoptóticas y antiapoptóticas tales como los miembros de la familia Bcl-2?, ¿cómo es la activación de caspasas en éstas células?
3. Se ha reportado que la dexametasona tiene efectos sobre la regulación del ciclo celular. Los datos mostrados en este trabajo, revelan que las células arrestadas en el ciclo celular por privación de factores de crecimiento, no son susceptibles al efecto citotóxico del $\text{TNF}\alpha$, en proporción similar a la observada con dexametasona. En

este sentido, la pregunta que nos planteamos es ¿Cómo se comportan algunos marcadores de ciclo celular (ciclinas) en las células protegidas por dexametasona contra la citotoxicidad del $\text{TNF}\alpha$?

4. Se sabe que los glucocorticoides inducen efectos no genómicos y genómicos de los cuales ya se habló en la introducción. Existen puntos de convergencia (cross-talk) que pueden ocurrir tanto a nivel citoplásmico como a nivel nuclear, entre algunos factores de transcripción (como $\text{NF-}\kappa\text{B}$) y el receptor de glucocorticoides. En nuestro modelo y con los datos generados, no podemos saber en que medida se ve afectada la maquinaria a nivel nuclear, y si la ausencia de protección por dexametasona en la mutante de $\text{I}\kappa\text{B}$, se debe a fenómenos que ocurren solamente en el citoplasma o también a nivel de la transcripción.
5. Dado que el receptor de glucocorticoides unido a su ligando se trasloca al núcleo y tiene funciones como factor transcripcional, surge una pregunta: ¿Cómo es la traslocación nuclear del receptor de glucocorticoides cuando las células se encuentran protegidas con dexametasona y cuando se inhibe la protección (en las células que sobreexpresan la mutante de $\text{I}\kappa\text{B}$)?, ¿Es comparable dicha traslocación? Si la respuesta fuera afirmativa, podríamos estar un poco más cerca de afirmar que en este modelo la protección se debe a respuestas de tipo genómico más que de tipo no genómico.
6. En este trabajo, pudimos observar cambios en el nivel de las IAPs en una primera aproximación. Sería interesante ahora, bloquear completamente a las IAPs (con RNAi por ejemplo), y evaluar el efecto de esta inhibición sobre la protección conferida por dexametasona contra la citotoxicidad del $\text{TNF}\alpha$.
7. Ya se han reportado microarreglos de células tratadas con dexametasona o con $\text{TNF}\alpha$, pero solamente por separado. En nuestro

sistema, sería de interés realizar microarreglos en células tratadas con ambos estímulos y determinar si existe alguna diferencia en los genes que se activan en respuesta a los estímulos separados y estímulos conjuntos.

8. Falta por examinar el ciclo celular en las células que sobreexpresan la mutante de I κ B α y que no traslocan NF- κ B. ¿De qué manera la ausencia de activación de NF- κ B afecta el ciclo celular?, ¿Las células que sobreexpresan la mutante de I κ B α ciclan más rápidamente y por lo tanto son más sensibles al efecto del TNF α ? , ¿Es diferente el patrón de expresión de ciclinas en estas células con respecto a la línea parental? y ¿De que manera la ausencia de activación de NF- κ B modifica este patrón de expresión de ciclinas?

NF- κ B activation but not PI3K/Akt is required for dexamethasone dependent protection against TNF- α cytotoxicity in L929 cells

Criselda Mendoza-Milla^{a,b,*}, Catalina Machuca Rodríguez^{a,b}, Emilio Córdova Alarcón^{a,b},
Adriana Estrada Bernal^c, E. Mayra Toledo-Cuevas^d, Eduardo Martínez Martínez^e,
Alejandro Zentella Dehesa^{a,b,*}

^a Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, D.F. 04510, México

^b Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", México, D.F. 14000, México

^c Department of Cell and Developmental Biology, University of Colorado School of Medicine, Aurora, CO 80045, USA

^d Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich. 58330, México

^e Departamento de Biología Celular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, D.F. 04510, México

Received 18 March 2005; revised 12 May 2005; accepted 29 May 2005

Available online 24 June 2005

Edited by Frances Shannon

Abstract Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) is one of the best-described cell death promoters. In murine L929 fibroblasts, dexamethasone inhibits TNF- α -induced cytotoxicity. Since phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) and nuclear factor kappa B (NF- κ B) proteins regulate several survival pathways, we evaluated their participation in dexamethasone protection against TNF- α cell death. We interfered with these pathways by over-expressing a negative dominant mutant of PI3K or a non-degradable mutant of inhibitor of NF- κ B alpha (I κ B α) (the cytoplasmic inhibitor of NF- κ B) in L929 cells. The mutant I κ B, but not the mutant PI3K, abrogated dexamethasone-mediated protection. The loss of dexamethasone protection was associated with a diminished accumulation in XIAP and c-IAP proteins.

© 2005 Published by Elsevier B.V. on behalf of the Federation of European Biochemical Societies.

Keywords: TNF- α ; I κ B; IAP; Cytotoxicity; Dexamethasone; L929 cells

1. Introduction

Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) is a cytokine that induces cell death through specific receptors (TNF-RI and TNF-RII) [1–3], the cytotoxicity pathway involves the activation of caspases 8 and 10 [4]. Parallel to this death signaling pathway, an antagonist nuclear factor kappa B (NF- κ B)-dependent survival response is activated [5]. The final balance between this two opposing signals determines the fate of the cells exposed to TNF- α .

The TNF- α -mediated cytotoxic effect on L929 is a well characterized model, that involves strong necrotic and apoptotic components [6]. While TNF- α -dependent cell death is only delayed by overexpression of Bcl-2 [7], the synthetic glucocorticoid (GC) dexamethasone, confers complete protection against TNF- α cytotoxicity [8].

Cellular responses to GCs require the formation of an active complex with the glucocorticoid cytoplasmic receptor (GR) that modulates transcriptional activity [9], leading to the expression or repression of a large variety of target genes [10]. In addition to these direct nuclear effects, dexamethasone has been shown to promote cytosolic activation of phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) and Akt proteins associated to different survival pathways [11,12].

Two main pathways of cell survival have been described: one regulated by NF- κ B, and the other by PI3K. Inactive NF- κ B is retained in the cytoplasm bound to inhibitor of NF- κ B (I κ B) family members [13]. Upon activation through TNF- α -dependent phosphorylation and ubiquitin-mediated degradation of the I κ B proteins, NF- κ B translocates to the nucleus and upregulates a panel of proteins, including the anti-apoptotic proteins c-IAP1, c-IAP2 and XIAP [14,15]. Deficiencies in NF- κ B activation or inhibition of new protein production render a cell extremely sensitive to TNF- α [16].

The ability of the PI3K/Akt pathway to suppress apoptosis has been attributed to both Bad and caspase-9 phosphorylation [17] as well as to ceramide regulation [18]. In addition to these anti-apoptotic effects, TNF- α -dependent activation of Akt can also contribute to cell survival by activating NF- κ B [19].

It has been demonstrated that NF- κ B is able to inhibit apoptosis triggered by TNF- α [20], and that NF- κ B activation by both, constitutively active PI3K or Akt suppresses TNF- α -dependent apoptosis of MCF7 and HEK 293 cells [18].

In this study, we have interfered with the PI3K/Akt or the NF- κ B pathways in an attempt to abrogate the protection conferred by dexamethasone against TNF- α -induced cytotoxicity in L929 cells. While the PI3K/Akt pathway is not involved in the dexamethasone protection against TNF- α cell death, disruption of the NF- κ B pathway by a non-degradable I κ B mutant abolished the protection conferred by dexamethasone. In addition, the loss of dexamethasone protection was

*Corresponding authors. Fax: +1 52 55 56 66 00 11.

E-mail addresses: cmendoza@ifc.unam.mx (C. Mendoza-Milla), bioquim@quetzal.innsz.mx (A.Z. Dehesa).

Abbreviations: TNF- α , tumor necrosis factor alpha; NF- κ B, nuclear factor kappa B; I κ B, inhibitor of NF- κ B; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; PI3K, phosphatidylinositol 3 kinase; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; Ab, antibody

associated with a lower accumulation of anti-apoptotic XIAP and c-IAP proteins.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and reagents

Murine L929 cells were obtained from ATCC and subcloned by serial dilutions. We used one specific clone with high sensitivity to TNF- α for all experiments [21]. Cells were grown in minimum essential medium (MEM) supplemented with 1 mM glutamine, 1% (v/v) penicillin/streptomycin and 10% FBS at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Cytotoxicity experiments were performed at a cell density of 20000 cells/cm² on 10 cm dishes or 48-well plates. Murine recombinant TNF- α and polyclonal antibody (pAb) against c-IAP1, XIAP and β -actin were from R&D Systems (Minneapolis, MN), pAb against phosphorylated and total Akt were from Pharmingen (San Diego, CA). Abs against I κ B α , and consensus oligonucleotide for NF- κ B were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Horseradish peroxidase-conjugated, anti-rabbit IgG, anti-goat IgG (Zymed, San Francisco, CA), or anti-mouse IgG (Pierce, Rockford, IL) were used. All other reagents used were obtained from Sigma-Aldrich.

2.2. Cell viability assays

Cell viability was evaluated by crystal violet staining as previously described [22]. Briefly, cells were treated as indicated, and fixed with 1.1% glutaraldehyde at the end of each experiment. After washing with de-ionized water and air-dried plates were stained with a 0.1% crystal violet solution. The bound dye was solubilized with 10% acetic acid and quantified at 590 nm (Bio-Tec Instruments, Winoosky, VT).

2.3. Expression plasmids and generation of stable transfectants

Plasmids SR α - Δ p85 (kindly provided by Dr. W. Ogawa and Dr. M. Kasuga [23]), containing the cDNA of the dominant-negative mutant p85 α -regulatory subunit of PI3K lacking the p110 binding site, and pCMV4-I κ B α mutant (kindly provided by Dr. Dean Ballard and Dr. Goeddel [24]), containing flag I κ B α with a double point mutation S32/36-A32/36, were used to subclone the Δ p85 or I κ B α cDNAs into pCLNX-GFPN (kindly provided by Dr. C. Cárdenas Aguayo, CINVESTAV, Mexico). L929 cells were (3×10^5) were seeded on 6-well plates 24 h before transfection with 1 μ g of the plasmid DNA, using a calcium phosphate transfection kit (Invitrogen Co., CA) following the manufacturer's instructions. The clones were selected with 2.5 mg/ml G418 (Gibco BRL, Rockville, MD). In both cases, expression of the recombinant proteins was revealed by Western blot. At least two stable clones and one control clone with an empty vector were used in all experiments. Transfection efficiency was standardized according to fluorescence of the GFP.

2.4. Nuclear extract preparation and EMSA

Nuclear translocation of NF- κ B was evaluated by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Cells were stimulated with 1 ng/ml recombinant TNF- α for the indicated times and nuclear protein was obtained as described earlier [25]. Protein concentrations were determined using a commercial Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA). EMSA was performed as previously described [26] on 5% polyacrylamide gels. Dried gels were exposed to a Storage Phosphor Screen and scanned with a Storm 850 Phosphorimager (Molecular Dynamics, San Francisco, CA). Gels were analyzed with the Image Quant software (Molecular Dynamics).

2.5. Western blot analysis

Total protein lysates (50 μ g) were separated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and transferred to a Hybond-ECL nitrocellulose membrane (Amersham, Buckinghamshire, UK) as described before [25]. Membranes were blocked with 5% skimmed milk and probed with the indicated Abs. The antigen-antibody complex was detected by enhanced chemiluminescence (Pierce). Signals were normalized against β -actin.

2.6. Statistical analysis

Data are presented as mean values \pm S.E.M. and *P* values were determined by unpaired Student's *t* test. All experiments were performed in triplicates and were repeated at least three times. For Western blot and EMSA, a representative assay is shown.

3. Results

3.1. Dexamethasone confers protection against TNF- α cytotoxicity

In L929 cells TNF- α -induced cell death in a dose and time dependent manner (Fig. 1A). After 24 h of treatment with 1 ng/ml, cell viability fell down to 16%, and by 48 h it was below 2%. At a higher dose (5 ng/ml), the viability decreased to 4% at 24 h and was undetectable by 48 h (Fig. 1A). The treatment of L929 cells with TNF- α (1 ng/ml) and increasing doses of dexamethasone (0.01–10 μ M) for 24 h shown suppression of the TNF- α -induced cell death in a dose-dependent way (Fig. 2B). Complete protection occurred at 10 μ M, even after 72 h of culture (data not shown).

3.2. The PI3K–Akt signaling pathway is not involved in the dexamethasone-mediated protection from TNF- α

In order to evaluate the role of the PI3K/Akt pathway in the protection conferred by dexamethasone against the TNF- α -induced cell death, we used wortmannin [19] or a dominant

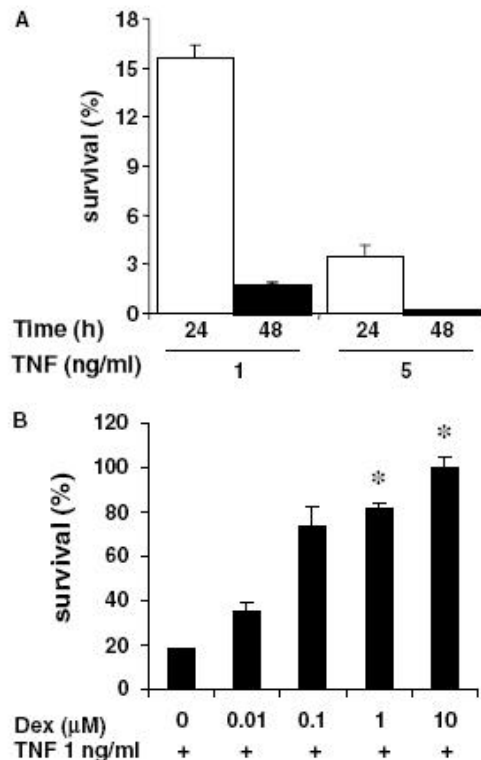


Fig. 1. Dexamethasone prevented TNF- α cytotoxicity in L929 cells. (A) Cell survival of L929 cells stimulated with TNF- α (1 or 5 ng/ml) for either 24 or 48 h. The percent is in respect with an untreated control. (B) Cell survival of L929 cells stimulated with TNF- α and increasing concentrations of dexamethasone (Dex) for 24 h. The percent is in respect with controls treated with indicated doses of dexamethasone. **P* < 0.05 vs. control.

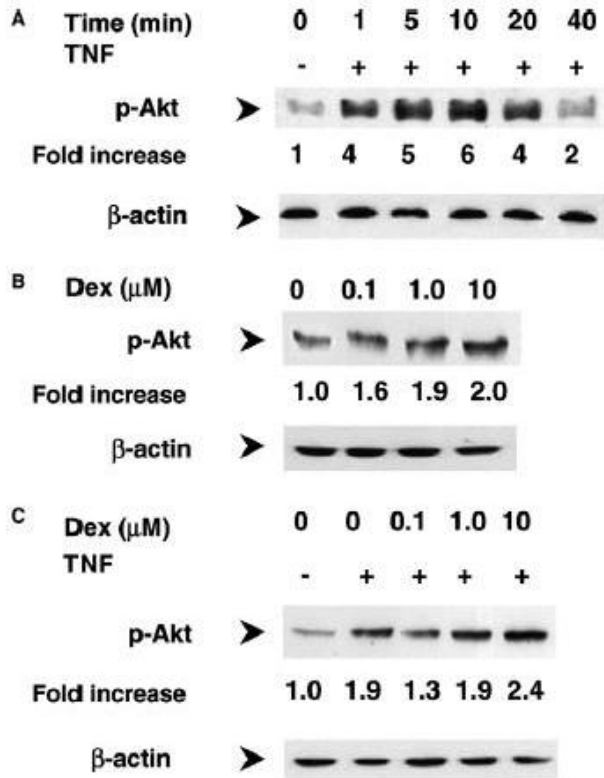


Fig. 2. Dexamethasone had no effect on the TNF- α -induced activation of Akt. (A) Western blot against phosphorylated Akt protein (pAkt) or β -actin in total lysates of L929 cells exposed to 1 ng/ml of TNF- α during 1, 5, 10, 20, and 40 min; (B) increasing concentrations of dexamethasone during 20 min; or (C) co-incubated with 1 ng/ml of TNF- α at the indicated concentrations of dexamethasone during 20 min.

negative form of PI3K (Δ p85). PI3K activation was measured by evaluating the phosphorylation of Akt using phospho-specific antibodies. In the parental cell line, TNF- α induced a transient time-dependent increase in Akt phosphorylation with a maximal induction (6-fold) at 10 min compared with untreated control (Fig. 2A). Addition of dexamethasone alone or TNF- α plus dexamethasone induced similar Akt phosphorylation levels (Fig. 2B and C) that were lower than the one induced by TNF- α . In all cases β -actin was used as loading control.

TNF- α -induced phosphorylation of Akt was completely blocked in parental cells treated with wortmannin and in Δ p85 expressing cells (Fig. 3A, second and third rows). Inhibition of Akt phosphorylation by wortmannin or Δ p85 expression, did not affect the nuclear translocation of NF- κ B (Fig. 3A, bottom row), neither the protective effect of dexamethasone against TNF- α cytotoxicity (Fig. 3B). We assured that pharmacologically active wortmannin was present even after 24 h of incubation by analyzing its ability to interfere with TNF- α -dependent Akt phosphorylation. In Δ p85 stable transfectants, the amount of NF- κ B translocated to the nucleus in basal conditions and following TNF- α treatment were similar to those in parental L929 cells (data not shown). These results suggest that the PI3K/Akt pathway is not relevant for the protection conferred by dexamethasone against TNF- α -induced cell death in L929 fibroblasts.

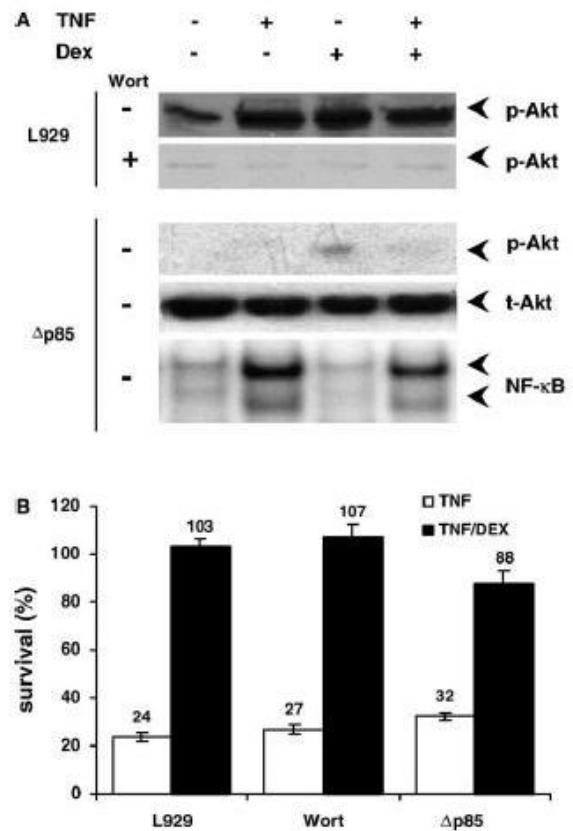


Fig. 3. Dexamethasone protection against TNF- α -induced cell death was not mediated by Akt function. (A) Western blot against phosphorylated (pAkt) or total (tAkt) Akt protein in parental (L929), or negative dominant (Δ p85) expressing cells. Membranes were stripped and re-blotted when required. When indicated cells were treated with 1 μ M wortmannin (Wort). The bottom panel (NF- κ B) corresponds to nuclear translocation of NF- κ B in Δ p85-expressing cells treated as indicated. Cells were incubated for 20 min with 1 ng/ml of TNF- α , 10 μ M dexamethasone or both. (B) Cell survival with TNF- α (1 ng/ml) (white bars) or TNF- α plus dexamethasone (10 μ M) (black bars), in parental cell line, in the presence of 1 μ M wortmannin (Wort) or in negative dominant (Δ p85) cells, stimulated for 24 h.

3.3. NF- κ B signaling pathway is required for dexamethasone protection against TNF- α -induced cell death

To evaluate the participation of the NF- κ B pathway in the protection conferred by dexamethasone against TNF- α cytotoxicity, we blocked nuclear translocation with a non-degradable mutant I κ B protein (I κ B Δ m). In the parental cell line, dexamethasone did not affect NF- κ B activation either I κ B α degradation (Fig. 4).

In contrast to endogenous I κ B α , the I κ B Δ m protein was not degraded after TNF- α stimulus (Fig. 5A), and prevented nuclear translocation of NF- κ B (Fig. 5B). The overexpression of I κ B Δ m dramatically abrogated the dexamethasone (10 μ M) protection against TNF- α (1 ng/ml), reducing survival from 100% to 22% at 24 h (Fig. 5C), suggesting that NF- κ B participates in the dexamethasone protection against TNF- α . Moreover, the expression of the I κ B Δ m protein significantly increased cell death mediated by TNF- α , reducing viability from 19% to 11%. Since dexamethasone on its own had no effect on NF- κ B activation, nor did it affect NF- κ B nuclear levels during TNF- α stimulation (Fig. 4), it appears that the

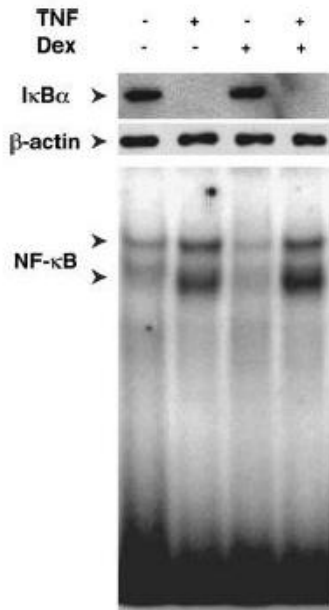


Fig. 4. Dexamethasone had no effect on the TNF- α -induced activation of NF- κ B. Western blot of I κ B (upper panel) or β -actin, and nuclear translocation of NF- κ B (lower panel), in parental cell line treated as indicated, stimulated for 20 min with 1 ng/ml of TNF- α , 10 μ M dexamethasone or both.

NF- κ B required during dexamethasone protection is provided by TNF- α stimulation.

3.4. Loss of dexamethasone protection by NF- κ B inactivation is associated with downregulation of IAP proteins

In an attempt to determine the effect of I κ B α m expression on c-IAP and XIAP protein levels we followed their cellular content by Western blot analysis. Our results shown that TNF- α induced a time-dependent reduction in both, c-IAP and XIAP protein levels (Fig. 6), which correlate with the onset of cell death in L929 cells. Dexamethasone inhibited the reduction of the IAP protein levels induced by TNF- α (Fig. 6, TNF/Dex). In contrast, I κ B α m increased the downregulation of IAPs induced by TNF- α , even in the presence of dexamethasone (Fig. 6).

4. Discussion

It has been shown that Akt promotes cell survival, and protects against apoptosis through mechanisms not fully understood. Using pharmacological inhibitors or negative dominants against PI3K, we found that interfering with the PI3K/Akt signaling pathway had no effect on the protection conferred by dexamethasone against TNF- α cytotoxicity on L929 cells. Interference with the NF- κ B signaling pathway through an I κ B α m completely eliminated the protective effect of dexamethasone. Also, the absence of NF- κ B activation correlated with a marked decrease of the content of the apoptosis inhibitory proteins (IAPs), suggesting their involvement in this phenomenon.

In this moment, we cannot distinguish if the protective effect of dexamethasone against the TNF- α observed in our system,

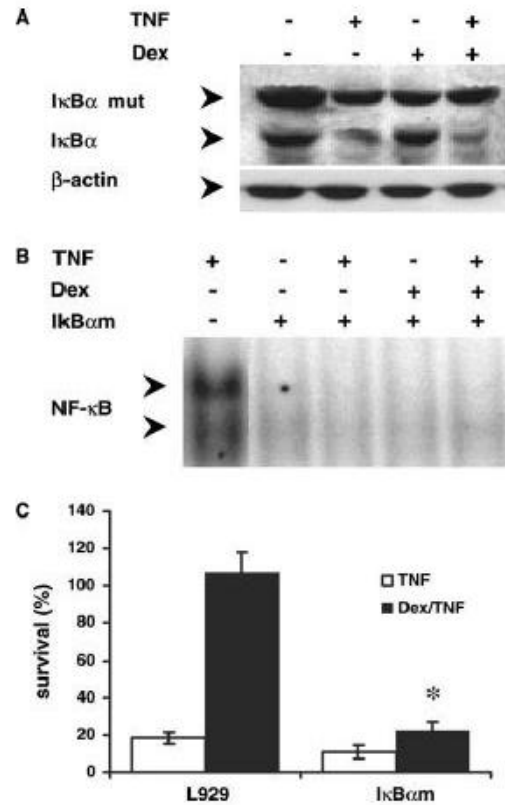


Fig. 5. Dexamethasone protection against TNF- α -induced cell death requires NF- κ B. (A) Western blot of I κ B α or β -actin in cells expressing the mutant form (I κ B α m), overexpressed and endogenous I κ B proteins are indicated. (B) Nuclear translocation of NF- κ B, in parental (first lane) and I κ B α m cells (lanes 2–5). Cells were stimulated as in Fig. 4. (C) Cell survival in parental (L929) and I κ B α m cells treated for 24 h with TNF- α (1 ng/ml) (white bars) or TNF- α plus dexamethasone (10 μ M) (black bars). * P < 0.01 vs. parental cell line.

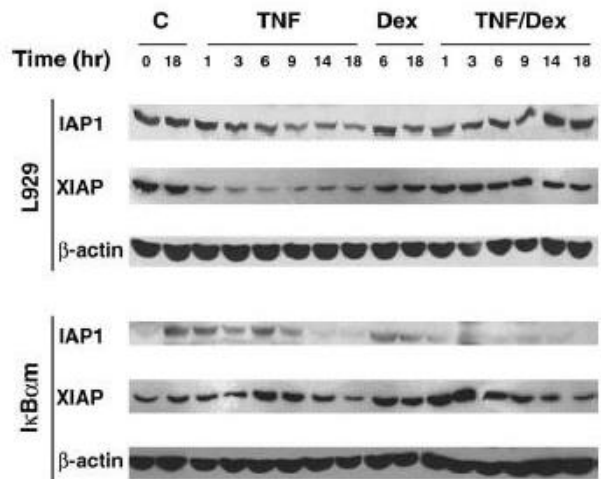


Fig. 6. Inactivation of the NF- κ B pathway reduces protein levels of c-IAP and XIAP. Western blot of c-IAP1, XIAP or β -actin in parental cells (L929) or I κ B α m-expressing cells (I κ B α m) treated as in Fig. 4. Membranes were stripped and re-blotted when required.

is dependent on the GR or on a different steroid receptor, nor discarding a possible combination of both of them.

Participation of the PI3K/Akt pathway in the NF- κ B activation induced by TNF- α is a controversial issue. The differences observed in the participation of the PI3K/Akt on the NF- κ B activation could be due to several reasons, including intrinsic differences in cell types or lineages. While in some cell types PI3K/Akt is essential for NF- κ B activation [19], in others this is not required [27]. In another hand, in primary human keratinocytes PI3K/Akt activation occurs without NF- κ B nuclear translocation [28], suggesting that this pathway does not necessarily lead to NF- κ B activation. This heterogeneity could include also variations in the concentration of the different elements of the PI3K/Akt pathway, e.g., different isoforms of them or alternative NF- κ B activating pathways. In this work, we showed that NF- κ B activation and dexamethasone protection are independent of PI3K/Akt pathway (Fig. 3A) on L929 cells.

The lack of effect by Δ p85 or wortmannin indicates that down stream events, such as Bax phosphorylation [17], are not relevant in the protection mechanism of dexamethasone. It has been shown that the proportion of IKK α vs. IKK β is a determining factor for the PI3K/Akt-dependent activation of NF- κ B in different cell types [29]. In Δ p85 cells, the lack of interference with TNF- α dependent NF- κ B activation, could be explained by a higher proportion of IKK β vs. IKK α [29].

As mentioned above, NF- κ B activation is required for dexamethasone-mediated protection and for this reason we decided to analyze the NF- κ B signaling pathway. In support of the importance of the NF- κ B pathway, we observed that the level of NF- κ B activation and degradation of endogenous I κ B in parental L929 cells observed in response to TNF- α plus dexamethasone, is remarkably similar to that observed when treated only with TNF- α (Fig. 4, lanes 4 and 2, respectively, upper and bottom panels). Although dexamethasone has been reported to regulate TNF- α receptors in some cell types [30,31], our results suggest that dexamethasone does not affect the strength of signaling of TNF- α receptors. We found a link between dexamethasone protection against TNF- α and TNF- α -dependent activation of NF- κ B that may represents by itself a protective mechanism, irrespective of the possible regulation of TNF- α receptors.

Abrogation of the protection promoted by dexamethasone against the TNF- α -induced cytotoxicity in the presence of I κ m B α m, correlates with the absence of NF- κ B nuclear translocation (Fig. 5). In support of the importance of NF- κ B in the protection, our results show that L929 cells stably transfected with mutated I κ B α where much more sensitive to the cytotoxic effect of TNF- α (Fig. 5). Comparing the kinetics of cell death between wild type and the mutant I κ B α cloned cells expressing the I κ B α m, the clones died faster and to a greater extent (data not shown). Taken together, our results suggest that dexamethasone protection is dependent on the TNF- α -mediated activation of the NF- κ B signaling pathway.

A likely way for dexamethasone to provide protection is by strengthening the survival signals. Microarray studies in dexamethasone treated cells show expression of a great variety of genes [32], interestingly, the anti-apoptotic proteins IAP1 and XIAP are induced in the presence of the glucocorticoid in different cell lines [33]. The correlation that we observed between the cellular content of IAPs and the protection degree in

the presence of dexamethasone, suggest that in this model, NF- κ B activation is required for a dexamethasone dependent expression of specific anti-apoptotic molecules. In fact, κ B sites have been identified in IAP1, IAP2 and XIAP promoters [32]. In cells expressing the I κ B α m, the enhanced downregulation of IAP1 and XIAP that persists even in the presence of dexamethasone, correlates with the increased susceptibility to TNF- α , and further supports the notion that NF- κ B signaling is essential to protection conferred by dexamethasone.

The protection conferred by dexamethasone against TNF- α -cytotoxicity on L929 cells has been used as a model to study the protective mechanisms involved in steroid hormone dependent tumor resistance, a frequent characteristic in aggressive forms of breast and prostate cancer.

The requirement of NF- κ B for the protection conferred by dexamethasone against TNF- α -mediated cell death points toward the NF- κ B pathway as a possible therapeutic target. Interference with this signaling pathway could have a beneficial effect in the treatment of hormone-dependent tumors rendering them more susceptible to the effect of endogenous cytotoxic cytokines.

Acknowledgments: Supported by CONACyT grant P45519216 and a donation from the Cooperativa La Cruz Azul, and fellowships from CONACyT and DGAPA, UNAM for Criselda Mendoza. We acknowledge Dr. Laura Ongay (Unidad de Biología Molecular, IFC, UNAM) for the use of phosphorimager, Dr. Maria del C. Cárdenas and Dr. Luis Covarrubias (IBT, UNAM), for the pCLNX-GFPN plasmid. We acknowledge José Luis Ventura (IFC, UNAM) for culture media preparation. We thank Dr. Salvador Mejía for critical review of the manuscript.

References

- [1] Hsu, H., Xiong, J. and Goeddel, D.V. (1995) The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappaB activation. *Cell* 81, 495–504.
- [2] Sipe, K.J., Dantzer, R., Kelley, K.W. and Weyhenmeyer, J.A. (1998) Expression of the 75 kDa TNF receptor and its role in contact-mediated neuronal cell death. *Brain Res. Mol Brain Res.* 62, 111–121.
- [3] Thoma, B., Grell, M., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P. (1990) Identification of a 60-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor as the major signal transducing component in TNF responses. *J. Exp. Med.* 172, 1019–1023.
- [4] Gupta, S. (2002) A decision between life and death during TNF-alpha-induced signaling. *J. Clin. Immunol.* 22, 185–194.
- [5] Hehner, S.P., Hofmann, T.G., Ratter, F., Dumont, A., Droge, W. and Schmitz, M.L. (1998) Tumor necrosis factor-alpha-induced cell killing and activation of transcription factor NF-kappaB are uncoupled in L929 cells. *J. Biol. Chem.* 273, 18117–18121.
- [6] Humphreys, D.T. and Wilson, M.R. (1999) Modes of L929 cell death induced by TNF-alpha and other cytotoxic agents. *Cytokine* 11, 773–782.
- [7] Vanhaesebroeck, B., Reed, J.C., De Valck, D., Grooten, J., Miyashita, T., Tanaka, S., Beyaert, R., Van Roy, F. and Fiers, W. (1993) Effect of bcl-2 proto-oncogene expression on cellular sensitivity to tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity. *Oncogene* 8, 1075–1081.
- [8] Pagliacci, M.C., Migliorati, G., Smacchia, M., Grignani, F., Riccardi, C. and Nicoletti, I. (1993) Cellular stress and glucocorticoid hormones protect L929 mouse fibroblasts from tumor necrosis factor alpha cytotoxicity. *J. Endocrinol. Invest.* 16, 591–599.
- [9] Schoneveld, O.J., Gaemers, I.C. and Lamers, W.H. (2004) Mechanisms of glucocorticoid signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1680, 114–128.
- [10] De Bosscher, K., Vanden Berghe, W. and Haegeman, G. (2003) The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear

- factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr. Rev.* 24, 488–522.
- [11] Krasil'nikov, M.A., Luzai, E.V., Scherbakov, A.M., Shatskaya, V.A., Shtil, A.A. and Gershtein, E.S. (2004) Role of phosphatidylinositol-3 kinase in regulation of differential sensitivity of melanoma cells to antitumor agents. A model for hormone resistance development in tumor cells. *Biochemistry (Mosc.)* 69, 322–330.
- [12] Franke, T.F., Hornik, C.P., Segev, L., Shostak, G.A. and Sugimoto, C. (2003) PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 22, 8983–8998.
- [13] Karin, M. and Lin, A. (2002) NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.* 3, 221–227.
- [14] Karin, M. and Ben Neria, Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kappaB activity. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 621–663.
- [15] Wang, C.Y., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V. and Baldwin Jr., A.S. (1998) NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281, 1680–1683.
- [16] Van Antwerp, D.J., Martin, S.J., Kafri, T., Green, D.R. and Verma, I.M. (1996) Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* 274, 787–789.
- [17] Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. and Greenberg, M.E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231–241.
- [18] Burow, M.E., Weldon, C.B., Melnik, L.I., Duong, B.N., Collins-Burow, B.M., Beckman, B.S. and McLachlan, J.A. (2000) PI3-K/AKT regulation of NF-kappaB signaling events in suppression of TNF-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271, 342–345.
- [19] Ozes, O.N., Mayo, L.D., Gustin, J.A., Pfeffer, S.R., Pfeffer, L.M. and Donner, D.B. (1999) NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 401, 82–85.
- [20] Beg, A.A. and Baltimore, D. (1996) An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274, 782–784.
- [21] Gomez, E.O., Mendoza-Milla, C., Ibarra-Sanchez, M.J., Ventura-Gallegos, J.L. and Zentella, A. (1996) Ceramide reproduces late appearance of oxidative stress during TNF-mediated cell death in L929 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 228, 505–509.
- [22] Lopez-Marure, R., Gutierrez, G., Mendoza, C., Ventura, J.L., Sanchez, L., Reyes, M.E., Zentella, A. and Montano, L.F. (2002) Ceramide promotes the death of human cervical tumor cells in the absence of biochemical and morphological markers of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 1028–1036.
- [23] Hara, K., Yonezawa, K., Sakaue, H., Ando, A., Kotani, K., Kitamura, T., Kitamura, Y., Ueda, H., Stephens, L. and Jackson, T.R. (1994) 1-Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for RAS activation in CHO cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7415–7419.
- [24] Brockman, J.A., Scherer, D.C., McKinsey, T.A., Hall, S.M., Qi, X., Lee, W.Y. and Ballard, D.W. (1995) Coupling of a signal response domain in I kappaB alpha to multiple pathways for NF-kappaB activation. *Mol. Cell Biol.* 15, 2809–2818.
- [25] Macotela, Y., Mendoza, C., Corbacho, A.M., Cosio, G., Eiserich, J.P., Zentella, A., Martinez, d.I.E. and Clapp, C. (2002) 16K prolactin induces NF-kappaB activation in pulmonary fibroblasts. *J. Endocrinol.* 175, R13–R18.
- [26] Estrada-Bernal, A., Mendoza-Milla, C., Ventura-Gallegos, J.L., Lopez-Bojorquez, L.N., Miranda-Peralta, E., Arechavaleta-Velasco, F., Vadillo-Ortega, F., Sanchez-Sanchez, L. and Zentella-Dehesa, A. (2003) NF-kappaB dependent activation of human endothelial cells treated with soluble products derived from human lymphomas. *Cancer Lett.* 191, 239–248.
- [27] Madge, L.A. and Pober, J.S. (2000) A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway, activated by tumor necrosis factor or interleukin-1, inhibits apoptosis but does not activate NFkappaB in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 275, 15458–15465.
- [28] Liu, H., Perlman, H., Pagliari, L.J. and Pope, R.M. (2001) Constitutively activated Akt-1 is vital for the survival of human monocyte-differentiated macrophages. Role of Mcl-1, independent of nuclear factor (NF)-kappaB, Bad, or caspase activation. *J. Exp. Med.* 194, 113–126.
- [29] Gustin, J.A., Ozes, O.N., Akca, H., Pincheira, R., Mayo, L.D., Li, Q., Guzman, J.R., Korgaonkar, C.K. and Donner, D.B. (2004) Cell type-specific expression of the IkappaB kinases determines the significance of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling to NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* 279, 1615–1620.
- [30] Kull Jr., F.C. (1988) Reduction in tumor necrosis factor receptor affinity and cytotoxicity by glucocorticoids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153, 402–409.
- [31] Monick, M.M., Akçamit, T.R., Geist, L.J. and Hunninghake, G.W. (1994) Dexamethasone inhibits IL-1 and TNF activity in human lung fibroblasts without affecting IL-1 or TNF receptors. *Am. J. Physiol.* 267, L33–L38.
- [32] Deregowski, V., Delhalle, S., Benoit, V., Bours, V. and Merville, M.P. (2002) Identification of cytokine-induced nuclear factor-kappaB target genes in ovarian and breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 64, 873–881.
- [33] Yoshida, N.L., Miyashita, T.U.M., Yamada, M., Reed, J.C., Sugita, Y. and Oshida, T. (2002) Analysis of gene expression patterns during glucocorticoid-induced apoptosis using oligonucleotide arrays. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 1254–1261.

14.2 ANEXO 2: ABREVIATURAS

Akt	PKB; proteína cinasa B
AMP	Adenosina 5´monofosfato
ATP	Adenosina 5´trifosfato
CREB	Proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DD	Dominio de muerte
DED	Dominio efector de la muerte
DISC	Complejo de señalización inductor de la muerte
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EMSA	Ensayo de retardo en la movilidad electroforética
Erk	Cinasa regulada por señales extracelulares
FADD	Proteína asociada al dominio de muerte de Fas
FAS-L	Ligando de FAS
I. F.	Intensidad de fluorescencia
I κ B	Inhibidor del factor de transcripción nuclear de la cadena κ de anticuerpos de las células B
IKK	Complejo de cinasas inhibitoras de I κ B
IL-1 β	Interleucina 1 beta
LPS	Lipopolisacárido
LT α	Linfotoxina alfa
LT β	Linfotoxina beta
MAPK	Cinasa de proteína activada por mitógeno
MEM	Medio esencial mínimo
NF- κ B	Factor de transcripción nuclear de la cadena κ de anticuerpos de células B
NGF	Factor de crecimiento neural
NIK	Cinasa inductora de NF- κ B
PARP-1	Poli(ADP-ribosa) polimerasa
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PI3K	Fosfatidil inositol-3cinasa
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLA2	Fosfolipasa A2
PLC	Fosfolipasa C
RIP1	Proteína 1 de interacción con el receptor
RNA _m	Acido ribonucleico, mensajero
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SFBi	Suero Fetal Bovino inactivado
SODD	Silenciador de dominios de muerte
TNF α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
TNFR-I	Receptor del TNF α tipo I
TNFR-II	Receptor del TNF α tipo II
TRADD	Proteína asociada al dominio de muerte del R-I

TRAF	Factor asociado al receptor del TNF α
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF.

15. REFERENCIAS

1. Abe, S., T.Yamamoto, S.Iihara, M.Yamazaki, and D.Mizuno. 1988. A possible role of glucocorticoids: an intrinsic inhibitor of the cytotoxic activity of tumor necrosis factor. *Jpn. J Cancer Res.* 79:305-308.
2. Acton, R.D., P.S.Dahlberg, M.E.Uknis, H.G.Klaerner, G.S.Fink, J.G.Norman, and D.L.Dunn. 1996. Differential sensitivity to *Escherichia coli* infection in mice lacking tumor necrosis factor p55 or interleukin-1 p80 receptors. *Arch. Surg.* 131:1216-1221.
3. Aggarwal, B.B. 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* 3:745-756.
4. Alessi, D.R., M.Andjelkovic, B.Caudwell, P.Cron, N.Morrice, P.Cohen, and B.A.Hemmings. 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15:6541-6551.
5. Algire, G.H., F.Y.Legallais, and B.F.Anderson. 1952. Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. V. The role of hypotension in the action of a bacterial polysaccharide on tumors. *J Natl. Cancer Inst.* 12:1279-1295.
6. Andjelkovic, M., D.R.Alessi, R.Meier, A.Fernandez, N.J.Lamb, M.Frech, P.Cron, P.Cohen, J.M.Lucocq, and B.A.Hemmings. 1997. Role of

- translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol. Chem.* 272:31515-31524.
7. Androlewicz, M.J., J.L.Browning, and C.F.Ware. 1992. Lymphotoxin is expressed as a heteromeric complex with a distinct 33-kDa glycoprotein on the surface of an activated human T cell hybridoma. *J Biol. Chem.* 267:2542-2547.
 8. Auphan, N., J.A.Didonato, C.Rosette, A.Helmberg, and M.Karin. 1995. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 270:286-290.
 9. Bailly-Maitre, B., G.de Sousa, K.Boulukos, J.Gugenheim, and R.Rahmani. 2001. Dexamethasone inhibits spontaneous apoptosis in primary cultures of human and rat hepatocytes via Bcl-2 and Bcl-xL induction. *Cell Death. Differ.* 8:279-288.
 10. Balkwill, F.R., M.S.Naylor, and S.Malik. 1990. Tumour necrosis factor as an anticancer agent. *Eur. J Cancer* 26:641-644.
 11. Barkett, M. and T.D.Gilmore. 1999. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18:6910-6924.
 12. Barnes, P.J. and I.M.Adcock. 2003. How do corticosteroids work in asthma? *Ann. Intern. Med.* 139:359-370.

13. Basu, S., N.F.Totty, M.S.Irwin, M.Sudol, and J.Downward. 2003. Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Mol Cell* 11:11-23.
14. Baud, V. and M.Karin. 2001. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* 11:372-377.
15. Beg, A.A. and D.Baltimore. 1996. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274:782-784.
16. Belizario, J.E. and C.A.Dinarello. 1991. Interleukin 1, interleukin 6, tumor necrosis factor, and transforming growth factor beta increase cell resistance to tumor necrosis factor cytotoxicity by growth arrest in the G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res.* 51:2379-2385.
17. Belizario, J.E., S.Sherwood, and W.Becak. 1999. Induction of apoptosis in cancer cells by tumor necrosis factor and butyrolactone, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Braz. J Med. Biol. Res.* 32:473-482.
18. Bellacosa, A., J.R.Testa, S.P.Staal, and P.N.Tsichlis. 1991. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 254:274-277.
19. Bemelmans, M.H., L.J.van Tits, and W.A.Buurman. 1996. Tumor necrosis factor: function, release and clearance. *Crit Rev. Immunol.* 16:1-11.

20. Bertazza, L. and S.Mocellin. 2008. Tumor necrosis factor (TNF) biology and cell death. *Front Biosci.* 13:2736-2743.
21. Besedovsky, H., A.del Rey, E.Sorkin, and C.A.Dinarelo. 1986. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* 233:652-654.
22. Beutler, B., D.Greenwald, J.D.Hulmes, M.Chang, Y.C.Pan, J.Mathison, R.Ulevitch, and A.Cerami. 1985. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 316:552-554.
23. Beutler, B.A. 1999. The role of tumor necrosis factor in health and disease. *J Rheumatol. Suppl* 57:16-21.
24. Bodmer, J.L., P.Schneider, and J.Tschopp. 2002. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem. Sci.* 27:19-26.
25. Braun, T., G.Carvalho, C.Fabre, J.Grosjean, P.Fenaux, and G.Kroemer. 2006. Targeting NF-kappaB in hematologic malignancies. *Cell Death. Differ.* 13:748-758.
26. Brockman, J.A., D.C.Scherer, T.A.McKinsey, S.M.Hall, X.Qi, W.Y.Lee, and D.W.Ballard. 1995. Coupling of a signal response domain in I kappa B alpha to multiple pathways for NF-kappa B activation. *Mol Cell Biol.* 15:2809-2818.

27. Brook, M., G.Sully, A.R.Clark, and J.Saklatvala. 2000. Regulation of tumour necrosis factor alpha mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signalling cascade. *FEBS Lett.* 483:57-61.
28. Bubici, C., S.Papa, K.Dean, and G.Franzoso. 2006. Mutual cross-talk between reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B: molecular basis and biological significance. *Oncogene* 25:6731-6748.
29. Burgering, B.M. and R.H.Medema. 2003. Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. *J Leukoc. Biol.* 73:689-701.
30. Burow, M.E., C.B.Weldon, L.I.Melnik, B.N.Duong, B.M.Collins-Burow, B.S.Beckman, and J.A.McLachlan. 2000. PI3-K/AKT regulation of NF-kappaB signaling events in suppression of TNF-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271:342-345.
31. Buttgereit, F. and A.Scheffold. 2002. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids* 67:529-534.
32. Caput, D., B.Beutler, K.Hartog, R.Thayer, S.Brown-Shimer, and A.Cerami. 1986. Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83:1670-1674.

33. Carballo, E., W.S.Lai, and P.J.Blackshear. 1998. Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin. *Science* 281:1001-1005.
34. Carswell, E.A., L.J.Old, R.L.Kassel, S.Green, N.Fiore, and B.Williamson. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 72:3666-3670.
35. Cato, A.C., A.Nestl, and S.Mink. 2002. Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Sci. STKE*. 2002:RE9.
36. Chan, F.K., H.J.Chun, L.Zheng, R.M.Siegel, K.L.Bui, and M.J.Lenardo. 2000. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288:2351-2354.
37. Chan, T.O., S.E.Rittenhouse, and P.N.Tsichlis. 1999. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.* 68:965-1014.
38. Chu, Z.L., T.A.McKinsey, L.Liu, J.J.Gentry, M.H.Malim, and D.W.Ballard. 1997. Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94:10057-10062.
39. Clark, E.A. and J.S.Brugge. 1995. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268:233-239.

40. Coquelle, A., S.Mouhamad, M.O.Pequignot, T.Braun, G.Carvalho, S.Vivet, D.Metivier, M.Castedo, and G.Kroemer. 2006. Cell cycle-dependent cytotoxic and cytostatic effects of bortezomib on colon carcinoma cells. *Cell Death Differ.* 13:873-875.
41. Couriel, D.R., K.Hicks, S.Giralt, and R.E.Champlin. 2000. Role of tumor necrosis factor-alpha inhibition with infliximab in cancer therapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Curr. Opin. Oncol.* 12:582-587.
42. Creech, H.J., M.A.Hamilton, and E.T.Nishimura. 1948a. The influence of antibody-containing fractions on the lethal and tumor-necrotizing actions of polysaccharides from *Serratia marcescens* (*Bacillus prodigiosus*). *Cancer Res.* 8:330-336.
43. Creech, H.J., M.A.Hamilton, and I.C.Diller. 1948b. Comparative studies of the immunological, toxic and tumor-necrotizing properties of polysaccharides from *Serratia marcescens* (*Bacillus prodigiosus*). *Cancer Res.* 8:318-329.
44. Crook, N.E., R.J.Clem, and L.K.Miller. 1993. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol.* 67:2168-2174.
45. Cross, D.A., D.R.Alessi, P.Cohen, M.Andjelkovich, and B.A.Hemmings. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378:785-789.

46. Croxtall, J.D., Q.Choudhury, and R.J.Flower. 2000. Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. *Br. J Pharmacol.* 130:289-298.
47. Datta, S.R., A.Brunet, and M.E.Greenberg. 1999. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 13:2905-2927.
48. Datta, S.R., H.Dudek, X.Tao, S.Masters, H.Fu, Y.Gotoh, and M.E.Greenberg. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91:231-241.
49. Dean, J.L., M.Brook, A.R.Clark, and J.Saklatvala. 1999. p38 mitogen-activated protein kinase regulates cyclooxygenase-2 mRNA stability and transcription in lipopolysaccharide-treated human monocytes. *J Biol. Chem.* 274:264-269.
50. Delhase, M., M.Hayakawa, Y.Chen, and M.Karin. 1999. Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK β subunit phosphorylation. *Science* 284:309-313.
51. Dembic, Z., H.Loetscher, U.Gubler, Y.C.Pan, H.W.Lahm, R.Gentz, M.Brockhaus, and W.Lessler. 1990. Two human TNF receptors have similar extracellular, but distinct intracellular, domain sequences. *Cytokine* 2:231-237.

52. Deregowski, V., S.Delhalle, V.Benoit, V.Bours, and M.P.Merville. 2002. Identification of cytokine-induced nuclear factor-kappaB target genes in ovarian and breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 64:873-881.
53. Desch, C.E., A.Dobrina, B.B.Aggarwal, and J.M.Harlan. 1990. Tumor necrosis factor-alpha exhibits greater proinflammatory activity than lymphotoxin in vitro. *Blood* 75:2030-2034.
54. Deveraux, Q.L., N.Roy, H.R.Stennicke, T.Van Arsdale, Q.Zhou, S.M.Srinivasula, E.S.Alnemri, G.S.Salvesen, and J.C.Reed. 1998. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* 17:2215-2223.
55. Devin, A., Y.Lin, S.Yamaoka, Z.Li, M.Karin, and Z.Liu. 2001. The alpha and beta subunits of IkappaB kinase (IKK) mediate TRAF2-dependent IKK recruitment to tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 in response to TNF. *Mol Cell Biol.* 21:3986-3994.
56. Din, F.V., M.G.Dunlop, and L.A.Stark. 2004. Evidence for colorectal cancer cell specificity of aspirin effects on NF kappa B signalling and apoptosis. *Br. J Cancer* 91:381-388.
57. Donepudi, M. and M.G.Grutter. 2002. Structure and zymogen activation of caspases. *Biophys. Chem.* 101-102:145-153.

58. Du, C., M.Fang, Y.Li, L.Li, and X.Wang. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102:33-42.
59. Eck, M.J., M.Ultsch, E.Rinderknecht, A.M.de Vos, and S.R.Sprang. 1992. The structure of human lymphotoxin (tumor necrosis factor-beta) at 1.9-A resolution. *J Biol. Chem.* 267:2119-2122.
60. Falkenstein, E., A.W.Norman, and M.Webling. 2000a. Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s). *J Clin. Endocrinol. Metab* 85:2072-2075.
61. Falkenstein, E., H.C.Tillmann, M.Christ, M.Feuring, and M.Webling. 2000b. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol. Rev.* 52:513-556.
62. Falkenstein, E. and M.Webling. 2000. Nongenomically initiated steroid actions. *Eur. J Clin. Invest* 30 Suppl 3:51-54.
63. Fan, Y., J.Dutta, N.Gupta, G.Fan, and C.Gelinas. 2008. Regulation of programmed cell death by NF-kappaB and its role in tumorigenesis and therapy. *Adv. Exp. Med. Biol.* 615:223-250.
64. Feldmann, M., F.M.Brennan, and R.N.Maini. 1996. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* 14:397-440.

65. Ghosh, S., M.J.May, and E.B.Kopp. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16:225-260.
66. Giguere, V., S.M.Hollenberg, M.G.Rosenfeld, and R.M.Evans. 1986. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 46:645-652.
67. Gold, P.W., W.C.Drevets, and D.S.Charney. 2002. New insights into the role of cortisol and the glucocorticoid receptor in severe depression. *Biol. Psychiatry* 52:381-385.
68. Golden, L.H. and K.L.Insogna. 2004. The expanding role of PI3-kinase in bone. *Bone* 34:3-12.
69. Gonzalez, E. and T.E.McGraw. 2006. Insulin signaling diverges into Akt-dependent and -independent signals to regulate the recruitment/docking and the fusion of GLUT4 vesicles to the plasma membrane. *Mol Biol. Cell* 17:4484-4493.
70. Gorman, A.M., U.A.Hirt, S.Orrenius, and S.Ceccatelli. 2000. Dexamethasone pre-treatment interferes with apoptotic death in glioma cells. *Neuroscience* 96:417-425.
71. Grell, M., E.Douni, H.Wajant, M.Lohden, M.Clauss, B.Maxeiner, S.Georgopoulos, W.Lesslauer, G.Kollias, K.Pfizenmaier, and P.Scheurich. 1995. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime

- activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83:793-802.
72. Groner, B., N.E.Hynes, U.Rahmsdorf, and H.Ponta. 1983. Transcription initiation of transfected mouse mammary tumor virus LTR DNA is regulated by glucocorticoid hormones. *Nucleic Acids Res.* 11:4713-4725.
73. Gruss, H.J. and S.K.Dower. 1995. The TNF ligand superfamily and its relevance for human diseases. *Cytokines Mol Ther.* 1:75-105.
74. Gueydan, C., L.Droogmans, P.Chalon, G.Huez, D.Caput, and V.Kruys. 1999. Identification of TIAR as a protein binding to the translational regulatory AU-rich element of tumor necrosis factor alpha mRNA. *J Biol. Chem.* 274:2322-2326.
75. Gupta, S. 2002a. A decision between life and death during TNF-alpha-induced signaling. *J Clin. Immunol.* 22:185-194.
76. Gupta, S. 2002b. Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in T cells from aged humans: a role of TNFR-I and downstream signaling molecules. *Exp. Gerontol.* 37:293-299.
77. Gustin, J.A., O.N.Ozes, H.Akca, R.Pincheira, L.D.Mayo, Q.Li, J.R.Guzman, C.K.Korgaonkar, and D.B.Donner. 2004. Cell type-specific expression of the I κ B kinases determines the significance of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling to NF-kappa B activation. *J Biol. Chem.* 279:1615-1620.

78. Hafezi-Moghadam, A., T.Simoncini, Z.Yang, F.P.Limbourg, J.C.Plumier, M.C.Rebsamen, C.M.Hsieh, D.S.Chui, K.L.Thomas, A.J.Prorock, V.E.Laubach, M.A.Moskowitz, B.A.French, K.Ley, and J.K.Liao. 2002. Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nat. Med.* 8:473-479.
79. Harper, N., M.Hughes, M.MacFarlane, and G.M.Cohen. 2003. Fas-associated death domain protein and caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol. Chem.* 278:25534-25541.
80. Hayden, M.S. and S.Ghosh. 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 18:2195-2224.
81. Herr, I. and K.M.Debatin. 2001. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 98:2603-2614.
82. Herr, I., E.Ucur, K.Herzer, S.Okouoyo, R.Ridder, P.H.Krammer, D.M.von Knebel, and K.M.Debatin. 2003. Glucocorticoid cotreatment induces apoptosis resistance toward cancer therapy in carcinomas. *Cancer Res.* 63:3112-3120.
83. Hirao, M., N.Sato, T.Kondo, S.Yonemura, M.Monden, T.Sasaki, Y.Takai, S.Tsukita, and S.Tsukita. 1996. Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible

- involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. *J Cell Biol.* 135:37-51.
84. Holcomb, B., M.Yip-Schneider, and C.M.Schmidt. 2008. The role of nuclear factor kappaB in pancreatic cancer and the clinical applications of targeted therapy. *Pancreas* 36:225-235.
85. Hotamisligil, G.S., D.L.Murray, L.N.Choy, and B.M.Spiegelman. 1994. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91:4854-4858.
86. Hsu, H., J.Huang, H.B.Shu, V.Baichwal, and D.V.Goeddel. 1996a. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity.* 4:387-396.
87. Hsu, H., H.B.Shu, M.G.Pan, and D.V.Goeddel. 1996b. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84:299-308.
88. Idriss, H.T. and J.H.Naismith. 2000. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc. Res. Tech.* 50:184-195.
89. Itoh, N. and S.Nagata. 1993. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol. Chem.* 268:10932-10937.

90. Jackson-Bernitsas, D.G., H.Ichikawa, Y.Takada, J.N.Myers, X.L.Lin, B.G.Darnay, M.M.Chaturvedi, and B.B.Aggarwal. 2007. Evidence that TNF-TNFR1-TRADD-TRAF2-RIP-TAK1-IKK pathway mediates constitutive NF-kappaB activation and proliferation in human head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 26:1385-1397.
91. Janssens, S. and J.Tschopp. 2006. Signals from within: the DNA-damage-induced NF-kappaB response. *Cell Death. Differ.* 13:773-784.
92. Jeoung, D.I., B.Tang, and M.Sonenberg. 1995. Induction of tumor suppressor p21 protein by kinase inhibitors in MCF-7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214:361-366.
93. Jijon, H., B.Allard, and C.Jobin. 2004. NF-kappaB inducing kinase activates NF-kappaB transcriptional activity independently of IkappaB kinase gamma through a p38 MAPK-dependent RelA phosphorylation pathway. *Cell Signal.* 16:1023-1032.
94. Johnson, G.L. and R.Lapadat. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298:1911-1912.
95. Karin, M., Y.Cao, F.R.Greten, and Z.W.Li. 2002. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat. Rev. Cancer* 2:301-310.

96. Karin, M. and M.Delhase. 2000. The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Semin. Immunol.* 12:85-98.
97. Karin, M. and A.Lin. 2002. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.* 3:221-227.
98. Kelliher, M.A., S.Grimm, Y.Ishida, F.Kuo, B.Z.Stanger, and P.Leder. 1998. The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity.* 8:297-303.
99. Kim, H.J., N.Hawke, and A.S.Baldwin. 2006. NF-kappaB and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death. Differ.* 13:738-747.
100. Kofler, R. 2000. The molecular basis of glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoblastic leukemia cells. *Histochem. Cell Biol.* 114:1-7.
101. Kotani, K., W.Ogawa, Y.Hino, T.Kitamura, H.Ueno, W.Sano, C.Sutherland, D.K.Granner, and M.Kasuga. 1999. Dominant negative forms of Akt (protein kinase B) and atypical protein kinase Clambda do not prevent insulin inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. *J Biol. Chem.* 274:21305-21312.
102. Kramer, S.M., B.B.Aggarwal, T.E.Eessalu, S.M.McCabe, B.L.Ferraiolo, I.S.Figari, and M.A.Palladino, Jr. 1988. Characterization of the in vitro and in vivo species preference of human and murine tumor necrosis factor-alpha. *Cancer Res.* 48:920-925.

103. Kramer, S.M. and M.E.Carver. 1986. Serum-free in vitro bioassay for the detection of tumor necrosis factor. *J Immunol. Methods* 93:201-206.
104. Kreuz, S., D.Siegmund, P.Scheurich, and H.Wajant. 2001. NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol.* 21:3964-3973.
105. Kull, F.C., Jr. 1988. Reduction in tumor necrosis factor receptor affinity and cytotoxicity by glucocorticoids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:402-409.
106. Langdown, M.L., M.J.Holness, and M.C.Sugden. 2001. Early growth retardation induced by excessive exposure to glucocorticoids in utero selectively increases cardiac GLUT1 protein expression and Akt/protein kinase B activity in adulthood. *J Endocrinol.* 169:11-22.
107. Legler, D.F., O.Micheau, M.A.Doucey, J.Tschopp, and C.Bron. 2003. Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNFalpha-mediated NF-kappaB activation. *Immunity.* 18:655-664.
108. Li, F., G.Ambrosini, E.Y.Chu, J.Plescia, S.Tognin, P.C.Marchisio, and D.C.Altieri. 1998. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 396:580-584.
109. Li, Z.W., W.Chu, Y.Hu, M.Delhase, T.Deerinck, M.Ellisman, R.Johnson, and M.Karin. 1999. The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for

- nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J Exp. Med.* 189:1839-1845.
110. Limbourg, F.P., Z.Huang, J.C.Plumier, T.Simoncini, M.Fujioka, J.Tuckermann, G.Schutz, M.A.Moskowitz, and J.K.Liao. 2002. Rapid nontranscriptional activation of endothelial nitric oxide synthase mediates increased cerebral blood flow and stroke protection by corticosteroids. *J Clin. Invest* 110:1729-1738.
111. Limbourg, F.P. and J.K.Liao. 2003. Nontranscriptional actions of the glucocorticoid receptor. *J Mol Med.* 81:168-174.
112. Liu, H., H.Perlman, L.J.Pagliari, and R.M.Pope. 2001. Constitutively activated Akt-1 is vital for the survival of human monocyte-differentiated macrophages. Role of Mcl-1, independent of nuclear factor (NF)-kappaB, Bad, or caspase activation. *J Exp. Med.* 194:113-126.
113. Lopez-Bojorquez, L.N., F.Arechavaleta-Velasco, F.Vadillo-Ortega, D.Montes-Sanchez, J.L.Ventura-Gallegos, and A.Zentella-Dehesa. 2004. NF-kappaB translocation and endothelial cell activation is potentiated by macrophage-released signals co-secreted with TNF-alpha and IL-1beta. *Inflamm. Res.* 53:567-575.
114. Lu, N.Z. and J.A.Cidlowski. 2005. Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol Cell* 18:331-342.

115. Madge, L.A. and J.S.Pober. 2000. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway, activated by tumor necrosis factor or interleukin-1, inhibits apoptosis but does not activate NFkappaB in human endothelial cells. *J Biol. Chem.* 275:15458-15465.
116. Madrid, L.V., C.Y.Wang, D.C.Guttridge, A.J.Schottelius, A.S.Baldwin, Jr., and M.W.Mayo. 2000. Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappaB. *Mol Cell Biol.* 20:1626-1638.
117. Massague, J. and A.Pandiella. 1993. Membrane-anchored growth factors. *Annu. Rev. Biochem.* 62:515-541.
118. McKay, L.I. and J.A.Cidlowski. 1998. Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism. *Mol Endocrinol.* 12:45-56.
119. McKenna, N.J., R.B.Lanz, and B.W.O'Malley. 1999a. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr. Rev.* 20:321-344.
120. McKenna, N.J., J.Xu, Z.Nawaz, S.Y.Tsai, M.J.Tsai, and B.W.O'Malley. 1999b. Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem. Mol Biol.* 69:3-12.
121. Messmer, U.K., C.Pereda-Fernandez, M.Manderscheid, and J.Pfeilschifter. 2001. Dexamethasone inhibits TNF-alpha-induced apoptosis and IAP protein downregulation in MCF-7 cells. *Br. J Pharmacol.* 133:467-476.

122. Messmer, U.K., G.Winkel, V.A.Briner, and J.Pfeilschifter. 1999. Glucocorticoids potently block tumour necrosis factor-alpha- and lipopolysaccharide-induced apoptotic cell death in bovine glomerular endothelial cells upstream of caspase 3 activation. *Br. J Pharmacol.* 127:1633-1640.
123. Messmer, U.K., G.Winkel, V.A.Briner, and J.Pfeilschifter. 2000. Suppression of apoptosis by glucocorticoids in glomerular endothelial cells: effects on proapoptotic pathways. *Br. J Pharmacol.* 129:1673-1683.
124. Monick, M.M., T.R.Aksamit, L.J.Geist, and G.W.Hunninghake. 1994. Dexamethasone inhibits IL-1 and TNF activity in human lung fibroblasts without affecting IL-1 or TNF receptors. *Am. J Physiol* 267:L33-L38.
125. Mukhopadhyay, A., J.Suttles, R.D.Stout, and B.B.Aggarwal. 2001. Genetic deletion of the tumor necrosis factor receptor p60 or p80 abrogates ligand-mediated activation of nuclear factor-kappa B and of mitogen-activated protein kinases in macrophages. *J Biol. Chem.* 276:31906-31912.
126. O'Malley, W.E., B.Achinstein, and M.J.Shear. 1963. ACTION OF BACTERIAL POLYSACCHARIDE ON TUMORS. III. REPEATED RESPONSE OF SARCOMA 37, IN TOLERANT MICE, TO SERRATIA MARCESCENS ENDOTOXIN. *Cancer Res.* 23:890-895.
127. Oh, H.Y., S.Namkoong, S.J.Lee, E.Por, C.K.Kim, T.R.Billiar, J.A.Han, K.S.Ha, H.T.Chung, Y.G.Kwon, H.Lee, and Y.M.Kim. 2006. Dexamethasone protects

- primary cultured hepatocytes from death receptor-mediated apoptosis by upregulation of cFLIP. *Cell Death. Differ.* 13:512-523.
128. Ozes, O.N., L.D.Mayo, J.A.Gustin, S.R.Pfeffer, L.M.Pfeffer, and D.B.Donner. 1999. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 401:82-85.
129. Park, H.S., M.S.Kim, S.H.Huh, J.Park, J.Chung, S.S.Kang, and E.J.Choi. 2002. Akt (protein kinase B) negatively regulates SEK1 by means of protein phosphorylation. *J Biol. Chem.* 277:2573-2578.
130. Piecyk, M., S.Wax, A.R.Beck, N.Kedersha, M.Gupta, B.Maritim, S.Chen, C.Gueydan, V.Kruys, M.Streuli, and P.Anderson. 2000. TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF-alpha. *EMBO J* 19:4154-4163.
131. Pierce, J.W., R.Schoenleber, G.Jesmok, J.Best, S.A.Moore, T.Collins, and M.E.Gerritsen. 1997. Novel inhibitors of cytokine-induced IkappaBalpha phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J Biol. Chem.* 272:21096-21103.
132. Pocsik, E., E.Duda, and D.Wallach. 1995. Phosphorylation of the 26 kDa TNF precursor in monocytic cells and in transfected HeLa cells. *J Inflamm.* 45:152-160.

133. Pratt, W.B. and D.O.Toft. 1997. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* 18:306-360.
134. Reichardt, H.M., K.H.Kaestner, J.Tuckermann, O.Kretz, O.Wessely, R.Bock, P.Gass, W.Schmid, P.Herrlich, P.Angel, and G.Schutz. 1998. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* 93:531-541.
135. Robinson-Rechavi, M., A.S.Carpentier, M.Duffraisse, and V.Laudet. 2001. How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? *Trends Genet.* 17:554-556.
136. Romas, E., M.T.Gillespie, and T.J.Martin. 2002. Involvement of receptor activator of NFkappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis. *Bone* 30:340-346.
137. Roy, N., Q.L.Deveraux, R.Takahashi, G.S.Salvesen, and J.C.Reed. 1997. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 16:6914-6925.
138. Sakamoto, T., W.T.Repasky, J.Chen, A.Hirata, and F.Hirata. 1995. Down-regulation of bcl-xs gene expression in rat thymocytes by dexamethasone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215:511-516.
139. Sapolsky, R.M., L.M.Romero, and A.U.Munck. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 21:55-89.

140. Sasson, R. and A.Amsterdam. 2003. Pleiotropic anti-apoptotic activity of glucocorticoids in ovarian follicular cells. *Biochem. Pharmacol.* 66:1393-1401.
141. Sasson, R., V.Shinder, A.Dantes, A.Land, and A.Amsterdam. 2003. Activation of multiple signal transduction pathways by glucocorticoids: protection of ovarian follicular cells against apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311:1047-1056.
142. Sastry, K.S., Y.Karpova, and G.Kulik. 2006. Epidermal growth factor protects prostate cancer cells from apoptosis by inducing BAD phosphorylation via redundant signaling pathways. *J Biol. Chem.* 281:27367-27377.
143. Satomi, N., A.Sakurai, R.Haranaka, and K.Haranaka. 1988. Preventive effects of several chemicals against lethality of recombinant human tumor necrosis factor. *J Biol. Response Mod.* 7:54-64.
144. Sebens, S., A.Arlt, and H.Schafer. 2008. NF-kappaB as a molecular target in the therapy of pancreatic carcinoma. *Recent Results Cancer Res.* 177:151-164.
145. Seckl, J.R. 2004. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur. J Endocrinol.* 151 Suppl 3:U49-U62.
146. Segal, R.A. and M.E.Greenberg. 1996. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu. Rev. Neurosci* 19:463-489.

147. Sethi, G., B.Sung, and B.B.Aggarwal. 2008. Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)* 233:21-31.
148. Sherr, C.J. 1996. Cancer cell cycles. *Science* 274:1672-1677.
149. Simoncini, T., A.Hafezi-Moghadam, D.P.Brazil, K.Ley, W.W.Chin, and J.K.Liao. 2000. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407:538-541.
150. Song, G., G.Ouyang, and S.Bao. 2005. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med.* 9:59-71.
151. Stauber, G.B., R.A.Aiyer, and B.B.Aggarwal. 1988. Human tumor necrosis factor-alpha receptor. Purification by immunoaffinity chromatography and initial characterization. *J Biol. Chem.* 263:19098-19104.
152. Sun, S.Y., P.Yue, J.Y.Zhou, Y.Wang, H.R.Choi Kim, R.Lotan, and G.S.Wu. 2001. Overexpression of BCL2 blocks TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in human lung cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280:788-797.
153. Sundberg, M., S.Savola, A.Hienola, L.Korhonen, and D.Lindholm. 2006. Glucocorticoid hormones decrease proliferation of embryonic neural stem cells through ubiquitin-mediated degradation of cyclin D1. *J Neurosci* 26:5402-5410.

154. Tada, K., T.Okazaki, S.Sakon, T.Kobarai, K.Kurosawa, S.Yamaoka, H.Hashimoto, T.W.Mak, H.Yagita, K.Okumura, W.C.Yeh, and H.Nakano. 2001. Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation and protection from cell death. *J Biol. Chem.* 276:36530-36534.
155. Takahashi, R., Q.Deveraux, I.Tamm, K.Welsh, N.Assa-Munt, G.S.Salvesen, and J.C.Reed. 1998. A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol. Chem.* 273:7787-7790.
156. Takeda, K., S.Iwamoto, H.Sugimoto, T.Takuma, N.Kawatani, M.Noda, A.Masaki, H.Morise, H.Arimura, and K.Konno. 1986. Identity of differentiation inducing factor and tumour necrosis factor. *Nature* 323:338-340.
157. Tartaglia, L.A., T.M.Ayres, G.H.Wong, and D.V.Goeddel. 1993. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74:845-853.
158. Torti, S.V., E.L.Kwak, S.C.Miller, L.L.Miller, G.M.Ringold, K.B.Myambo, A.P.Young, and F.M.Torti. 1988. The molecular cloning and characterization of murine ferritin heavy chain, a tumor necrosis factor-inducible gene. *J Biol. Chem.* 263:12638-12644.
159. Urban, G., T.Golden, I.V.Aragon, L.Cowsert, S.R.Cooper, N.M.Dean, and R.E.Honkanen. 2003. Identification of a functional link for the p53 tumor suppressor protein in dexamethasone-induced growth suppression. *J Biol. Chem.* 278:9747-9753.

160. Vacchio, M.S., V.Papadopoulos, and J.D.Ashwell. 1994. Steroid production in the thymus: implications for thymocyte selection. *J Exp. Med.* 179:1835-1846.
161. Van Antwerp, D.J., S.J.Martin, T.Kafri, D.R.Green, and I.M.Verma. 1996. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* 274:787-789.
162. Van Linden, A.A., V.Cottin, C.Leu, and D.W.Riches. 2000. Phosphorylation of the membrane proximal region of tumor necrosis factor receptor CD120a (p55) at ERK consensus sites. *J Biol. Chem.* 275:6996-7003.
163. Vanhaesebroeck, B. and D.R.Alessi. 2000. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem. J* 346 Pt 3:561-576.
164. Vanhaesebroeck, B. and M.D.Waterfield. 1999. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp. Cell Res.* 253:239-254.
165. Ventura, J.J., P.Cogswell, R.A.Flavell, A.S.Baldwin, Jr., and R.J.Davis. 2004. JNK potentiates TNF-stimulated necrosis by increasing the production of cytotoxic reactive oxygen species. *Genes Dev.* 18:2905-2915.
166. Verhagen, A.M., P.G.Ekert, M.Pakusch, J.Silke, L.M.Connolly, G.E.Reid, R.L.Moritz, R.J.Simpson, and D.L.Vaux. 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102:43-53.

167. Viatour, P., M.P.Merville, V.Bours, and A.Chariot. 2005. Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem. Sci.* 30:43-52.
168. Wajant, H., K.Pfizenmaier, and P.Scheurich. 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death. Differ.* 10:45-65.
169. Wang, C.Y., M.W.Mayo, and A.S.Baldwin, Jr. 1996. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 274:784-787.
170. Wang, C.Y., M.W.Mayo, R.G.Korneluk, D.V.Goeddel, and A.S.Baldwin, Jr. 1998. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281:1680-1683.
171. Wang, J.M., J.R.Chao, W.Chen, M.L.Kuo, J.J.Yen, and H.F.Yang-Yen. 1999. The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol Cell Biol.* 19:6195-6206.
172. Ware, C.F. 2003. The TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14:181-184.
173. Warzocha, K. and G.Salles. 1998. The tumor necrosis factor signaling complex: choosing a path toward cell death or cell proliferation. *Leuk. Lymphoma* 29:81-92.

174. Webster, J.C., R.M.Huber, R.L.Hanson, P.M.Collier, T.F.Haws, J.K.Mills, T.C.Burn, and E.A.Allegretto. 2002. Dexamethasone and tumor necrosis factor-alpha act together to induce the cellular inhibitor of apoptosis-2 gene and prevent apoptosis in a variety of cell types. *Endocrinology* 143:3866-3874.
175. Wehling, M. 1997. Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu. Rev. Physiol* 59:365-393.
176. Wehling, M. and R.Losel. 2006. Non-genomic steroid hormone effects: membrane or intracellular receptors? *J Steroid Biochem. Mol Biol.* 102:180-183.
177. Weiner, J.A. and J.Chun. 1999. Schwann cell survival mediated by the signaling phospholipid lysophosphatidic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:5233-5238.
178. Weller, M., C.Schmidt, W.Roth, and J.Dichgans. 1997. Chemotherapy of human malignant glioma: prevention of efficacy by dexamethasone? *Neurology* 48:1704-1709.
179. Widen, C., J.A.Gustafsson, and A.C.Wikstrom. 2003. Cytosolic glucocorticoid receptor interaction with nuclear factor-kappa B proteins in rat liver cells. *Biochem. J* 373:211-220.

180. Wintermantel, T.M., S.Berger, E.F.Greiner, and G.Schutz. 2005. Evaluation of steroid receptor function by gene targeting in mice. *J Steroid Biochem. Mol Biol.* 93:107-112.
181. Wolf, G. 2003. The function of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor delta in energy homeostasis. *Nutr. Rev.* 61:387-390.
182. Wong, B.C., X.Jiang, X.M.Fan, M.C.Lin, S.H.Jiang, S.K.Lam, and H.F.Kung. 2003. Suppression of RelA/p65 nuclear translocation independent of IkappaB-alpha degradation by cyclooxygenase-2 inhibitor in gastric cancer. *Oncogene* 22:1189-1197.
183. Wu, W., S.Chaudhuri, D.R.Brickley, D.Pang, T.Karrison, and S.D.Conzen. 2004. Microarray analysis reveals glucocorticoid-regulated survival genes that are associated with inhibition of apoptosis in breast epithelial cells. *Cancer Res.* 64:1757-1764.
184. Yamamoto, Y. and R.B.Gaynor. 2004. IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. *Trends Biochem. Sci.* 29:72-79.
185. Yin, D., S.Kondo, G.H.Barnett, T.Morimura, and J.Takeuchi. 1995. Tumor necrosis factor-alpha induces p53-dependent apoptosis in rat glioma cells. *Neurosurgery* 37:758-762.
186. Yoshida, N.L., T.Miyashita, U M, M.Yamada, J.C.Reed, Y.Sugita, and T.Oshida. 2002. Analysis of gene expression patterns during glucocorticoid-

- induced apoptosis using oligonucleotide arrays. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293:1254-1261.
187. Yudt, M.R. and J.A.Cidlowski. 2002. The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene. *Mol Endocrinol.* 16:1719-1726.
188. Zhou, J. and J.A.Cidlowski. 2005. The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids* 70:407-417.