

25
2E3-



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANALISIS DE LAS RESPUESTAS A ESTRES
DURANTE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR
EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF- α)

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
MA. DEL PILAR CAMACHO LEAL

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

1999

RECIBI



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Análisis de las respuestas a estrés durante la muerte celular inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF- α)"

realizado por

Ma. Del Pilar Camacho Leal

con número de cuenta 9450329-0 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Mano Justo

Director de Tesis
Propietario

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Propietario

Dr. Julio Moran Andrade

Propietario

Dr. Emilio Rojas del Castillo

Suplente

M. en C. Victor Manuel Valdés López

Suplente

Dra. Georgina Regina Garza Ramos Martínez

Consejo Departamental de Biología

Edna María Suárez Díaz

Dra. Edna María Suárez Díaz

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

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

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico del proyecto del PAPIIT DGAPA, UNAM IN200396

Durante la realización de este trabajo Pilar Camacho Leal contó con el apoyo económico del Programa de Becas para Tesis de Investigación (PROBETEL) de la coordinación de Programas Académicos, UNAM.

“Quien no conoce nada, no ama nada. Quien no puede hacer nada, no comprende nada. Quien nada comprende, nada vale. Pero quien comprende también ama, observa, ve... Cuanto mayor es el conocimiento inherente a una cosa, mas grande es el amor...”

PARACELSO

Ante todo este trabajo esta dedicado a mis padres....tal vez nunca he conseguido demostrar del todo cuanto los quiero; pretendo que esto, que es solo el primer contacto con el mundo real, no solo en términos académicos; sea un pequeño reconocimiento a su esfuerzo y al apoyo incondicional que me han brindado y reflejo patente de la formación que he recibido de su parte.
GRACIAS.

A mis hermanos, Dario y León Felipe, que han sido parte importante en mi vida.

Quiero agradecer a toda la gente que me ha apoyado tanto en lo académico como fuera del ámbito de trabajo, a todos gracias.

A los orígenes, familia Camacho y familia Leal. En especial a la abuelita Rosita que siempre esta pendiente.

A alguien que siempre ha estado conmigo en los buenos y malos ratos, una persona como pocas...gracias Dago.

A la familia Acevedo, porque han sido siempre un apoyo muy grande.

A mis amigos de la prepa (Hugo, Héctor, Erik, Julián, Jano, Gabo, Danieles, Lucia, Geno, Ricardo, Ileris, Elisa, Ana) y de la facultad (Toño, Froy, Viet, Fer, Mario, Mao, Luis, Norman, Héctor, Daniela, Roca, Joaquin, Vero, Lorena, Maika, Omar, Adán) con quienes he vivido momentos irrepetibles. En especial a la Leo, de las pocas amigas legítimas.

Al Dr. Alejandro Zentella, por estar dispuesto a enseñar, por su apoyo en el desarrollo de mi formación académica.

Al laboratorio Zentella, porque además de compañeros de trabajo, son parte de mi segunda casa. A Jose Luis, Adriana, Caty, Cris, Erika (la madre), Lucia, a Rocio C. por sus consejos y su ayuda.

A Ricardo, Lety, Humberto, Enrique, que junto con Lucia me han echado la mano, además de compartir las inolvidables noches tropicales.

Al Dr. Hansberg por su apoyo en la realización de estas tesis, a los miembros de su laboratorio quienes además del apoyo académico siempre han hecho patente su amistad, Pablo, Jessica, Adelaida, Fernando, Miguel, Daniel (Dragon), Shaday.

A la gente del IFC, a Fernando porque siempre logró subirme el ánimo, a Ere, a Rocío Alcantara, a Ricardo Pineda, a la unidad de computo del IFC, Rodrigo y Juan, que siempre soportaron que les descompusiera sus aparatos.

A todos los maestros de la facultad de Ciencias, en particular a Héctor Lara, que además de buen maestro, es un buen amigo

A los sinodales, por aceptar formar parte de este trabajo,

Dr. Emilio Rojas del Castillo

M. en C. Víctor Valdez López

Dr. Julio Morán Andrade

Dra. Georgina Garza Ramos

INDICE

ABREVIATURAS	i
RESUMEN	ii
INTRODUCCIÓN	1
Factor de necrosis tumoral (TNF)	1
Muerte celular programada y apoptosis	1
Transducción de la señal	4
Vias de muerte celular inducida por el TNF	7
Activación de la proteína cinasa C	7
Activación de la fosfolipasa A2 (PLA2)	7
Metabolismo de esfingolípidos	7
Activación de cisteil-proteasas	8
TNF y estrés oxidativo	8
Defensas Antioxidantes	11
Manganeso Superóxido dismutasa (MnSOD)	11
Catalasa	13
Glutación oxido reductasa (GSH)	13
Proteínas de choque térmico	15
Proteína A20	17
Caracterización de la resistencia a la muerte celular inducida por el TNF	18
ANTECEDENTES DIRECTOS	20
JUSTIFICACIÓN	22
OBJETIVOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN	51
CONCLUSIÓN GENERAL	63
BIBLIOGRAFÍA	64

ABREVIATURAS

FACTORES Y PROTEÍNAS

TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNF- β	Factor de necrosis tumoral beta
IL-3	Interleucina 3
NGF	Factor de crecimiento neuronal
TNFR1	Receptor del TNF tipo I
TNFR β	
p55	
CD120a	
TNFR2	Receptor del TNF tipo II
TNFR α	
p75	
DC120b	
IL-1	Interleucina 1
FADD	Proteína asociada al dominio de muerte del antígeno FAS
TRADD	Dominio de muerte asociado al TNF
FAN	Factor Asociado a la activación de la esfingomielinasa neutra
FLICE	Factor tipo ICE (caspasa-8)
RIP	Proteína que interactúa con el receptor tipo 2 del TNF
JUNK	Proteína cinasa nuclear de JUN
ICE	Convertasa de interleucina-1
NF κ B	Factor nuclear kappa B
AP-1	Factor transcripcional formado por heterodímeros JUN-FOS
CAPK	Proteína cinasa activada por ceramida
DAG	Diacilglicerol
ROS	Especies reactivas de oxígeno
PC-PLC	Fosfolipasa C
PLA2	Fosfolipasa A2
PkC ζ	Proteína cinasa C zeta
CED-3	Gen de muerte de <i>Caenorhabditis elegans</i>

Bcl-2	Gen 2 de linfoma de células B
NO	Oxido nítrico
DNA	Acido desoxiribonucleico
SOD	Superóxido dismutasa
CAT	Catalasa
GSHP	Glutati3n peroxidasa
MnSOD	Super3xido dismutasa dependiente de manganeso
CuZnSOD	Super3xido dismutasa dependiente de cobre-zinc
GSH	Glutati3n oxidado
GSSG	Glutati3n reducido
hsp	Prote3nas de choque t3rmico
A20	Producto g3nico primario inducido por el TNF
ICAM1	Mol3cula de adhesi3n intercelular
VCAM-2	Mol3cula de adhesi3n vascular

COMPUESTOS

MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-1)-2,5-difeniltetrazolio
DCF	Diacetato de diclorofluoresceina
H ₂ O ₂	Per3xido de hidr3geno

LINEAS CELULARES

L929-P6	Clona sensible a TNF y puromicina generada de la l3nea celular L929 proveniente de pulm3n de rat3n
L929-PR1	Clona transfectada con el pl3smido de expresi3n p-BABE, resistente a TNF y puromicina generada de la l3nea celular L929 proveniente de pulm3n de rat3n

RESUMEN

El factor de necrosis tumoral (TNF) es una citocina producida principalmente por macrófagos activados, descrito inicialmente por su capacidad de producir necrosis en tumores; sin embargo, su valor terapéutico en el tratamiento del cáncer ha sido limitado, ya que en dosis altas resulta muy tóxico para el organismo. *In vitro*, el TNF produce muerte por apoptosis en varias líneas celulares transformadas y en la línea celular de fibroblastos de pulmón de ratón L929. Este tipo de muerte celular es un proceso altamente regulado, que es desencadenado y controlado por señales solubles mediadas a través de receptores específicos. En el caso del TNF, el programa de muerte se enciende por la unión a sus receptores específicos sobre la superficie de la célula, p55 (TNFR1) y p75 (TNFR2).

Un aspecto característico de la actividad citotóxica del TNF es el incremento en el estrés oxidativo, sugiriendo que la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) es importante como mediador de la respuesta citotóxica del TNF, y que la respiración mitocondrial juega un papel muy importante en la generación de este estrés oxidativo. Por lo anterior, estudios previos se han enfocado en caracterizar la resistencia al efecto citotóxico del TNF en ciertas líneas celulares, generando clonas resistentes al factor y evaluando en estas los mecanismos de protección, tanto enzimáticos como no enzimáticos.

En el presente trabajo se utilizó como modelo experimental la clona celular PR1 resistente al efecto citotóxico del TNF, derivada de la línea celular L929 de fibroblastos de pulmón de ratón, evaluando la participación de mecanismos de protección como la catalasa, la proteína de estrés A20 y la expresión de la proteína de choque térmico hsp70, en la resistencia a la muerte celular inducida por el TNF.

Se demostró que la proteína hsp70 es un marcador de las respuestas endógenas al estrés térmico que protegen contra el efecto citotóxico del TNF y

del H_2O_2 , que hay una relación lineal entre la protección contra el efecto citotóxico del TNF y los niveles de expresión de la proteína hsp70.

Los resultados demuestran que el estrés oxidativo es una de las vías de muerte inducida por el TNF, ya que existe una correlación entre la resistencia al H_2O_2 , y al TNF por parte de la clona L929 PR1. La determinación de la actividad de catalasa sugiere que la actividad de peroxidasa implicada en esta protección no está dada por esta enzima.

INTRODUCCIÓN

Factor de necrosis tumoral (TNF)

El factor de necrosis tumoral (TNF), es una citocina producida principalmente por macrófagos activados, aunque también por otros tipos celulares como linfocitos T,B, o fibroblastos, los cuales secretan TNF- α o TNF- β (1). *In vitro* el TNF actúa como agente citotóxico en muchas células transformadas, y también tiene efectos antitumorales *in vivo* en diferentes sarcomas, lo cual lo hace un candidato interesante como agente antitumoral (2). Sin embargo, el valor terapéutico del TNF para el tratamiento del cáncer, se halla limitado por sus efectos tóxicos a altas dosis, a las que se induce choque séptico capaz de producir daño orgánico múltiple. Su aplicación también se dificulta por la amplia variación de sensibilidad de diferentes líneas tumorales *in vitro*. Así, mientras que algunas células tumorales muestran una baja sobrevivencia, otras no responden a su efecto(2)

Muerte celular programada y apoptosis

La muerte celular programada identificada originalmente en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (3) se consideró, hasta hace poco, como un mecanismo de recambio celular. Sin embargo, actualmente se ha propuesto que tiene un papel clave en la oncogénesis y en el frágil balance entre la proliferación y muerte celular, que contribuye a la homeostasis tisular.

En mamíferos se ha identificado un proceso homólogo a la muerte celular programada de nemátodos, a este tipo de muerte en mamíferos se le denominó muerte por apoptosis, también denominada muerte celular fisiológica. La apoptosis, es un proceso fundamental en la morfogénesis y en la determinación de la constitución tisular, particularmente bien caracterizado en la eliminación de timocitos autoinmunes y en la muerte de neuronas simpáticas con sinapsis deficiente. En estos dos casos las células mueren por apoptosis en respuesta a la

desaparición de diversos factores de crecimiento, como la IL-3, para el caso de timocitos, o del NGF en el caso de las neuronas simpáticas. La acción de estos factores de sobrevivencia interrumpe la expresión de un programa de muerte que se expresa de manera constitutiva. Por el contrario el TNF y el ligando del receptor APO/FAS activan el programa de muerte en células en las que éste está normalmente inactivo(4).

El primer paso en las diversas respuestas celulares inducidas por TNF, es la unión a receptores específicos localizados sobre la superficie de la célula. Se han identificado y clonado dos tipos de receptores para el TNF, los cuales tienen pesos moleculares de 55 kDa (TNFR1, TNFR β , p55 o CD120a) y 75kDa (TNFR2, TNFR α , p75 o DC120b). En humanos y en ratones la mayoría de las células expresan ambos tipos de receptores aunque su expresión se halla regulada de manera diferencial en diferentes tipos celulares. La expresión del receptor TNFR1 parece estar controlada por un promotor constitutivo que puede responder débilmente al estímulo del TNF, IL-1, esteroides de forbol, células epiteliales, fibroblastos y células T; así pues, la baja expresión constitutiva del receptor TNFR1, y la expresión inducible del TNFR2 explican en parte las diferentes respuestas fisiológicas por parte del factor (5). El dominio extracelular contiene el sitio de unión del TNF, ambos receptores poseen un 28% de homología en esta región, el dominio transmembranal de un solo cruce es pequeño. El dominio intracelular de los receptores es totalmente diferente en ambos tipos; esta falta de homología entre los dominios intracelulares en los dos tipos de receptores, sugiere que su activación evoca diferentes señales de transducción (5) (fig 1).

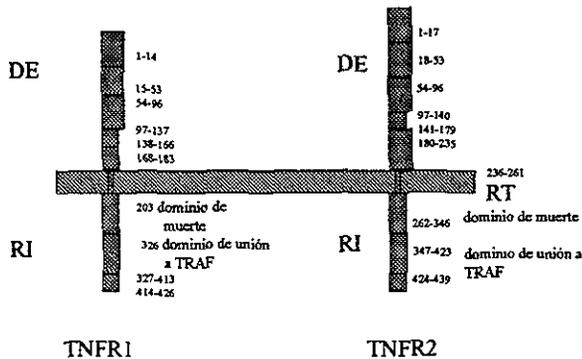


FIGURA 1. Representación esquemática de los dos receptores del TNF- α . Ambos receptores poseen un dominio extracelular (DE), con un 28% de similitud, una región transmembranal (RT) y finalmente una región intracelular totalmente distinta para ambos receptores (IR). La organización estructural es característica de una familia de receptores llamado TNF-NGF-R. Algunos otros miembros de esta superfamilia son LT- β R, Fas, CD27, CD30, CD40, 4-1BB, el receptor de baja afinidad NGF-R y OX40, así como las proteínas virales PV-T2 y PV-A53R. Aunque el dominio citoplásmico de esta familia de receptores es diferente entre cada uno de ellos, gran parte de estos receptores participan en respuestas proliferativas y citotóxicas.

Si bien se ha demostrado la formación de homotrimeros del receptor TNFR1, no se ha descartado la posible formación de heterotrimeros cuyo papel transduccional aún no ha sido caracterizado. En la mayoría de las células, la activación de los receptores ocurre por oligomerización de manera trimérica, y una vez formado el complejo TNFR1-ligando es internalizado rápidamente. A diferencia de el TNFR1, el TNFR2 no posee residuos de tirosina en su dominio intracelular implicados en la internalización por lo que carece de una señal para su rápida internalización. Experimentos en los que se han utilizado anticuerpos agonistas contra los receptores del TNF (6, 7) sugieren que, en la mayoría de los

casos, sólo la unión con el receptor TNFR1 es suficiente para la actividad citotóxica, y que el receptor TNFR2 sinergiza las respuestas biológicas del TNFR1(8).

Transducción de la señal

En general, para todas las citocinas, el mecanismo de transducción de señales se inicia con la interacción del factor soluble con sus receptores de membrana, lo que desencadena una cascada de señales intracelulares. La secuencia de sucesos que siguen la interacción del TNF con sus receptores aún no se conoce con precisión, aunque observaciones recientes en varias líneas celulares sugieren 5 etapas (1, 2):

- 1) La formación de complejos proteicos heteroméricos que incluyen a los receptores tipo TNFR1 y TNFR2 (p55 y p75), proteínas acopladoras como FADD, TRADD y FAN, además de proteínas cinasas como RIP y/o proteasas de la familia de las caspasas como FLICE. Experimentos de mutagénesis y sobreexpresión de todas estas proteínas, han llevado a la conclusión de que en esta primera etapa es en donde se enciende más de una vía de transducción: una asociada a la muerte celular por apoptosis dependiente de FLICE, y otra asociada a los cambios de expresión génica que depende de RIP.
- 2) Se ha identificado una proteína denominada FAN cuya unión al receptor tipo I media la activación de una esfingomielinasa que se asocia a un efecto citostático y en ocasiones citotóxico. La activación de esta esfingomielinasa resulta en un aumento en el recambio de esfingolípidos de membrana que da origen a segundos mensajeros como la ceramida y sus productos metabólicos como la esfingosina y la esfinganina.
- 3) La rápida activación de cascadas de transducción en las que participan proteínas cinasas como JUNK y la proteasa cinasa dependiente de ceramida CAPK, proteínas fosfatasa del tipo 2A y proteasas solubles de la familia de la convertasa de interleucina 1 (ICE).
- 4) La activación de la transcripción mediada por factores de transcripción como NFκB y AP-1 implicados en cambios en la expresión génica.

5) Paralelo a estos cambios de la fisiología celular se produce un aumento en la producción de radicales libres y consecuentemente un estrés oxidativo. La cadena respiratoria mitocondrial es un componente importante en la generación de este estrés, aunque también se ha reportado la activación de oxidasas citoplasmáticas. Se ha propuesto que este estrés también forma parte de la transducción de la señal dependiente del receptor tipo I, en particular a las respuestas dependientes del factor transcripcional NF κ B.

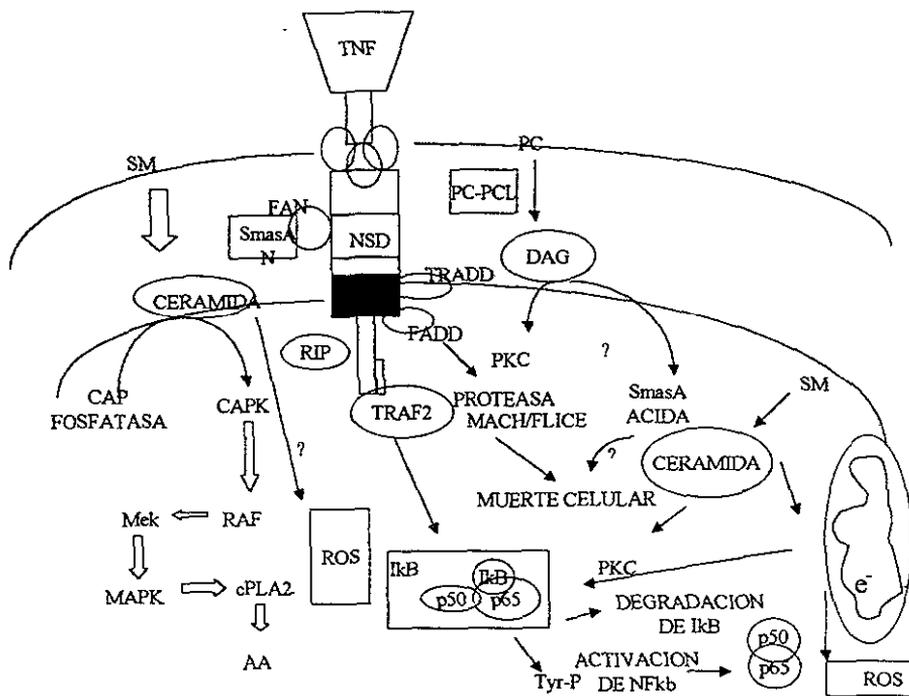


FIGURA 2. Representación esquemática de las señales de transducción desencadenadas por el receptor p55 de TNF (TNFR1). La activación de la esfingomielinasa neutra (SMN) por la interacción del dominio citoplásmico de la esfingomielinasa (NSD) con el factor protelco asociado a la esfingomielinasa neutra (FAN) incrementa la hidrólisis de esfingomielina y los niveles de ceramida que a su vez activa a una fosfatasa citosólica del tipo 2A dependiente de ceramida (CAP) y la proteína cinasa activada por ceramida (CAPK). La activación de CAPK induce la activación de la proteína cinasa activada por mitógenos y la liberación de ácido araquidónico (AA). La activación de la esfingomielinasa ácida (SMA) requiere un dominio del receptor próximo a la membrana al cual se une la proteína FAN. El extremo carboxilo presenta un dominio que media la interacción del receptor con otras proteínas acopladoras como TRADD; a este dominio se le denomina dominio de muerte. Mientras la interacción de TRADD con el transductor de señal FADD promueve muerte celular, la asociación con otros transductores, RIP y TRAF2, activa al factor de transcripción NFκB. La enzima fosfolina-fosfolipasa C (PC-PLC) participa en la activación de la esfingomielinasa neutra a través del diacilglicerol (DAG). Esta enzima promueve la producción de una poza de ceramida funcional distinta activando la proteína cinasa C. Esto lleva a la fosforilación de IκB activando a NFκB. Resultados preliminares muestran que esta poza de ceramida actúa sobre la mitocondria, promoviendo la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (9)

Vías de muerte celular inducida por el TNF

i) Activación de la proteína cinasa C

Se ha encontrado que diversas proteínas son fosforiladas unos minutos después de que la célula ha sido tratada con TNF, lo cual parece deberse a la activación de proteínas cinasas. Recientemente, se ha propuesto que la proteína cinasa zeta (PKC ζ) está involucrada en la señal de transducción del TNF (9). Esta PKC δ está clasificada como atípica, ya que es independiente de ésteres de forbol y al ser activada no es translocada a la membrana (10).

ii) Activación de la fosfolipasa A2 (PLA2)

En muchos tipos celulares, se ha descrito que el TNF activa una fosfolipasa citosólica del subtipo A2, la cuál produce ácido araquidónico (AA) (11,12). En algunos casos, la fosfolipasa A2 participa en la señal de transducción de receptores acoplados a proteínas G, que son proteínas que enlazan nucleótidos de guanina (13,14). Existen evidencias experimentales que sugieren que la activación de proteínas G ocurre como parte de la señal de transducción del TNF (13, 14).

iii) Metabolismo de esfingolípidos

También se ha sugerido que el ciclo de la esfingomielina es importante en la transducción de señales de diversas citocinas, entre las que se encuentra el TNF (15). El ciclo de la esfingomielina se inicia con la activación de una esfingomielinasa (neutra o ácida) que hidroliza la esfingomielina generando fosfocolina y ceramida (16). A su vez la ceramida modula diversos procesos como la activación de fosfatasa (15,17) y fosforilación de proteínas cinasa (18, 19), también regula negativamente el protooncogen c-myc (20) y produce apoptosis o citostasis, dependiendo del tipo celular (21), por lo que la ceramida y/o algunos de sus productos metabólicos, son considerados como segundos mensajeros.

iv) Activación de cisteil-proteasas

La activación de caspasas (del inglés: cysteinyl acid aspartic proteases) se describió como un mecanismo implicado en la apoptosis a partir del descubrimiento de CED-3, producto génico necesario para la muerte celular en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, relacionado con la convertasa de interleucina 1b de mamíferos (ICE o caspasa 1). El mecanismo de activación inicial de la cascada de caspasas aún no es claro, sin embargo, se sabe que las caspasas inactivan proteínas que protegen del programa de muerte celular (proteínas de la familia de Bcl-2, ICAD/DFF45, proteína inhibidora de la nucleasa responsable de la fragmentación de DNA, etc). Si bien la activación de las caspasas juega un papel importante en la apoptosis, en general y en la muerte inducida por TNF, en algunos tipos celulares la producción de estrés oxidativo tiene una contribución tanto o más importante que la activación de caspasas (22).

v) TNF y estrés oxidativo

La generación de especies moleculares con radicales libres durante el metabolismo normal de los seres vivos, promueve la activación de reacciones en cadena que generan más radicales libres y la subsecuente destrucción de lípidos, proteínas y daño al DNA (21). Muchas de estas especies reactivas, potencialmente destructivas, contienen oxígeno o nitrógeno. Algunos productos como los superóxidos, son considerados subproductos accidentales del metabolismo aeróbico, mientras que otros, como el óxido nítrico (NO), un potente regulador del tono vascular, o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generado como bactericida por macrófagos y neutrófilos; son productos que resultan de la activación de vías metabólicas especialmente diseñadas para su producción. En general las especies reactivas más abundantes son las especies reactivas de oxígeno (ROS).

Para contrarrestar los efectos de las ROS, las células poseen mecanismos que les permiten neutralizarlas. Entre los compuestos bioquímicos que reaccionan uno a uno con dichas especies moleculares, se cuentan a algunos agentes

metabólicos reducidos como el glutatión y metabolitos relacionados, así como la vitamina C o la vitamina E. También hay enzimas peroxidasas y quelantes de metales libres que además participan en la regeneración y biosíntesis de antioxidantes naturales y agentes reductores (figura 3). Uno de los mecanismos mejor caracterizados requiere de las enzimas superóxido dismutasa y de la catalasa actuando en tandem. La importancia protectora de estos agentes, depende del tipo de ROS generadas, de cómo y dónde se originaron y del tipo de daño que producen (23, 24).

Debido a que *in vivo* la producción de las ROS, y los niveles de las defensas antioxidantes se hallan en equilibrio, cualquier incremento brusco en la formación de ROS o disminución de los sistemas de defensa fácilmente inclina este balance en favor de las especies reactivas de oxígeno, originándose un estrés oxidativo (figura 4).

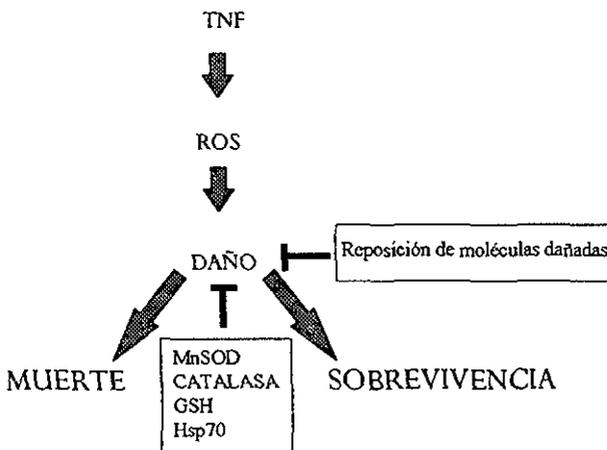


FIGURA 3 Papel del TNF en el mecanismo apoptótico. El TNF propicia la producción de especies reactivas (ROS) que provocan daño peroxidativo, lo que lleva i) activación del programa de muerte o ii) a la activación de agentes antioxidantes, condición que previene e incrementa la supervivencia celular, favoreciendo la oncogénesis

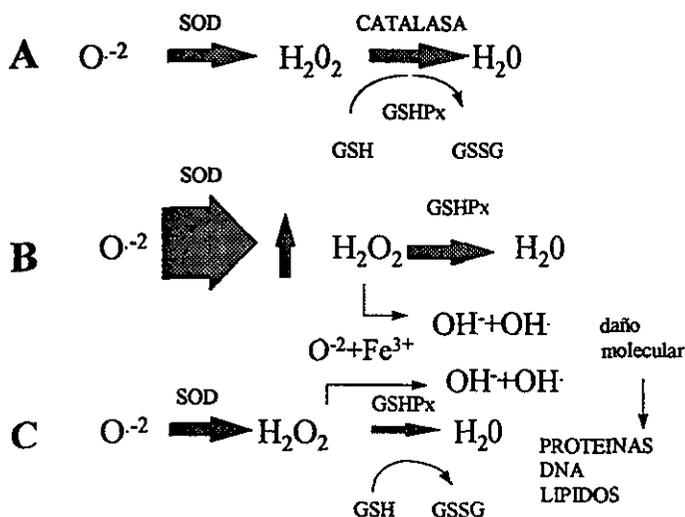


FIGURA 4. Balance entre los sistemas antioxidantes. Diagrama que muestra como el balance entre las enzimas antioxidantes es necesario para mantener controlados los niveles de peróxido de hidrógeno intracelular. Cuando la actividad de la enzima generadora de superóxidos se encuentra en equilibrio con las enzimas que lo metabolizan, SOD, catalasa y glutatión peroxidasa (GSH), se mantienen niveles bajos en la acumulación de peróxido intracelular (A). Sin embargo, si la actividad de SOD es mayor respecto a la GSH peroxidasa (B), o la actividad de GSH o catalasa es menor en relación a la actividad de SOD (C) resulta en un incremento en los niveles de peróxido. La acumulación de peróxido puede llevar a la formación de especies reactivas que promueven la generación de radicales hidroxilo.

Como se mencionó anteriormente, un aspecto característico de la actividad citotóxica del TNF es el incremento en el estrés oxidativo, reportado para diferentes tipos celulares, en respuesta a este factor y otros estímulos apoptóticos

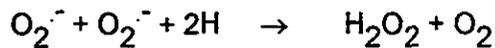
(25, 26, 27, 28, 29, 30). Varias evidencias sugieren que el estrés oxidativo es importante como mediador de la respuesta citotóxica del TNF, y que la respiración mitocondrial juega un papel importante en la generación de este estrés oxidativo (24, 31, 32, 33): i) las mitocondrias de células tratadas con TNF se hallan alteradas en su estructura y función (34, 35), ii) mitocondrias de células L929 generan cantidades elevadas de superóxidos (36), iii) el efecto citotóxico del TNF en células sensibles L929 es bloqueado bajo condiciones de hipoxia (37), iv) la adición exógena de antioxidantes, catalasa o superóxido dismutasa, provee protección contra la citotoxicidad del TNF (38, 39), v) el tratamiento con TNF induce la actividad de la MnSOD y su mRNA en varias líneas celulares y tipos celulares primarios sin alterar la actividad de otras enzimas mitocondriales (28), vi) el factor de transcripción NFκB, cuya activación es dependiente de estrés oxidativo, es liberado rápidamente de su inhibidor citoplásmico IκB y transportado hacia el núcleo después de la adición del TNF (40) y vii) el tratamiento con TNF induce la producción y liberación de especies reactivas de oxígeno (27, 33). De esta forma, el programa de muerte activado por el TNF depende en parte de la formación temprana de ROS y por tanto, la resistencia a la muerte depende de la capacidad de la célula de amortiguar el estrés oxidativo generado (41) (figura 3).

Defensas antioxidantes

MnSOD

El radical superóxido puede ser dismutado a H_2O_2 , para lo cual existen tres tipos de superóxido dismutasas: una dependiente de cobre y zinc extracelular ($CuZnSOD_{ex}$), una similar pero citosólica ($CuZnSOD$) y una mitocondrial dependiente de manganeso (MnSOD). La enzima superóxido dismutasa dependiente de manganeso es una enzima primitiva presente en bacterias y en la matriz mitocondrial de células eucariontes. El cDNA de la MnSOD de varias especies muestra que la secuencia primaria de aminoácidos se halla altamente conservada entre los mamíferos, lo cual sugiere que esta enzima se generó en las células ancestrales como mecanismo de protección contra el daño producido

durante el metabolismo aeróbico celular por la formación de radicales superóxido. Las superóxido dismutasa se requieren en el metabolismo aeróbico tanto de células procariontes como eucariontes (42). Las superóxido dismutasas protegen a la célula de los efectos nocivos de los radicales superóxido al convertirlos a peróxido de hidrógeno; este último es procesado subsecuentemente por la catalasa, enzimas de la familia de las glutatión peroxidasa (GPXs) y otras peroxidases para formar agua, disipando así el peligro de la presencia de estos radicales libres dentro de las células (ver reacción 1))(43).



REACCION 1. Reacción catalizada por la MnSOD (manganeso superóxido dismutasa dependiente de manganeso)

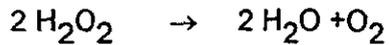
En presencia de iones metálicos, los radicales superóxido reaccionan con H_2O_2 para formar radicales hidroxilo. Dada la alta reactividad de estas especies, resultan sumamente dañinas en todos los sistemas biológicos. Por lo tanto, es importante que la actividad de SOD actúe en serie con peroxidases que inactivan al H_2O_2 convirtiéndolo en H_2O y O_2 (42).

La inducción de MnSOD en respuesta al TNF se ha reportado en varias líneas celulares in vivo e in vitro, sugiriendo que esta citocina induce un aumento en los niveles intracelulares de superóxidos (42, 43, 45). Sin embargo, el significado fisiológico de la actividad de la MnSOD aún no ha sido definido. Se ha reportado el incremento en la resistencia a la actividad citotóxica del TNF en células renales de embrión humano que sobreexpresan MnSOD como resultado de haber sido transfectadas con un vector que expresa MnSOD (42). Estos resultados sugieren que esta enzima es una de las proteínas de protección inducida de manera indirecta por TNF en respuesta a la generación de radicales superóxidos en la mitocondria (28, 30, 43, 44, 45, 46). De hecho se ha propuesto

que la producción de superóxido constituye un componente importante de la actividad citotóxica del TNF (36).

Catalasa

La catalasa es una enzima localizada en los peroxisomas de las células de mamífero, que participa en la eliminación del peróxido de hidrógeno generado por las oxidasas peroxisomales (Reacción 2). La catalasa humana esta constituida por cuatro subunidades idénticas, cada una de las cuales contiene un grupo hemo (48)



REACCIÓN 2. Reacción catalizada por la catalasa (CAT)

Observaciones previas, han demostrado que cepas de las células L929 resistentes al efecto tóxico del H_2O_2 muestran niveles altos en la actividad de catalasa en relación a las células sensibles. Esta resistencia al H_2O_2 muestra una correlación al efecto citotóxico del TNF, mostrando que las variantes resistentes al peróxido, son igualmente resistentes al factor, presentando un incremento del 2.3 % en su actividad de catalasa (37).

Glutation oxido-reductasa (GSH)

Además de las enzimas antioxidantes, existe un sistema reductor de defensa constituido por antioxidantes de bajo peso molecular, uno de los más importantes es el glutati6n. El glutati6n es un tripeptido cuya forma reducida, GSH (Figura 5), est1 asociada con numerosas funciones celulares, incluyendo la sntesis de DNA, la regulaci6n de los niveles de Ca^{2+} citos6lico y la detoxificaci6n de ROS (31, 48)

El GSH tiene un papel esencial en la prevención del daño mediado por el estrés oxidativo, participando en la destrucción del H_2O_2 , atrapando radicales libres y especies reactivas de oxígeno. Además el alto potencial reductor del GSH actúa como un fuerte agente reductor que ayuda a mantener numerosas proteínas y enzimas en estado reducido, y regenera a su vez otros antioxidantes de bajo peso molecular, como el tocoferol y el ascorbato (48). En consecuencia, el decremento del GSH celular, reduce la capacidad de atrapar radicales libres, incrementando el potencial oxidativo celular (31, 49, 50).

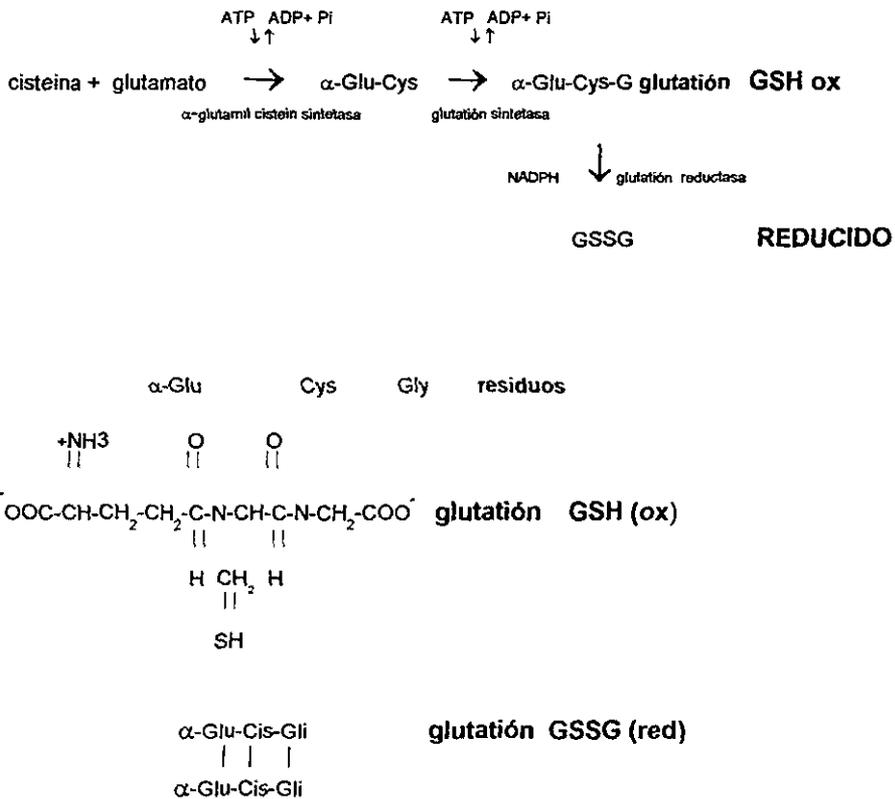
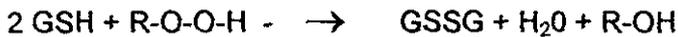


FIGURA 5. Biosíntesis y estructura del glutatión oxidado (GSH) y reducido (GSSG).



glutati3n peroxidasa

REACCI3N 3. Reacci3n catalizada por la glutati3n peroxidasa

En c3lulas L929, se ha visto que el TNF disminuye la concentraci3n total de glutati3n reducido, seguido de un aumento de este en c3lulas sensibles al factor, en tanto que en las c3lulas resistentes, la concentraci3n del glutati3n reducido desciende, regresando a los niveles del control despu3s de 24 h. La disminuci3n del GSH inducido por el TNF seguido de un aumento en la concentraci3n, refleja cambios en el estado de oxidaci3n del ambiente intracelular y sugiere que el GSH se consume al reaccionar con algunas especies reactivas previo a la s3ntesis de m3s GSH en respuesta al estr3s oxidativo (37).

Prote3nas de choque t3rmico

Las prote3nas de estr3s (hsp's) pertenecen a la familia de las prote3nas de choque t3rmico, cuya expresi3n, se sabe, aumenta la sobrevivencia de c3lulas de mam3fero expuestas a temperaturas elevadas o da3o por oxidaci3n (51, 52, 53).

Un patr3n com3n de respuesta al choque t3rmico sucede en muchos organismos, procariontes y eucariontes. Posterior a un incremento de temperatura, la s3ntesis de prote3nas que usualmente se utilizan para el metabolismo celular disminuye o se apaga, y un nuevo grupo de prote3nas son sintetizadas, cuya expresi3n reestablece la s3ntesis de muchas de las prote3nas afectadas por el choque t3rmico. Estas nuevas prote3nas son el producto de los genes de choque t3rmico, los cuales protegen a la c3lula contra una condici3n de estr3s, y son sintetizadas en respuesta tanto al choque t3rmico como a otros

factores. Muchas de las proteínas de choque térmico son chaperonas, que se asocian a otras proteínas ayudando a adquirir su conformación nativa. Las chaperonas reconocen la proteína blanco en su estructura no plegada, durante la síntesis, previniendo la adquisición de una conformación errónea, algo que ocurre con frecuencia cuando el plegamiento se da en un ambiente con temperatura elevada (51, 52, 53, 54).

Existen tres familias de chaperonas, definidas por su relación (o identidad) con las proteínas de estrés. Las familias son llamadas proteínas de choque térmico (hsp's), debido a que originalmente se descubrieron como proteínas cuya síntesis era inducida por este tratamiento; la familia mejor caracterizada es la hsp70, la cual incluye las hsp70 en animales, y un miembro común llamado Bip y la proteína DnaK en *E. coli*, y la hsp60 que en *E. coli* se conoce como GroEL. Cuando hay una situación de estrés que genera la desnaturalización de las proteínas, las chaperonas reconocen la estructura no plegada y se unen a las proteínas desnaturalizadas. De la misma forma que previenen un mal plegamiento en las proteínas recién sintetizadas, evitando que estas proteínas adquieran una conformación inactiva irreversible (54).

La resistencia al TNF, H_2O_2 o medianona (un generador de radicales libres), se halla en relación a la expresión constitutiva de diferentes shsp como las hsp27 de mamífero, hsp27 de *Drosophila* (Dshsp27) y la humana αB . El mecanismo por el cual las shsp confieren resistencia a la muerte celular por el TNF, es aún desconocido, pero sugiere interferencia con algún tipo de estrés generado por este factor (54).

Se ha reportado que en células L929 la sobreexpresión de diferentes formas de shsp correlaciona con un decremento en el contenido celular de ROS, e incluso que la sobreexpresión de estas proteínas bloquea la producción intracelular de los radicales libres generados por el TNF (50, 54). Esta interferencia con el estrés oxidativo resulta en un decremento en la peroxidación de lípidos dependiente de ROS y la oxidación de proteínas. Igualmente, el decremento en los niveles de estas especies reactivas, promueven que la

activación por TNF, del factor de transcripción NF κ B, no se lleve a cabo (50, 51, 54, 55).

Proteína A20

La resistencia contra la acción citotóxica del TNF es un proceso activo que requiere la síntesis de proteínas inducidas por el TNF. Las proteínas específicas inducidas (manganeso superóxido dismutasa y plasminógeno tipo 2) juegan un papel muy importante en la resistencia contra la citotoxicidad al TNF y confiere a las células protección parcial al TNF, lo cual sugiere que en este mecanismo deben participar otros genes (57).

La proteína A20 fue identificada como producto génico primario inducido por TNF en células endoteliales, el cual codifica para una nueva proteína con estructura dedos de zinc (58, 59), y posteriormente en varias otras células (56). La expresión de A20 en líneas celulares de carcinomas humanos de mama, resistentes y sensibles a la citotoxicidad del TNF, mostraron que la resistencia se halla asociada con un incremento en los niveles del mensajero y la proteína, así como la expresión constitutiva de A20. Posteriormente, la transfección de cDNA de A20 en células NIH 3T3 y WEHI 164, confirmó que su expresión tiene resistencia parcial a la citotoxicidad del TNF (57).

Recientemente se encontró que los receptores celulares del TNF (TRAF1 Y TRAF 2) interactúan con A20 (59), por medio de análisis mutacionales demostraron que el amino terminal de A20 interactúa con el dominio carboxilo terminal de TRAF1 y TRAF2. En experimentos de cotransfección, A20 inhibe la activación de NF- κ B mediada por el receptor TRAF2, así como la activación de NF- κ B inducida por TNF e IL-1, lo cual sugiere que: i) A20 inhibe la activación de NF- κ B por diversos estímulos (60, 61). ii) A20 bloquea los mecanismos transduccionales inducidos por el TNF, no en relación a la citotoxicidad, sino mediado por los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 (62) y iii) A20 actúa como

un regulador negativo del TNF, interfiriendo con la señal de transducción en un punto muy temprano después de la unión con el receptor pero antes de la activación de segundos mensajeros (60).

Caracterización de la resistencia a la muerte celular inducida por el TNF

El TNF es citotóxico sólo para algunas células tumorales, en tanto que para muchas otras sólo provoca inhibición en el crecimiento; efectos que no se asocian a diferencias en el número de receptores o su afinidad entre células resistentes o sensibles al TNF (45). Cuando el TNF se administra en combinación con inhibidores de RNA o inhibidores de la síntesis de proteínas, promueve la citólisis, de esta forma, la citotoxicidad, o la estimulación en el crecimiento son respuestas específicas para cada tipo celular, en tanto que la citólisis en presencia de inhibidores como ciclohexamida o actinomicina D es una respuesta general al TNF. El tratamiento con TNF previo a la adición de estos inhibidores en fibroblastos humanos transformados, protege a las células contra el daño provocado por el TNF. Esta observación sugiere que el TNF induce la síntesis de proteínas que protegen contra el daño celular.

La citotoxicidad inducida por el TNF está dada, en parte, por el estrés oxidativo, por lo que estudios previos se han enfocado en caracterizar la resistencia al efecto citotóxico del TNF en ciertas líneas celulares, generando clones resistentes al factor y evaluando en estas los mecanismos de protección, tanto enzimáticos como no enzimáticos.

Evidencias de la resistencia a la muerte celular inducida por el TNF

NUMERO CELULAR	Evidencia	Fuente
	-Alta densidad del cultivo celular interfiere, con la muerte celular inducida por el TNF	Zentella, A. resultado inédito
ROS	-Agentes que inhiben la producción del radical hidroxilo (OH [•]) previenen la muerte celular inducida por el TNF	63 64
	-Células SK-MEL-109 con altos niveles de RNAm de MnSOD son resistentes al paraquat y al TNF	45
MnSOD	-La transfección de células de embriones humanos con un vector de expresión de MnSOD protege contra la citotoxicidad del TNF	28 30
	--En células de cáncer de cervix humano, ME-180, la citotoxicidad del TNF es modulada vía expresión de RNAm sentido o anti-sentido de la MnSOD.	
	-Células SK-MEL-109 resistentes al TNF generadas por tratamiento con TNF y cicloheximida expresan más MnSOD.	45
	-Incremento en la actividad constitutiva de MnSOD en células L929.12 (resistentes al TNF) en relación a la línea sensible.	52
	-Actividad de SOD inducible por el TNF en la clona sensible y no en la resistente al factor	
CATALASA	-Variantes de la línea celular HA-1 de ovano de hamster resistentes al H ₂ O ₂ presentan niveles elevados en la actividad de catalasa	65
PROTEINAS DE CHOQUE TERMICO (hsp's)	La inducción de la respuesta celular al choque térmico por calor o arsenito en la línea celular C3HA de fibroblastos	66
	murinos provee protección a células sensibles al TNF por tratamiento con inhibidores de la síntesis de proteínas.	
	-El gen humano hsp70 transfectado en la línea tumoral WEHI-S provee protección contra la citotoxicidad inducida por el TNF.	55
	-En la línea celular L929 de fibroblastos murinos la expresión de hsp27 humano y de <i>Drosophila</i> reduce los niveles intra-celulares de ROS, y depleta la generación de ROS inducida por el TNF	54
	-La expresión de las shsp's inhibe la activación de NF-kB, peroxidación de lípidos y oxidación de proteínas, efectos del incremento de ROS mediado por el TNF.	
	-La expresión de las shsp's incrementan los niveles de glutatión en la línea celular L929.	
	-En la línea premonocítica humana U937 el choque térmico previene alteraciones en el potencial de membrana y la expresión del producto proteico Bcl-2, la protección correlaciona con la expresión de hsp70	52
	-La activación de SAPK/JNK se inhibe en células en las que se indujo la expresión de hsp70.	
	-Células que constitutivamente sobreexpresan hsp70 son resistentes a la muerte celular inducida por ceramida	66
PROTEINA A20	-La expresión de hsp70 previene el rompimiento de PARP	
	-Se identificó A20 como un gen inducible por el TNF en células NIH 3T3 y en células WEHI y el cual confiere resistencia contra la muerte celular inducida por el factor	
	-En carcinomas de mama humanos, líneas celulares resistentes al TNF expresan constitutivamente el producto génico de A20	62
	-Incremento en la expresión del RNAm y proteína de A20 en carcinomas de mama humanos resistentes al TNF- α	56
	-Transfectantes de A20 en células NIH3T3 y WEHI164 presentan resistencia parcial al TNF	

ANTECEDENTES DIRECTOS

En el laboratorio del doctor Zentella se estudian los mecanismos de transducción del TNF utilizando un modelo de muerte celular apoptótica en fibroblastos murinos L929. Recientemente se ha reportado que el estrés oxidativo es un mecanismo implicado en la muerte celular por TNF (34). La manera de detectar el estrés oxidativo fue utilizando moléculas que atrapan electrones desapareados y los estabilizan haciendo posible su detección, lo cual proporciona una medida indirecta de la ocurrencia de superóxidos y peróxidos en células tratadas con TNF. Uno de estos compuestos, el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), puede ser reducido únicamente por electrones con un alto potencial redox, como los presentes en los superóxidos. Así, el uso del MTT sirvió como sonda para evaluar el estrés oxidativo en células L929 tratadas con TNF.

Los resultados demuestran que aún cuando el número celular disminuye, la reducción de MTT se incrementa, lo cual indica una producción de superóxidos previo o durante la muerte celular, observando este mismo fenómeno en células resistentes al efecto citotóxico del TNF. En estudios previos se han utilizado células resistentes al efecto citotóxico del TNF obtenidas por tratamiento prolongado de bajas concentraciones del factor (45), u obtenidas por mutagénesis química o transfección con Bcl-2 (34). En nuestro laboratorio se han generado clonas estables, resistentes al TNF por mutagénesis química o por transfección de plásmidos de expresión de origen comercial carentes de insertos dentro de sus sitios de policlonación. Por este último procedimiento se obtuvo la clona L929 PR1 resistente a la muerte inducida por el TNF mediante transfección estable del plásmido de expresión pBABE "vacío". La transfección estable con este tipo de plásmidos genera clonas que expresan resistencia al antibiótico, ya que si las clonas se crecen en ausencia del agente de selección, se pierden ambas características (comunicación personal de Erika O. Gómez del laboratorio del Dr. Zentella).



Figura 6. Mapa del plásmido de expresión p-BABE que se expresa en la clona resistente L929-PR1, el cual contiene el gen de resistencia a puromicina y se encuentra bajo el control del promotor SV40.

En otros experimentos en los que se evaluó la generación de radicales libres en células sensibles y resistentes al factor empleando la sonda fluorescente de diacetato de diclorofluoresceína (DFC), muestran que en las células resistentes la producción de ROS es menor (Resultados inéditos de Fabian Romero).

Los resultados anteriores hacen pensar que posiblemente en las células resistentes al efecto citotóxico del TNF se hallan implicados mecanismos de protección que contrarrestan el daño por radicales libres inducido por el TNF o bien que previenen la formación de ROS.

JUSTIFICACIÓN

Recientemente se reportó protección contra el TNF en células L929 bajo condiciones de hipoxia total y parcial. Estos resultados sugieren un papel crítico de las especies derivadas del oxígeno en el mecanismo de citotoxicidad del TNF.

El evaluar los mecanismos de protección antioxidantes o de protección contra estrés térmico en varias clonas celulares que despliegan diferentes grados de sensibilidad al TNF, permitirá determinar la relación entre el nivel de la actividad de las enzimas antioxidantes, la expresión de las proteínas de choque térmico y la proteína A20, con el efecto citotóxico del TNF.

El identificar los procesos por los cuales ciertos tipos celulares son resistentes al efecto citotóxico del TNF, puede contribuir al desarrollo de herramientas y terapias anticancer que mejoren la selectividad en cuanto a la acción citotóxica de este factor.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del trabajo consiste en caracterizar los sistemas de protección en células resistentes al TNF en los fibroblastos murinos L929.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Determinar diferencias en el sistema de transducción del receptor al TNF en la clona sensible L929 P6 y en la clona resistente L929 PR1.
- 2) Evaluar los niveles de estrés oxidativo basal y en respuesta al TNF en ambas clonas celulares
- 3) Evaluar el efecto del H₂O₂ en la sobrevivencia celular en la clona L929 P6 y L929 PR1
- 4) Evaluar la actividad de la catalasa en células sensibles y resistentes a TNF
- 5) Evaluar la expresión de la proteína A20 en células sensibles y resistentes al TNF
- 6) Evaluar la expresión de la proteína de choque térmico hsp70 en células sensibles y resistentes al factor
- 7) Evaluar el efecto de la expresión de la proteína de choque térmico hsp70 en la muerte celular inducida por el TNF en células sensibles y resistentes al factor
- 8) Evaluar el efecto del choque térmico en la sobrevivencia celular en respuesta al tratamiento con H₂O₂ en ambas clonas
- 9) Evaluar el efecto del choque térmico en los niveles de estrés oxidativo en ambas clonas celulares
- 10) Evaluar el efecto del choque térmico en la actividad de catalasa en la clona sensible L929 P6

MATERIALES Y MÉTODOS

Células y condiciones del cultivo

En esta tesis se utilizó la línea de fibroblastos murinos L929, derivada inicialmente de tejido pulmonar de embrión de ratón. En estos experimentos se utilizaron dos clonas derivadas de esta línea celular, la clona L929 P6 y la clona L929 PR1. Esta última se obtuvo por transfección de un plásmido que sólo confiere resistencia a puromicina (PBABE-puro). El resultado de la incorporación del plásmido confirió resistencia contra el TNF por un mecanismo desconocido.

Las células se crecieron en medio completo y 50 mg de gentamicina (medio completo) (GIBCO DRL) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Una vez sembradas, las células fueron mantenidas a 37 °C con una humedad relativa del 100% y una atmósfera de 5% de bióxido de carbono y 95% de aire, supervisando periódicamente la ausencia de infección por micoplasma. Para los experimentos se utilizaron cajas de petri de 10cm² de diámetro. Las células fueron utilizadas para los ensayos experimentales a una densidad de 40x10³ células por cm². Estos cultivos fueron tratados con TNF a diferentes tiempos y concentraciones y fueron empleados para las extracciones de proteína y RNA total. La línea celular HeLa derivadas de un tumor de mama humano se compraron del ATCC y se crecieron en DMEM suplementado con 120% de SFB.

Determinación de la sensibilidad de las clonas L929 P6 y L929 PR1 al TNF

Para evaluar la respuesta de sobrevivencia de las diferentes clonas celulares utilizadas, se hicieron ensayos de viabilidad cuantificando el número celular capaz de excluir azul de tripano después del tratamiento con TNF. Las células se cultivaron por triplicado en placas de 48 pozos, las cuales, se trataron con concentraciones decrecientes de TNF, a una concentración final de 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001 ng/ml, al final de la incubación se aspiró el medio, se lavó el pozo con 200µl de PBS y se agregaron 200µl de tripsina; una vez que las células se despegaron de la superficie de cultivo, 20µl de azul de tripano fueron agregados directamente al pozo, se tomaron 20µl, los cuales se colocaron en una

cámara de Neubauer. Para cada pozo se contaron 4 campos, de los cuales se calculó el promedio, finalmente se estimó el número celular en el pozo multiplicando por el factor de dilución.

Determinación de la sensibilidad de las clonas L929 (P6) y L929 (PR1) al peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

Para evaluar la sensibilidad de la clona resistente y sensible al peróxido de hidrógeno, las células se sembraron a una densidad de 40×10^3 células / cm² en placas de 24 pozos, los cultivos se trataron durante 4 h con H₂O₂ 2mM y se determinó la viabilidad celular por exclusión de azul de tripano como se describió anteriormente.

Ensayo de MTT

Para la determinación de nivel de estrés oxidativo celular, se midió la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), molécula que atrapa electrones con un alto potencial redox.

Las células se sembraron por triplicado en placas de 24 pozos, se trataron con 5 ng/ml de TNF por 18 h. 4 h previas al término del tratamiento con el factor, se agregaron a cada pozo 5 mg/ml de MTT, posteriormente se aspiró el medio y se dejó secar. El MTT se redisolvió en isopropanol ácido, agregando un mismo volumen de PBS. La absorbancia se determinó en un lector de placas de ELISA (BIO-TEK Instruments) a 570 nm.

Extracción de proteína para ensayos de actividad de catalasa

La actividad de catalasa en cultivos control y tratados con 5 ng/ml de TNF se cuantificó a partir de extractos celulares precipitados con acetona. Las células fueron sembradas en cajas de petri de 78.5 cm² a una densidad de 10×10^3 células / cm². Se ha caracterizado que el tiempo de ciclado de las L929 es de 24 h, y debido a que tripzinizar a las células posterior al sembrado daña las células y puede modificar las condiciones del experimento, la determinación de la

actividad se efectuó dos días después de iniciar el cultivo celular, es decir al momento de tener 40×10^3 células / cm^2 .

Para obtener el extracto celular se aspiró el medio de las cajas, se hizo un lavado con PBS antes de tripzinizar con 1 ml de tripzina verseno (0.1 %), una vez que las células se despegaron, se agregaron 2 ml de medio completo, esta suspensión se centrifugó por 3 min a 1000 x rpm. El sobrenadante se desechó, el pelet se lavó con un 1 ml de PBS, finalmente, se precipitó con dos volúmenes de acetona, esto con el objeto de separar la fase orgánica y eliminar cualquier actividad de peroxidasa. El precipitado se mantuvo a 4 °C durante 2 h. Posteriormente se centrifugó el extracto por 5min a 14000 rpm, se desechó el sobrenadante, el pelet se resuspendió en solución amortiguadora (HEPES 20 mM, DTT 1 mM, DESFEROL 1 mM y PMSF 1 mM) en un volumen de 130 μl para después centrifugar nuevamente por 3 min a 14000 x rpm recuperando el sobrenadante, en el cual se hicieron las mediciones de actividad de catalasa por oximetría.

Ensayo de proteína

La cantidad de proteína presente en los extractos celulares fue determinada por el método de Bradford (BIORAD). Se construyeron curvas estándar con una solución concentrada de albúmina (500 $\mu\text{g/ml}$), agregando 200 μl de reactivo de Bradford y 760 μl y 680 μl de agua para un volumen de 40, 60, 80 100 y 120 μl correspondiente de la solución concentrada de albúmina, lo que representa una curva de 5, 10, 15, 20 y 25 μg de proteína. Para calcular la cantidad de proteína de las muestras se agregaron 5 μl del extracto celular, 200 μl de Bradford y se completó con agua a un volumen final de 1 ml. Tanto las muestras de la curva estándar como de los extractos celulares se leyeron en un espectrofotómetro BECKMAN, cuya lectura registró la absorbancia a una longitud de onda de 590 nm. Una vez tomadas las lecturas, se realizó una regresión lineal que por interpolación permitió calcular la cantidad de proteína con base a la lectura dada por la curva estándar.

Ensayo de oximetría

El ensayo de oximetría permitió medir la actividad de catalasa; este ensayo basa su funcionamiento a partir de la reacción catalizada por esta enzima: $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2$. El oxímetro consiste en una cámara en la que se inyecta la muestra, y en la cual se usa como sustrato una solución amortiguadora (fosfatos 50 mM pH 7.8) y peróxido de hidrógeno (1M); un electrodo de Clark, el cual detecta el oxígeno liberado por la actividad de catalasa; y un graficador. A partir de la pendiente del trazo es posible expresar la actividad enzimática (moles de O_2 liberado / min / mg de proteína).

Estas unidades se calcularon a partir del volumen máximo de la cámara (2 ml), considerando que el 100% del oxígeno en la cámara corresponde a 400 μmol . Con el porcentaje de oxígeno producido por minuto se calculó la pendiente, multiplicando el número de cuadros recorridos por minuto por el volumen adicionado de muestra y por la cantidad de proteína adicionada.

Inducción de la expresión de la proteína de choque térmico hsp70

La línea de fibroblastos murinos L929 no expresa constitutivamente la proteína de choque térmico hsp70, sin embargo se ha reportado previamente que el choque térmico induce la síntesis de las hsp's, lo cual promueve la resistencia celular a varios tipos de estrés, incluyendo el choque térmico y la citotoxicidad mediada por el TNF (51). Por lo tanto se indujo la expresión de la proteína de choque térmico hsp70 por calentamiento a 42 °C por 30 min, y se cuantificó la expresión a las 3, 6, 9, 12 y 24 h después del choque térmico, manteniendo los cultivos durante este tiempo en un incubador a 37 °C. Las células se sembraron en cajas de petri de 78.5 cm² a una densidad de 40x10³ células / cm² después de lo cual se sometieron a un choque térmico, realizando la extracción de proteína total para inmunoanálisis al finalizar los distintos tiempos de incubación correspondientes.

Inmunoanálisis

La cantidad de proteína expresada se determinó por inmunoanálisis. La proteína total fue extraída utilizando una solución de lisis conteniendo Tris (50 mM), NaCl (120 mM), NP-40 (0.5 %) e inhibidores de proteasas (aprotinina 70 / U / ml), y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, 0.58 mM). Las células fueron lavadas con una solución de PBS y lisadas con 350 ml de solución de lisis por plato por 15 min sobre hielo. La proteína extraída fue colectada en tubos eppendorf con la ayuda de un gendarme, el lisado celular fue pasado varias veces por una micropipeta, guardando el extracto en congelación a -20 ° C. La cantidad de proteína obtenida por muestra fue determinada por el método de Bradford. Posteriormente, entre 25 µg y 100 µg de proteína de cada muestra fueron sometidos a electroforesis en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 7.5 %, usando como marcador de peso molecular estándares preteñidos de bajo peso y β-galactosidasa preteñida de un peso de 116 KDa. El gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa (HYBOND, Amersham Life Sciences) la cual se bloqueó con una solución de leche al 6% en TBS-Tween durante 1 h y se incubó durante 1 h con un anticuerpo monoclonal contra hsp70 (Santa Cruz, USA) a una dilución 1:10000. Como anticuerpo secundario se adicionaron IgGs de ratón acopladas a biotina (DAKO, USA) a una dilución de 1:2500. La presencia del complejo fue detectada mediante un conjugado avidina-biotina y peroxidasa. Las señales se obtuvieron por autoradiografía revelando la actividad de peroxidasa (Super Signal Kit, Perkin Elmer, USA). Las películas veladas por inmunoanálisis se cuantificaron por densitometría, determinando los niveles de expresión de hsp70 a los diferentes tiempos de incubación. El análisis densitométrico consiste en la determinación del área y longitud de la banda identificada por el anticuerpo dirigido contra hsp70, lo cual permite cuantificar la intensidad de la señal y permitió establecer los tiempos de mayor inducción de la proteína.

Transcriptasa reversa (TR) y PCR

Extracción de RNA. El RNA total fue extraído por el método de tiocianito de guanidino y fenol-cloroformo empleando el reactivo de TRIZOL (GIBCO BRL). Para ello las monocapas de células fueron homogeneizadas con 500 μ l de TRIZOL por cada caja de petri de 78.5 cm² por 5 min. El lisado celular se colectó con un gendarme de plástico y se paso a un tubo eppendorf donde se adicionaron 100 μ l de cloroformo por cada muestra, se agitó vigorosamente durante 15 seg y se dejó a temperatura ambiente por 2 ó 3 min después de los cuales se centrifugó a 1200 x rpm por 15 min a 4° C. Se colectó la fase acuosa (superior) donde el RNA permanece soluble. Para la precipitación del RNA se adicionaron a la fase acuosa 250 μ l de isopropanol y se mantuvo a las muestras 1 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron a 1200 x g por 15 min y el botón de RNA fue lavado con 1 ml de etanol al 75% a 4 °C. El precipitado fue centrifugado nuevamente y secado para disolverlo en agua pretratada con dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma). La cantidad de RNA se determinó por espectrofotometría a 260 nm y su calidad se determinó corriendo las muestras en geles al 1% de agarosa-formaldehído buscando la presencia de las bandas de RNA ribosomal no degradado.

Transcripción reversa y Amplificación por PCR. Se tomó 1 μ g de RNA total siguiendo el protocolo que presenta el juego de reactivos de TR y PCR (Perkin Elmer); para la reacción de transcripción reversa se utilizó como control interno el RNA del Kit para la síntesis de cDNA. Esta reacción se realizó como se describe a continuación: 15 min a 42 °C, 5 min a 99 °C y por último 5 min a 5 °C ; para la reacción de PCR se sintetizaron oligonucleótidos específicos reportados por Dixit y colaboradores (58), para la amplificación del cDNA de la proteína A20. Para la reacción de amplificación se usó el promedio de la T_m de los oligos utilizados. Para cada reacción se empleó el siguiente protocolo: 2 min a 95 °C, 35 ciclos de 1 min a 95 °C y 1 min al promedio de la T_m. Al terminar los 35 ciclos se llevó a cabo una extensión por 7 min a 72 °C. Del producto de la reacción de PCR se tomaron

10 µl y se corrieron en un gel de agarosa al 1%.

OLIGONUCLEÓTIDO	T _m (°C)		TAMAÑO DEL PRODUCTO ESPERADO (PB)
	individual	promedio	
A20 (sentido) ATGCGGAAAGCTGTGAAGATA	64.6	64	1012
A20(antisentido) CGTGCTGAACAAGCTCAAAGT	64.9		

Marcaje del oligonucleotido interno y Southern Blot Para asegurar que la banda obtenida por PCR correspondía a la proteína A20, se hibridó el producto amplificado con los oligonucleótidos específicos para A20, con un oligonucleótido interno.

OLIGONUCLEOTIDO

INTERNO	T _m (°C)
A20 (sentido) CGGGGTAGGTTTGAAGACTTA	63.6

1 µg del producto de PCR de dos muestras representativas de la reacción de amplificación se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Previo a la transferencia del gel a una membrana de nylon, el DNA se trató con una solución desnaturalizante (NaOH 5 N, NaCl 5 M y H₂O) durante 30 min, posteriormente, durante otros 30 min el gel se embebió en una solución neutralizante (TRIS 2 M, NaCl 5 M y H₂O). Aproximadamente 100 ng de DNA (1

μl del oligonucleótido interno) se marcaron por quinación con la enzima T₄ quinasa en presencia de 2 μl de P³²-γATP. Las condiciones de prehibridación e hibridación fueron las siguientes:

Solución de prehibridación

H ₂ O	6.15 ml
SSC (20x)	3 ml
Denharts (50x)	200 μl
DNA de Salmón (100μg/ml)	40 μl
SDS (10%)	500 μl

El tiempo de incubación fue de 12 h a 37 °C

Solución de hibridación

H ₂ O	6.73 ml
SSC (20x)	3 ml
Denharts (50x)	200 μl
tRNA (10mg/ml)	20 μl
Pirofosfato de sodio	50 μl

El tiempo de incubación fue de 12 h a 37 °C. La membrana fue lavada con SSC (6x) y 0.05% de Pirofosfato de sodio, comenzando 5 °C arriba de la T_m del oligo. Finalmente se expuso en una pantalla de fosforímetro (Molecular Dynamics)

Obtención de extractos nucleares y geles de retardo

Los extractos nucleares se obtuvieron a partir de la línea de fibroblastos murinos L929. Las células se colectaron con espátula y se resuspendieron en un amortiguador hipotónico (Hepes 10mM, KCL 10mM, 1 mM DTT pH 7.9) para ser lisadas por congelación. Los núcleos se separaron por centrifugación a 800 x g por 10 min a 4°C. Para la extracción de las proteínas nucleares, el pellet se resuspendió en amortiguador hipotónico (Hepes 20mM, 0.4 mM NaCl, 25% glicerol, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT y 0.5 mM PMSF a pH 7.9), y se incubaron por 30 min a 4 °C en agitación. Esta mezcla se centrifugó a 16,000 x g por 20 min a

4°C y el sobrenadante se mezcló en proporción 1:1 con el amortiguador de dilución (20mM Hepes, 50mM KCl, 20% glicerol, 0,2 mM EDTA, 1mM DTT y 0.5 mM PMSF). La cantidad de proteína se determinó por el método de Bradford y se almacenó en alícuotas de 10 µg a -70°C hasta su utilización.

Para los ensayos de retardo de movilidad electroforética los extractos nucleares se incubaron por 25 min a temperatura ambiente en un buffer que contiene 50mM DTT, 2% glicerol, 20 µg albumina sérica bovina, 50 U de polihexanucleótido, 2 µg de polideoxinosina-polideoxicidina (Pharmacia) y 1µl de oligonucleótido fosforilado por kinación (oligonucleótido para el sitio consenso de unión del factor de transcripción NFκB) marcado radioactivamente a través de la incorporación de ³²P-αdCTP .

Las muestras se corren en geles no desnaturalizantes de acrilamida al 5% a 100 V por 1 hr y una vez secados al vacío se exponen a una película de autoradiografía (Kodak) o a una pantalla de fosforímetro (Molecular Dynamics).

Análisis Estadístico

Todos los experimentos se hicieron por triplicado al menos en dos o tres ocasiones independientes. Los resultados se expresan como promedio + / - la desviación estándar.

La significancia estadística se calculó obteniendo el valor de p de la prueba de student. En cada pie de figura se da la información particular de cada análisis.

RESULTADOS

Activación del factor de transcripción NFκB en respuesta al TNF en la clona sensible (L929 P6) y resistente al factor (L929 PR1)

El factor de transcripción NFκB es activado por varias vías de señalización, muchas de las cuales están relacionadas con respuestas a estrés celular. Estudios previos en los que se caracterizaron las vías de señalización inducidas por la activación de los receptores del TNF (TNF-R1 y R2) mostraron que el TNF autorregula de manera negativa la inducción de muerte celular, hecho que parece depender de la activación del factor de transcripción NFκB, el cual induce genes que previenen la apoptosis.

La regulación de NFκB se basa en su localización celular, cuando está activo reside en el núcleo, y cuando se encuentra en estado inactivo se localiza en el citoplasma, dicha localización es controlada por proteínas inhibitorias llamadas IκB's. Con base en este hecho, la translocación de NFκB del citoplasma al núcleo sirvió como parámetro para determinar de manera indirecta el estado de activación de los receptores al TNF en la clona sensible (L929 P6) y resistente al factor (L929 PR1).

Las células se trataron con diferentes concentraciones de TNF (0.001, 0.01, 0.1 y 1 ng /ml) por 20 min, posteriormente se obtuvieron extractos nucleares con los cuales se realizaron ensayos de retardo como se describe en el apartado de materiales y métodos (figura 7 A). El análisis de la radiografía de los ensayos de retardo (figura 7 B) muestra que la translocación de NFκB es dosis dependiente incrementándose para ambas clonas, con intensidad ligeramente disminuida en la activación de NFκB para la clona resistente (L929 PR1)

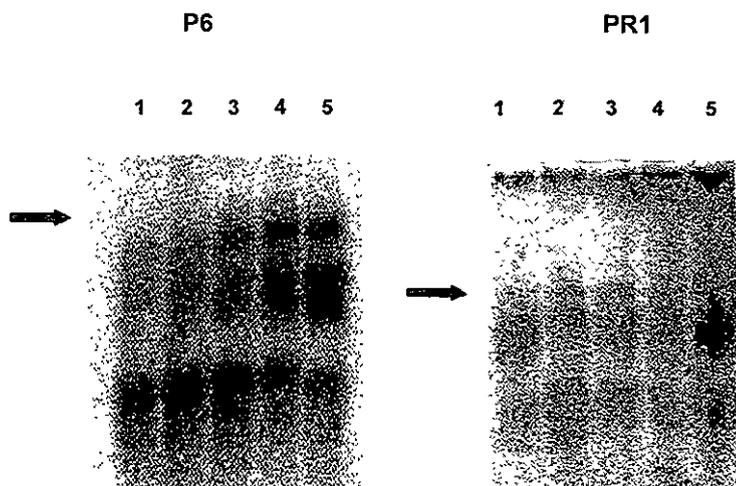
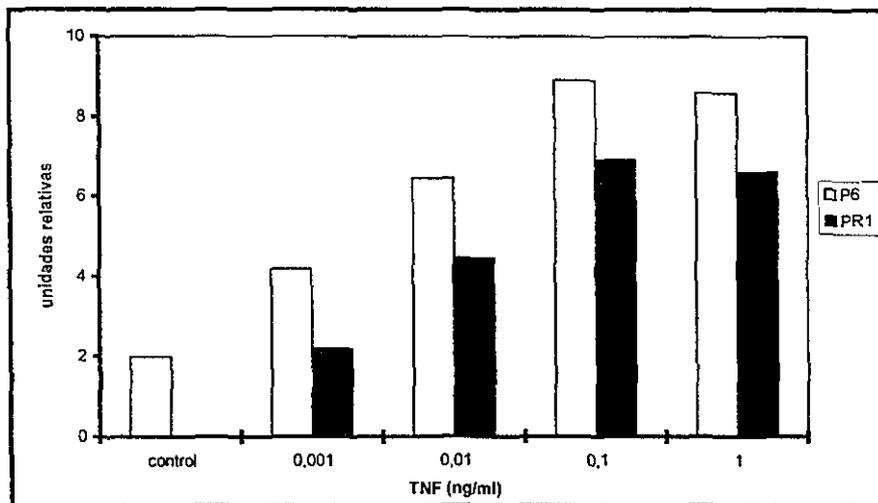
A**B**

Figura 7 **A** Autorradiografía de los ensayos de retardo de movilidad electroforética en las clonas sensible (L929 P6) y resistente (L929 PR1) control (carril 1), 0,001 (carril 2), 0,01 (carril 3), 0,1 (carril 4) y 1ng/ml (carril 5) La flecha indica el complejo seleccionado para cuantificar la translocación del factor NFκB al núcleo. **B** Cuantificación de la señal de NFκB a partir de los ensayos de retardo para ambas clonas. Valores expresados en unidades relativas

Caracterización del efecto citotóxico del TNF en las clonas con fenotipo sensible (L929 P6) y resistente (L929 PR1) al factor

Con el objetivo de definir la sensibilidad al TNF tanto de la clona sensible L929 P6 como de la clona resistente L929 PR1, generada al transfectar de manera estable un plásmido que confiere resistencia a puromicina (pBABE-puro) (figura 6), se evaluó la viabilidad por conteo celular en respuesta a concentraciones crecientes de TNF (0.05, 0.5, y 1 ng/ml) después de 24 h de tratamiento con el factor (Fig 8 A). En los ensayos de viabilidad se observa que aún después de 24 h para la concentración más alta de TNF (1 ng/ml) la clona resistente (L929 PR1) muestra un 75% de sobrevivencia, en tanto que las células sensibles (L929 P6) tienen un 18% de viabilidad. El ensayo anterior mostró que para las P6 después de 24h de tratamiento con TNF, la viabilidad cae por debajo del 20% .

La figura 8 B muestra un curso temporal en respuesta al tratamiento con 0.01, 0.1 y 1 ng/ml de TNF después de 12, 24 y 36 h. Los resultados muestran que la concentración de TNF con mayor efecto en la viabilidad fue la de 1ng/ml, con un porcentaje e sobrevivencia de 39 %, 21 % y 7.4 % para 12, 24 y 36 h de tratamiento con TNF respectivamente.

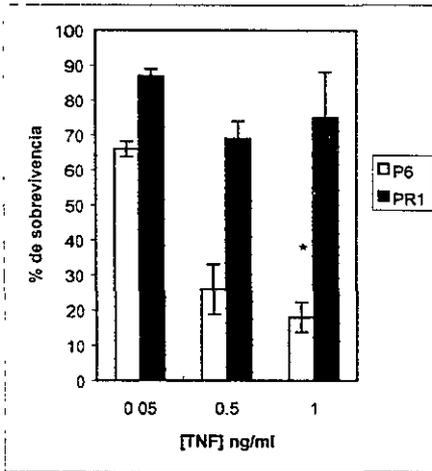
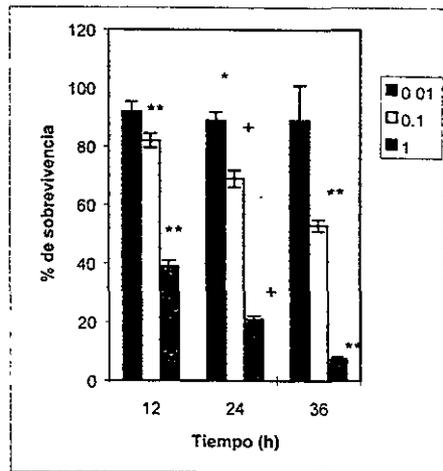
A**B**

Figura 8 Ensayo de citotoxicidad en células sensibles (L929 P6) y resistentes (L929 PR1) al TNF. **A**, curva de sobrevivencia para la clona sensible (L929 P6) y resistente (L929 PR1) después de 24 h de incubación con TNF (0.05, 0.5 y 1 ng/ml). (* $p < 0.05$; $n = 3$). **B**, curva de sobrevivencia para la clona sensible (L929 P6) después de 12, 24 y 36 h de incubación con TNF (0.01, 0.1 y 1 ng/ml). (* $p < 0.05$, ** 0.005 , + 0.001 , $n = 18$). El porcentaje de sobrevivencia esta representado respecto al control.

Determinación de los niveles de estrés oxidativo basal y en respuesta al TNF en las clonas L929 P6 y L929 PR1

La citotoxicidad inducida por el TNF está dada en parte por el estrés oxidativo, estudios previos en los que se ha caracterizado la resistencia al efecto citotóxico del TNF, se ha asociado esta resistencia con la amplificación de mecanismos enzimáticos antioxidantes como la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD), lo cual sugiere que el TNF eleva los niveles intracelulares de ROS generados provocando muerte celular. Con la finalidad de determinar el estrés oxidativo basal y en su posible aumento en respuesta al TNF en ambas clonas, se evaluó la reducción del MTT a 12 y 20 h de tratamiento con el factor (5 ng/ml).

En la figura 9 A se observa que la clona sensible (L929 P6) a 12 h y 20 h de tratamiento con TNF eleva los niveles de MTT reducido de manera significativa, con un 50% de incremento para ambos tiempos, mientras que la clona resistente (L929 PR1), se mantiene en los niveles basales (figura 9 B). Al comparar el nivel oxidativo basal entre ambas clonas, encontramos que la clona resistente (L929 PR1) presenta niveles elevados (0.7 unidades arbitrarias) en comparación a la clona sensible (L929 P6) (con 0.45 unidades arbitrarias), lo que representa un aumento del 80% en la reducción basal de MTT por parte de las células resistentes (L929 PR1).

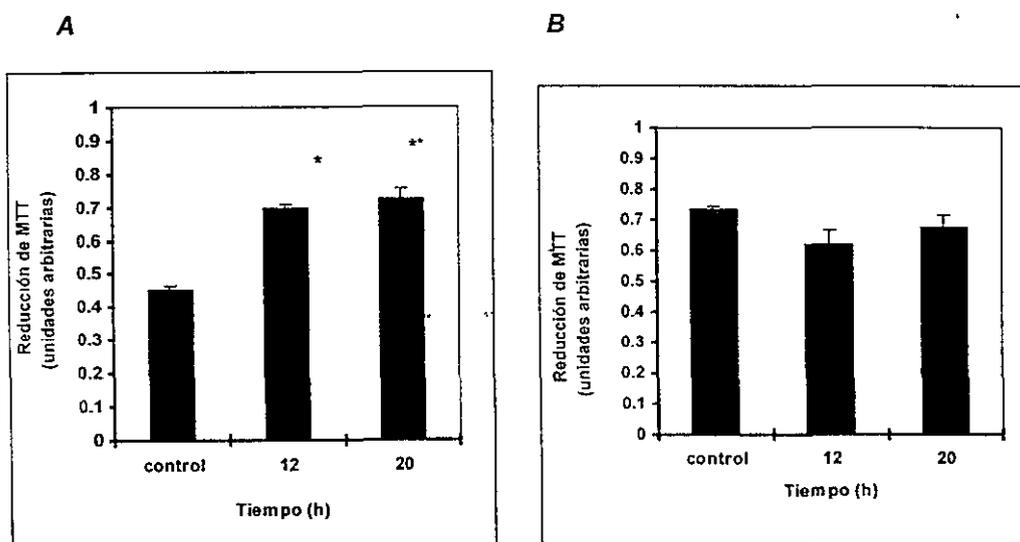


Figura 9. Reducción de MTT en la clona sensible (L929 P6) **A** y resistente (L929 PR1) **B** al TNF Reducción de MTT después de 12 y 20 h de tratamiento con el TNF (5ng/ml) en la clona sensible ($p < *0.05$ $**0.005$ $n = 3$). Al comparar los controles la clona resistente (L929 PR1) reduce 2.5 veces más MTT que la sensible (L929 P6) ($p < *0.001$ $n = 3$, diferencias entre controles). La reducción de MTT está representada en unidades arbitrarias de densidad óptica (570 nm)

Efecto del peróxido (H₂O₂) en la sobrevivencia de las clonas L929 P6 y L929 PR1

El aumento en la reducción de MTT en respuesta al TNF en la clona

sensible (L929 P6) sugiere la inducción de estrés oxidativo, mientras que en la clona resistente (L929 PR1), el tratamiento con TNF no eleva la reducción de MTT por encima del control. Con el propósito de evaluar una correlación entre la resistencia al TNF con la resistencia a un estrés oxidativo inespecífico, se evaluó la resistencia de cada una de las clonas al estrés oxidativo generado por la adición de H_2O_2 de manera exógena.

La figura 10 muestra la sobrevivencia celular después de 4 h de tratamiento con 2 mM de H_2O_2 , se encontró que la clona resistente al TNF (L929 PR1) también presenta resistencia al H_2O_2 con un 53% de viabilidad celular, mostrando una sobrevivencia 2.5 veces mayor comparada con la clona sensible (L929 P6).

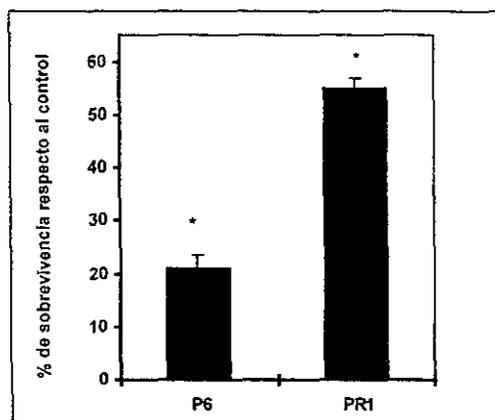


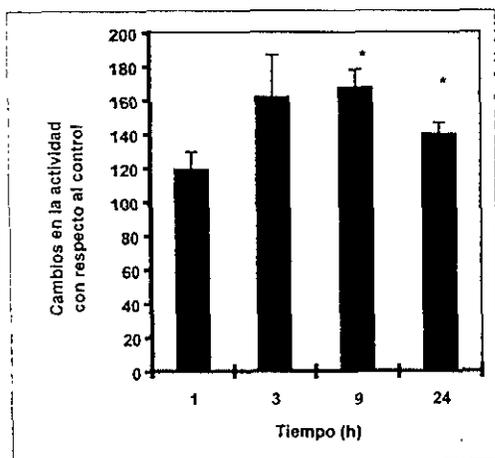
Figura 10. Ensayo de citotoxicidad al H_2O_2 en la clona sensible (L929 P6) y resistente (L929 PR1) al TNF. La viabilidad celular se evaluó por exclusión de azul de tripano después de 4 h de tratamiento con H_2O_2 (2mM) (* $p < 0.001$, $n=15$). El porcentaje de sobrevivencia está representado respecto al control

Efecto del TNF en los niveles de actividad de catalasa en las clonas L929 P6 y L929 PR1

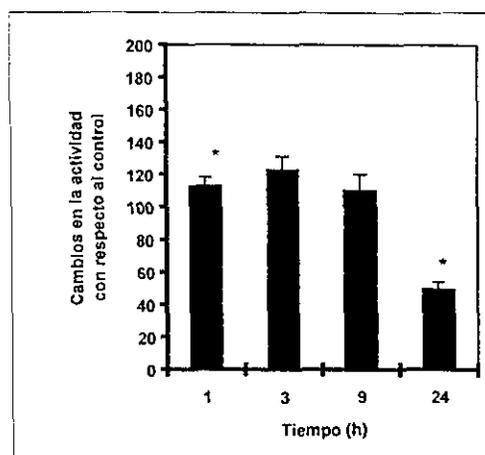
Una vez demostrado que la clona L929 PR1 es resistente tanto al efecto citotóxico del TNF como al peróxido de hidrógeno, y que cada una de las clonas presentan un nivel de estrés oxidativo diferente, se quizá evaluar la

actividad basal de catalasa y las posibles alteraciones en esta actividad en respuesta al TNF después de 1, 3, 9, y 24 h de tratamiento con TNF (5 ng/ml). La actividad de catalasa para la clona L929 P6 presenta un incremento del 12 % desde la primera hora, mostrando los valores máximos a 1 y 3 h, posteriormente la actividad tiende a disminuir (figura 11 A) La actividad de catalasa para la clona resistente (figura 11 B) alcanzó los valores máximos a las 3 y 9 h de tratamiento para después regresar a los valores del control. Con el objeto de determinar diferencias en el nivel de actividad de catalasa entre ambas clonas independiente del efecto del TNF, se comparó la actividad basal en ambas clonas, donde se observa que la clona L929 PR1 presenta un menor nivel de actividad que la clona L929 P6 (73%) (figura 11 C).

A



B



C

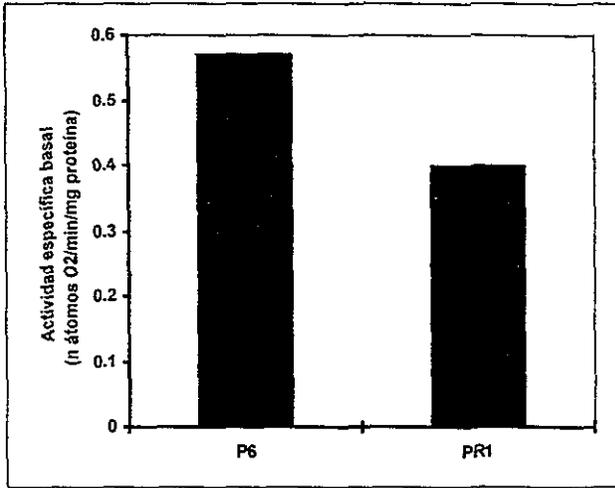


Figura 11. Actividad de catalasa en respuesta al TNF en la clona sensible (L929 P6) A ($p < 0.05$, $n = 6$) y resistente (L929 PR1) B ($p < 0.05$, $n = 6$) al factor. La actividad de catalasa expresada en n átomos O₂ / min / mg proteína, se evaluó por oximetría después de 1, 3, 9, y 24 h de tratamiento con TNF (5 ng/ml) en la clona sensible y en la clona resistente. Actividad representada respecto al control. C, actividad basal de catalasa en ambas clonas ($p < 0.05$, $n = 6$)

Defensas no antioxidantes durante la muerte celular inducida por el TNF

Considerando que el TNF induce un aumento en el estrés oxidativo reflejado en el aumento en la reducción de MTT en la clona sensible (L929 P6) (figura 9 A) se decidió estudiar la expresión de proteínas de estrés en respuesta al TNF. Entre las proteínas que se sintetizan en respuesta a una condición de estrés se encuentran las proteínas de choque térmico como la hsp70, cuya expresión aumenta la sobrevivencia celular en mamíferos en respuesta al choque térmico (66); otra de estas proteínas es la proteína A20 con estructura dedos de zinc (56). Resultados previos han demostrado que la sobreexpresión de ambas proteínas correlaciona con la resistencia celular inducida por el TNF(54, 55, 56, 59, 61, 66). Estos estudios muestran que la sobreexpresión de las proteínas de choque térmico bloquean los niveles de ROS generados por el TNF, además que su sobreexpresión correlaciona con un

aumento en contenido intracelular de glutatión reducido. Por lo anterior se decidió evaluar la correlación entre la expresión de estas proteínas y la resistencia al efecto citotóxico del TNF en las clonas L929 P6 y L929 PR1.

Efecto del TNF sobre los niveles de RNA mensajero de la proteína A20 en las clonas L929 P6 y L929 PR1

Con el objetivo de medir cambios en la expresión del mensajero de la proteína A20 en respuesta al TNF- α , se aisló RNA total de cultivos de células sensibles (L929 P6) y resistentes (L929 PR1) tratados con el factor por 3 y 12 h. Para ello se utilizó la técnica de TR-PCR, usualmente esta técnica se emplea como método de determinación cualitativa, para que la PCR sirva como análisis cuantitativo y permita establecer comparaciones, es necesario asegurar que las diferencias en los niveles de mensajero se reflejen en la intensidad de las bandas de los productos de PCR, y no sean resultado de diferencias en la cantidad de RNA utilizada en cada condición. Para lo cual se partió de la misma dilución de RNA que se visualizó corriendo las muestras en geles de agarosa-formaldehido buscando la presencia de las bandas de RNA ribosomal (figura 12 A), estas diluciones se emplearon para llevar a cabo las reacciones de amplificación (figura 12 B). Para asegurar que las bandas del producto obtenido por amplificación correspondían a la proteína A20, se realizó un análisis tipo Southern (figura 12 C).

Los resultados obtenidos muestran que hay una inducción en la expresión de A20 para la clona sensible (L929 P6) después de 3 h de tratamiento con el TNF (2 veces), observando el máximo nivel de expresión de la proteína A20 a las 12 h (3.5 veces). Para la clona resistente (L929 PR1), el nivel de expresión después de 3 h de tratamiento con TNF se incrementa 1.3 veces, no encontrando expresión a tiempos posteriores (12 h).

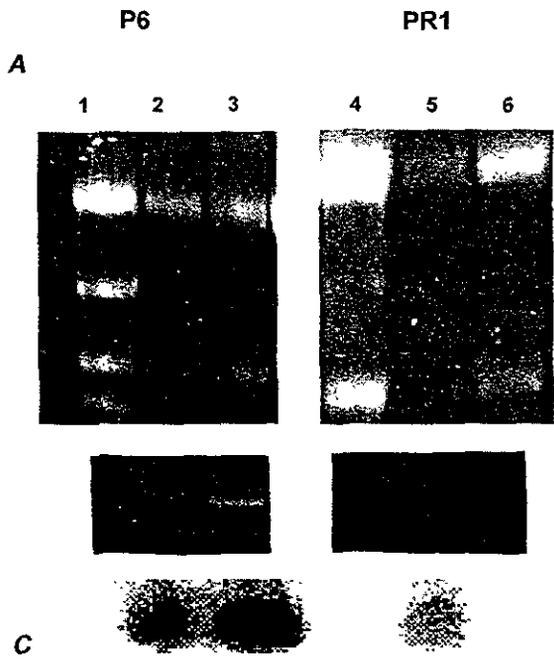


Figura 12 Cambios en los niveles de RNAm de la proteína A20 en respuesta al TNF- α . La clona sensible (L929 P6) y resistente (L929 PR1) al TNF fueron tratadas con el factor por 3 (carril 2 y 5) y 12 h (carril 3 y 6) control (carril 1 y 4) , después se realizó una extracción de RNA total, el cual se separó en un gel de agarosa y se visualizó con bromuro de etidio **A**, posteriormente se evaluó la cantidad de transcrito por TR y PCR de acuerdo a materiales y métodos, **B. C** Análisis tipo Southern.

Niveles de inducción de la proteína de choque térmico hsp70 en las clonas L929 P6 y L929 PR1

Por medio de inmunoanálisis se evaluó la presencia de la proteína hsp70 utilizando un anticuerpo monoclonal contra la proteína. El inmunoanálisis contra hsp70 muestra que ninguna de las clonas estudiadas expresa de manera constitutiva la proteína, se utilizó como control células HeLa que expresan de manera constitutiva la proteína hsp70 (Figura 13). Con el objetivo de evaluar el nivel de expresión de la proteína hsp70 en respuesta a un choque térmico, se obtuvieron muestras 3, 6, 9, 12 y 24 h después de un calentamiento a 42 °C por 30 min.

En la clona P6 se observó una inducción desde las 3 h, alcanzando un máximo de expresión a las 3 y 6 h para después caer paulatimamente (figura 14 A). La clona PR1 presenta una cinética de inducción diferente, la expresión se incrementa a lo largo del tiempo con la máxima expresión a las 12h y con un decremento drástico a las 24 h (figura 14 B).

HeLa P6 PR1



Figura 13. Expresión constitutiva de hsp70 en células HeLa, sensibles (L929 P6) y resistentes (L929 PR1) después de 18 h de tratamiento con TNF (5 ng/ml)

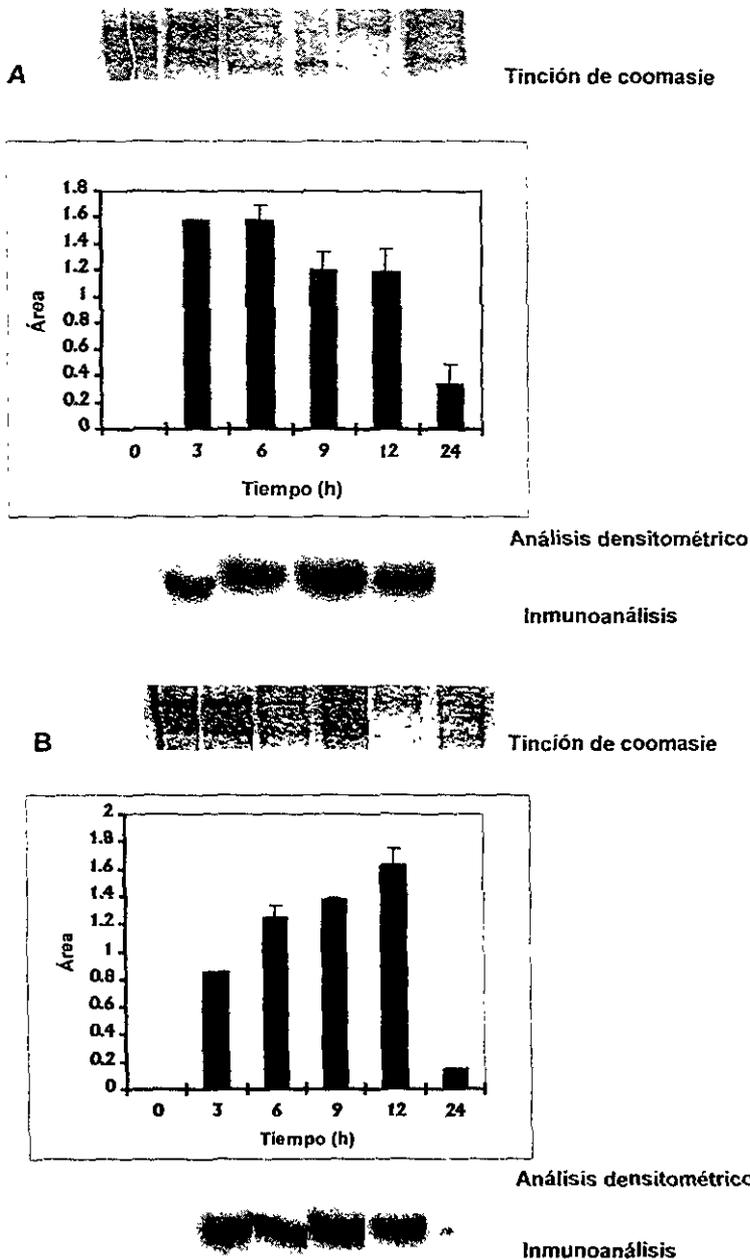


Figura 14. Expresión de la proteína de choque térmico hsp70 en la clona sensible (L929 P6) y resistente (L929 PR1) al TNF. Análisis densitométrico del inmunoblot de hsp70 en respuesta a choque térmico (42 °C, 30 min), después de 3, 6, 9, 12 y 24 h de incubación en la clona sensible **A**, y en la clona resistente **B**. Como control de cargado para cada gel se muestra la porción del gel no transferida teñida con coomasie

Efecto del choque térmico sobre la muerte celular inducida por el TNF en las clonas L929 P6 y L929 PR1

Una vez establecida la cinética de inducción de la proteína hsp70, se evaluó la sobrevivencia celular en respuesta al TNF después del choque térmico en la clona sensible (L929 P6) y en la clona resistente (L929 PR1); esto con el objetivo de determinar una posible correlación entre la expresión de la proteína hsp70 y la protección al efecto citotóxico del TNF. El protocolo experimental consistió en someter a las clonas a un choque térmico (42 °C/30 min). Después de 3, 6, 12 y 24 h las clonas fueron estimuladas con TNF (5ng/ml) por 18 h más.

El choque térmico tuvo un efecto protector contra el efecto citotóxico del TNF, en particular el aumento en viabilidad fue mayor cuando los niveles de expresión de la proteína hsp70 se encontraban elevados al inicio del tratamiento con TNF. En la clona sensible (L929 P6), la viabilidad aumentó en más del doble (de 20 a 45%) desde las 3 h después del choque térmico, alcanzando un máximo a las 6 h (2.4 veces con respecto al control sin choque térmico). La viabilidad disminuyó cuando el TNF se adicionó 12 y 24 h después del choque térmico (figura 15 A). Este fenómeno de protección se manifestó incluso en la clona resistente (L929 PR1), en la que la sobrevivencia aumentó del 80 al 100% a las 12 h después del choque térmico, tiempo al cual presenta el nivel más alto en la expresión de la proteína hsp70 (figura 15 B). En el análisis de correlación (figura 15 C) se observa que hay una relación lineal entre los niveles de expresión de hsp70 y el porcentaje de sobrevivencia en la clona sensible (L929 P6), con un valor de $r = 0.99$, mientras que en la clona resistente esta relación no es lineal con un valor de $r = 0.75$.

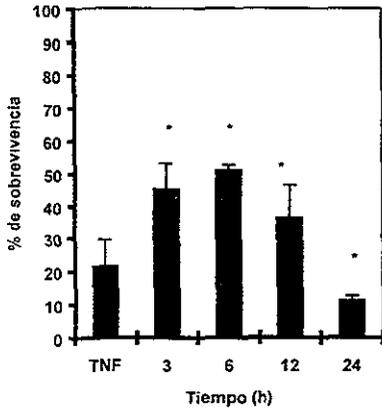
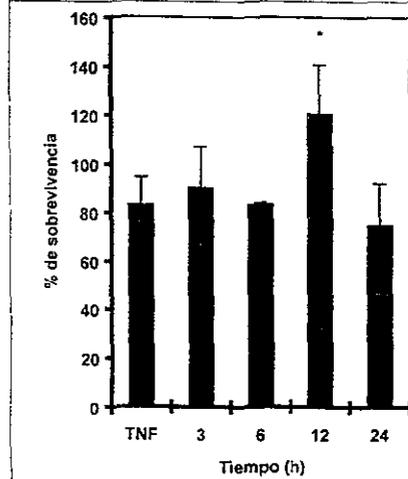
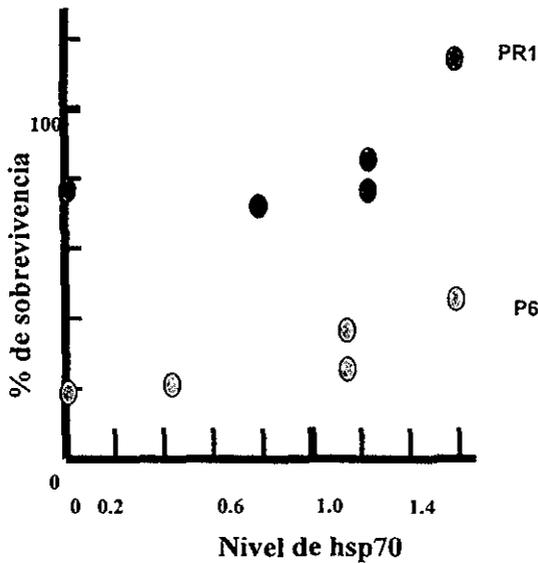
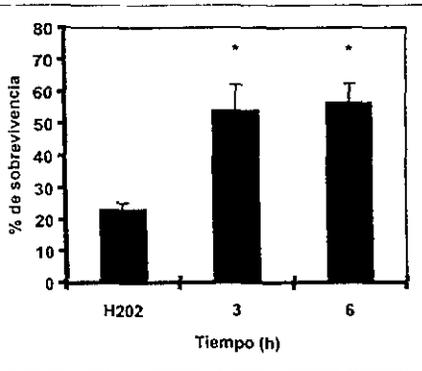
A**B****C**

Figura 15. Efecto del choque térmico en la viabilidad en respuesta al TNF en la clona sensible (L929 P6) y resistente al factor (L929 PR1). Las clonas se sometieron a un choque térmico (42 °C, 30 min) después del cual, las células se incubaron por 3, 6, 9, 12 y 24 h, al finalizar el tiempo de incubación las células se trataron con TNF (5 ng/ml), evaluando la viabilidad celular por exclusión de azul de tripano 18 h después del tratamiento con el factor en la clona sensible **A** (* $p < 0.01$ $n = 3$), y en la clona resistente **B** (* $p < 0.01$ $n = 3$). El porcentaje de sobrevivencia está representado respecto al control **C**, Análisis de correlación entre los niveles de expresión de la proteína de choque térmico hsp70 y protección contra el efecto citotóxico del TNF en la clona sensible (L929 P6) ($r = 0.99$) y resistente (L929 PR1) ($r = 0.75$) al factor

Efecto del choque térmico en la sobrevivencia de las clonas L929 P6 y L929 PR1 por peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Con la finalidad de saber si el choque térmico tiene un efecto en la viabilidad en respuesta al estrés oxidativo generado de manera exógena, se evaluó la sobrevivencia celular 3 y 6 h después del choque térmico, tratando a los cultivos celulares por 4 h con H₂O₂ (2mM). Para la clona sensible (L929 P6) hubo un incremento significativo en la viabilidad (2.7 veces) para ambos tiempos de incubación después del choque térmico (figura 16 A), en tanto que para la clona L929 PR1 el choque térmico no confirió resistencia al efecto del peróxido, la viabilidad se mantuvo a los niveles del control (figura 16 B).

A



B

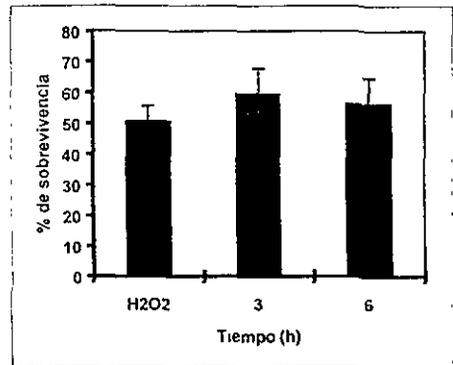


Figura 16. Efecto del choque térmico sobre la viabilidad en respuesta al H₂O₂ en la clona sensible (L929 P6) y resistente (L929 PR1) al TNF. Las clonas se sometieron a un choque térmico (42 °C, 30 min) después del cual, las células se incubaron por 3, y 6 h, al finalizar el tiempo de incubación las células se trataron por 4 h con H₂O₂ (2mM), la viabilidad celular se evaluó por exclusión de azul de tripano en la clona sensible A (*p<0.001, n=3) y en la clona resistente B (n=3) El porcentaje de sobrevivencia está expresado respecto al control

Determinación de los niveles de estrés oxidativo en respuesta al TNF después del choque térmico en las clonas L929 P6 y L929 PR1.

Estudios previos han mostrado que la sobreexpresión de la proteína de choque térmico hsp70 en la línea L929 de fibroblastos murinos depleta la

generación de ROS generados por el tratamiento con TNF (54). Con el objetivo de evaluar el efecto del choque térmico en los niveles de estrés oxidativo en respuesta al TNF por 18 h (5 ng/ml) en la clona sensible (L929 P6) y resistente al TNF (L929 PR1), se determinó la reducción de MTT en ambas clonas 3 y 6 h después del choque térmico.

La figura 17 A muestra que en la clona L929 P6 el estrés oxidativo se mantiene sobre los niveles del control para 3 y 6 h, mientras que para la clona L929 PR1 los niveles de ROS generados se reducen significativamente para ambos tiempos (figura 17 B).

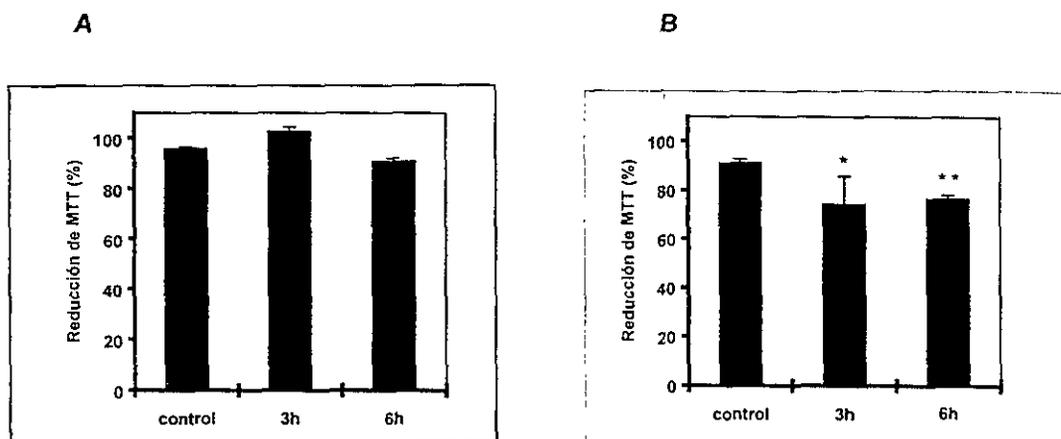


Figura 17. Efecto del choque térmico en la reducción de MTT en respuesta al TNF en la clona sensible (L929 P6) y resistente (L929 PR1) al factor. Las clonas se sometieron a un choque térmico (42 °C, 30 min), posteriormente 3, 6, y 12 h después los cultivos celulares se trataron con TNF (5 ng/ml) por 18 h. Al final de la incubación con el factor, se evaluó el nivel de estrés oxidativo midiendo la reducción de MTT en la clona sensible A y en la clona resistente B (* $p < 0.05$ ** 0.005 , $n=3$). Los valores de reducción de MTT están representados respecto al control.

Efecto del choque térmico en los niveles de actividad de catalasa en la clona L929 P6

La expresión de la proteína hsp70 después del choque térmico es sólo una de las respuestas celulares a un estado de estrés, mecanismo que ayuda a contrarrestar el daño celular generado e incrementar la sobrevivencia. Se sabe que la expresión de la proteína de choque térmico hsp70 induce la expresión de la enzima glutatión peroxidasa, disminuyendo los niveles de

estrés oxidativo y que esto correlaciona con un incremento de la viabilidad celular. Con la finalidad de analizar si una de las respuestas celulares inducidas por el choque térmico es la elevación de otros mecanismos antioxidantes como la catalasa, que pudiera contribuir con la protección al efecto citotóxico del TNF, se evaluó la actividad de esta enzima 6 y 12 después del choque térmico. Los resultados de actividad de catalasa en respuesta al TNF mostraron que la mayor actividad en las células L929 P6 se presenta 1h después de adicionar el TNF, por lo que la actividad de la enzima se evaluó 1 h después de su adición (5 ng/ml), y 6 y 12 h posteriores al choque térmico. Una vez demostrado que para la clona sensible el choque térmico correlaciona con la protección contra el efecto citotóxico del TNF y del H₂O₂, se decidió analizar la actividad de catalasa únicamente en la clona L929 P6.

Los resultados presentados en la figura 18 muestran que la actividad de catalasa cae después de 6 h (0.7 veces la actividad del control) y que esta aumenta solo 1.22 veces a 12 h de incubación después del choque térmico. Por lo que no hay correlación entre una actividad aumentada de catalasa y resistencia al TNF y al H₂O₂

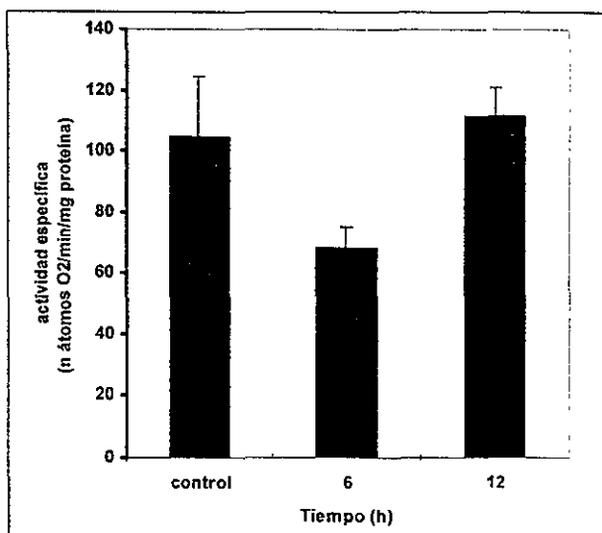


Figura 18. Efecto del choque térmico sobre los niveles de actividad de catalasa en la clona sensible (L929 P6). La clona sensible se sometió a un choque térmico (42 °C, 30 min), posteriormente el cultivo celular se incubó por 6 y 12 h, al finalizar el tiempo de incubación las células se trataron con TNF (5ng/ml), después de 1h de tratamiento con el factor, se determinó la actividad de catalasa por oximetría en la clona sensible al TNF. (n=3). La actividad específica de catalasa está expresada en n átomos O₂/ min/mg de proteína.

DISCUSION

Al comparar la susceptibilidad de las clonas L929 PR1 y L929 P6 al efecto citotóxico del TNF, encontramos que la clona L929-PR1 muestra resistencia al TNF con un 75% de sobrevivencia contra 18% de la clona L929-P6 (fig 8 A). La explicación más sencilla a esta resistencia al efecto citotóxico del TNF podría ser la ausencia de receptores membranales al TNF o una disminución en su número. Sin embargo, estudios previos en varias líneas celulares en las que se ha caracterizado el mecanismo de resistencia al TNF, se ha visto que esta resistencia no se debe a una diferencia en el número de receptores al TNF (30). Ensayos de unión con TNF marcado con I^{125} podrían resolver esta pregunta, desafortunadamente estos ensayos no han dado resultados concluyentes en el laboratorio debido a la baja actividad específica del TNF-yodado con I^{125} por causas comerciales, y el reducido número de receptores por célula entre 1000 y 10000 x (comunicación personal de Criselda Mendoza). Aún si el número de receptores se conservara constante en las células resistentes, la capacidad transductora de los mismos podría estar disminuida por mutaciones puntuales o por la falta de proteínas acopladoras (descritas en la introducción). Tanto una disminución en el número de receptores como una transducción defectuosa se reflejarían en una intensidad reducida de las señales intracelulares inducidas por el TNF. Con el propósito de descartar estas posibilidades se midió la cantidad del factor transcripcional NF κ B translocado al núcleo en respuesta al TNF en células susceptibles y resistentes al efecto citotóxico del TNF. Los ensayos de retardo (fig 7) mostraron que la translocación del factor de transcripción NF κ B es similar en ambas clonas, lo cual sugiere que la resistencia no se deriva de diferencias en el número de receptores ni en la vía de transducción inducida por esta citocina. El estrés oxidativo generado en respuesta al TNF por parte de la clona L929 P6 se incrementa un 50% respecto a los niveles de estrés generados en la clona resistente, mientras que los niveles de estrés oxidativo basal son mayores en la clona resistente (2 veces) (fig 9). El que los niveles de estrés oxidativo basal en la clona resistente se encuentren incrementados en relación a la clona sensible, y

que el tratamiento con TNF eleve los niveles en la clona L929 P6 y los mantenga en los niveles basales en la clona PR1, sugiere que los mecanismos antioxidantes en la clona resistente son suficientes para contrarrestar este incremento en los niveles de estrés oxidativo inducido por el TNF mientras que en la clona sensible probablemente se requiera inducir mecanismos de protección contra el daño oxidativo. La resistencia al TNF observada en la clona L929 PR1 correlaciona con su resistencia al H₂O₂ lo cual sugiere que la protección contra la citotoxicidad producida por el TNF en la clona L929 PR1 está relacionada con protección a un estrés oxidativo inespecífico (fig 10). La actividad de catalasa provee evidencias de que la protección a la citotoxicidad inducida por el TNF en la clona resistente no es debida al aumento en los niveles de la actividad específica de esta enzima (fig 11 B); ya que la actividad basal en la clona resistente (L929 PR1) es sólo el 73% de la clona sensible (L929 P6) (fig 11 C). En respuesta al TNF el incremento en la actividad de catalasa en la clona L929 P6 es del 12% desde la primera hora de tratamiento con el factor (fig 11 A), mientras que para la clona L929 PR1 los cambios en la actividad se dan de manera transitoria con cambios significativos a tiempos más largos (3 y 9 h) alcanzando un máximo de 1.65 veces sobre el control (fig 11B). Para explorar esta posibilidad, se evaluó la protección conferida por la proteína A20. Una de las respuestas de estrés inducidas por el TNF es la expresión de la proteína A20 (58). Con el fin de corroborar que la clona resistente L929 PR1 responde con menor estrés al TNF, se hicieron estudios de transcripción reversa y PCR acoplados a ensayos de "Southern" utilizando como sonda oligonucleótidos contra el producto de amplificación de A20. El análisis de Southern del producto obtenido por TR y PCR del mensajero de la proteína A20 muestra que se expresa de manera transitoria en ambas clonas, observando una marcada reducción en la clona L929 PR1. La mayor inducción se da a tiempos tempranos (3 h, 2 veces) en la clona sensible; el pico de expresión de A20 se observa a las 12 h en L929 P6 y a las 3 h en la clona resistente (fig 12 B). Si bien A20 se induce rápidamente en la clona resistente en respuesta al tratamiento con TNF, la magnitud de este aumento es mucho menor al que se da en la clona sensible. Esto sugiere que el estrés generado es menor en la clona resistente.

Por otro lado, el análisis de la expresión de la proteína hsp70 en respuesta al choque térmico muestra que la máxima inducción se da a tiempos tempranos en la clona sensible (L929 P6) (3 y 6h) (fig 14 A), mientras que en la clona resistente (L929 PR1) se da a las 12 h (fig 14 B). El choque térmico provee protección contra el efecto citotóxico del TNF, al evaluar la viabilidad celular encontramos que el mayor porcentaje de sobrevivencia en la clona sensible se da si el TNF se adiciona a los tiempos en los que los niveles de expresión de hsp70 se encuentran elevados, tanto para la clona sensible (3 y 6 h), como para la clona resistente (6 y 12 h). (fig 15 A y 15 B).

El estrés oxidativo como mediador de la respuesta citotóxica del TNF: El TNF es una citocina producida principalmente por macrófagos activados, a la cual se le atribuyen múltiples actividades biológicas, entre las que se encuentra la muerte celular, mediada por la activación de dos tipos de receptores (TNFR1 y TNFR2) (5). La secuencia de sucesos que siguen a la interacción del TNF con sus receptores aún no se conoce con precisión, aunque hasta el momento se han descrito diversos eventos tempranos desencadenados por el TNF. Dentro de estos eventos se encuentran la activación de proteínas cinasas como JUNK, fosfatasa del tipo 2A y proteasas solubles de la familia de la convertasa de interleucina 1 (ICE), la activación de la fosfolipasa A2, esfingomielinasas y la activación de factores de transcripción (NFkB y AP-1). Recientemente varias evidencias sugieren que de manera directa o indirecta algunos de estos eventos llevan a un aumento en el estrés oxidativo, que es considerado como un evento importante en la mediación de la respuesta citotóxica del TNF en la que se ha implicado a la respiración mitocondrial (25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34). Orientados a valorar un aumento en la producción de superóxidos durante la muerte inducida por el TNF, otros estudios en el laboratorio, utilizando las clonas sensibles al TNF L929 P6 y L929 CR1, mostraron que el TNF es capaz de inducir un aumento en la reducción de MTT por número de célula viable, apoyando la idea que el estrés oxidativo participa en la muerte mediada por el TNF (41).

Caracterización de células resistentes al efecto citotóxico del TNF como modelo de estudio: El TNF tiene un efecto citotóxico limitado en células obtenidas de cultivos primarios. Por ejemplo, las células endoteliales humanas derivadas de cordones umbilicales se activan en respuesta al TNF, incluso presentan un incremento en los niveles de estrés oxidativo reflejados por un aumento en la reducción de MTT pero no mueren (70). La ausencia de muerte no se debe a la falta de receptores capaces de ser activados por el TNF, ya que en respuesta a esta citocina hay un aumento en la translocación del factor transcripcional NF κ B y un aumento en la expresión de moléculas de adhesión (selectina E, I-CAM1 y V-CAM2) (datos inéditos de Lucía N López y de Adriana Estrada). En contraposición con las células endoteliales humanas, en cultivos primarios de células endoteliales de aorta de bovino el TNF induce muerte masiva produciendo cambios ultratesructurales característicos de apoptosis (67), induce retracción celular, activación de fosfolipasa A2 y síntesis de eicosanoides (68).

El efecto citotóxico del TNF prevalece sólo sobre células transformadas o inmortalizadas como los promielocitos HL-60 o los fibroblastos de ratón L929 (70), aunque existen líneas tumorales que son resistentes al efecto citotóxico del TNF, como las células ACHN derivadas de un tumor de mama humano (datos inéditos de Catalina Machuca). El mecanismo por el cual células tumorales como las ACHN no responden al efecto citotóxico del TNF, aún no se comprende. Ya que el TNF ha sido postulado como un agente antitumoral fisiológico, comprender los mecanismos que confieren resistencia a su acción podría ayudar a un mejor tratamiento preventivo y/o terapéutico de tumores. Para resolver este problema se emplean como modelo experimental células resistentes derivadas de células susceptibles al efecto citotóxico del TNF, lo cual permite analizar algunos de los mecanismos implicados en la resistencia a esta citocina. En investigaciones previas se ha caracterizado la sensibilidad al TNF en células derivadas de fibroblastos murinos L929 resistentes al factor, generadas ya sea por tratamiento prolongado con TNF (45), transfección con cDNA de proteínas de choque térmico como hsp70 y hsp27 (54) y la sobreexpresión de la enzima manganeso

superóxido dismutasa (MnSOD) (52). En las células que sobreexpresan proteínas de choque térmico se ha reportado un decremento en los niveles de ROS generados en respuesta al tratamiento con el TNF (52, 54), mientras que en las células que sobreexpresan MnSOD se encontró que la resistencia al TNF correlaciona con un incremento en la actividad de la glutatión peroxidasa (54). Estos resultados apoyan la hipótesis de que el estrés oxidativo juega un papel importante en el efecto citotóxico del TNF. En vista de que la sobreexpresión de la proteína de estrés térmico hsp70 confiere resistencia al TNF, en este trabajo se planteó como objetivo determinar si la expresión transitoria del gen endógeno de la proteína hsp70 correlaciona con protección contra el efecto citotóxico del TNF y contra estrés oxidativo en general.

Análisis del estrés oxidativo basal y generado en respuesta al tratamiento con TNF en la clona sensible (L929 P6) y resistente (L929 PR1): Varias evidencias muestran que el aumento en las defensas antioxidantes son un mecanismo clave en el fenómeno de resistencia al TNF por lo que se ha postulado que el estrés oxidativo es un mediador en la muerte celular inducida por esta citocina (25,26,27,28,29,30). Experimentos previos en el laboratorio en los que se evaluó el estrés oxidativo en células L929 sensibles y resistentes al TNF (estas últimas transfectadas con Bcl-2) utilizando como sonda moléculas que atrapan electrones desapareados (MTT y DCF) mostraron que la producción de ROS en respuesta al TNF en las células resistentes es menor.

Dados estos antecedentes, en este trabajo se evaluaron los niveles de estrés oxidativo basal y en respuesta al TNF en las clonas sensible L929 P6 y resistente L929 PR1. La primera aproximación para caracterizar el efecto citotóxico del TNF tanto para la clona sensible L929 P6, como para la clona resistente generada en el laboratorio L929 PR1, fue evaluar la viabilidad celular en respuesta al tratamiento con TNF. El MTT es una trampa de electrones que reduce electrones de alto potencial de oxidación-reducción. Resultados inéditos de Fabián Romero en el laboratorio han mostrado que los mayores niveles en la reducción de MTT

después de 24 h de tratamiento con TNF se observa a tiempos tardíos, mientras que el DCF, el cual oxida electrones de bajo potencial de oxidación-reducción, detecta un incremento en los niveles de estrés oxidativo a tiempos cortos después de la adición del TNF (1 h). Una posible interpretación a estos resultados, es que el estrés oxidativo detectado por el DCF refleja una respuesta inicial en el proceso de muerte inducido por el TNF, mientras que el detectado por el MTT tal vez sea una consecuencia tardía del proceso de muerte. Los resultados de reducción de MTT en la clona L929 P6 mostraron que la clona sensible (fig 9 A) presenta un nivel de estrés oxidativo basal menor (1.5 veces) a la clona resistente (L929 PR1) (figura 9 B), mientras que los niveles de ROS generados en respuesta al tratamiento con TNF aumentan de manera significativa en la clona sensible (figura 9 A), manteniéndose en los niveles basales para la clona resistente L929 PR1 (figura 8 B).

El aumento en la reducción basal de MTT en las células resistentes L929 PR1 puede ser meramente el resultado de haber seleccionado una clona con una actividad oxidativa más alta que la del promedio de las células, representadas por la clona L929 P6. Esta condición oxidativa basal debe tener un componente respiratorio, ya que la reducción de MTT refleja en gran medida la respiración mitocondrial, en particular la generación de radicales superóxido generados en el sitio 1 de la cadena respiratoria (69).

El hecho que los niveles de estrés oxidativo se mantengan después del tratamiento con TNF en la clona resistente, sugiere que el programa de muerte nunca progresa a un punto tal en el que puedan generarse las especies reactivas que pueden reducir al MTT. Esta posibilidad estaría de acuerdo con un menor estrés oxidativo y una mayor viabilidad.

Por el contrario el incremento observado en los niveles de estrés oxidativo y el bajo porcentaje de sobrevivencia en respuesta al TNF en la clona sensible L929 P6, implica que el programa avanza hasta un punto en el que se forman las especies reactivas que reducen al MTT. La muerte celular asociada a este punto implica la incapacidad de estas células para lidiar con este tipo de estrés oxidativo inducido por el TNF y sugiere la presencia de mecanismos antioxidantes en las

células resistentes L929 PR1.

La adición de H_2O_2 de manera exógena nos permitió valorar el efecto de una fuente inespecífica de estrés oxidativo sobre la viabilidad celular de ambas clonas. Los resultados del tratamiento con 2 mM de H_2O_2 en la clona sensible (L929 P6) y resistente al TNF (L929 PR1), muestran en esta última una sobrevivencia 2.5 veces mayor a la de clona sensible (fig 10). Estos resultados demuestran que el estrés oxidativo es una de las vías de muerte inducida por el TNF ya que existe una correlación entre la resistencia a H_2O_2 y al TNF por parte de la clona L929 PR1. También sugiere que uno de los mecanismos protectores contra el TNF que operan en esta clona puede ser una mayor eficiencia en la remoción de especies reactivas derivadas del H_2O_2 . Si bien desconocemos el proceso bioquímico preciso por el cual ocurre, es muy probable que se encuentre implicada la actividad de una peroxidasa. La determinación de catalasa, analizada en mayor detalle más adelante, sugiere que la actividad de peroxidasa implicada en esta protección no está dada por esta enzima. Queda por valorar la actividad de otras peroxidosas, como la glutatión peroxidasa y la tioredoxina peroxidasa.

Análisis de la actividad de catalasa durante la muerte celular inducida por el TNF:

Habiendo demostrado que la clona L929 PR1 es resistente al efecto citotóxico del TNF y al peróxido de hidrógeno; el primer paso a analizar fue si los niveles de estrés oxidativo correlacionan con los niveles en las defensas antioxidantes, para lo cual se evaluó la actividad de catalasa en condiciones basales y en respuesta al TNF. Estudios paralelos sobre los niveles de RNAm de la catalasa mostraron que la clona L929 PR1 presenta un pico de inducción del mensajero de catalasa de manera tardía (6 h) en comparación al máximo pico de inducción del mensajero de catalasa para la clona sensible L929 P6 (1h) (comunicación personal de Catalina Machuca del Laboratorio del Dr. Zentella).

Con el objetivo de correlacionar la inducción del RNAm de catalasa inducida por el TNF y los niveles de actividad de la enzima, se evaluó un curso temporal de la actividad de catalasa en respuesta al tratamiento con 5 ng/ml de TNF. Los resultados muestran que el pico de actividad de catalasa para la clona sensible (L929 P6) (fig 11 A) se da en la primera hora y tercer hora, mientras que para la clona resistente (L929 PR1) (fig 11 B) la actividad se comporta de manera transitoria, donde los valores máximos de actividad de catalasa se registran a las 3 y 9 h de tratamiento con TNF. Al comparar la cinética de expresión de RNAm y de actividad de catalasa, encontramos que para la clona sensible (L929 P6), hay una correlación entre el nivel máximo de expresión del mensajero y la actividad enzimática (1h). Sin embargo, la actividad permanece elevada hasta las 9 h mientras que los niveles del mensajero bajan entre las 3 y 9 h. Esto sugiere que la actividad de catalasa no refleja los cambios en mensajero y probablemente se deba a la enzima presente desde el principio del ensayo. La caída en actividad registrada a las 24 h es muy probablemente el reflejo de la destrucción generalizada de los componentes celulares.

En el caso de la clona resistente (L929 PR1), mientras que el mensajero alcanzó su nivel máximo a las 6 h, el pico máximo en la actividad de catalasa se alcanza a las 3 h. La inconsistencia entre una actividad elevada a las 3 h y un aumento en el mensajero 3 h después (a las 6 h de tratamiento) sugiere que el aumento en actividad a las 3 h es un efecto postraduccional. Por otra parte a las 9 h ya hay mas mensajero de catalasa que no se refleja en la actividad ni a las 9 ni a las 24 h. Esto sugiere que en la clona resistente L929 PR1 el aumento en actividad de catalasa no guarda ninguna relación con los cambios en los niveles del mensajero. La figura 11 C muestra que la actividad específica basal de catalasa es menor en la clona resistente L929 PR1(0.4 nátomos de O_2 /min/mg proteína), mientras que la figura 11B muestra que en respuesta al TNF esta actividad aumenta a 160% con respecto a su control (100%). Este aumento hace que la actividad de catalasa en la clona resistente L929 PR1 en respuesta al TNF alcance valores semejantes a la actividad basal en la clona sensible L929 P6 (0.4 nátomos de O_2 /min/mg proteína $\times 1.60 = 0.64$ nátomos de O_2 /min/mg proteína). Esta comparación nos lleva a

proponer que a pesar de haber un aumento en la actividad de catalasa en la clona resistente, este difícilmente puede explicar la resistencia al estrés oxidativo, ya que es muy parecida a la actividad basal de catalasa de la clona sensible (0.6 nátomos de O₂/min/mg proteína).

La actividad de catalasa en la clona sensible presenta un pequeño aumento en respuesta TNF que se da desde la primera hora, esta respuesta es transitoria y cae por debajo del control a tiempos posteriores (24 h) (fig 11 A), lo cual correlaciona con un incremento en los niveles de estrés oxidativo evaluados por MTT a 12 y 20 h de tratamiento con TNF (fig 9 A). Estos resultados sugieren que de darse un respuesta antioxidante protectora en la clona sensible (L929 P6) en respuesta al TNF esta es muy pequeña (no mayor al aumento del 12% en la actividad de catalasa); y que este mecanismo de protección es transitorio ya que el estrés oxidativo después va en aumento (12 y 20 h , fig 9 A).

Por el contrario en la clona resistente L929 PR1 no hubo correlación entre la actividad de catalasa y los niveles de estrés oxidativo, ya que mientras que hubo un aumento del 60% (fig 11 B) en la actividad de catalasa, la reducción de MTT permaneció constante (fig 9 B).

Respuestas antioxidantes no enzimáticas

Estudios previos muestran que además de la sobreexpresión de enzimas antioxidantes como la MnSOD, GSH y thiorredoxina peroxidasa (44,48,71), correlaciona con protección al efecto citotóxico del TNF, otros mecanismos no enzimáticos como la sobreexpresión de proteínas de estrés A20 (56,62) y proteínas de choque térmico hsp70 y hsp27(54,55) las cuales no poseen una actividad antioxidante intrínseca, igualmente participan en la resistencia a la citotoxicidad inducida por el factor. En este trabajo quisimos correlacionar el curso temporal de la expresión endógena de la proteína hsp70 en respuesta al choque térmico, y la expresión de la proteína de estrés A20, como marcadores de estrés celular, con la protección contra la muerte celular inducida por el TNF.

Proteína de choque térmico hsp70: Los niveles de la proteína hsp70 se determinaron por inmunoanálisis después de 3, 6, 9, 12 y 24 h posterior al choque térmico. El análisis densitométrico del inmunoanálisis de hsp70 en ambas clonas muestra que la expresión de la proteína se da de manera transitoria, en la clona sensible (L929 P6) se observa una inducción en la expresión a tiempos muy tempranos (3 h) (fig 14 A) en comparación a la clona resistente (L929 PR1), la cual alcanza el máximo pico de inducción 12 h después del choque térmico (fig 14 B). Estos resultados correlacionan con la viabilidad celular en células expuestas a choque térmico y tratadas con 5ng/ml de TNF. La ventana de máxima expresión de la proteína hsp70 en células L929 P6 está entre las 3 y 6 h, tiempos en donde encontramos el mayor porcentaje de sobrevivencia (fig 15 A) mientras que para la clona L929 PR1 la viabilidad aumenta a las 12 h de expresión de la proteína (fig 15 B), tiempo en el cual observamos el máximo nivel de inducción (fig 14 B). Los tiempos de inducción diferenciales se reflejan en la viabilidad celular en ambas clonas después del tratamiento con el TNF, lo cual muestra que la respuesta celular al estrés térmico, seguido como la expresión de la proteína hsp70, protege contra la citotoxicidad inducida por el TNF. De esta manera, estos resultados sugieren una correlación entre el aumento en los niveles de expresión de hsp70 y protección contra el efecto citotóxico del TNF en ambas clonas celulares. En la clona L929 P6 esta relación es directamente proporcional (círculos claros de la figura 15 C), en tanto que en la clona resistente la relación no es totalmente lineal (círculos oscuros de la figura 15 C). Esta diferencia se explica porque la sobrevivencia intrínseca de la clona L929 PR1 en respuesta al TNF es del 80 %, contra un 20 % de la clona sensible (L929 P6). Eliminado este primer punto, el resto de los puntos correspondientes a la clona L929 PR1 caen dentro de un comportamiento lineal, paralelo al de la clona L929 P6. Esta relación sugiere que la protección en la clona PR1 está dada por dos mecanismos aditivos entre sí. El hecho de que la clona L929 PR1 presente resistencia en ausencia de hsp70 que no se expresa de manera basal sugiere un mecanismo independiente de la respuesta al choque térmico. A este mecanismo de protección intrínseco de la

clona resistente se suma al inducido por el choque térmico, cuya intensidad correlaciona con la expresión de la proteína hsp70 (fig 14 C).

Protección contra H_2O_2 mediada por el choque térmico hsp70: Hemos propuesto al estrés oxidativo como un componente de la vía de muerte mediada por el TNF. Si la respuesta celular al choque térmico interfiere con el estrés oxidativo generado por el TNF, al tratar a las células con una fuente de estrés oxidativo generado de manera inespecífica (H_2O_2), estas deberían ser resistentes después del choque térmico. Al evaluar la viabilidad en células expuestas a choque térmico en respuesta al tratamiento H_2O_2 por 4 h (2 mM), la viabilidad se incrementa para la clona sensible (L929 P6) (fig 16 A) y no así para la clona resistente (L929 PR1) (fig 16 B), donde el porcentaje de sobrevivencia se mantiene a los niveles del control. Estos resultados sugieren que efectivamente el choque térmico promueve la inducción de mecanismos de protección antioxidantes que interfieren con un estrés oxidativo inespecífico.

Aún se desconoce el mecanismo mediante el cual la respuesta celular al choque térmico protege contra la muerte celular inducida por el TNF. Se ha observado que en la línea L929 la sobreexpresión de estas proteínas por transfección depleta la generación de ROS en respuesta al tratamiento con el TNF, evento que correlaciona con un incremento en los niveles de la glutatión peroxidasa (54). En la línea premonocítica humana U937 el choque térmico correlaciona con la expresión de la hsp70, lo cual previene alteraciones en el potencial de membrana y la expresión del producto proteico Bcl-2. Dados estos antecedentes, y con base en los resultados anteriores, se evaluó la relación entre el choque térmico y los niveles de ROS generados en respuesta al tratamiento con el TNF. Los niveles de estrés oxidativo en la clona sensible (L929 P6) se mantienen constantes (fig 17 A), en tanto que en la clona resistente (L929 PR1) los niveles de estrés oxidativo presentan un pequeño decremento a lo largo del tiempo (fig 17 B). Estos datos sugieren que en la clona sensible L929 P6 la respuesta al choque térmico no afecta el equilibrio de producción y remoción de las especies reactivas detectadas

por MTT, a pesar del aumento en la viabilidad en presencia de H_2O_2 . En tanto que en la clona resistente L929 PR1 la reducción de MTT presenta una pequeña disminución, lo que refuerza la idea de que en estas células la resistencia resulta a una combinación de entre los mecanismos intrínsecos y los inducidos por el choque térmico.

Actividad de catalasa en respuesta al choque térmico hsp70: Con el objetivo de terminar si la resistencia que confiere la respuesta celular al choque térmico implica un incremento en la actividad de catalasa evaluamos su actividad específica 6 y 12 h después del choque térmico. La actividad se determinó una hora después del tratamiento con TNF. Los resultados de la figura 18 muestran que la actividad a las 6 h disminuye un 40% mientras que a las 12 h regresa a los valores control. Estos cambios son inconsistentes con una actividad antioxidante que pudiera explicar la protección contra el H_2O_2 (fig 16 A), por lo que concluimos que en la protección antioxidante que se activa en respuesta al choque térmico participan otras peroxidasas distintas a la catalasa.

Proteína A20: Los resultados en los cambios de RNAm de la proteína A20 en respuesta al TNF muestra que en ambas clonas la proteína se expresa de manera transitoria, aun cuando el pico de expresión en la clona resistente (L929-PR1) se observa a tiempos tempranos (3 h), en comparación a la clona sensible (L929 P6), en la que la mayor expresión de la proteína se da 12 h después del tratamiento con TNF, la magnitud de la expresión es claramente mayor en la clona sensible (fig 12). Estos resultados correlacionan con los niveles de estrés oxidativo detectado por MTT, mostrando que en respuesta al tratamiento con TNF para la clona sensible (fig 9 A), los niveles de ROS generados aumentan de manera significativa, en tanto que se mantienen a los niveles basales en la clona resistente (fig 9 B). Estos resultados sugieren que la expresión de la proteína A20 es un reflejo del estado de estrés celular, encontrando una correlación entre este estado de estrés con la protección contra la muerte celular inducida por el TNF.

CONCLUSIÓN GENERAL

La expresión endógena de la proteína de choque térmico hsp70 se refleja en la viabilidad celular tanto en la clona sensible (L929 P6) como en la clona resistente (L929 PR1), lo cual muestra que la respuesta celular al estrés térmico, seguido como la expresión de la proteína hsp70, protege contra la citotoxicidad inducida por el TNF. El análisis de correlación (fig 14) sugiere que la protección conferida por el choque térmico en la clona resistente esta dada por un mecanismo intrínseco de la clona, al que se le suma el inducido por el choque térmico. Los niveles de estrés oxidativo basales y generados en respuesta al TNF apoyan la hipótesis de que en la clona resistente uno de los mecanismos protectores pudiera ser la eficiencia en la remoción de especies reactivas derivadas del H_2O_2 ; los resultados de actividad de catalasa sugieren que probablemente son otras las enzimas antioxidantes, como la glutatión peroxidasa o la tioredoxina peroxidasa, las que participan en la protección contra el estrés generado por el efecto citotóxico del TNF.

19 Goldkam T, Dressler KA, Muindi J, Radin NS, Medelshohn J, Menaldino D, Liotta D y Kolesnick RN (1990) **Ceramide stimulates epidermal grow factor receptor phosphorylation in A431 human epidermoid carcinoma cells.** J Biol Chem 266, 16092

20 Okasaki T, Bielawska A, Bell RM y Hannun YA (1990) **Roles of ceramide as a lipid mediator of 1 α , 25 dihydroxivitamin D₃ induced HL-60 cell differentiation.** J Biol Chem 265, 15823.

21 Obeid LM, Linardic CM y Karolak LA (1993) **Programmed cell death induced by ceramide.** Science 259, 1769

22 Thornberry A y Lazenbnik Y (1998) **Caspases: Enemies Within.** Science 281, 1312

23 Halliwell B (1997) **Antioxidants and human disease: A General Introduction.** Nutrition Reviews 55, 44.

24 Buttke TM y Sandstrom PA (1994) **Oxidative stress a mediator of apoptosis.** Immunol Today 15, 7.

25 Zimmerman, RJ, Chan A y Leadon SA (1989) **Oxidative damage in murine tumor cells treated in vitro by recombinant human tumor necrosis factor.** Cancer Res 49, 1644.

26 Christiansen NO (1988) **A term course study on superoxide generation and protein kinase C activation in human neutrophils.** FEBS Lett 239, 195.

27 Meier B, Radeke HH, Selle S, Younes M, Sies H, Reshc K y Habermehi GH (1989) **Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumor necrosis factor-alpha.** Biochem J 263, 539

28 Wong GH y Goeddel DV (1988) **Induction of manganese superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism.** Science 242, 941-944.

29 Schrek R, Albermann K y Baeurele PA (1992) **Nuclear factor kappa B: an oxidative stress responsive transcription factor of eukariotic cells.** Free Radical Res Commun 17, 221-237

30 Wong G, Elwell JH, Oberley LW y Goeddel DV (1989) **Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor.** Cell 58, 923.

31 Yamamuchi-N, Watanabe N, Kuriyama H, Neda H, Maeda M, Himeho Tsuji Y y Niitsu Y (1990) **Suppressive effects of intracellular glutathione o hydroxyl radical production induced by tumor necrosis factor.** Int J Cancer 46 (5), 884

32 Schulze O, Beyaert R, Vandevoorde V, Haegeman G y Fiers W (1993) **Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene inductive effect of TNF.** EMBO J 12, 3095

33 Goosens V, Grooten J, De Vos K y Fiers W (1995) **Direct evidence for tumor necrosis factor induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity.** Proc Natl Acad Sci USA 92, 8115

34 Schulze OK, Bakker AC, Vanhaesebroeck B, Beyaert , Jacob WA y Fiers W (1992) **Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions: Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation.** J Biol Chem 267, 5317

- 35 Lancaster JR, Laster SM y Gooding LR (1989) **Inhibition of target cell mitochondria electron transfer by tumor necrosis factor.** FEBS Lett 248, 169
- 36 Hennes T, Richter C y Peterhans E (1993) **Tumor necrosis factor-alpha induces superoxide anion generation in mitochondria of L929 cells** Biochem J 289, 587.
- 37 Young M, Robin Kp, Anderson L, Spitz RD y Hahn GM (1992) **Hypoxia and resistance to hydrogen peroxide confer resistance to tumor necrosis factor in murine L929 cells.** Radiation Res 131, 162
- 38 Suffys P, Beyaert R, Van Roy F y Fiers W (1987) **Reduced tumour necrosis factor-induced cytotoxicity by inhibitors of the arachidonic acid metabolism.** Biochem Biophys Res Commun 149, 735
- 39 Schulze OK, Krammer PH y Droege W (1994) **Divergent signaling via APO-1/Fas and the TNF receptor, two homologous molecules involved in physiological cell death.** EMBO J 13, 4587
- 40 Chan H y Agarwal BB (1994) **Role of tumor necrosis factor receptor in the activation of nuclear factor kappa B in human histiocytic lymphoma U-937 cells.** J Biol Chem 268, 31424
- 41 Gómez EO, Mendoza MC, Ibarra SM, Ventura GJ y Zentella A (1996) **Ceramide reproduces late appearance of oxidative stress during TNF-mediate cell death in L929 cells.** Biochem Biophys Res Commun 228, 505.
- 42 Steven WX y Daret KST (1993) **Thiol-Modulating agents increase manganese superoxide dismutase activity in human lung fibroblasts.** Arch Biochem and Biophys 304, 1

43 Meyrick B y Magnuson M (1993) **Identification and functional characterization of the bovine manganous superoxide dismutase promoter.** Am Resp Cell Mol Biol. 10, 113.

44 Hirose K, Longo DL, Oppenheim JJ y Matsushimak K (1993) **Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase promotes the survival of tumor cells exposed to interleukin 1, tumor necrosis factor, selected anticancer drugs and ionizing radiation.** FASEB J 7, 361.

45 Melendez J y Baglioni C (1991) **Reduced expression of manganese superoxide dismutase in cells resistant to cytolysis by Tumor necrosis factor.** Free Radical Biol and Med. 12, 151

46 Liochev SI y Fridovich S (1997) **How does superoxide dismutase protect against tumor necrosis factor: An hyphotesis informed by effect of superoxide on "free" iron.** Free Rad Biol and Med 23, 668.

47 Visner GA, Dougall WC, Wilson JM, Burr MI and Nick HS (1990) **Regulation ofsuperoxide manganese dismutase by lipopolysaccharide interleukin 1 and tumor necrosis factor.** J Biol Chem 265, 2856

48 Deisseroth A y Dounce AL (1970) **Catalase: Physical and chemical properities, mechanisms of catalysis, and physiological role.** Physiological Reviews 50,

48 Meister A y Anderson ME (1983) **Glutathione.** Annu Rev Biochem 52, 711

49 Renard DC, Seitz MB y Thomas AP (1992) **Oxidized glutathione causes sensitization of calcium released to inositol 1,4,5-triphosphate in permeabilized hepatoocytes.** Biochemical J 284 (pte2), 507.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

50 Mehlen P, Kretz C, Preville X y Arrigo AP (1996) **Human hsp27, Drosophila hsp27 and human α B-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNF- α -induced cell death.** EMBO J 11, 2695

51 Mehlen P, Kretz R, Briolay J, Fostan P, Mirault ME y Arrigo AP (1995) **Intracellular reactive oxygen species as apparent modulators of heat shock protein 27 (hsp27) structural organization and phosphorylation in basal and tumor necrosis alpha-treated T47A human carcinoma cells.** Biochem J 312, 367.

52 Polla BS, Kantengwa S, Francois D, Salvioi S, Franceschi C, Marsac C and Cossarizza A (1996) **Mitochondria are selective targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury.** Proc Natl Acad Sci USA 93, 6458.

53 Mehlen P, Schulze O y Arrigo AP (1996) **Small stress proteins as novel regulators of Apoptosis.** J Biol Chem 271, 16510

54 Mehlen D, Preville X, Chareryon P, Klemenz R y Arrigo AP (1995) **Constitutive expression of human hsp27 or human α B-crystallin confers resistance to TNF and oxidative stress-induced cytotoxicity in stable transfected murine L929 fibroblasts.** J Immunol 154, 363

55 Jaattela M, Wissing D, Bauer P y Gloria C (1992) **Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity.** EMBO J. 11, 3507.

56 Opipari AW, Ming H, Yabokowitz y Dixit V. (1992). **The A20 Zinc Finger Protein protects cells from tumor necrosis factor cytotoxicity.** J Biol Chem 267,12424.

57 Dixit VM, Green S, Sarma V, Holzman LB, Wolf FW, Rourke O, Wardk K, Prochownik PA y Marks RM (1990) **Tumor necrosis factor-alpha induction of novel gene products in humn endothelial cells including a macrophage-specific chemotaxin.** J Biol Chem. 265, 2973

58 Opipari AW, Boguski MS y Dixit V (1990) **The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor encoded a novel of zinc finger protein.** J Biol Chem 267, 12424.

59 Song, YH, Rothe M y Goeddel DV (1996) **The tumor necrosis factor inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NFkB activation.** Proc Natl Sci USA 93, 6721

60 Krikost A, Laherty D y Dixit V (1992) **Transcriptional activation of the tumor necrosis factor α -inducible finger protein, A20, is mediated by κ B elements.** J Biol Chem 267:17971

61 Jaattela M, Mouritzen H, Elling F y Bastholm L (1996) **A20 Zinc Finger protein Inhibits TNF and IL-1 Signaling.** J Immunol 134, 1166.

62 Dixit VM, Marks RM, Sarma V y Prochownik EV (1989) **The antimitogenic action of tumor necrosis factor is associated with increased AP-1/c-jun proto-oncogene transcription.** J Biol Chem 264, 16905.

63 Matthews M, Neale ML, Jackson SK y Stark JM (1987) **Tumour cell killing by tumour necrosis factor: Inhibition by anaerobic conditions, free-radical scavengers conditions, free radical scavegners and inhibitors of arachidonate metabolism.** Immunol 62, 153.

64 Watanabe N, Niitsu Y, Neda H, Sone H, Yamauchi N, Maeda M y Urushizaki I. (1988) **Cytotoxicidal mechanism of TNF:effects of lysosomal enzyme and hydroxyl radical inhibitors on cytotoxicity.** ImmunopharmacolImmunotoxicol 10, 109

65 Spitz DR, Li GC, Sun Y, Oberley LW y McCormick ML (1988) **Stable H₂O₂ resistant variants of chinese hamster fibroblasts demonstrate increases in catalase activity.** Radiation Res 114, 114.

66 Kusher DI, Ware CF, Gooding LR (1990) **Induction of the heat shock response protects cells from lysis by tumor necrosis factor.** J Immunol 145, 2925.

67 Robaye B, Mosselmans R, Fiers W, Dumont JE, Goland P (1991) **Tumor necrosis factor induce apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro.** Am. J. Pathol 138: 447.

68 Clark A M, Conway M T, Shorr R G, Crooke T E (1987) **Identification and isolation of a mammalian protein wich is antigenically and functionally related to the phospholipase A2 stimulator, peptide melitin.** J. Biol Chem, 262, 4402.

69 Mosmann T (1983) **Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays.** Journal of Immunological Methods. 65, 55.

70 Lopez Marure R, Estrada B A y Zentella A (1997) **Interference with c-myc expression and RB phosphorylation during TNF-mediated growth arrest in Human Endothelial Cells.** Biochem Biophys Res Comm. 236, 819.