

00551 14



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

289450

"PAPEL DE LA RUTA ANTIAPOPTOTICA MEDIADA
POR EL FACTOR DE TRANSCRIPCION NF-KB EN LA
RESISTENCIA A GEMCITABINA EN DOS LINEAS
DE CaCu".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUIMICA)

P R E S E N T A L A

Q.F.B. DIANA GONZALEZ ESPINOSA

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS



MEXICO, D.F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química
División de Estudios de Posgrado

"Papel de la ruta antiapoptótica mediada por el factor de transcripción
NF- κ B en la resistencia a gemcitabina en dos líneas de CaCu".

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias (Bioquímica)
Presenta la
Q.F.B Diana González Espinosa

Directora de Tesis
Dra. Vilma Maldonado Lagunas

México D.F

2001

Jurado Asignado:

Presidente: Dr. Jorge Vázquez Ramos
Vocal: Dr. Adolfo García Sáinz
Secretario: Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra
Suplente: Dra. Martha Menjivar Iraheta
Suplente: Dr. Félix Recillas Targa

Sitio donde se desarrolló el tema:
Instituto Nacional de Cancerología, SS.
Laboratorio de Biología Molecular

**Esta tesis fue realizada en el Instituto Nacional de Cancerología,
bajo la dirección de la Dra. Vilma Maldonado Lagunas
y la asesoría técnica del Dr. Jorge Meléndez Zajgla,
contando con el apoyo como becaria por parte del CONACyT y
la DGEP.**

Dedicatorias

A Ricardo y Esperanza con todo mi cariño, por su infinito amor y paciencia.

A mis hermanos Claudia, Kathya, Nadya y Ricardo por una incomparable vida juntos.

A mis sobrinos: Alex y Pablo por obligarme a expandir el corazón a diario.

Al Dr. Andrés A. Gutiérrez por enseñarme lo más importante de mi trabajo... prolongar la esperanza.

Agradecimientos:

Al Dr. Jorge Vázquez Ramos, por su fuerte compromiso y extraordinaria vocación de servicio para con los alumnos del posgrado.

A los Drs. Adolfo García Sáinz, Francisco Javier Plasencia, Martha Menjivar y Félix Recillas, jurado revisor del presente trabajo; porque todas sus sugerencias y comentarios siempre fueron enriquecedores.

A los Drs. Jorge Vázquez, Enrique Ortega y Vilma Maldonado, por todas sus sugerencias durante la realización del presente trabajo.

Al CONACYT y a la DGEP, por el apoyo económico brindado para realizar mis estudios de maestría.

Al los Drs. Alfonso Dueñas González , Marcela Lizano Soberón y Claudia García Cuéllar; porque siempre tuvieron tiempo para enseñarme.

A mis compañeros de laboratorio Alma Chávez y Francisco Martínez; por lo que aprendimos juntos en el trabajo diario.

A Blanca Segura, por su alegría y amistad eternas.

A la familia Aguilar Segura, por dejarme formar parte de ella como un miembro más.

A mis hermanos postizos: Alex, Alex Montaña y Jair, porque su presencia fortalece a nuestra familia.

INDICE

Resumen.....	1
--------------	---

1.- Introducción

1.1 ¿Qué es el cáncer?.....	2
1.2 Cáncer cérvicouterino. Generalidades.....	3
1.2.1 Epidemiología.....	4
1.2.2 Factores de riesgo.....	4
1.2.3 Patrón metastásico.....	4
1.2.4 Esquemas de tratamiento.....	5
1.3 Apoptosis. Generalidades.....	6
1.3.1 Controles sobre el proceso apoptótico.....	8
1.4 Familia de Rel/ NF- κ B.....	12
1.4.1 Características estructurales de la familia de Rel.....	13
1.4.2 Inhibidores de la familia de Rel.....	17
1.4.3 Funciones nucleares de la familia I κ B.....	17
1.4.4 Mecanismos de activación de la familia de Rel.....	18
1.5 Antiapoptosis mediada por NF- κ B.....	22
1.5.1 Efecto protector de NF- κ B en la muerte celular inducida por TNF- α	22

2.- Antecedentes

2.1 Gemcitabina. Propiedades farmacológicas.....	26
2.2 Justificación.....	28

3.- Hipótesis.....

4.- Objetivo general.....

5.- Objetivos particulares.....

6.- Material y Métodos

6.1 Cultivos y líneas celulares.....	34
6.2 Preparación de extractos nucleares.....	34
6.3 Ensayos de retardo en movilidad electroforética.....	35
6.4 Marcaje de oligonucleótido.....	35
6.5 Cursos temporales.....	35
6.6 Preparación de extractos proteínicos totales.....	36
6.7 Ensayos de Western blot.....	36
6.8 Ensayos de Northern blot.....	37
6.9 Anticuerpos empleados.....	38

7. - Resultados.....	39
8.- Análisis de resultados.....	56
9.- Conclusiones.....	64
10.- Bibliografía.....	65
11.- GLOSARIO.....	71

Resumen

NF- κ B pertenece a una familia de factores de transcripción que son activados por una gran variedad de estímulos extracelulares, incluidos diversos agentes antineoplásicos. En células somáticas no estimuladas, estos factores de transcripción permanecen inactivos en el citoplasma por interacción directa con proteínas inhibitoras pertenecientes a la familia de I κ B. Su principal mecanismo de activación consiste en permitir su translocación nuclear, previa degradación proteosómica inducida por estímulo, de dichos inhibidores. En cambio, en diversos sistemas tumorales, se ha descrito que la actividad nuclear de estos factores de transcripción es constitutiva, específicamente la del complejo formado por las proteínas p50 y p65. Recientemente se estableció que la activación de estos factores de transcripción se correlaciona con la capacidad de algunos sistemas celulares para inhibir apoptosis inducida por diferentes estímulos.

El objetivo del presente trabajo consistió en estudiar la posible implicación de NF- κ B en la distinta resistencia a sufrir apoptosis inducida por el antineoplásico Gemcitabina, en los dos sistemas tumorales de cérvix, SiHa (poco sensible) y CaSki (sensible).

Demostremos que existen al menos dos complejos basales pertenecientes a la familia de Rel en ambos sistemas. Además, que es en la línea celular CaSki en donde se encuentran los mayores niveles de activación de ambos complejos y que es sólo en esta línea que la translocación de NF- κ B al núcleo es inducida por el tratamiento con gemcitabina. El fenotipo de resistencia diferencial entre ambas líneas puede ser explicado, al menos parcialmente, en función a que existen diferencias en la composición molecular del sistema de transducción que permite la activación de NF- κ B a través del receptor a TNF- α . De dichas diferencias, la más significativa consistió en que la línea celular SiHa presenta mayores niveles de expresión de diversos inhibidores de la familia de Rel con respecto a los encontrados en la línea celular CaSki. Este estudio demuestra que probablemente el efecto protector contra apoptosis mediado por estos factores de transcripción, esté asociado no solamente a su presencia constitutiva en el núcleo, sino a los niveles y tiempo de inducción alcanzados en función a determinado estímulo.

I.- Introducción

1.1 - ¿Qué es el cáncer?

De manera muy simple, una célula tumoral pierde la capacidad para controlar su proliferación, diferenciación y muerte. Estas características son generadas esencialmente por cambios en la expresión de dos clases de genes: los oncogenes y los genes supresores de tumores. La función alterada de las proteínas codificadas en estos genes, producen una regulación anormal de las vías de señalización que controlan el ciclo celular, la apoptosis, la estabilidad genética, la diferenciación celular y la morfogénesis. Los cambios en todos estos procesos son los responsables de los pasos iniciales para la transformación neoplásica y la subsecuente progresión tumoral, resultando en el desarrollo de los tumores malignos (Kopnin, 2000).

El término **oncogen** se designó originalmente a elementos genéticos discretos (genes) de origen viral que poseían la capacidad de modificar el fenotipo de las células a las cuales infectaban. Esta transformación fenotípica de las células (disminución en el tiempo de doblaje, cambios en la estructura macroscópica celular, pérdida de la inhibición por contacto, entre otras), estaba relacionada con la integración del genoma viral al genoma de la célula huésped.

Estudios posteriores demostraron que estos oncogenes codificaban para proteínas (*oncoproteínas*), que jugaban un papel importante durante el ciclo de vida viral, como aquellas relacionadas con el inicio de la replicación y control transcripcional de genes virales, y parte de la habilidad de estos oncogenes para transformar a las células parecía ser consecuencia de estas actividades.

Con la identificación y clonación de diversos oncogenes logró demostrarse que existen genes homólogos a los oncogenes en la mayor parte de los organismos pluricelulares. A estos genes se les denominó proto-oncogenes u oncogenes celulares (Bishop, 1991 y Rabbits, 1994). Los oncogenes celulares son genes celulares normales; su conversión a oncogenes puede ocurrir por diversos mecanismos como la amplificación y diversas mutaciones.

Los genes supresores de tumores (anti-oncogenes) son también genes celulares; su inactivación aumenta la probabilidad de formación de tumores, mientras que el restablecimiento de sus funciones suprimen el crecimiento de las células tumorales.

Algunos de los criterios para caracterizar a genes e incluirlos en alguna de estas dos categorías (oncogenes o genes supresores de tumores) son los siguientes: a) cambios en la estructura y/o expresión del gen en diversos sistemas tumorales ; b) la aparición de tumores en individuos muy jóvenes asociados a mutaciones de tipo germinal del gen en cuestión; c) un incremento en la incidencia de tumores en animales transgénicos los cuales expresan la forma activa alterada del gen(en el caso de los oncogenes) o mutaciones tipo "knock-out" en el caso de los genes supresores de tumores; d) la capacidad para causar alteraciones morfológicas características de transformación neoplásica como el crecimiento ilimitado (oncogenes) o por el contrario, inhibición del crecimiento en células cultivadas *in vitro* (genes supresores de tumores, Kopnin , 2000).

Por lo anterior, es necesaria la elección de un modelo experimental muy específico, lo cual permite profundizar en los mecanismos de transformación propios del modelo y con ello mejorar la prevención y tratamiento posteriores de dicha neoplasia. Si bien es cierto que existen mecanismos comunes y básicos de malignización o transformación neoplásica, cada tipo tumoral presenta particularidades que se ponen de manifiesto sobre todo, a nivel de su respuesta a los diferentes tratamientos.

El presente trabajo está enfocado al modelo de cáncer cervicouterino que primero, es un problema de salud pública en México y segundo presenta como característica importante ser muy resistente a los diferentes tipos de terapias convencionales actuales.

1. 2.- Cáncer cervicouterino (CaCu). Generalidades

El cáncer cervicouterino es una de las principales causas de muerte en los países en vías de desarrollo. En México, esta enfermedad es responsable de aproximadamente el 33% de las muertes por cáncer en mujeres (Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. Secretaría de Salud , 1998).

Como todas las neoplasias malignas, el carcinoma de cérvix es consecuencia de una serie de alteraciones en genes que regulan la proliferación celular y el proceso apoptótico. La infección por el virus de papiloma humano (VPH) es probablemente el factor más importante en su etiopatogenia . El DNA viral se encuentra integrado en el 90% de los casos diagnosticados como lesiones invasoras. El mecanismo de transformación asociado a la infección por el VPH, consiste principalmente en la inactivación de proteínas celulares que son producto de genes supresores de tumores como p53 y retinoblastoma por oncoproteínas virales (E6 y E7).

1.2.1 Epidemiología

En México, el cáncer cervicouterino es la principal causa de muerte en mujeres entre los 25 y 64 años de edad, con más de 4300 muertes anuales, por lo que es considerado un problema grave de salud pública. Entre 1996 y 1998 se reportaron 58,638 casos de este tipo de cáncer en el registro nacional, de los cuales un 78% se diagnosticó como carcinoma invasivo (Tapia et al., 1998).

En el Instituto Nacional de Cancerología se atienden en promedio 600 nuevos casos al año y la gran parte de ellos se diagnostican como lesiones en estadios avanzados (Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas, Secretaría de Salud, 1998).

1. 2.2 Factores de riesgo

-Edad: La incidencia de carcinoma cervical se incrementa rápidamente del 0.3 antes de los 20 años y menos del 2.0 por 100,000 antes de los 25 años hasta el 16.6 por 100, 000 a los 40 años. Este porcentaje se incrementa hasta un 22.4/ 100,000 a los 85 años de edad. La edad promedio de diagnóstico son los 54 años (Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. Secretaría de Salud, 1998).

-Raza: Las mujeres de raza negra presentan una mayor incidencia que las caucásicas, (2.0-2.5 veces más).

-Patologías ginecológicas previas: Comportamiento sexual: promiscuidad, temprano inicio de vida sexual activa. **Infección:** Como en casi todas las regiones del mundo la infección por el virus de papiloma humano (VPH) es el principal factor de riesgo, siendo el subtipo 16 el más comúnmente identificado (50-65% del total de casos.) Sin embargo, la infección por el subtipo 18 también es muy frecuente. La infección por ambos subtipos de papiloma es considerada de alto riesgo.

-Tabaquismo. El riesgo a padecer este tipo de cáncer se incrementa cuatro veces más en pacientes fumadoras (Manual Clínico, Lange de oncología práctica, 1999).

1. 2.3.- Patrón metastásico

Se han detectado tres rutas principales de diseminación: 1) extensión directa (crecimiento directo a estructuras contiguas: vagina, vejiga, recto) 2) Diseminación linfática y 3) Diseminación hematológica, la más frecuente en estadios avanzados.

Los principales órganos de diseminación y metástasis son el pulmón, el hueso e hígado (Manual Clínico Lange de oncología práctica, 1999).

1. 2.4 Esquemas de tratamiento

El carcinoma cervical sigue un patrón de progresión relativamente ordenado. Se caracteriza primeramente por diseminación locoregional a órganos pélvicos y ganglios linfáticos regionales y posteriormente a órganos distantes. La elección del tratamiento depende de factores como el estadio clínico, el tamaño tumoral y/o la presencia de ganglios pélvicos infiltrados por tumor. En general, los carcinomas microinvasivos (Estadio IA1) se resecan quirúrgicamente, este tratamiento permite la curación de prácticamente todos los casos.

Los tumores en estadios clínicos tempranos (IA2 a IB1) se tratan habitualmente mediante histerectomía radical y linfadenectomía pélvica, lo que produce porcentajes de curación superiores al 90%. Sin embargo en estadios avanzados, que desafortunadamente son los más observados en nuestro país, el tratamiento consiste en radioterapia como modalidad única, siendo el pronóstico de estas pacientes mucho menos alentador, lográndose porcentajes de supervivencia a cinco años de solo el 15%. Para las pacientes que presentan enfermedad metastásica a distancia (IVB) o aquellas con recurrencia o persistencia de la enfermedad, la supervivencia media es de aproximadamente ocho meses (Omura GA, 1996).

Un problema grave dentro de los tratamientos convencionales para cualquier tipo de cáncer es la resistencia mostrada tanto a quimio como a radioterapia. Se ha demostrado que parte de los mecanismos moleculares involucrados en este proceso, derivan de la variabilidad celular intra-lesional que existe en los tumores, es decir, no todas las alteraciones moleculares son las mismas en cada una de las células que forman parte del tumor. Debido a lo anterior, es necesario seguir estudiando mecanismos probables de resistencia que pudieran estar involucrados con dicha variabilidad, para modificar esquemas de tratamiento con terapias adyuvantes que permitan optimizar las terapias convencionales.

Actualmente, la mayor parte de las terapias anti-tumorales están dirigidas a tratar de inducir el proceso apoptótico en las células blanco mediante la activación de diferentes cascadas de señalización que activan dicho proceso. La radiación ultravioleta, por ejemplo, al alterar la estructura de los ácidos nucleicos, previa formación de radicales libres por radiólisis del agua, genera inestabilidad genómica la cual se considera un evento iniciador de apoptosis, vía señalización nuclear por p53 (Bristow *et al*, 1996). Otros agentes antineoplásicos que generan también inestabilidad genómica como el etopósido, un inhibidor de

topoisomerasa II, es capaz de inducir la expresión del ligando de Fas, evento que se asocia con apoptosis en linfocitos T. Esta vía de señalización para inducir apoptosis ocurre a través de receptores a muerte, en donde están incluidos Fas (CD95) y el receptor a TNF- α (Kasibhatla *et al.*, 1998).

Algunos detalles de estos mecanismos de activación apoptótica se revisan con mayor detalle en la siguiente sección.

1.3.- Apoptosis. Generalidades

La muerte celular ha sido descrita como la pérdida irreversible de la estructura y función celular. La muerte celular ocurre como proceso fisiológico normal durante la organogénesis en los embriones y el recambio celular en organismos adultos, así como en procesos patológicos en respuesta a diferentes tipos de daño.

La apoptosis es un tipo de muerte celular que a diferencia de la necrosis, que se considera un proceso esencialmente accidental que ocurre como consecuencia de un daño generalmente mecánico grave a la célula, además de presentar características morfológicas específicas, se le considera un proceso genéticamente regulado (Raff MC, 1992).

Morfológicamente la apoptosis se caracteriza por condensación citoplásmica y del núcleo, seguida de una pérdida de la membrana nuclear, fragmentación de la cromatina y la subsecuente formación de múltiples fragmentos rodeados por membrana plasmática que contienen material nuclear y citoplásmico, conocidos como cuerpos apoptóticos (Kerr *et al.*, 1972).

Estudios sobre los mecanismos moleculares involucrados en el proceso apoptótico han demostrado que la maquinaria basal para su ejecución es constitutiva, es decir, no es estrictamente dependiente de transcripción en todas las células de vertebrados (Martin *et al.*, 1990).

Algunos de los elementos moleculares involucrados con dicho proceso, se han descrito con base a estudios genéticos realizados en el modelo del nemátodo *Caenorhabditis elegans*, (Yuan *et al.*, 1990).

Estos estudios demostraron que mutaciones que generaban pérdida de la función del producto del gen *ced-3*, provocaban la inhibición del programa de muerte en este organismo. Demostraron también, que el proceso de muerte en este nemátodo era inhibido por la sobre-expresión del producto del gen *ced-9*. La caracterización de la estructura y función de estas proteínas permitieron identificar a las proteínas homólogas en células de mamífero.

En estos organismos se encontró que existen varias proteínas homólogas a CED-3, las cuales hoy se agrupan en una familia denominada "familia de las caspasas". Igualmente los homólogos en mamíferos de la proteína CED-9 de *C. elegans*, constituyen hoy a la familia de Bcl-2 (Salvesen *et al.*, 1997).

A la fecha las caspasas en los mamíferos comprenden un grupo de trece proteasas que han sido divididas en tres subfamilias: las subfamilia de las proteasas "ICE-LIKE" que incluye a las caspasas 1, 4, 5 y 13, así como a las caspasas murinas 11 y 12 para los cuales no se han identificado homólogos en humanos. La subfamilia de Ced-3 que incluye a las caspasas 3, 6, 7, 8, 9 y 10, y la última subfamilia que solo incluye a un miembro que es la caspasa 2 (Chinnaiyan *et al.*, 1996).

Mientras la caspasa 1 está principalmente involucrada en la activación de pro-citocinas, las caspasas 2, 3, 6, 7, 8 y 10 son características de la apoptosis (Nicholson *et al.*, 1997).

Estas proteínas tienen como característica estructural común una cisteína en su sitio activo y todas cortan a su sustrato con un motivo consenso común que incluye un aspartato. Algunas veces el corte generado por estas proteínas resulta en la activación de distintos blancos, otras en su inactivación, pero nunca en la degradación. Estas proteínas son sintetizadas de manera constitutiva como zimógenos, los cuales son denominados "pro-caspasas". Existe evidencia experimental que sugiere que la activación de las procaspasas ocurre de manera secuencial, como una cascada proteolítica (Nicholson *et al.*, 1997).

Una vez activadas por corte, las caspasas cortan proteínas blanco que son indispensables en el mantenimiento de la estructura celular normal como las láminas nucleares, la actina, la β -tubulina, así como de sustratos que solo son activados durante la apoptosis como el Factor de Fragmentación de DNA (DFF-45, Liu *et al.*, 1997) y al inhibidor de la nucleasa murina ICAD (Enari *et al.*, 1998), los cuales son responsables al menos en parte, de los cortes internucleosómicos característicos de una célula apoptótica (Kidd , 1998).

El orden exacto en el que actúan las caspasas en las diferentes vías de señalización pro-apoptótica es controversial al igual que la secuencia temporal con otros eventos característicos del programa de muerte; sin embargo existen algunas caspasas ya identificadas como específicas de las diferentes vías de inducción de muerte celular, como la caspasa 8 relacionada con la activación de apoptosis vía receptores a muerte (Raff, 1998).

Existen caracterizadas actualmente tres vías de señalización para la inducción de apoptosis. Todas tienen en común el permitir la activación de las pro-caspasas y con ello la ejecución del programa de muerte.

Una de ellas es la interacción de receptores de superficie con sus respectivos ligandos, los cuales, a través de moléculas adaptadoras pueden reclutar y activar pro-caspasas, específicamente la pro-caspasa 8 como es el receptor a el ligando Fas y el receptor a TNF- α , TNFR1, que se les ha denominado en conjunto receptores a muerte, dada su capacidad para activar apoptosis en las células que los expresan. Este tipo de inducción de apoptosis es el empleado por los linfocitos normales activados, una vez que han llevado a cabo su función (Ashkenazi *et al.*, 1998).

La segunda vía de señalización es iniciada por una gran variedad de estímulos pro-apoptóticos e involucra daño mitocondrial en sus pasos iniciales. Cuando la mitocondria es dañada y se altera su potencial de membrana, ésta libera al citoplasma al citocromo C. Esta proteína funciona normalmente en el proceso de transporte de electrones durante la respiración celular para la formación de ATP. Una vez en citoplasma, esta proteína tiene una función muy diferente. Se une a la molécula adaptadora APAF-1, que es homóloga a la proteína CED-4 en *C.elegans*. Este complejo permite la activación directa de la pro-caspasa 9, la cual inicia la cascada de caspasas y la ejecución de la apoptosis (Zou *et al.*, 1997) Cabe mencionar que este mecanismo es activado tanto por señales intracelulares y extracelulares, por eso se le considera un mecanismo de amplificación de la cascada de caspasas, lo cual permite aumentar la eficiencia y la velocidad con la que el proceso de muerte se lleva a cabo.

La tercera vía de señalización involucra el daño directo al DNA. Aunque es el mecanismo que está menos caracterizado, se han involucrado proteínas como p53, que es producto de un gen supresor de tumor. Esta proteína que actúa como factor de transcripción es capaz de activar apoptosis y detener la progresión del ciclo celular (Raff, 1998).

1.3.1- Controles sobre el proceso apoptótico.

El inicio o no del programa de muerte es entonces una decisión que no es trivial para una célula; por lo tanto, es necesario que dicho proceso esté regulado de una manera muy estricta.

Dentro del contexto de regulación, uno de los más claros es aquel que se ejerce sobre la actividad de las caspasas. Como cualquier otra enzima, la actividad de estas proteínas puede modificarse ya sea por permitir o no su activación (p.ej. controlando el tráfico subcelular de estas proteínas y/o de sus sustratos) o por inhibición directa de la actividad enzimática propia de la caspasa una vez que ya ha sido activada, impidiendo que se corte el sustrato siguiente.

Otra forma de regulación es inhibir la activación de las caspasas por competencia del sitio de reclutamiento de la pro-caspasa , como es el caso específico de los receptores a muerte. En este sistema se han descrito proteínas adaptadoras truncas que se unen al sitio de reclutamiento o dominio de muerte presente en la región intracelular de estos receptores , impidiendo que se una y se active a la pro-caspasa 8 (Nicholson *et al.*, 1997).

Se han descrito familias completas de proteínas que forman parte de los mecanismos de control sobre la apoptosis mediante la intervención sobre la actividad de las caspasas.

Una de estas familias es la familia de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP). El primer miembro de esta familia fue caracterizada en baculovirus (virus que infectan a células de insecto) gracias a su capacidad para atenuar la apoptosis inducida por infección viral. A la fecha se han descrito en mamíferos cinco homólogos de estas proteínas, NAIP, cIAP1, cIAP2, XIAP y muy recientemente la proteína survivina, cuya expresión es regulada a través de las fases del ciclo celular y tiene afinidad por proteínas de citoesqueleto . A esta proteína se le ha implicado en el control de la apoptosis durante la división celular. El principal mecanismo de acción de estas proteínas consiste en inhibir la activación de algunas pro-caspasas como la 9, pero tienen además la capacidad de interaccionar con proteínas adaptadoras que permiten la transducción de la señal de muerte a través de receptores membranales (Roy *et al.*, 1997; LaCasse *et al.*, 1998).

Otra familia encargada del control del proceso apoptótico es la familia de Bcl-2. Se han clonado hasta la fecha 12 proteínas de mamífero con homología estructural a la proteína Bcl-2. Los miembros de esta familia se dividen en proteínas pro-apoptóticas y antiapoptóticas. Las proteínas antiapoptóticas están mucho más relacionadas estructuralmente con Bcl-2 (Bcl-x, Bcl-2, Mcl-1, A1 y Boo) y estructuralmente más alejadas las proteínas pro-apoptóticas , Bik, Blk, Hrk, Bim, Bad, Bid y Diva (Green *et al.*, 1998).

Los miembros de esta familia pueden heterodimerizar vía interacciones entre motivos estructurales conocidos como dominios homólogos a Bcl-2. Dado que se ha descrito que no es la presencia individual de cada una de ellas la que se correlaciona con determinado efecto, sino el balance entre las cantidades de proteínas de un tipo u otro, se ha sugerido que la heterodimerización resulta en una neutralización de los efectos y el fenotipo sensible o resistente a sufrir apoptosis se genera en función a qué grupo de proteínas domine en concentración. Sin embargo existen proteínas mutantes en el dominio de dimerización que son capaces de ejercer su efecto pro-ó-antiapoptótico independiente a su capacidad de heterodimerizar. Entonces se acepta que hay

mecanismos dependientes y no dependientes de heterodimerización (Zhu *et al.*, 1996)

Muchos de los miembros de la familia de BCL-2 contienen en la región carboxilo terminal una región hidrofóbica capaz de interactuar con diferentes membranas intracelulares como la mitocondrial y la de retículo endoplásmico y perinuclear. Estudios realizados con proteínas de fusión han demostrado que la unión a membranas por los miembros de esta familia es indispensable para su efecto antiapoptótico. La unión de los miembros de Bcl-2 a la membrana mitocondrial es de particular interés dado que se ha demostrado que un mecanismo probable de inhibición de apoptosis sea estabilizar la membrana mitocondrial e impedir la liberación de citocromo C al citoplasma, impidiendo de esta manera la formación de complejos de citocromo C con Apaf-1; inhibiendo de esta manera la activación de procaspasa 9 y con ello la cascada de activación de las caspasas efectoras como la 3 y la 7 (Kluck *et al.*, 1997).

Es interesante también que Bcl-2, Bcl-x y Bax pueden formar canales iónicos en membranas biológicas. Esta actividad de canales iónicos mostrada por algunos miembros de la familia podrían controlar apoptosis al modificar la permeabilidad de membranas intracelulares.

Por ejemplo la interacción de la proteína Bax con el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), un componente de el poro de transición, induce un cambio en la permeabilidad de la membrana mitocondrial alterando el potencial y con ello, la liberación de citocromo C hacia citosol , induciendo apoptosis.

Esta actividad de Bax es inhibible por Bcl-2. Bcl-x , en cambio permite mantener el recambio mitocondrial ATP/ADP bajo condiciones no óptimas para el crecimiento (p.ej deprivación de suero) al estabilizar la función del translocador de nucleótidos de adenina , el cual es dependiente de la función de VDAC. Esto es, que los miembros de la familia de Bcl-2 controlan la liberación de citocromo c de la mitocondria por regulación de componentes formadores del poro de transición que se genera en la membrana mitocondrial después de determinados estímulos pro-apoptóticos.

Otro mecanismo propuesto para la acción de Bcl-2, es la regulación para el mantenimiento homeostático de los flujos de calcio desde retículo endoplásmico (Minn *et al.* , 1997; Schendel *et al.*, 1997 y Narita *et al.*, 1998).

Finalmente, otro mecanismo importante de regulación es el control de la expresión génica de las proteínas que intervienen directamente en el proceso apoptótico. En este sentido, la participación de los factores de

transcripción en la regulación de dicho proceso resulta crítico, tanto en la regulación como en la ejecución de todo el proceso.

Un ejemplo muy claro de la importancia de estos factores de transcripción en la regulación del proceso apoptótico es el caso de la proteína p53 y el factor de transcripción NF- κ B.

p53 es una proteína producto de un gen supresor de tumor. Esta proteína está involucrada en una gran variedad de procesos fisiológicos de una célula. Entre éstos se incluyen transcripción de genes, reparación del DNA, control del ciclo celular, mantenimiento de la estabilidad genómica, envejecimiento y muerte celular. Esta proteína es activada en respuesta a daño específico al material genético. Su papel dentro de la regulación positiva del proceso apoptótico está ligado a su actividad transcripcional (Frebourg et al., 1995, Levine et al., 1995, Macleod et al., 1995).

NF- κ B es un factor de transcripción que permanece inactivo en el citoplasma, por interacción con proteínas inhibitoras específicas, por lo que su principal mecanismo de regulación consiste en permitir o no su translocación nuclear previa degradación de su inhibidor. Este factor es activado por una gran variedad de estímulos extracelulares como: el estrés oxidativo, la luz ultravioleta, TNF- α y los lipopolisacáridos (May et al., 1998) . Su papel como regulador negativo de la apoptosis se describió en 1996, en donde se demostró que la restauración de una de las subunidades que lo conforman(p65) en fibroblastos de ratones knockout inducía protección a sufrir apoptosis mediada por el factor de necrosis tumoral alfa. Esta actividad antiapoptótica está asociada a su capacidad para activar la transcripción de genes antiapoptóticos como las proteínas IAP 1 y 2 y otros genes como la proteína adaptadora TRAF 2, evento asociado a la inhibición de la activación de la procaspasa 8 vía receptores a muerte (Wang et al., 1998).

Sin embargo el papel como regulador de la apoptosis es controversial, en algunos sistemas es capaz de inhibir el proceso , mientras que en algunos otros es un activador específico de la apoptosis (Wang et al, 1996).

Y es por esta controversia, así como su capacidad de ser inducido por diferentes agentes externos, incluidos algunos antineoplásicos, que decidimos estudiar el papel que juega este factor de transcripción en la sensibilidad diferencial a sufrir apoptosis presente en dos sistemas tumorales de cérvix mediada por el agente anti-tumoral gemcitabina.

1.4.- Familia de Rel/NF- κ B

Todas las células responden a estímulos externos por generación de segundos mensajeros en el citoplasma, los cuales son capaces de enviar señales al núcleo, finalizando con la expresión de un conjunto de genes específicos. Esto es, el proceso de regulación de la transcripción puede determinar las características de crecimiento, estado de diferenciación, desarrollo e incluso estados patológicos de un tejido. La expresión de genes está regulada por elementos tipo *cis*, los cuales son reconocidos por los factores de transcripción, cuya actividad es modulada a su vez, por una gran cantidad de estímulos. Los principales mecanismos de regulación de la actividad de estos factores de transcripción son muy diversos: regulación a nivel transcripcional, modificaciones post-traducción, interacción con otros factores o por localización subcelular.

NF- κ B es un factor de transcripción que fue identificado inicialmente como una proteína específica de tejido linfoide que se une a la secuencia decamérica GGGACTTCC presente en el "enhancer" intrónico de la cadena ligera (*k*) de las inmunoglobulinas (Sen *et al.*, 1986). La actividad de NF- κ B es regulada principalmente por su localización subcelular. Este factor de transcripción está presente como un complejo inactivo en el citoplasma de todas las células normales no estimuladas con su inhibidor I κ B. Una gran variedad de señales extra e intracelulares son capaces de modificar a los complejos NF- κ B/I κ B, permitiendo la liberación del inhibidor I κ B, con la subsecuente translocación de NF- κ B al núcleo.

Una vez en el núcleo, NF- κ B se une a secuencias consenso en el DNA, regulando la actividad transcripcional de diversos genes responsivos. La clonación molecular de los genes que codifican para NF- κ B e I κ B, permitieron identificar a una familia de genes relacionados, tanto en el sistema de *Drosophila* como en humanos. En las moscas el sistema de NF- κ B regula el desarrollo embrionario y la inmunidad de los adultos. En el hombre, estos factores están involucrados en procesos inmunológicos, respuestas de fase aguda, control del ciclo celular, diferenciación y recientemente se les ha involucrado en procesos de regulación tanto positiva como negativa de la apoptosis.

Tabla.1 Nomenclatura actual de las proteínas involucradas en el sistema de transducción Rel/NF- κ B.

Gen	Proteína	
dorsal	Dorsal	
dif	Dif	
relish	Relish	Sistema
cactus	Cactus	Drosophila
v-rel	v-rel	Viral
c-rel	c-Rel	
rela	RelA	
relb	RelB	Humano
nfb1	P50,p105	
nfb2	P52,p100	
Inhibidores		
ikba	IkB α	
ikbb	IkB β	
ikbe	IkB ϵ	Humano
bcl-3	Bcl-3	
Cinasas		
ikka	IKK α	
ikkb	IKK β	Humano
ikky	IKK γ	

1.4.1 Características estructurales de la familia de Rel.

La actividad de NF- κ B fue identificada originalmente en linfocitos B. Sin embargo, el mismo grupo de Sen y Baltimore demostró que la actividad de NF- κ B es inducible en otros sistemas celulares por ésteres de forbol. Demostraron también que esta activación es independiente de la síntesis *de novo* de proteínas. Actualmente se ha demostrado que la actividad de NF- κ B existe en casi todos los sistemas celulares estudiados y que los sitios consenso de unión de estos factores, denominados sitios **κ B** están presentes en una gran cantidad de promotores y "enhancers" de muchos y diversos genes. El rango de factores biológicos y condiciones ambientales capaces de inducir la actividad de NF- κ B también se encuentra en expansión.

NF- κ B existe en el citoplasma de la mayor parte de los sistemas celulares como homo u heterodímeros formados por una familia de proteínas estructuralmente relacionadas, denominadas proteínas de **Rel**. Cada una de las subunidades identificadas hasta la fecha contienen una región amino terminal conservada denominada dominio de Rel. El

dominio de homología de Rel (DHR) contiene los motivos estructurales para unión a DNA, dimerización y la señal de localización nuclear. En células no estimuladas, los complejos de NF- κ B están secuestrados en el citoplasma en una forma inactiva por interacción con proteínas inhibidoras monoméricas denominadas I κ B, las cuales por sí mismas pertenecen a otra familia de proteínas funcional y estructuralmente relacionadas (May et al., 1997).

Las dos primeras proteínas purificadas de la familia de Rel presentan pesos moleculares de 50 y 65 kDa. Empleando cromatografía de afinidad con el consenso para κ B se demostró que estas dos proteínas también denominadas NF κ B1 (p50) y Rel A (p65) forman un heterodímero que es capaz de unirse con alta afinidad a la secuencia consenso κ B del gen para la cadena ligera κ de las inmunoglobulinas.

La clonación de la subunidad p50 permitió demostrar la existencia de una región de 300 aminoácidos en su porción amino terminal que mostraba alta homología con la oncoproteína viral v-Rel, su homólogo celular c-Rel y la proteína *Dorsal* en *Drosophila*. Esta característica estructural originó que a esta región se le denominara dominio de homología de Rel. Así mismo ya se han identificado otras dos nuevas proteínas pertenecientes a esta familia: RelB y p52 / N- κ B2 (Ryseck et al., 1992, Ruben et al., 1992).

Las proteínas Rel/NF- κ B están relacionadas a través del dominio conservado de Rel. Sin embargo estas proteínas se han dividido en dos clases en función a las secuencias que presentan en su región carboxilo.

Los miembros de la primera clase, p100 y p105 en humanos, Relish en *Drosophila*, contienen regiones carboxilo muy largas que presentan múltiples copias de repeticiones de ankyrina. Los miembros de esta clase llegan a ser activas después de ser escindidas por proteólisis, la cual genera proteínas más pequeñas con capacidad para unirse al DNA: la escisión de p105 genera a la proteína p50 y el corte de p100 genera a la proteína p52. El mecanismo de proteólisis no es el único mediante el cual se generan las proteínas p50 y p52; se ha demostrado que existe también control a nivel de traducción restringida de los mensajeros precursores (Chen et al., 1999)

Las proteínas miembro de esta clase, no son activadoras de la transcripción, excepto cuando forman dímeros con los miembros de la segunda clase de proteínas de Rel. Esta segunda clase incluye a las proteínas c-Rel, Rel B, Rel A (p65) en humanos, *Dorsal* y *Dif* en el sistema de *Drosophila*. Estas proteínas contienen en su región carboxilo terminal un dominio de trans-activación.

Todas las proteínas de la familia de Rel en vertebrados son capaces de formar dímeros u heterodímeros, excepto Rel B, la cual solo puede formar heterodímeros. Esta capacidad de combinación genera una gran diversidad, la cual contribuye a una regulación distinta de conjuntos de genes diversos, debido a que los dímeros individuales tienen especificidades distintas por las regiones consenso (May *et al.*, 1997).

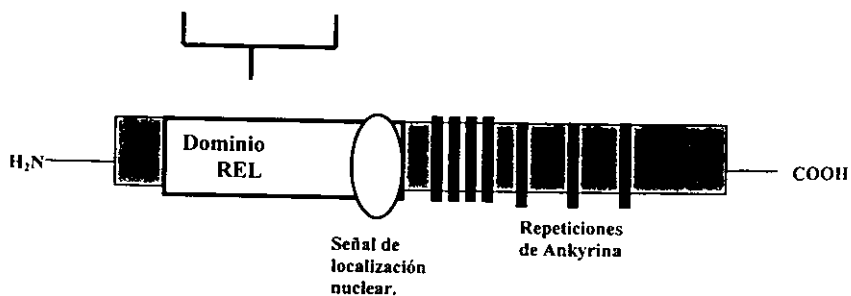
Al dímero formado por las proteínas p50-p65 es al que comúnmente se le refiere como NF- κ B; éste es además es el complejo más común en la mayoría de los sistemas celulares.

La actividad de NF- κ B es regulada por su interacción con la familia de proteínas inhibidoras I κ B, las cuales tienen afinidades distintas por complejos individuales, se regulan de manera distinta, además de presentar una expresión tejido específica. La interacción Rel-I κ B mejor estudiada es la formada por NF- κ B e I κ B- α . Esta interacción bloquea la capacidad de NF- κ B para entrar al núcleo y unirse al DNA (Baeuerle *et al.*, 1996).

La interacción con las proteínas inhibidoras cubren la secuencia de localización nuclear del complejo, así como algunas regiones esenciales para la unión a DNA (**Fig. 1**, Chen *et al.*, 1999).

Clase I p50
p52

Unión a DNA
Dimerización
Unión a proteínas I κ B
Dimerización



Rel A (p65)
Rel B
Clase II c-Rel (p75)
Dorsal (*Drosophila*)

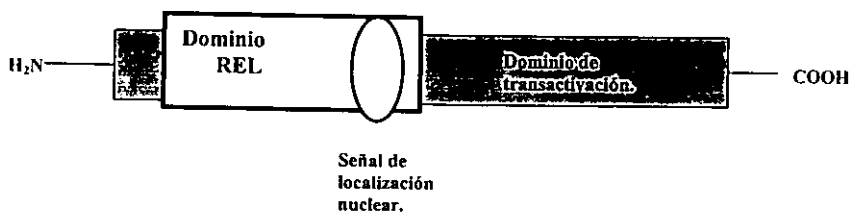


Fig. 1 Estructura de las proteínas pertenecientes a la familia de Rel.

1.4.2 Inhibidores de la familia Rel/ NF- κ B.

En la mayor parte de los sistemas celulares, NF- κ B está presente en una forma latente, inactivo, unido a I κ B. Una vez que llega el estímulo extracelular, NF- κ B se transloca rápidamente al núcleo y activa la expresión génica. Esto es, un paso clave para la regulación de estos factores de transcripción ocurre a través de la modulación de la interacción de los complejos con los inhibidores de I κ B.

La actividad de inhibición por I κ B, fue descrita bioquímicamente como dos actividades inmunológicas distintas, α y β , con diferentes pesos moleculares (35 y 43 kDa respectivamente) así como en su mecanismo de inactivación: mientras que la I κ B- α purificada podía ser inactivada por tratamiento con diferentes cinasas, I κ B- β podía ser inactivada por tratamiento con fosfatasas (Link *et al*, 1992). Otra proteína perteneciente a esta familia logró identificarse, I κ B- ϵ , la cual controla a otro conjunto de complejos de la familia de NF- κ B y también es regulada por fosforilación. Existe la actividad de I κ B- γ que solo está presente en sistemas murinos.

Finalmente existe una proteína que pertenece a esta familia de inhibidores con localización nuclear: Bcl-3, la cual une específicamente a los complejos homodiméricos de p52 y p50, regulando su unión y actividad de transactivación pero a nivel nuclear.

Los diferentes inhibidores miembros de esta familia presentan especificidad distinta para unirse a los diferentes complejos de la familia de Rel. Por ejemplo, I κ B- α y β interactúan con heterodímeros de p50 y p52 con las proteínas Rel A o c-Rel, así como heterodímeros y homodímeros de Rel A y c-Rel. En contraste I κ B- ϵ parece unirse solamente a dímeros que contienen solo RelA y/o c-Rel. Esta capacidad de inhibir específicamente a distintos complejos de la familia de NF- κ B se ha asociado con una regulación diferencial de conjuntos de genes distintos que de alguna manera permiten la modulación de los diferentes roles fisiológicos que juega la familia de factores de transcripción NF- κ B.

1.4.3. Funciones nucleares de la familia I κ B.

I κ B- α , β y γ difieren en su respuesta a los diferentes inductores de la familia de Rel. I κ B- α es degradado rápidamente en respuesta a todos los inductores de NF- κ B y es sintetizado de novo, rápidamente también de una manera dependiente de NF- κ B. Esta propiedad, así como la capacidad de remover a los complejos ya activos en el núcleo permiten establecer la hipótesis de que este inhibidor está involucrado preferentemente en las respuestas de tipo transitorio generados por la familia de NF- κ B. La actividad nuclear de I κ B podría entonces unirse y

remover a los complejos de NF- κ B del DNA, gracias a la señal de exporte nuclear presente en la estructura de estas proteínas (NES), que permitiría el bombeo de los complejos activos al citoplasma.

Mientras que I κ B- α es degradado rápidamente en respuesta a los diferentes inductores de la actividad de NF- κ B, I κ B- β y γ lo hacen más lentamente. Se ha propuesto que I κ B- β regula un tipo de respuesta más persistente como respuesta a algunos inductores. En células no estimuladas, NF- κ B está asociado a una forma hiperfosforilada de I κ B- β , mientras que en células estimuladas NF- κ B se encuentra unido a formas hipofosforiladas de I κ B- β . Estos complejos tienen expuestas las señales de transporte nuclear y son insensibles a la inhibición por I κ B- α . En células estimuladas se han encontrado en el núcleo complejos ternarios NF- κ B/I κ B- β unidos al DNA. Es por esto que se ha propuesto que la forma hipofosforilada de I κ B- β actúa como una chaperona, protegiendo a los complejos de I κ B- α , permitiendo que NF- κ B se transloque al núcleo, permitiendo la persistencia de la respuesta (May *et al.*, 1997, Suyang H *et al.*, 1996).

1.4.4 Mecanismos de Activación de la familia de Rel.

Existen diversos estímulos capaces de activar a los complejos de la familia de Rel. Algunos de ellos se enlistan en la tabla número 2.

Tipo de agente inductor	Ejemplos
Productos Bacterianos:	LPS, Exotoxina B.
Virus:	Hepatitis B, Adenovirus, HIV-1
Citocinas:	IL-1,2,12,15, TNF- α , TNF- β
Estrés fisiológico:	Isquemia, hipoglucemia
Estrés mecánico:	Radiación U.V y γ .
Estrés Oxidativo:	Ozono, Reoxigenación, Peróxido de Hidrógeno
Metales pesados:	Cr, Co, Ni, Pb.
Agentes terapéuticos:	AZT, Cisplatino, Daunomicina, Etopósido.
Mediadores apoptóticos:	Anti- Fas /Apo-1.
Hormonas, Factores de crecimiento:	GM-CSF, Insulina, HGF
Mediadores fisiológicos:	Hemoglobina, ceramida, colágena tipo I

Tabla No. 2 . Agentes Inductores de la Activación de NF- κ B (Pahl, 1999).

Todos los estímulos permiten la activación de estos factores de transcripción mediante un paso común dentro del mecanismo de transducción: todos permiten la activación de cinasas que fosforilan en residuos específicos de serina presentes en los inhibidores de la familia de I κ B; esta fosforilación permite que las moléculas de I κ B sean sustrato para ubiquitinación y poder ser degradadas por la subunidad 26 S del proteasoma (Karin, 1999).

De manera general, los mecanismos de activación de NF- κ B pueden ser divididos en función a su nivel de activación; es decir, un mecanismo activado a nivel membranal a través de receptores a muerte como el TNF-R1, otro a nivel citoplásmico a través de la activación de cinasas como isoformas atípicas de PKC y Akt o bien a través de una señalización proveniente del núcleo, la cual es la menos caracterizada y se ha identificado a la proteína cinasa dependiente de DNA como parte del sistema de transducción.

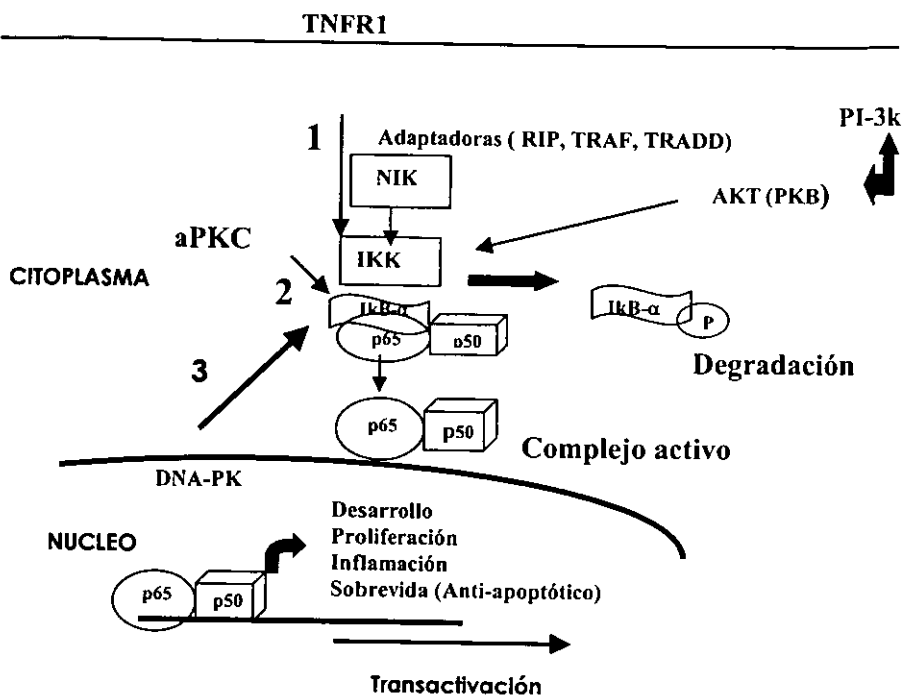


Fig 2. Mecanismos de activación descritos para la familia de NF-κB/Rel. 1) A través de receptores de muerte. 2) Vía de activación del complejo de IKK por cinasas citoplásmicas y 3) Activación desde el núcleo.

El mecanismo mejor descrito para la activación de NF-κB es a través del receptor a TNF-α, el receptor tipo I (TNF-R1) , el cual se describirá con mayor detalle en la sección siguiente, ya que es éste el implicado en el papel antiapoptótico mediado por estos factores de transcripción.

La capacidad de estos factores de transcripción para modular tantos tipos de respuestas fisiológicas en una célula, pueden explicarse en función a la enorme cantidad (alrededor de 150) de genes responsivos que regulan. A continuación se enlistan en una tabla los diferentes genes sujetos a regulación por los factores de transcripción de la familia de Rel.

Tabla No. 3 Genes que responden a NF- κ B (Pahl, 1999)

GEN	FUNCION
Citocinas: IFN- γ , IL-1, 2, 6, 8 y 9, TNF- α y β .	Inmunomoduladores
Inmuno-receptores: CCR5 Cadena alfa del receptor a IL-2 MHC clase I	Receptor a citocinas Reconocimiento antigénico
Moléculas de adhesión: ICAM-1	Reconocimiento Inter-celular
Proteínas de fase aguda: Angiotensinógeno Factor tisular I Factor C4 Proteína C reactiva	Precursor de angiotensina Activación del complemento. Factor del complemento Pentaxina
Respuesta a estrés: Angiotensina II Cadena H de ferritina MnSOD Fosfolipasa A2	Hormona peptídica Proteína de almacenamiento de Fe Superóxido dismutasa Metabolismo de ácidos grasos.
Receptores de superficie celular: A1 adenosina Bradicinina B1 CDC69	Efectos pleiotrópicos Efectos pleiotrópicos Lectina de superficie de Células T
Factores de crecimiento: G-CSF GM-CSF PDGF cadena B	Factor estimulante de granulocitos Factor estimulante de macrófagos Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
Factores de transcripción: c-myb c-myc c-rel IRF-1 junB p53	Proto-oncogén Proto-oncogén Proto-oncogén Factor 1 regulación de Interferón Proto-oncogén Gen supresor de tumores
Enzimas: Ceramide glucosil-transferasa Colagenasa I	Metabolismo de esfingolípidos Metaloproteínasa de matriz
Reguladores del ciclo celular: Ciclina D1 Ciclina D3	Proliferación
Reguladores de la apoptosis: A1 Bcl-xL CDC95 (Fas) IAP	Homólogos a Bcl-2. Protección apoptosis Receptor pro-apoptótico Inhibidoras de apoptosis

Como ya se había mencionado NF- κ B en células somáticas no estimuladas, se encuentra inactivo en el citoplasma por unión a inhibidores tipo I κ B. Sin embargo se ha demostrado que en sistemas tumorales (la gran mayoría) se encuentra actividad constitutiva de NF- κ B en el núcleo. Esto, aunado a su capacidad para regular apoptosis, han sentado las bases para estudiar el papel de estos factores de transcripción en el proceso de transformación neoplásica, específicamente en su papel como mecanismo de resistencia a sufrir apoptosis.

1.5 Antiapoptosis mediada por NF- κ B.

La primera evidencia acerca de la probabilidad de que los factores de transcripción de la familia de Rel estuvieran involucrados en el control del proceso apoptótico, se derivó de los estudios realizados con la oncoproteína retroviral v-Rel. v-Rel está codificada por el retrovirus Rev-T, que infecta a aves y causa tumores graves de tipo linfóide, además de immortalizar y transformar a células B en cultivo.

En 1991 , Neiman *et al.*, demostraron que células derivadas de tumores de pollo eran resistentes a sufrir apoptosis inducida por radiación y por dexametasona *in vitro*. Posteriormente en 1995, White *et al.*, demostraron que este efecto era debido a la presencia de la proteína v-Rel, en función a que era posible restituir el fenotipo de resistencia cuando se trabajaba a temperaturas permisivas de una mutante sensible de esta proteína.

1.5.1 Efecto protector de NF- κ B en la muerte celular inducida por TNF- α .

TNF- α fue descrito inicialmente como un factor sérico producido por células tratadas con lipopolisacáridos, capaz de inducir necrosis hemorrágica en tumores. TNF- α es una citosina pro-inflamatoria que es producida principalmente por macrófagos activados. La producción de TNF- α es inducida por citocinas y otros activadores , como LPS y algunos virus. Esta citosina regula una gran cantidad de funciones fisiológicas , incluidos procesos inflamatorios, de proliferación y respuestas antivirales.

Las acciones de esta citosina son mediadas a través de su interacción con dos tipos de receptores , TNF-R1 (p60) y TNF-R2(p80), los cuales pertenecen a su vez a una gran familia de receptores que es la superfamilia de las inmunoglobulinas. La mayor parte de los tejidos y estirpes celulares expresan ambos tipos de receptores. La unión de TNF- α al receptor TNF-R1 , produce la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, la cual desencadena las acciones pro-inflamatorias e inmunomoduladoras. Sin embargo, en algunos tipos celulares y bajo

determinadas condiciones, TNF- α puede inducir apoptosis (Van Antwerp *et al.*, 1998).

La dualidad de la señal mediada por el receptor tipo I se explica en función a que se han identificado dos vías intracelulares de transducción: una vía pro-apoptótica mediada por FADD y otra ruta antiapoptótica, mediada por la proteína adaptadora TRAF2 y en algunos tipos celulares por Akt cinasa (Ozes *et al.*, 1999; Romashkova and Makarov, 1999), que permite la activación de NF- κ B.

Los miembros de la superfamilia de receptores de TNF contienen un dominio citoplásmico, denominado dominio de muerte, el cual es un motivo estructural que permite interacciones proteína-proteína críticas para la transducción de la señal río abajo del receptor. La unión de TNF- α permite la trimerización del receptor, seguida del reclutamiento de distintas proteínas en el dominio citoplásmico del mismo. En la vía de señalización pro-apoptótica, el receptor recluta a la molécula adaptadora FADD la cual a través del dominio estructural de muerte permite el reclutamiento y activación a su vez, de la pro-caspasa 8, iniciando así la cascada de muerte.

Una segunda vía pro-apoptótica implica el reclutamiento de la proteína RAIDD/ CRADD, la cual permite el reclutamiento y activación posterior de la pro-caspasa 2.

Dentro del sistema de transducción del mecanismo antiapoptótico, una vez activado el receptor, se permite el reclutamiento de la molécula adaptadora TRADD al dominio citoplásmico del receptor. TRADD puede reclutar entonces a la proteína TRAF2 que a su vez une a la proteína RIP1 (Receptor Interacting Factor) y permiten la activación de NF- κ B debido al reclutamiento y activación de cinasas tipo MAPK como la cinasa NIK, la cual fosforila y activa a su vez a un multicomplejo de proteínas denominado IKK .Este complejo es el responsable directo de la fosforilación del inhibidor I κ B- α en los residuos de serina 32 y 36, señal que la prepara para ser degradada por el proteasoma, permitiendo así la translocación nuclear de NF- κ B (Karin, 1999).

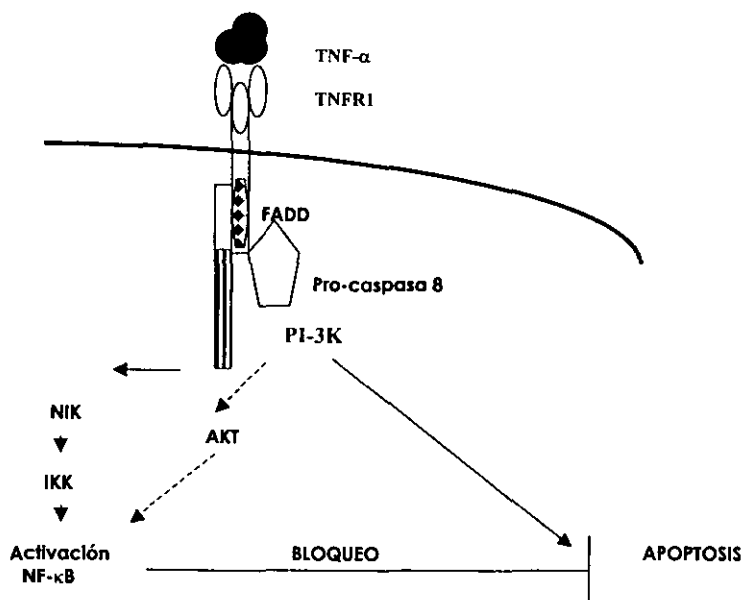


Fig. 3 Vías de regulación apoptótica mediadas por el receptor TNF-R1.

Se han propuesto tres modelos generales mediante los cuales los miembros de la familia de Rel/NF- κ B podrían regular apoptosis: (1) por regulación directa de genes que controlen positiva o negativamente dicho proceso, (2) por regulación del ciclo celular lo cual sensibiliza o desensibiliza a la célula a recibir señales apoptóticas; y (3) por interacción con proteínas celulares cuyos niveles afecten el balance sobrevida-muerte en la célula.

El proceso antiapoptótico mediado por NF- κ B en la muerte celular inducida por TNF- α es dependiente de la síntesis de proteínas y necesita específicamente la presencia de la subunidad p65 (que es una de las más activas transcripcionalmente) en el núcleo. De la misma forma se ha caracterizado que es un evento multigénico, es decir más de un gen debe ser transcrito para poder llevar a cabo el efecto protector. Entre estos genes se encuentran las proteínas adaptadoras TRAF 1 y 2 y las proteínas inhibidoras de apoptosis c-IAP1 y c-IAP2 (Wang *et al.* 1998)

La protección de la apoptosis mediada por TNF- α en fibroblastos de ratón deficientes en Rel A requieren la expresión simultánea de los cuatro genes, mientras que la sobre-expresión de c-IAP1 o c-IAP2 es

suficiente para inhibir la apoptosis inducida por etopósido. Estos genes están involucrados en la resistencia a apoptosis por inhibición del reclutamiento y activación de la procaspasa 8 por el receptor TNF-R1.

Se ha demostrado recientemente que existen otros sistemas en donde en la apoptosis inducida por la eliminación del suero en los medios de cultivo permite la activación de una caspasa iniciadora que corta a la subunidad p65, generando formas trunca incapaces de activar transcripción, lo cual permite la activación del programa de muerte en estas células (Levkau *et al.*, 1999).

2. Antecedentes

2.1 Gemcitabina. Propiedades farmacodinámicas.

La Gemcitabina [2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero β) ; dFdC] es un nuevo análogo a la desoxicitidina . La gemcitabina es un profármaco, el cual requiere después de su incorporación a las células, modificarse por fosforilación. La gemcitabina es modificada por la desoxicitidina cinasa a gemcitabina monofosfato, la cual es convertida a los compuestos metabólicamente activos: gemcitabina di y trifosfato.

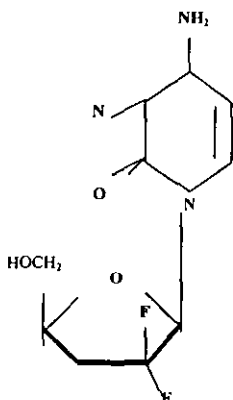


Fig. 4 Estructura química de la Gemcitabina.

Su principal actividad farmacológica consiste en inhibir competitivamente la síntesis de DNA, promoviendo su fragmentación y con ello la muerte celular.

Una vez que la gemcitabina trifosfatada ha sido añadida a la cadena de DNA, la DNA polimerasa solo puede añadir un solo nucleótido adicional , después de lo cual la elongación de la cadena se termina. Es importante mencionar que el hecho de que la gemcitabina trifosfatada no ocupe una posición terminal en la cadena recién sintetizada la protege de su detección y remoción por las exonucleasas de reparación. La gemcitabina ha mostrado tener efectos citotóxicos en un gran número de líneas celulares *in vitro* y actividad antitumoral en varios modelos animales. Es muy activa en tumores sólidos como en

cáncer de células no pequeñas de pulmón (NSCLS), cáncer pancreático y cáncer de vejiga (Van Moorsel *et al.*, 1997).

En cuanto a su farmacocinética, la concentración máxima alcanzada en plasma ocurre entre los 15 y 30 minutos posteriores a su administración por vía intravenosa, en un rango entre los 10 y los 40 mg/L. Su unión a proteínas plasmáticas es mínima y su distribución no es muy extendida. Es rápidamente metabolizada intracelularmente. Se excreta por vía renal en orina.

Los principales mecanismos de acción caracterizados para la gemcitabina se resumen en la siguiente tabla:

Mecanismo	Molécula activa	Efecto primario	Efecto secundario
Inhibición competitiva de la incorporación del dCTP a la cadena de DNA.	GEM-TP	Término de la elongación de la cadena de DNA.	Fragmentación y muerte celular.
Inhibición de la ribonucleótido reductasa	GEM-DP	Reducción de la síntesis de los desoxinucleótidos, incluido el dCTP	Incrementa la relación GEM-TP/dCTP, lo cual aumenta la probabilidad de incorporación de la gemcitabina a la cadena.
Inhibición de la CTP sintetasa	GEM-TP	Reduce la conversión de UTP a CTP, con lo cual reduce mucho más los niveles de dCTP.	Permite mayor activación por fosforilación de GEM.

Abreviaturas: CTP= citidina trifosfato; dCTP= desoxicitidina trifosfato; GEM-MP= gemcitabina monofosfato; GEM-DP= gemcitabina difosfato; GEM-TP = gemcitabina trifosfato; UTP= uridina trifosfato (Noble *et al.*, 1997).

2.2 Justificación

Se ha demostrado que la gemcitabina es un excelente agente antineoplásico solo, o en combinación con otros quimioterápicos, incluso como terapia adyuvante a la radiación (Van Moorsel et al., 1997).

Este antitumoral es capaz de inducir apoptosis en sistemas tumorales *in vitro* (Huang et al, 1992). Este efecto ha sido demostrado en cultivos celulares tumorales de pulmón y de estómago. Sin embargo, a la fecha no existen aún reportes en donde se describa el efecto de gemcitabina en líneas de cáncer cervicouterino.

En nuestro laboratorio se describió el efecto *in vitro* en seis líneas de cáncer cervicouterino del antineoplásico Gemcitabina.

Estudios de viabilidad permitieron demostrar que existe diferente sensibilidad a este fármaco entre las líneas y que el efecto es dependiente de dosis (datos no mostrados). De estos ensayos pudieron delimitarse dos grupos de sensibilidad al fármaco gemcitabina: un grupo muy sensible (CaSki, C33-A y HeLa) y otro resistente (INBl, CaLo y SiHa).

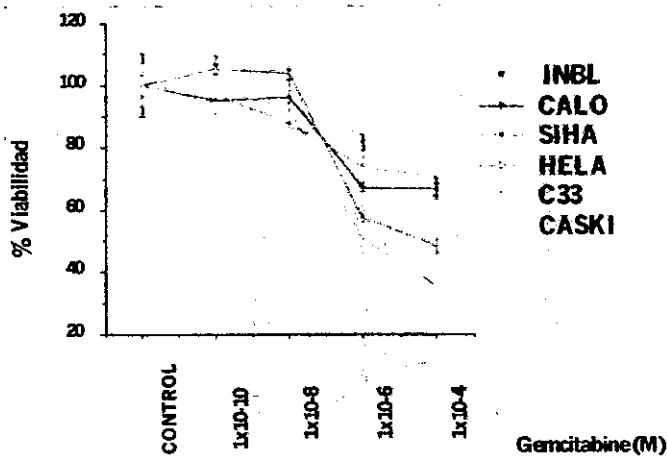


Fig. 5 El efecto de gemcitabina es dependiente de la dosis en líneas de CaCu. Curvas de viabilidad donde se muestra el efecto de gemcitabina en cultivos de distintas líneas celulares expuestas a gemcitabina durante 24 horas a diferentes dosis.

De manera paralela a los ensayos anteriores, se demostró que en las líneas celulares sensibles CaSki y C33-A, la disminución de la viabilidad ocasionada por la exposición a gemcitabina, correlacionaba con un incremento en la fragmentación del DNA mediante ensayos de TUNEL (datos no mostrados). Cabe recordar que los ensayos de TUNEL permiten la identificación de células apoptóticas.

Juntos, los datos anteriores demuestran que la gemcitabina es capaz de inducir apoptosis solo en las líneas celulares CaSki y C33-A.

Uno de los datos moleculares más importantes como antecedente para este trabajo resultó ser la baja expresión de la proteína inhibidora de NF- κ B, I κ B- α , en las líneas más sensibles CaSki y C33-A (datos no mostrados).

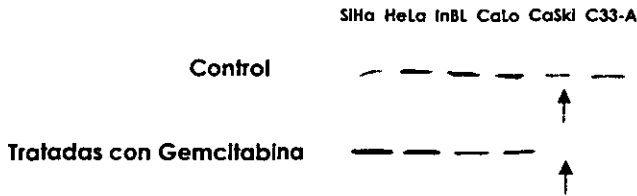


Fig.6 La expresión del inhibidor de NF- κ B, I κ B- α es menor en las líneas celulares CaSki y C33-A. Western blot donde se muestran los niveles de expresión de la proteína inhibidora I κ B- α en seis líneas de CaCu. Nótese que la expresión de esta proteína es baja en las líneas celulares CaSki y C33-A, las cuales además son las más sensibles al efecto de gemcitabina. La señal obtenida para este inhibidor en el carril control de la línea celular SiHa es un defecto en la carga. Esto es que no existe un aumento real de la proteína en estas células por tratamiento con gemcitabina.

En estos ensayos se demuestra también que el tratamiento con gemcitabina durante 24 horas disminuye aún más la cantidad de I κ B- α presente en los extractos totales obtenidos de cultivos de las líneas celulares más sensibles: CaSki (marcado con una flecha) y C33-A.

Existe evidencia experimental en donde se demuestra que diversos antineoplásicos de manera independiente a su mecanismo de acción, son capaces de inducir la traslocación nuclear de NF- κ B (Das *et al.*, 1998). Estos estudios revelan que el Paclitaxel (taxol), que es un estabilizador de microtúbulos por lo cual es capaz de inhibir el proceso de mitosis, induce la producción de TNF- α y de lipopolisacáridos. Ambos tipos de moléculas son capaces de activar la translocación nuclear de

NF- κ B y se ha sugerido que ésta podría funcionar como un mecanismo de resistencia a este fármaco en la línea celular A549 de adenocarcinoma de pulmón (Das *et al.*, 1998)

De la misma manera se ha demostrado que vincristina, vinblastina, cisplatino y específicamente el etopósido son capaces de activar un mecanismo similar para modular la translocación al núcleo de los miembros de la familia de Rel (Das *et al.*, 1998).

Por lo anterior, decidimos estudiar en los modelos celulares de cáncer de cérvix SiHa y CaSki, que en el panel de líneas estudiadas representan los extremos en sensibilidad a sufrir apoptosis por gemcitabina, a moléculas involucradas en la activación de este factor de transcripción a través del receptor a TNF- α , por analogía con el mecanismo de acción del etopósido y el cisplatino que se asocian a la generación de alteraciones sobre el metabolismo y/o daño directo al DNA, respectivamente.

Además, en función a que el factor de transcripción NF- κ B ha sido involucrado en un proceso antiapoptótico, el presente trabajo tiene como objetivo principal, establecer el papel de la ruta antiapoptótica mediada por NF- κ B en el fenotipo diferencial de resistencia a sufrir apoptosis en los modelos celulares antes mencionados.

3.- Hipótesis

La distinta susceptibilidad a sufrir apoptosis inducida por gemcitabina, mostrada por las dos líneas celulares de CaCu: SiHa (poco sensible) y CaSki (muy sensible), se correlaciona con la activación diferencial de complejos de la familia Rel/NF- κ B, generada por alteraciones en los niveles de expresión de proteínas involucradas en el sistema de transducción TNF-R1-/ NF- κ B existentes entre estas dos líneas.

4.- Objetivo General

Analizar los niveles de activación basal e inducibles por el tratamiento con gemcitabina de complejos pertenecientes a la familia de Rel/ NF- κ B, así como la expresión de proteínas clave en el sistema de transducción para la activación de esta familia de factores de transcripción a través del receptor a TNF- α y determinar si existe correlación entre éstos y la susceptibilidad diferencial a sufrir apoptosis por las líneas celulares SiHa y CaSki.

5.- Objetivos particulares

5.1.- Establecer los niveles de activación basal de los complejos de la familia Rel/NF- κ B por ensayos de retardamiento en la movilidad electroforética (EMSA).

5.2 .-Verificar la capacidad de activación de los complejos de la familia de Rel por gemcitabina mediante cursos temporales por la técnica de EMSA .

5.3.- Medir los niveles de expresión mediante ensayos de "Western blot" de proteínas involucradas en la movilización al núcleo de complejos de Rel/NF- κ B, a través de la activación del receptor a TNF- α :

Proteínas de la familia de Rel: p50, p65, c-Rel

Receptores: TNFR1

Cinasas: IKK- α , IKK- β y NIK.

Inhibidores citoplásmicos: I κ B- α , I κ B- β , I κ B- ϵ

Inhibidores nucleares: Bcl-3

Genes responsivos: c-IAP1 y c-IAP2

5.4.-Llevar a cabo la identificación de los complejos de la familia de Rel presentes en ambas líneas por la técnica de "Western Blot".

6 . Material y Métodos

Cultivos Celulares.

Células SiHa y CaSki fueron cultivadas a semiconfluencia (60-80%) en monocapa en medio DMEM alta glucosa, adicionado con 8% de suero fetal bovino y se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. El medio DMEM y el suero fetal bovino se obtuvieron de la compañía GIBCO BRL.

Líneas Celulares.

CaSki. Línea celular humana derivada de un carcinoma epidermoide de cérvix (Número: ATCC CRL-1550). Esta línea contiene integrado a su genoma cerca de 600 copias por célula del DNA del virus de papiloma humano y algunas otras copias de secuencias relacionadas con el tipo 18. (Patifillo *et al.*, 1977).

SiHa. Línea celular humana derivada de carcinoma epidermoide de cérvix (Número: ATCC HTB-35). Tumorigénica en ratones desnudos. Forma tumores epidermoides poco diferenciados grado III. Esta línea contiene integrado a su genoma de 1 a 2 copias por célula de DNA del virus del papiloma humano tipo 16 (Scheffner *et al.*, 1991).

Preparación de Extractos nucleares.

Las células fueron recolectadas de las cajas por raspado con gendarme y concentradas por centrifugación. Estas se lavaron con PBS. El botón celular se resuspendió en 300 µl de amortiguador A (10mM HEPES , pH 7.5), 2mM de MgCl₂, 15 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1mM EGTA, 1mM DTT, 0.5 mM PMSF, 2 µg/ml de leupeptina y 2µg/ml de aprotinina) y se incubaron en hielo durante 15 minutos, se agregaron 25 µl de NP40 al 10% y se centrifugaron a 3000 x g. Se descartó el sobrenadante y el botón nuclear se resuspendió en 100 µl de amortiguador C (25 mM HEPES (pH 7.5), 400 mM NaCl, 1mM EDTA, 20% glicerol, 1mM DIT, 0.1% NP40, 0.5mM PMSF, 2 µg/ml de leupeptina y 2 µg/ml de aprotinina. (Frantz *et al.*, 1994, Zabel *et al.*, 1991).

La mezcla anterior se incubó 30 min en hielo y se recolectó el sobrenadante por centrifugación a 3000 x g durante 10 minutos.

Ensayos de retardo en movilidad electroforética.

Aproximadamente 2 µg de proteína nuclear diluida en buffer de unión (20 mM HEPES, pH 7.9, 1 mM MgCl₂, 4% glicerol, 0.5 mM DTT, 0.05 µg/µL de poli dIdC y 50mM de KCl) suficiente para completar 18 µl, se incubaron con 2 µl de oligonucleótido marcado (aprox. 2 ng) durante 30 minutos en hielo. Los complejos DNA-proteína se resolvieron en un gel de poli acrilamida al 6% (0.5X TBE), las muestras se cargaron sin colorante. Después de precorrido el gel 15 minutos a 150V, se cargaron las muestras y entraron al gel a este mismo voltaje, después de 5 minutos el voltaje se cambió a 85 V (12 mA) durante toda la corrida. Se corrieron paralelamente reacciones de competencia con oligonucleótido no marcado en exceso 100 y 200X (Dent *et al.*, 1993).

Marcaje de oligonucleótido:

Secuencia específica κB presente en el promotor de colagenasa I de cuyo :

5'-GGGTCACCTTAAGGGGTCGGAACGGAT-3'
3'-CCAGTGGAAATCCCCAGCCTTGCTACGTACG-5'

Secuencia específica κB presente en el promotor del gen IκB-α humano:

5'-AGTTCGATGGGACTTCCCACATCGGTA-3'
3'- CTACCCTGAAAGGGGTGTAGCCATGCCTTG-5'

El oligonucleótido se marcó en el extremo 5' empleando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E.coli*. Se mezclaron 50 ng del oligonucleótido alineado, junto con 20 µCi [³²P] dCTP, 1mM de dATP,TTP y dGTP, en buffer de reacción Klenow. Se le adicionó 1 unidad de enzima. La reacción se incubó a 37°C durante media hora. La reacción se detuvo por la adición de EDTA 0.5mM. Para eliminar el exceso de nucleótido sin incorporar se purificó la sonda mediante centrifugación a 4000 rpm por una columna de Sephadex G-50 (Dent *et al.*,1993).

Cursos temporales.

Se obtuvieron extractos nucleares empleando el método descrito anteriormente, de cultivos celulares al 70% de confluencia, expuestos durante los diferentes tiempos a una concentración de 10 µM de gemcitabina y TNF-α a una concentración final de 10 ng/mL.

Preparación de extractos proteínicos totales.

Se extrajeron proteínas totales mediante lisis celular con el amortiguador RIPA (1% NP40, 0.5% desoxicolato de sodio y 0.1% de SDS). Las células se rasparon de la caja con gendarme, el botón celular se resuspendió en 1 ml de PBS 1X y las células se recolectaron por centrifugación. El botón se resuspendió en el volumen adecuado de buffer RIPA (10×10^6 células/500 μ l de buffer RIPA). Los núcleos se lisaron por homogenización durante diez minutos pasando por una jeringa de insulina varias veces. Las muestras se incubaron durante 30 minutos en hielo y posterior a esta incubación los extractos de proteínas se obtuvieron por centrifugación a 15 000 x g durante 20 minutos. Los extractos se guardaron a -20°C hasta su uso (Carey , 1991).

Ensayos de "Western blot"

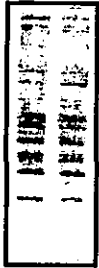
Cantidades iguales de proteína (20-40 μ g) obtenidas mediante extracción con el buffer RIPA, se fraccionaron en geles de SDS- poliacrilamida al 10% y electro transferidos (cámara semi-seca) a membranas de PVDF (Millipore). Las membranas fueron bloqueadas durante dos horas a temperatura ambiente con buffer TBS (Tris buffer saline, TRIS 20mM y NaCl 8g/L) que contenía leche en polvo al 5%, azida de sodio 0.02% y antifoam al 0.33%. La incubación con el anticuerpo primario se llevó a cabo toda la noche a 4°C a la concentración indicada en la tabla 4. Los lavados posteriores a las distintas incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente en buffer TBS. La incubación con anticuerpo secundario se llevó a cabo en una solución de leche al 5% en TBS durante dos horas a temperatura ambiente en el caso de los policlonales anti-IgG de conejo. Los policlonales anti-IgG de cabra se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente.

La reacción de detección se llevó a cabo por quimioluminiscencia (Amersham Life Science Inc., Cleveland , OH).

Controles de carga y transferencia para los ensayos de Western Blot.

Se cuantificó la proteína en los diferentes extractos (nucleares y totales) mediante la técnica de Bradford. Se cargaron al gel lo equivalente a 20 μ g de proteína para los ensayos con proteína total y de 50 a 80 μ g de proteína para ensayos con extractos nucleares.

Posterior a la electrotransferencia de las proteínas a membranas de PVDF, los geles fueron teñidos con Coomassie y posterior al ensayo de detección, las membranas se tiñeron con tinta china para verificar la equivalencia en carga de proteínas.



Gel de acrilamida
teñido con azul de
coomassie.

Marcador



Membrana de PVDF
teñida con tinta

Ensayos de Northern blot.

Se extrajo RNA total de cultivos celulares al 70% de confluencia con el reactivo TRIZOL* GIBCO. Inc.

Las muestras se resolvieron en geles desnaturizantes (formaldehído al 1%) de agarosa al 1.5%. Estos geles fueron transferidos por capilaridad en membranas de Nylon. Las condiciones de hibridación fueron de alta astringencia (65°C). Se llevaron a cabo 3 lavados de 20 min c/u con una solución de NaCl 150mM, citrato de sodio 15 mM, pH 7.4 y SDS 0.2% a 60° C. Las sondas se marcaron con 20 μ Ci [³²P]dCTP según instrucciones del fabricante: RTS Rad Prime DNA Labeling System GIBCO. Inc.

Las membranas se expusieron en placas de autoradiografía X-O- MAT. Kodak, toda la noche a -70°C (Sambrook et al., 1989).

Tabla No. 4 . Anticuerpos empleados.

Nombre	Marca y No.	Origen	Cat. No	[]Final Empleada
P50	Santa Cruz. Biotechnologies (NLS)	Policlonal. Conejo	SC114	1 µg/mL
P65	Santa Cruz. Biotechnologies C-20	Policlonal. Conejo	SC372	1 µg/mL
c-Rel	Santa Cruz. Biotechnologies (N)	Policlonal Conejo	SC-070	1 µg/mL
IκB-α	Santa Cruz. Biotechnologies C-15	Policlonal Conejo	SC-203	1 µg/mL
IκB-β	Santa Cruz. Biotechnologies C-20	Policlonal Conejo	SC-945	1 µg/mL
IκB-ε	Santa Cruz. Biotechnologies M-364	Policlonal Conejo	SC-7155	1 µg/mL
Bcl-3	Santa Cruz. Biotechnologies C-14	Poloclonal Conejo	SC-185	1 µg/mL
NIK	Santa Cruz. Biotechnologies H-248	Policlonal Conejo	SC-7211	1 µg/mL
IKK1 (α)	Santa Cruz. Biotechnologies	Policlonal Conejo	SC-3425	1 µg/mL
IKK2(β)	Santa Cruz. Biotechnologies C-20	Policlonal Conejo	SC-945	1 µg/mL
TNFR1	Santa Cruz. Biotechnologies N-20	Policlonal cabra	SC-1067	1 µg/mL
TNFR2	Santa Cruz. Biotechnologies N-18	Policlonal cabra	SC-1071	1 µg/mL
CIAP1	Santa Cruz. Biotechnologies N-19	Policlonal Cabra	SC-1867	1.4 µg/mL
CIAP2	Santa Cruz. Biotechnologies F-20	Policlonal Cabra	SC-1957	1.4 µg/mL

7.- Resultados.

7.1 Complejos de Rel presentes en las líneas celulares SiHa y CaSki.

El objetivo central de este trabajo consistió en analizar la posible implicación de los factores de transcripción pertenecientes a la familia de Rel en el fenotipo de resistencia diferencial a sufrir apoptosis inducida por el fármaco gemcitabina en dos líneas de cáncer cervicouterino.

La gemcitabina es un análogo estructural a la desoxicitidina, cuyo mecanismo de acción está asociado a daño al DNA. En nuestro laboratorio se analizaron los efectos *in vitro* de este antineoplásico en seis líneas de cáncer cervicouterino. Demostramos que existen dos grupos de sensibilidad a este fármaco: un grupo sensible y otro resistente. Solo en el grupo sensible el efecto de gemcitabina es dependiente de dosis y la disminución de la viabilidad correlaciona con un incremento en la fragmentación del DNA. Esto es, la gemcitabina es capaz de inducir apoptosis solo en las líneas celulares sensibles.

Demostramos también que es solo en el último grupo que los niveles del inhibidor de NF- κ B, I κ B- α están disminuidos con respecto a las líneas celulares resistentes.

En función a que el factor de transcripción NF- κ B está implicado en un mecanismo de resistencia a sufrir apoptosis, decidimos analizar la posible asociación de este factor en la distinta sensibilidad a la apoptosis inducida por gemcitabina en las dos líneas de cáncer cervicouterino, SiHa (resistente) y CaSki (sensible).

El primer paso consistió en identificar a los complejos pertenecientes a la familia de Rel en los sistemas celulares SiHa y CaSki empleando la técnica de retardo en la movilidad electroforética, EMSA (Fig.1). Logramos identificar dos complejos de retardamiento asociados a NF- κ B en ambas líneas (Fig.2). Estos complejos además, no se encuentran en cantidades equimolares (Fig. 3).

La familia de Rel está conformada por diversas subunidades que al combinarse entre sí, generan complejos diméricos con distintas afinidades por los sitios de unión y con capacidades transcripcionales distintas. De lo anterior se genera la necesidad de identificar todas las actividades presentes en las líneas SiHa y CaSki.

Para analizar el número de complejos asociados a la familia de Rel en las dos líneas estudiadas, empleamos dos sondas con la finalidad de poner de manifiesto la mayor cantidad de complejos presentes en estos sistemas. Empleamos como sondas al sitio κ B del gen de colagenasa de

cuyo y la región κB del gen $I\kappa B-\alpha$ de humano. Con ambas sondas fue posible identificar los dos complejos antes mencionados (Fig.2 Panel B).

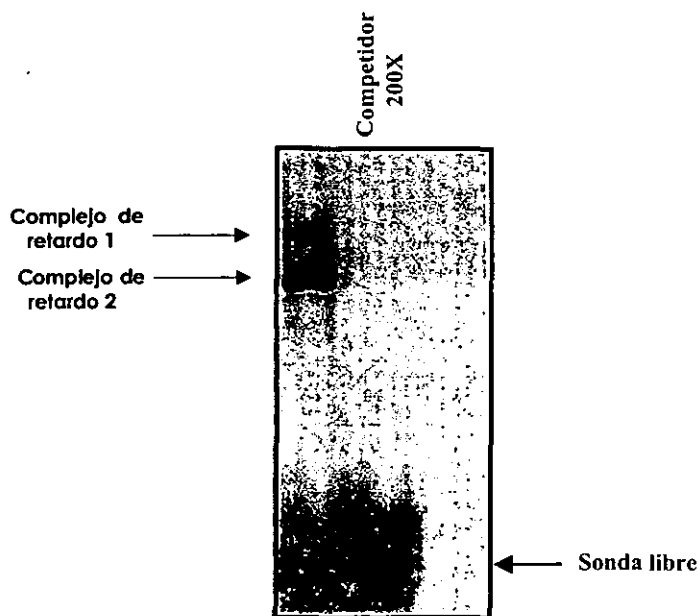


Fig. No 1. Ensayo de retardo en la movilidad electroforética: EMSA. Ejemplo. Esta técnica nos permite reconocer proteínas con actividad de unión a DNA. El complejo DNA-proteína "retarda" su migración en un gel, en comparación con la sonda libre.

Para estos ensayos la secuencia de DNA empleada como sonda corresponde al sitio de unión para los factores de transcripción de la familia de Rel. La especificidad de la reacción de unión se verificó empleando la misma sonda sin marcar como competidor.

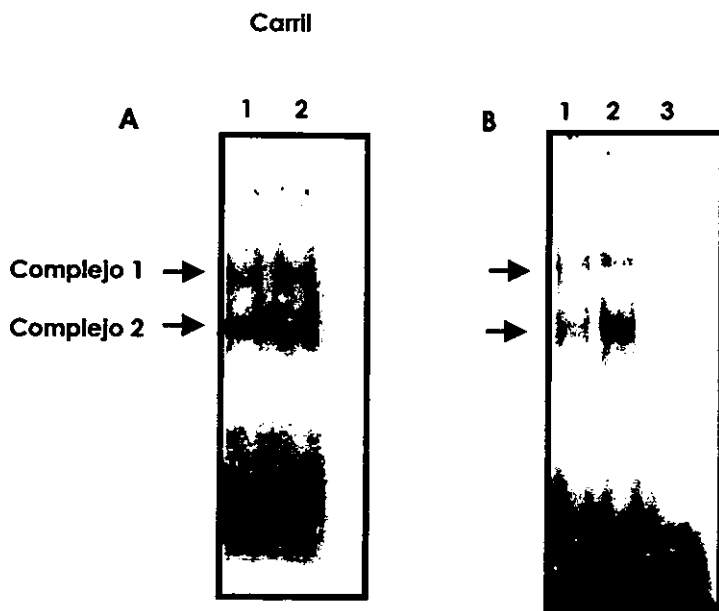


Fig.No.2. En las líneas celulares SiHa y CaSki existen dos complejos basales pertenecientes a la familia de Rel constitutivos en el núcleo: C1 y C2.

Panel A. Ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSA).

Extractos de proteínas nucleares de células SiHa (carril 1) y CaSki (carril 2) sin tratamiento, se incubaron durante 30 minutos en hielo con una sonda marcada con ^{32}P . Esta sonda contiene la secuencia del sitio de unión a NF- κB que se encuentra en el promotor del gen de colagenasa I de cuyo.

Panel B. Estos ensayos de retardamiento se realizaron empleando como sonda el sitio de unión a NF- κB presente en el promotor del gen I κB - α de humano
Carril 3: Competidor homólogo 100X.

Análisis densitométrico de las actividades basales de NF- κ B en las líneas celulares SiHa y CaSki.

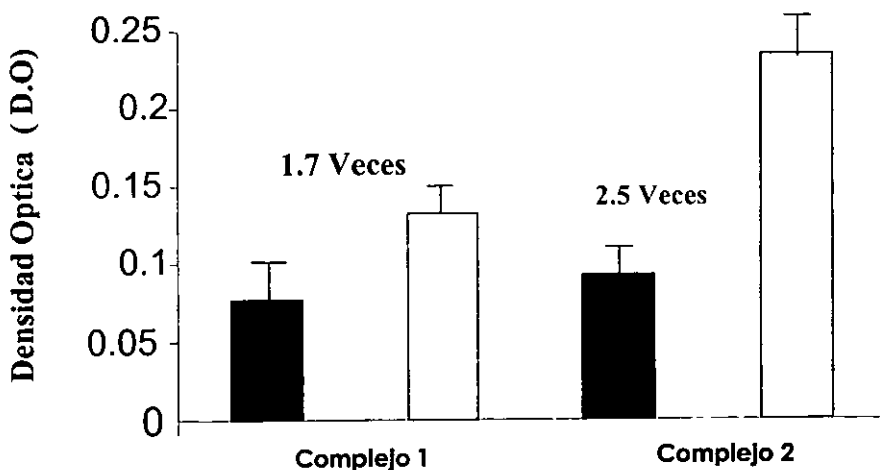


Fig.No.3 La línea celular CaSki es la que presenta los mayores niveles de activación basal de los dos complejos pertenecientes a la familia de Rel, en comparación con los encontrados en la línea celular SiHa. Se presenta el análisis densitométrico de las actividades basales de los Complejos de Rel en las líneas celulares SiHa (■) y CaSki (□). Los experimentos se realizaron por triplicado con extractos nuevos cada vez.

7.2 Inducción de la translocación nuclear de NF- κ B por gemcitabina.

Una característica importante del sistema NF- κ B, es que su activación es inducible, lo cual le permite modular transcripcionalmente a determinado conjunto de genes y dirigir diferentes respuestas en función al estímulo en la célula. Como ha sido descrito en otros sistemas celulares, el efecto de protección contra apoptosis por NF- κ B está asociado a la capacidad del estímulo para lograr su translocación al núcleo. Como se muestra en la figura número 4, solo en la línea celular CaSki la gemcitabina es capaz de modificar los niveles nucleares de los dos complejos de Rel ya descritos. La acción de gemcitabina a las 24 horas posteriores al tratamiento produce en las células CaSki un aumento de 4.3 veces del complejo C2 y la disminución de 1.6 veces del complejo C1 en el núcleo, con respecto a células no tratadas (Fig. 5).

A diferencia del comportamiento de las distintas actividades de Rel en células CaSki, la acción de gemcitabina no produce cambios en las actividades de los complejos Rel en la línea celular SiHa (Fig. 4).

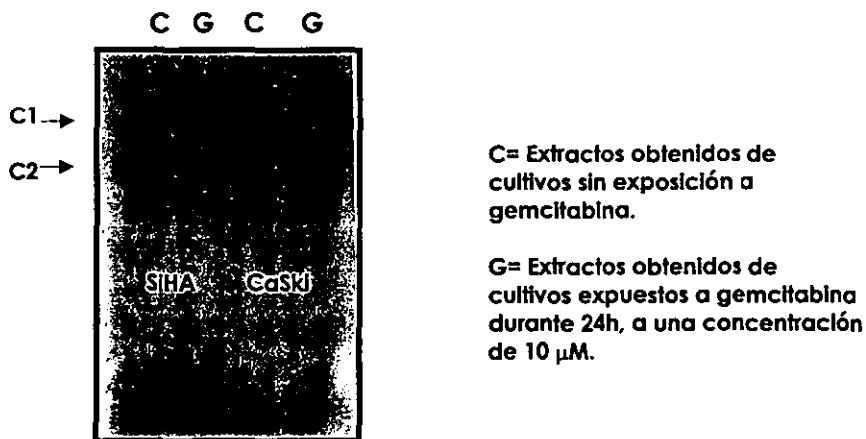


Fig. No 4. El tratamiento con gemcitabina produce cambios en las actividades basales de los complejos de NF- κ B solo en el sistema celular CaSki. EMSA. Extractos nucleares de células SiHa y CaSki sin tratamiento y los obtenidos de cultivos pretratados con gemcitabina a una concentración de 10 μ M durante 24 horas, fueron incubados durante 30 minutos en hielo con una sonda que corresponde a el sitio de unión a NF- κ B presente en el gen de I κ B- α de humano. Nótese que la actividad C1 disminuye 1.6 veces en los extractos de células Caski y al mismo tiempo la actividad C2 se incrementa 4.3 veces (densitometrías fig. 5).

Inducción de NF- κ B 24 H Posteriores al tratamiento con Gemcitabina [10 μ M].

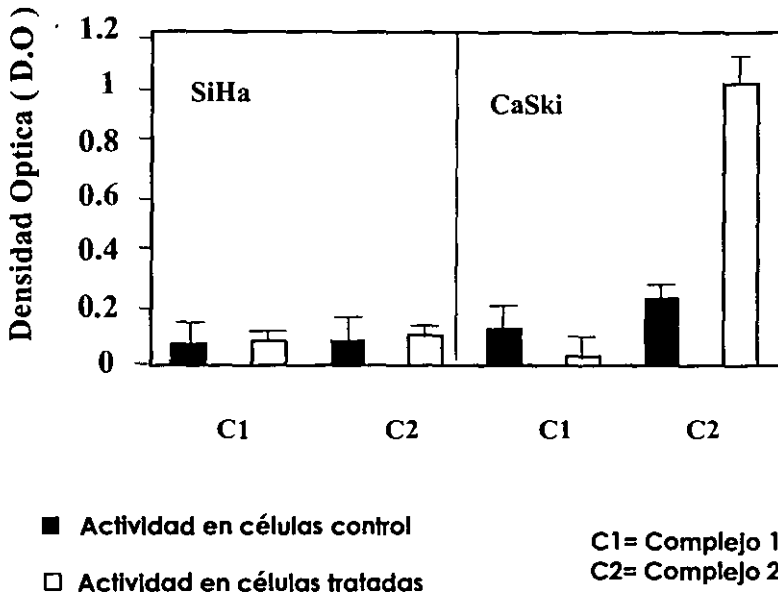


Fig. No.5. Análisis densitométrico de las actividades de NF- κ B en extractos nucleares de células SiHa y CaSki pretratadas con gemcitabina durante 24 horas a una concentración 10 μ M. Estos ensayos demuestran que sólo la línea celular CaSki es capaz de inducir la activación de NF- κ B por acción de gemcitabina (4.3 veces con respecto al basal)

■ Actividad en células control. □ Actividad en células tratadas.
 Los valores de densidad óptica son los promedios de tres experimentos independientes con extractos nuevos cada vez.

Para establecer si la incapacidad de las células SiHa para activar a NF- κ B por acción de la gemcitabina es específica de estímulo o no, las células fueron tratadas con TNF- α a una concentración de 10 ng/mL y se analizaron las actividades de unión relacionadas a NF- κ B en extractos nucleares a diversos tiempos (Fig. 6).

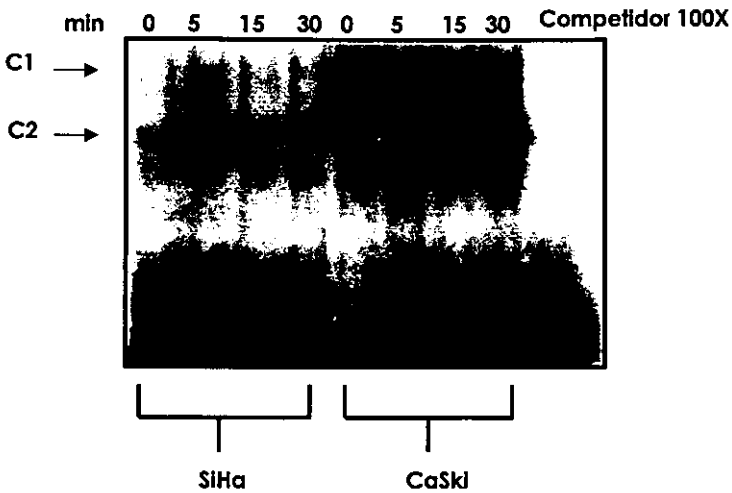


Fig. No. 6. EMSA . Cursos temporales de inducción de la actividad de NF- κ B en células tratadas con TNF- α a una concentración final de 10 ng / mL. Estos ensayos demuestran que la línea SiHa es capaz de activar a NF- κ B (C2)a tiempos cortos (5min) y que esta activación es transitoria. En cambio la línea celular CaSki no modula la actividad de NF- κ B por acción del TNF- α en ninguno de los tiempos analizados.

Estos ensayos demostraron que, al contrario de lo que ocurre con gemcitabina, SiHa es capaz de modular la activación de NF- κ B por acción del TNF- α , mientras que CaSki es incapaz de hacerlo. Estos resultados indican que existen diferencias en la capacidad para activar a los complejos de Rel y que esta capacidad es dependiente de estímulo.

En función a lo anterior, decidimos estudiar a proteínas importantes para la activación de NF- κ B a través del receptor a TNF- α , primero, porque es la ruta de activación mejor caracterizada molecularmente y segundo, debido a que otros antineoplásicos con un mecanismo de

acción homóloga al de gemcitabina, son capaces de activar a NF- κ B a través de este mecanismo (Das *et al.*, 1998).

7.3 Composición molecular de la ruta TNF-NF- κ B en las líneas celulares SiHa y CaSki

En conjunto, los ensayos anteriores demuestran que existen diferencias significativas en la capacidad de ambos sistemas celulares para inducir la activación de NF- κ B y que esta capacidad es dependiente de estímulo: mientras que gemcitabina es incapaz de inducir la translocación nuclear de NF- κ B en las células SiHa, la acción de TNF- α en este mismo sistema si lo hace. El fenotipo anterior se invierte en el sistema celular CaSki.

En función a los resultados anteriores, decidimos analizar los niveles de expresión de las principales proteínas involucradas directamente en la vía de transducción para activar a NF- κ B a través del receptor a TNF- α y tratar de establecer alguna correlación entre dichos niveles y la distinta capacidad para activar a este factor.

7.3.1- Niveles de expresión basal de proteínas clave en la activación de NF- κ B a través del receptor a TNF- α .

Las acciones de TNF- α son mediadas a través de dos tipos de receptores el TNF-R1 y el TNF-R2. El receptor TNF-R1 es el más ubicuo de los dos receptores en el organismo y es a través de éste que NF- κ B es activado para inhibir apoptosis.

Mediante ensayos de "Western blot" fue posible identificar la expresión del receptor TNF-R1 (60 kDa) en las dos líneas celulares estudiadas (Fig.7).

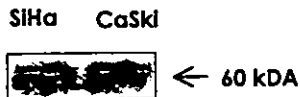
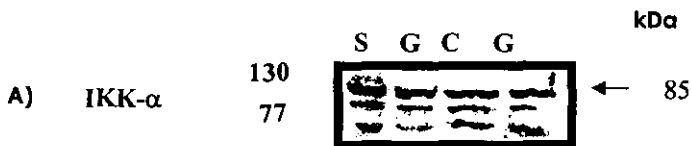


Fig. No. 7 Las líneas celulares SiHa y CaSki expresan el receptor a TNF- α . "Western blot" donde se muestran los niveles de expresión del receptor a TNF- α , en extractos de proteína total de cultivos celulares de SiHa y CaSki sin tratamiento.

La fosforilación directa de los inhibidores de la familia de Rel a través del receptor a TNF- α , ocurre principalmente mediante el reclutamiento de diversas proteínas en la región intracelular amino- terminal del receptor TNFR1. NIK es una proteína cinasa perteneciente a la familia de las MEK, la cual es reclutada en esta porción amino de receptor y es responsable directa de fosforilar y activar a las IKK *in vivo* e *in vitro* (Malinin *et al*, 1997).

Como se muestra en la figura No. 8, la línea celular CaSki contiene mayores niveles de expresión de esta cinasa, además de demostrar una señal doble lo cual podría deberse a la presencia de la forma fosforilada de esta proteína (Fig. 8, panel C).

En esta misma figura se muestran también que los niveles de las cinasa IKK- α (Fig. 8, panel A) no son muy distintos entre ambas líneas y que estos niveles no se modifican por el tratamiento con gemcitabina. Finalmente es la línea celular CaSki, la que presenta niveles más altos de expresión de la cinasa IKK β (Fig.8, panel B).



S= Extractos control SiHa
C= Extractos control CaSki
G= Extractos pretratados con gemcitabina 24 horas.

Fig 8A. Las líneas celulares SiHa y CaSki expresan la cinasa IKK- α . Además estos niveles no se modifican por la acción de gemcitabina. La proteína IKK- α es una cinasa que forma parte del multicomplejo que permite la fosforilación del inhibidor I κ B- α para activar a NF- κ B a través del receptor a TNF- α .



Fig 8 B. Las líneas celulares SiHa y CaSki expresan la proteína IKK β . Como los extractos fueron obtenidos con inhibidores de fosfatasa, la presencia del doblete en la señal podría deberse a la presencia de la forma fosforilada de esta proteína.



Fig.8C. Western blot donde se muestran los niveles de expresión basal de la cinasa NIK en los sistemas celulares SiHa y CaSki. En todos los ensayos anteriores la cantidad de extracto de proteína total fue la misma: 60 ng por carril.

7.3.2 Expresión de inhibidores de NF- κ B.

El mecanismo mediante el cual los complejos de la familia de Rel pueden translocarse al núcleo, contempla la modificación por fosforilación de los inhibidores citoplásmicos. Dicha modificación facilita la disociación de los dímeros activos, los cuales se translocan al núcleo. Una vez en el núcleo, estos dímeros pueden actuar como factores de transcripción por unión a las secuencias específicas, denominadas κ B. Una parte muy importante de la regulación de las funciones de esta familia, es entonces la presencia de distintos inhibidores, con localización subcelular específica y una cinética de degradación diferente.

En función a lo anterior es que decidimos analizar los niveles de expresión de los inhibidores más comunes en células somáticas pertenecientes a la familia de I κ B y correlacionar, tanto sus niveles de expresión, como el tipo y variedad de estos inhibidores presente en las células SiHa y CaSki y tratar de asociar estos datos con la distinta capacidad de ambos sistemas celulares para activar a miembros de la familia de Rel.

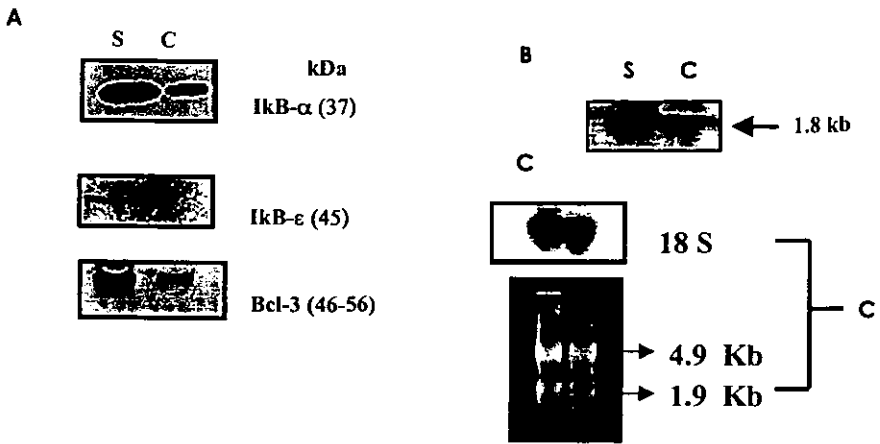


Fig. No 9 Western blot. **Panel A** se demuestran los niveles de expresión basal de los principales inhibidores de la familia de Rel en las líneas SiHa (S) y CaSki (C). **Panel B**, Northern blot donde se muestra los niveles de RNA mensajero del inhibidor IκB-α en ambas líneas. Estos ensayos permitieron demostrar que en la línea celular CaSki los niveles disminuidos en la expresión del inhibidor IκB-α se modulan desde un nivel transcripcional.

Como puede apreciarse en la figura No. 9 panel A, es la línea celular SiHa la que presenta de manera global mayor cantidad a nivel basal de los inhibidores IκB-α, ε y Bcl-3. Debido a que uno de los inhibidores más abundantes y mayoritariamente responsables de las actividades de la familia de Rel en células somáticas es el inhibidor IκB-α, decidimos verificar los niveles de RNA mensajero de este inhibidor presentes en ambas líneas celulares. Como puede verse en la figura 9 panel B, los niveles disminuidos de IκB-α en la línea celular CaSki pueden deberse en parte a que este gen se expresa menos que en la línea celular SiHa. El panel C de la figura 9, muestra los controles para el ensayo de Northern blot, con el gel de RNA teñido con bromuro de etidio y la hibridación con una sonda para el mensajero ribosomal 18 s.

7.3.3 Proteínas de la familia de Rel.

Como ya hemos mencionado, la familia de Rel está compuesta por dos clases de proteínas con características estructurales específicas, las cuales permiten la formación de distintos dímeros activos transcripcionalmente. La asociación de los distintos complejos con los inhibidores e incluso su capacidad de transactivar genes depende directamente de las subunidades que forman los complejos.

Como se muestra en la figura No.10 panel A, la línea celular SiHa muestra niveles menores con respecto a la línea celular CaSki de las proteínas p50 y Rel- A. En cambio tiene niveles más altos de la proteína c-Rel. Como la señal por western blot para la proteína p50 es muy confusa, fue necesario la identificación por northern blot del RNA mensajero para esta proteína (Fig.10, panel B). Este ensayo permitió demostrar que los niveles de la proteína p50 son muy bajos en la línea celular SiHa.

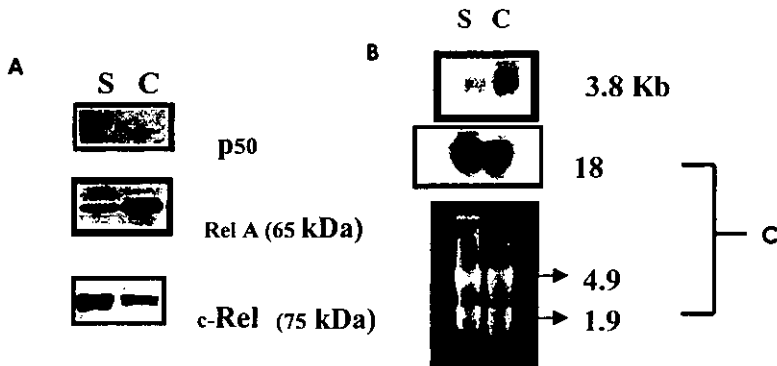


Fig No. 10 Panel A. Western blot demostrando los niveles de expresión de proteínas pertenecientes a la familia de Rel. **Panel B.** Ensayo tipo northern contra una sonda para la proteína p50 en muestras de RNA total de células SiHa sin tratamiento. **Panel C:** Controles de carga para los ensayos tipo northern blot. Hibridación contra la subunidad 18S ribosomal y gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. **S= SiHa C= CaSki**

Dentro de la ruta de transducción para permitir la translocación nuclear de los complejos de Rel hacia el núcleo y ejercer un efecto protector, se encuentra como paso final la transcripción de genes específicos asociados a la inhibición del proceso apoptótico como son las proteínas inhibidoras de apoptosis denominadas IAP.

Ensayos de western blot sobre extractos totales de proteínas obtenidos de cultivos celulares sin tratamiento de células SiHa y CaSki demostraron que la proteína cIAP -1 se expresa en cantidades semejantes en ambas líneas celulares (Fig. No.11).



Fig No 11. Las líneas celulares SiHa y CaSki expresan cantidades equivalentes de la proteína c-IAP1. Ensayos de Western blot realizados sobre extractos de proteínas totales obtenidos de cultivos de células SiHa y CaSki sin tratamiento contra la proteína c-IAP1. Se cargaron al gel cantidades equivalentes de proteína en ambos carriles: 60 ng/carril.

Este ensayo permite demostrar que no es la expresión basal diferencial de estas proteínas inhibitoras las que pudieran estar involucradas en la susceptibilidad que muestran ambas líneas para sufrir apoptosis. Sin embargo, dadas las características de inducibilidad de NF- κ B hubiera sido interesante estudiar las variaciones en la expresión de estas proteínas por acción de la gemcitabina, en función a que alteraciones en estos niveles pudieran hablar de un mecanismo de resistencia adquirido por estas células inducido por el antineoplásico .

Todos los resultados anteriores se resumen en la siguiente tabla.

	SIHa	Caskl	Nivel de análisis
TNFR1	+	+	Proteína
IKK α	+++	++	Proteína
IKK β	++	++++	Proteína
NIK	++	+++	Proteína
Bcl-3	+++	+	Proteína-RNA
IkBα	+++	+	Proteína-RNA
IkBβ	-	-	Proteína
IkBϵ	++	+	Proteína
P50	+	+++	Proteína-RNA
P65	+	+++	Proteína
cRel	+++	++	Proteína
P50n	+	+	Proteína
P65n	++	+++	Proteína
cReln	-	-	Proteína
IAP-1	+	-	Proteína
IAP-2		-	Proteína

Tabla No. 5 No existen diferencias en la composición molecular de la vía de transducción para activar a NF- κ B a través del receptor a TNF- α . Al parecer las diferencias más significativas se encuentran a nivel de cantidad de expresión.

7.4 Identidad de los complejos de Rel presentes en las líneas celulares SiHa y CaSki.

Se ha demostrado que los distintos complejos que componen a la familia de Rel presentan capacidades transcripcionales diferentes además de mostrar afinidades distintas por los sitios consenso. Una vez demostrado que no es posible asociar directamente la falta o presencia de alguna proteína para activar a NF- κ B a través del receptor a TNF- α con el fenotipo de resistencia diferencial a sufrir apoptosis por las líneas SiHa y CaSki, otra de las opciones viables sería la de variaciones en la composición de los complejos de Rel encontrados en las líneas.

Por ello, estudiamos la presencia de las diferentes proteínas pertenecientes a la familia de Rel por western blot en extractos nucleares de células sin tratamiento y tratadas con gemcitabina durante 24 horas, para relacionar su presencia en el núcleo con la composición de las dos actividades de Rel encontradas en las células SiHa y CaSki.

Como se muestra en la figura No. 12, tanto la proteína p50 como la proteína p65 se encuentran presentes en extractos nucleares de células SiHa y CaSki sin tratamiento, indicando que ambas subunidades conforman alguna de las actividades de Rel encontradas en ambas líneas celulares. Llama la atención que no se detectó señal por western blot de la proteína c-Rel en extractos nucleares en ninguna de las dos líneas, indicando posiblemente que los complejos no estén conformados por esta proteína o que sea el complejo minoritario (C1) el que esté compuesto por esta subunidad. Para descartar la existencia de error técnico en este experimento, se realizó simultáneamente la detección de la proteína c-Rel en extractos de proteína total como control positivo. Como puede verse en el inserto de la figura 12, obtuvimos señal positiva para la proteína c-Rel solo en extractos de proteína total.

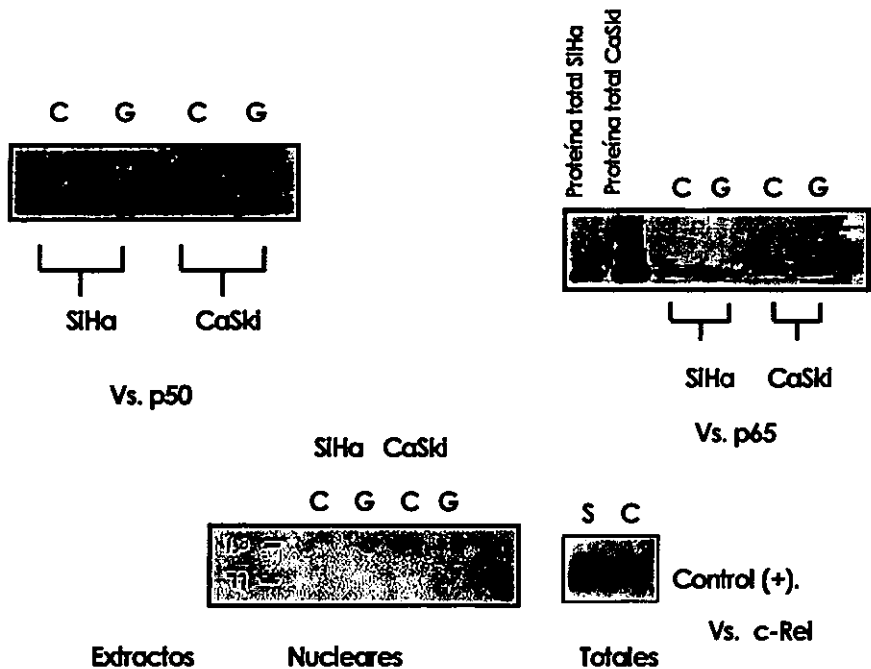


Fig No.12 Los complejos de Rel presentes en las líneas celulares SiHa y CaSki están compuestos principalmente por las subunidades p50 y p65. Ensayos de western blot sobre extractos nucleares de células sin tratamiento (C) y pretratadas con gemcitabina (G) durante 24 horas. Se emplearon extractos de proteína total como control positivo.

8.-Análisis de Resultados.

El objetivo central de este trabajo consistió en analizar la posible implicación de los factores de transcripción pertenecientes a la familia de Rel en el fenotipo de resistencia diferencial a sufrir apoptosis inducida por el fármaco gemcitabina en dos líneas de cáncer cervicouterino.

Estudios realizados en el laboratorio demostraron que en las líneas celulares sensibles a sufrir apoptosis mediada por gemcitabina, los niveles del inhibidor de NF- κ B, I κ B- α están disminuidos con respecto a las líneas celulares resistentes y que estos niveles disminuyen aún más después del pre-tratamiento con gemcitabina.

En función a que el factor de transcripción NF- κ B está implicado en un mecanismo de resistencia a la apoptosis, decidimos analizar la posible asociación de este factor en la distinta sensibilidad para sufrir apoptosis inducida por gemcitabina en las dos líneas de cáncer cervicouterino SiHa (resistente) y CaSki (sensible).

8.1 Complejos de la familia de Rel presentes en los sistemas celulares SiHa y CaSki.

NF- κ B es un factor de transcripción que forma parte de la familia de Rel. Esta familia está conformada por diversas subunidades que al combinarse entre sí, generan complejos diméricos con distintas afinidades por los sitios de unión y con capacidades transcripcionales distintas también. De lo anterior se genera la necesidad de identificar todas las actividades presentes en las líneas SiHa y CaSki.

La presencia de diferentes complejos entre las líneas podría ser una característica molecular que permitiera la expresión selectiva de genes en cada una de ellas, aún con el mismo estímulo y contribuir de esta manera al establecimiento del fenotipo diferencial a apoptosis mostrado por las líneas por acción de gemcitabina.

Sin embargo, al parecer este no es el caso debido a que en ambas líneas los complejos encontrados co-migran en los geles; si bien es cierto que podría tratarse de complejos distintos, al analizar la presencia nuclear de las diferentes subunidades (p50,p65,c-Rel) capaces de formar dímeros funcionales, no encontramos diferencias en el tipo de proteínas presentes; más bien, estas diferencias son notables en niveles de expresión .

Por ejemplo, no encontramos niveles detectables de la proteína c-Rel en el núcleo de estas células, lo cual permite inferir que los complejos encontradas en ambas líneas, al menos los complejos mayoritarios (C2) no estén compuestos por esta proteína.

8.2 Inducción de la translocación nuclear de NF- κ B por gemcitabina.

El hecho de haber encontrado diferencias en los niveles de activación basales de las actividades de NF- κ B es interesante (Fig. 2), porque se ha postulado que la presencia constitutiva de actividades de NF- κ B en el núcleo de todos los sistemas celulares tumorales, podría ser un mecanismo de resistencia intrínseco en las células para sufrir apoptosis por trans-activación continua de genes involucrados en la inhibición de dicho proceso. Sin embargo, en CaSki los mayores niveles basales de las actividades de NF- κ B con a SiHa, al parecer no son suficientes para protegerla de sufrir apoptosis.

Sin embargo, gemcitabina es capaz de inducir cambios en las actividades de los complejos de la familia de Rel a nivel nuclear solo en el sistema celular CaSki. La actividad C1 disminuye en función al tratamiento con gemcitabina, mientras que la actividad C2 aumenta de manera dramática. En cambio, la gemcitabina no produce cambios en los niveles de actividad nuclear de NF- κ B en SiHa.

Este dato es muy importante debido a que al parecer en el mecanismo de resistencia mostrado por SiHa no está asociado la capacidad de gemcitabina para lograr la activación de NF- κ B. En este sentido SiHa es un sistema celular en donde los niveles nucleares basales constitutivos de NF- κ B la protegen contra la apoptosis. Además esta línea celular expresa a la proteína c-IAP1, la cual está involucrada en la inhibición de apoptosis mediada por TNF- α .

Otro supuesto interesante que se genera en función a la movilización de complejos mostrada por CaSki a la acción de gemcitabina, es la posibilidad de la existencia de complejos pro-apoptóticos o antiapoptóticos dentro de la familia de Rel y que sea la capacidad para activar unos u otros lo que permita el fenotipo de resistencia o apoptosis.

Como hemos demostrado en este trabajo, la gemcitabina es capaz de provocar la translocación nuclear de un complejo de Rel (C2) en CaSki y sin embargo estas células sufren apoptosis por la acción de este fármaco. Esto demuestra, que no es solo la presencia nuclear de NF- κ B ni la capacidad de determinado estímulo para activar a los complejos lo que genera resistencia a apoptosis en esta línea celular. Aunque creemos que CaSki es un sistema particular por no comportarse de acuerdo a los modelos en donde se estableció el papel antiapoptótico de los complejos de Rel, los resultados que encontramos abren la

posibilidad de que sean los niveles de activación inducidos por el estímulo, el tiempo en los que se alcance el "nivel óptimo" de esta activación e incluso el tipo de complejos que se transloquen lo que realmente determine el efecto de NF- κ B como agente protector.

Lo que resulta interesante también en el sistema celular CaSki, es el hecho de que ésta es incapaz de modular la actividad de NF- κ B por acción de TNF- α , porque a pesar de tener la vía de activación a través del receptor aparentemente completa, la acción sobre el receptor TNFR-1 no modifica los niveles nucleares de los complejos de Rel en esta línea. Una manera de poder explicar lo anterior sería que la vía de activación de NF- κ B a través del receptor TNFR-1 está constitutivamente activada, en función a que encontramos en esta línea celular cantidades aumentadas de las cinasas NIK e I κ B- β , ambas cinasas responsables directas de la fosforilación de los distintos inhibidores de Rel. O bien que esta vía esté activada siempre al máximo y sea imposible modularla positivamente por estímulo.

Otra circunstancia que sugiere este resultado, es que el fármaco gemcitabina es capaz de modular a NF- κ B en el sistema celular CaSki por un mecanismo diferente y alterno al de retroalimentación positiva de la activación vía receptor a TNF- α . Otros posibles mecanismos que que podrían ser los responsables de la activación de NF- κ B por acción de la gemcitabina y que resultan muy interesantes de estudiar son la activación vía cinasas citoplásmicas del tipo PKC (Lallena *et al.*, 1999) o vía DNA-PK (Basu *et al.*, 1998) las cuales son capaces de fosforilar al complejo IKK, el cual a su vez es el responsable de la fosforilación directa de los inhibidores I κ B- α y β .

Lo cierto es que estos experimentos pusieron de manifiesto que existen diferencias en la capacidad para modular la translocación de NF- κ B al núcleo entre las dos líneas celulares y esta capacidad al parecer es dependiente de estímulo. Debido a lo anterior decidimos estudiar la composición de la vía para activar a NF- κ B vía el receptor a TNF- α , que es la vía mejor caracterizada a nivel molecular.

8.3 Composición molecular de la ruta TNF-NF- κ B en las líneas celulares SiHa y CaSki

Ensayos de Western blot demostraron que existen diferencias en los niveles de expresión de proteínas pertenecientes a la familia de Rel entre las dos líneas. La línea celular CaSki es la que presenta en general, niveles mayores de las proteínas p50 y p65 en extractos de proteínas totales, a diferencia de SiHa que presenta niveles altos de la proteína c-Rel (Fig 9).

Si bien es cierto que la presencia de determinadas proteínas así como de sus concentraciones, habla de cierta tendencia a formar determinados complejos, es decir CaSki podría formar complejos preferentemente conformados por las subunidades p50 y p65 (dímeros p50-p50, p65-p65, p50-p65, etc.) , existe mayor probabilidad de que en SiHa los complejos formados estuvieran conformados por c-Rel, sin embargo este parece no ser el caso debido a que no pudimos detectar la presencia de la proteína c-Rel en el núcleo de ninguno de los dos sistemas celulares estudiados. Este resultado podría sugerir que ninguna de las actividades de Rel encontradas en SiHa y CaSki estuvieran formadas por c-Rel o que solo la actividad minoritaria C1 estuviera compuesta por esta subunidad.

Por otro lado, es posible observar la presencia de un doblete en la señal para la detección nuclear de la proteína p50 (Fig. 12) solo en la línea celular CaSki. Este dato podría ser significativo en el sentido de que diferentes grados de fosforilación de cada una de las subunidades que forman el complejo altera su capacidad para unirse a DNA y para transactivar genes (Kushhner *et al.*, 1999). En el caso específico de la subunidad p50 por ejemplo, la fosforilación disminuye su capacidad para unirse a DNA lo que modifica directamente su capacidad transcripcional y su afinidad por distintas variantes de la región consenso lo cual permite modulación distinta de genes. Este fenómeno si podría estar implicado en el tipo de genes que son inducidos en función al estímulo con gemcitabina entre las líneas e implicarse de esta manera directamente con el fenotipo diferencial de resistencia.

La presencia de determinada clase de proteínas en estas células, habla de la tendencia a formar solo ciertos complejos, sin embargo, esta tendencia es un evento independiente a la activación individual de cada uno.

La fosforilación directa de los inhibidores de la familia de Rel a través del receptor a TNF- α , ocurre principalmente mediante el reclutamiento de diversas proteínas en la región intracelular amino- terminal del receptor TNFR1. NIK es una proteína cinasa perteneciente a la familia de las MEK, la cual es reclutada en esta porción amino de receptor y es responsable directa de fosforilar y activar a las IKK *in vivo* e *in vitro* (Malinin *et al.*, 1997). Como se muestra en la figura No. 8, la línea celular CaSki contiene niveles de expresión aumentados de esta cinasa, además de mostrar una señal doble lo cual podría deberse a la presencia de la forma fosforilada de esta proteína.

En esta misma figura se muestran también que los niveles de las cinasa IKK- α no son significativamente distintas entre ambas líneas y que estos niveles no se modifican por el tratamiento con gemcitabina. Finalmente, es la línea celular CaSki la que presenta mayores de expresión de la

cinasa IKK- β . También puede notarse la presencia de posibles formas fosforiladas de esta cinasa (los extractos fueron obtenidos empleando inhibidores de fosfatasa y la variación en peso es mínima) en ambas líneas y la relación entre formas fosforiladas y no fosforiladas es al parecer equimolar. Es necesario hacer notar lo anterior en función a que la actividad de estas proteínas es regulada por fosforilación, por lo tanto cambios en la relación entre las isoformas también habla de niveles de activación distintos de estas proteínas entre las líneas, lo cual podría modificar la cinética de degradación de los inhibidores respectivos y con ello la movilización de los complejos de Rel hacia el núcleo. Sin embargo, para concluir lo anterior es necesario realizar experimentos enfocados a la demostración de formas fosforiladas y no fosforiladas de estas proteínas.

Uno de los datos que consideramos más relevantes del trabajo es la caracterización de los diferentes niveles de expresión de los inhibidores de la familia de Rel (Fig. No. 9). Es la línea celular SiHa la que presenta de manera global los niveles más altos de expresión de tres de los cuatro inhibidores analizados en este trabajo. Este dato es importante debido a que estos inhibidores son los responsables de la movilización y acción nuclear de los complejos de Rel. Por lo tanto, la variación en los niveles de expresión de estos inhibidores se puede asociar directamente con la capacidad distinta que existe entre las líneas para modular la translocación de los complejos de Rel al núcleo, qué complejos son los que se activan e incluso que genes se transcriben en función al estímulo.

Esta apreciación acerca de la importancia de los niveles distintos de expresión de los inhibidores se basa principalmente en que estos inhibidores presentan una distribución tisular característica, lo cual se ha asociado al tipo de complejos y a genes que se modulan por la familia de Rel en cada sistema celular; pero además, al presentar una cinética de degradación distinta, así como una diferente afinidad por determinados complejos, permiten una regulación mucho más fina de las acciones de estos factores de transcripción (Karin *et al.*, 1998).

El inhibidor I κ B- α por ejemplo, es el más abundante en la mayoría de los sistemas celulares estudiados y es el que presenta una cinética de degradación más rápida activada por todos los inductores de NF- κ B. Por lo tanto la degradación selectiva de este inhibidor se ha asociado con las respuestas de tipo transitorio e inmediato que modula NF- κ B.

Además se ha demostrado que este inhibidor se resintetiza rápidamente y que en el núcleo es capaz de unirse a complejos ya activos de Rel unidos a DNA y bombearlos hacia el citosol por la presencia de señales de retención citoplásmica que este inhibidor posee (Zabel U *et al.*, 1990, Brown K *et al.* 1993). Esta cinética permite entonces asegurar el carácter transitorio de algunas acciones de NF- κ B.

El inhibidor I κ B- β en cambio, se degrada más lentamente. Además, se han encontrado, complejos ternarios NF- κ B/ I κ B- β en el núcleo unidos a DNA, los cuales al parecer impiden que actúe I κ B- α en el núcleo permitiendo una acción más prolongada de los complejos de Rel como activadores transcripcionales, lo cual permite una respuesta de tipo más persistente (Thompson JE *et al.*, 1995).

El caso del inhibidor Bcl-3, a diferencia de los antes mencionados, es interesante debido a que presenta una localización nuclear y tiene una alta afinidad por los homodímeros de p50 y p52, los cuales son los menos activos transcripcionalmente y al parecer impiden, al favorecer la unión de estos dímeros al DNA, la acción de otros dímeros más activos atenuando la respuesta (Caamaño *et al.*, 1996).

Por otro lado, ensayos de Northern blot demostraron que los niveles de mensajero de I κ B- α están disminuidos en la línea celular CaSki, implicando con esto que los niveles de proteína bajos mostrados por esta línea pueden deberse a deficiencias en la regulación transcripcional de este gen, lo cual resulta muy interesante porque el gen I κ B- α se ha caracterizado como un supresor de tumores. Lo anterior abre la expectativa de que la disminución en la expresión de este gen sea al menos un mecanismo parcial responsable de la transformación neoplásica en este tipo de tejido.

Debido a lo anterior, creemos que las variaciones en expresión de estas proteínas que están involucradas con la activación de los complejos de la familia de Rel, pueden explicar la distinta capacidad de ambas líneas para modular la translocación nuclear de los distintos complejos, modificando la respuesta transcripcional global modulada por estos factores, repercutiendo dramáticamente en la respuesta celular: inducción de apoptosis o resistencia.

El proceso antiapoptótico mediado por NF- κ B depende de su actividad transcripcional. Algunos de los productos génicos modulados por NF- κ B que han sido involucrados en este proceso son las proteínas IAP (cIAP-1 y cIAP-2), así como las moléculas transductoras TRAF1 y TRAF2 (Wang *et al.*, 1998).

Mediante ensayos de Western blot fue posible identificar la expresión basal de la proteína cIAP-1, sin encontrar diferencias entre las dos líneas.

Este ensayo permite demostrar que no es la expresión basal diferencial de estas proteínas inhibitoras las que pudieran estar involucradas en la susceptibilidad que muestran ambas líneas para sufrir apoptosis. Sin embargo, dadas las características de inducibilidad de NF- κ B, hubiera sido interesante estudiar las variaciones en la expresión de estas proteínas por acción de la gemcitabina, en función a que alteraciones

en estos niveles pudieran hablar de un mecanismo de resistencia adquirido por estas células inducido por el antineoplásico .

El presente trabajo demuestra también que la línea celular SiHa es un sistema celular muy resistente a la acción de distintos agentes anti-neoplásicos. Este modelo resulta entonces muy interesante para poder estudiar mecanismos diversos mediante los cuales una célula es capaz de evadir las señales pro-apoptóticas. Al parecer no es el sistema NF- κ B el principal responsable de este efecto protector, sin embargo existen muchos otros mecanismos que pudieran estar implicados en la resistencia, como por ejemplo algunas cinasas relacionadas a sobrevivida celular como la cinasa Akt (Delhase *et al.*, 2000).

Finalmente, el presente trabajo más bien descriptivo que mecanístico, permite involucrar al sistema NF- κ B en el proceso de resistencia a antineoplásicos en el sistema tumoral de cérvix. Esto es importante a nivel clínico en función de que uno de los principales problemas en el tratamiento de estos tumores es precisamente la alta resistencia a una gran variedad de antineoplásicos.

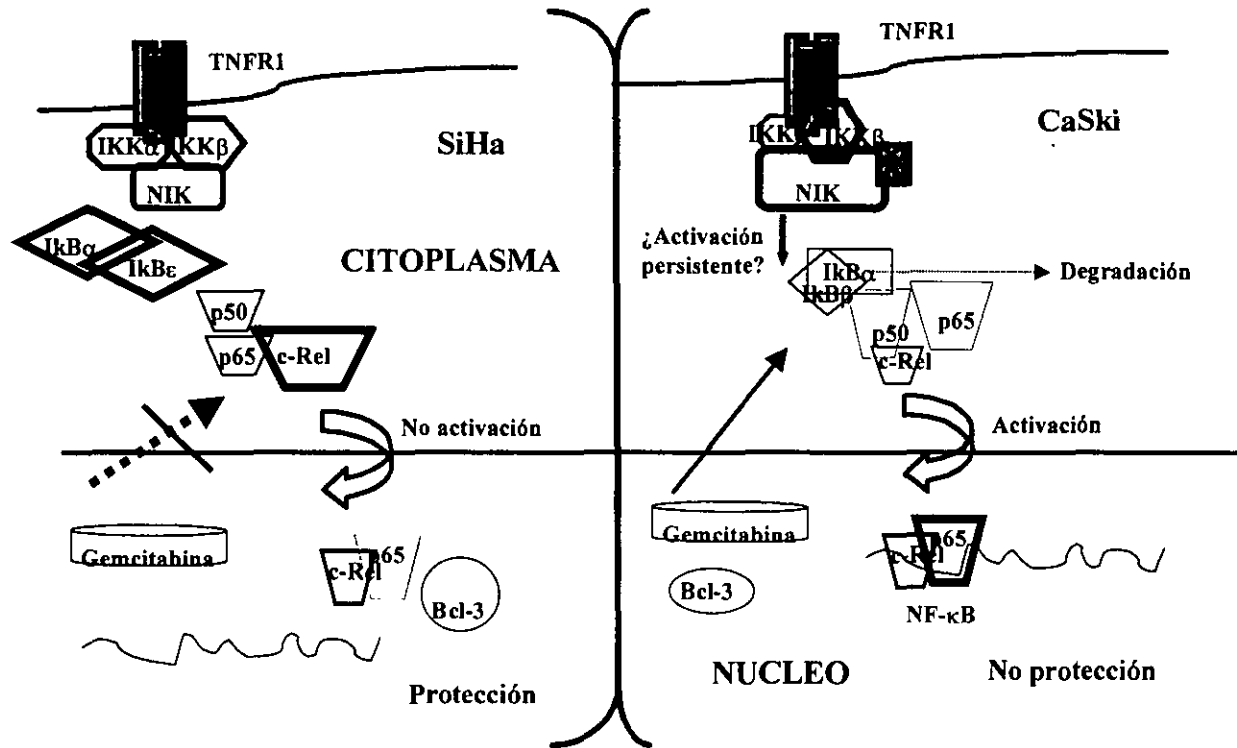


Fig. No 13. Modelo experimental propuesto para la acción de NF- κ B en las dos líneas celulares SiHa y CaSki.

El efecto de resistencia mostrada por la línea SiHa para el efecto de gemcitabina es independiente a su capacidad para inducir la translocación nuclear de NF- κ B por la acción de este fármaco. Posiblemente los niveles basales nucleares en estas células son suficientes para inducir protección. En cambio en la línea celular CaSki, la activación de NF- κ B promovido por la acción de gemcitabina no es suficiente para protegerla apoptosis. El evento de protección debe depender, más que de la capacidad para activar a NF- κ B, de los niveles de inducción alcanzados, el complejo que se transloque y la función transactivadora de éstos.

9 . Conclusiones

1.-La capacidad para inducir la activación de complejos de la familia de Rel por la línea celular Caski , se asocia con cierta resistencia a sufrir apoptosis mediada por el fármaco gemcitabina

2.- Proponemos que la gemcitabina debe emplear un mecanismo alternativo a la activación de NF- κ B vía receptor a TNF- α debido a que el pretratamiento de estas células con esta citocina no induce la translocación de NF- κ B al núcleo presumiblemente por activación constitutiva de la ruta, lo cual no permite que ésta sea modulable.

3.- En el mecanismo de resistencia a apoptosis inducida por gemcitabina en la línea celular SiHa no está implicado la activación de NF- κ B. Esta línea celular es resistente a sufrir apoptosis inducida por gemcitabina, a pesar de que este fármaco no es capaz de promover la translocación de NF- κ B al núcleo de estas células. Probablemente los niveles basales de activación sean suficientes para promover la resistencia a apoptosis.

4.- No existen diferencias en la composición de la vía TNF /NF- κ B entre ambas líneas celulares, la diferencia pensamos más significativa ocurre a nivel de cantidad de expresión: la línea celular SiHa , la más resistente, presenta en general niveles aumentados de los inhibidores de la familia de Rel. Esta diferencia podría estar correlacionada con las distintas capacidades para inducir a los diferentes complejos de la familia de Rel.

5.- La activación constitutiva de NF- κ B en líneas tumorales de cérvix no es un mecanismo universal de protección a sufrir apoptosis : el efecto es tipo celular específico y dependiente de estímulo.

6.- Finalmente, este estudio permite suponer que el sistema NF- κ B podría estar implicado como mecanismo molecular de variación intra-lesional (heterogeneidad celular en los tumores) en cáncer de CaCu. Por lo tanto, el bloqueo de su activación podría funcionar como tratamiento adyuvante para abatir la resistencia a quimioterápicos mostrada por este tipo de tumores.

10 . Bibliografía

- Ashkenazi A, Dixit VM (1998): Death Receptors: signaling and modulation. *Science*. **281**:1305-1308 .
- Baeuerle P & Baltimore D (1996): NF- κ B: ten years after. *Cell*, **87**: 13-20.
- Barkett M & Gilmore T(1998): Control of apoptosis by Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene* **18**: 69-10-6924 .
- Basu S,Rosenzweig KR, Youmell M & Price B (1998): The DNA-Dependent Protein Kinase Participates in the activation of NF- κ B following DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**: 79-83.
- Bishop JM (1991): Molecular themes in oncogenesis. *Cell* **64**:235-248.
- Bristow R, Benchimol S & Hill RP (1996): The p53 gene as a modifier of intrinsic radiosensitivity: implication for radiotherapy. *Radiat.Oncol.* **40**:197-223.
- Brown K, Park S, Kanno T, Franzoso G & Siebenlist U (1993): Mutual regulation of the transcriptional activator NF- κ B and its inhibitor, I κ B- α .. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**:2532-2536.
- Bours V, Franzoso G, Azarenko V, Park S, Kanno T, Brown K, Siebenlist U (1993): The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates though κ B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell* **72**: 729-739 .
- Caamaño JH, Perez P, Lira S, Bravo R (1996): Constitutive Expression of Bcl-3 in thymocytes increases the DNA binding of NF- κ B (p50) homodimers in vivo. *Mol Cell Biol.* **16**: 1342-1348.
- Cameron RB. Editor. Lange : A Clinical manual. Primera edición. 1994.
- Carey J (1991): Gel retardation. *Methods Enzymol.* **208**:103-117.
- Chen F & Ghosh G (1999): Regulation of DNA binding by Rel/NF- κ B transcription factors: structural views. *Oncogene.* **18**:6845-6852.
- Das CK & White CW (1998): Activation of NF- κ B by antineoplastic agents. *J Biol Chem.* **272**:14914-14920.
- Delhase M, Li N & Karin M (2000): Signalling pathways: Kinase regulation in inflammatory response. *Nature.* **406**:367-368.

Dent C & Latchman S (1993): Transcription factors. A practical approach. IRL Press, Oxford University Press. Cap. 1. Págs:9-11

Enari H, Mukae N, Sakahira Y, Fukuda J, Inazawa H (1998): A caspase - activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*. **391**: 43-50 .

Epinat JC & Gilmore T(1998): Diverse agents act at multiple levels to inhibit the Rel/ NF- κ B signal transduction pathway. *Oncogene* **18**: 6896-6909.

Gilmore T (1999): **Oncogene reviews**. **18**(49).

Huang P & Plunkett W (1992): A quantitative assay for fragmented DNA in apoptotic cells. *Anal Biochem*, **207**: 163-167.

Karin M (1999): How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. *Oncogene*. **18**: 6867-6874.

Kasibhatla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Mahboubi A & Green D (1998): DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF- κ B and AP-1. *Mol.Cell* **1**:543-55.

Kerr JFR, Wyllie AH, Curie AR (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*. **26**: 239-57.

Kidd V (1998): Proteolytic activities that mediate apoptosis. *Annu.rev. Physiol*. **60**: 533-573.

Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR & Newmeyer DD (1997): The release of cytochrome c of mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. **275**: 1132-1136.

Kopnin BP (2000): Targets of oncogenes and tumor supressors: Key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry (Moscow)* **65**: 3- 26.

Kushner DB & Ricaciardi RP (1999): Reduce phosphorylation of p50 is responsible for diminished NF- κ B binding to the mayor histocompatibility complex class enhancer in adenovirus type 12 transformed cells. *Mol Cell Biol* . **19**(3): 2169-2179.

Kunsch C, Ruben SM & Rosen C (1992): Selection of optimal κ B/Rel DNA-binding motifs: Interaction of both subunits of NF- κ B with DNA is requires for Transcriptional activation. *Mol Cell Biol*. **12**:4412-4421 .

LaCasse E, Baird S, Korneluk R and MacKenzie A (1998): The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* .17: 3247-3259.

Lallena M, Díaz-Meco M, Bren G, Payá C & Moscat J (1999): Activation of I κ B Kinase β by protein kinase C isoforms . *Mol. Cell. Biol* 19: 2180-2188.

Latchman DS (1993): **Transcription Factors. A practical Approach.** The practical Approach Series. Oxford University Press, UK.

Levkau B, Scatena M, Giachelli C, Ross R & Raines E (1999): Apoptosis overrides survival signals through a caspase-mediated dominant-negative NF- κ B loop. *Nature Cell Biol.* 1: 227-233.

Levine AJ (1993): The tumor suppressor genes. *Annu Rev Biochem* 62: 623-651.

Link E, Kerr LD, Schreck R, Zabel U, Verma I, Beaurle PA (1997): Purified I κ B β is inactivated upon dephosphorylation. *J Biol Chem* . 267: 239-246.

Liu X, Zou H, Slaughter C & Wang X (1997): DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* . 89: 175-184.

Malinin NL, Boldin M, Kovalenko A & Wallach D (1997): MAPK-3-related kinase involved in NF- κ B induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature*. 385:540-544.

May MJ & Ghosh S (1997): Rel / NF- κ B and I κ B proteins : an overview. *Cancer Biol* , 8:63-73.

May MJ & Ghosh S (1998): Signal transduction through NF- κ B. *Immunol.Today* 19:80-88.

Minn AJ, Vélez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW & Thompson CB (1997): Bcl-xL forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature*. 385: 353-357.

Nagata S & Golstein P (1995): The Fas death factor. *Science*. 267: 1449-1456.

Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H & Tsujimoto Y (1997): Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* .95: 14681-14686 .

Neiman PE, Thomas SJ & Loring G (1991): Induction of apoptosis during normal and neoplastic B-cell development in the bursa of fabricius. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 5857-5861.

Nicholson D & Thornberry A (1997): Caspases: killer proteases. *TIBS* **22**:299-306.

Noble S., Goa KL (1997): Gemcitabine. A review of its Pharmacology and clinical potential in Non-small cell lung cancer and pancreatic cancer. *Drugs*. **54**:447-471.

Omura GA (1996): Chemotherapy for stage IVB or recurrent cancer of the uterine cervix. *Monogr NCI*. **21**: 123-126.

Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM and Donner DB (1999): NF- κ B activation by tumour necrosis factor requires the akt serine-threonine kinase. *Nature* **40**:182-85.

Pahl H (1999): Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*, **18**: 6853-6866.

Patitillo RA (1977): Tumor antigen and chorionic gonadotropin in CoSki cells: a new epidermoid cervical cancer cell line. *Science*. **196**: 1456-1458.

Rabbits TH (1994) : The oncogenes and tumor suppressor genes. *Nature* **72**:143-149

Raff M (1992) : Social controls on cell survival and cell death. *Nature* **356**:397-400.

Raff M (1998): Cell suicide for beginners. *Nature*, **396**:119-122.

Ruben SM, Klement JF, Coleman TA, Maher M, Chen CH & Rosen CA (1992): I-Rel: a novel rel-related protein that inhibits NF- κ B transcriptional activity . *Genes Dev*, **6**: 745-760.

Roy N, Deveraux Q, Takahashi R, Salvesen G and Reed J (1997): The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J*. **16**: 6914-6925.

Ryseck RP, Bull P, Takamiya M, Bours V, Siebenlist U, Dobrzanski P & Bravo R (1992): Rel B , a new Rel family transcription activator then can interact with p50-NF- κ B. *Mol Cell Biol* , **12**: 674-684.

Sambrook M, Fritsch A & Maniatis (1989): Molecular cloning. Cold Spring Harbor Press.

Schendel SL, Xie Z, Montal MO, Matsuyama S, Montal M & Reed JC (1997): Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . **94**: 5113-5118.

Salvesen GS, Dixit VM (1997): Caspases: Intracellular signaling by proteolysis. *Cell*. **91**: 443-466.

Tapia R, Kuri P, Macías MC, et al.,eds: Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas en México. Morbilidad y Mortalidad, Bienio 1993-1994, Tendencias 1985-1994, Secretaría de Salud 1996.

Thompson JE, Phillips RJ, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S (1995): I κ B- β regulates the persistent response in a biphasic activation of NF- κ B. *Cell* **80**: 573-582.

Van Antwerp DJ, Martin SJ, Verma IM & Green DR (1998): Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF- κ B. *Trends Cell Biol.*, **8**,107-11

Van Moorsel C, Peters G & Pinedo H (1997): Gemcitabine: future prospects of single-agent and combination studies. *The Oncologist* , **2**:127-134

Wang CY, Mayo MW & Baldwin AS Jr (1996): TNF- α cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- κ B. *Science*. **274**:784-787.

Wang C, Mayo M, Korneluk R, Goeddel D & Baldwin A (1998): NF- κ B antiapoptosis: Induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*, **281**:1680-1683.

White DW, Roy A and Gilmore TD. (1995): The v-Rel oncoprotein blocks apoptosis and proteolysis of I κ B- α in transformed chicken spleen cells. *Oncogene*, **10**,857-868.

Whiteside A & Israel A (1997): I κ B proteins: structure, function and regulation. *Cancer Biol* . **8**: 75-82.

Yuan JY, Horvitz RH (1990): Genetics mosaic analysis of ced-3 and ced-4, two genes that control programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Dev. Biol.* **138**:33-41.

Zabel U, Baeuerle PA (1990): Purified human I κ B- α can rapidly dissociate the complex of the NF- κ B transcription factor with its cognate DNA. *Cell* **61**:255-265.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA.

Zhu W, Cowie A, Wasfy G, Penn L, Leber & Andrews DW (1996): Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types. *EMBO J.* **15**: 4130-4141.

Zou H, Henzel W, Xuesong L, Lutschg A and Wang X (1997): Apaf-1 a human protein homologous to C. Elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase 3. *Cell.* **90**:405-413 .

11. GLOSARIO

APAF-1	Apoptotic Protease Activating Factor-1
CAD	Caspase activated DNase
DNA-PK	DNA dependent Protein Kinase
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
FADD	Fas-associated death domain protein
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte and Macrophage Colony Stimulating Factor
c-IAP	Cellular Inhibitor of apoptosis Protein
ICAD	Inhibitor of Caspase Activated DNase
ICE	Interleukin-1 β -converting enzyme
I κ B- α	Inhibitor of NF- κ B alpha
IKK	I κ B kinases
IL-1,2	Interleucinas 1 y 2
LPS	Lipopolisacáridos
NF- κ B	Nuclear Factor kappa Binding Protein
NIK	NF- κ B inducing kinase
PDGF	Platelet Derivated Growth Factor
PI(3)K	Phosphatidylinositol-3-OH-kinase
PKB	Protein Kinase B
PKC	Protein Kinase C
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR1	Tumor Necrosis Factor Receptor
TRADD	TNFR1-associated Death Domain Protein
TRAF	TNFR1-associated Factor
TUNEL	Terminal dUTP Nick End Labeling