

108



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EXPRESION DE LOS GENES p53, bcl-2, bax, bcl-x_L y bcl-x_S
DURANTE LA REGRESION DEL EPITELIO UTERINO
DE LA RATA.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
MARIA GABRIELA MONROY MENDOZA



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Marisol López López
Vocal	Prof. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez
Secretario	Prof. Marco Antonio Cerbón Cervantes
1er. Suplente	Prof. Ricardo Gamboa Ávila
2o. Suplente	Prof. José Ignacio Páramo Ramírez

Sitio donde se desarrollo el tema

Laboratorio de Endocrinología Molecular. Departamento de Biología. Facultad de Química U. N. A. M.

Asesor del Tema:


Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Supervisor Técnico:


Dra. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez

Sustentante:


Monroy Mendoza María Gabriela

Gracias:

Al Dr. Cerbón por haberme brindado la oportunidad de integrarme en su equipo de trabajo y por estar siempre dispuesto a ayudarme. Gracias por su carácter tan accesible y tolerante.

A la Dra. Adriana Mendoza por la paciencia y por las observaciones que realizó para mejorar este trabajo. Por guiarme como una maestra y por ser al mismo tiempo una amiga.

Al Subprograma 127 "Formación Básica en Investigación" de la Facultad de Química que me apoyó económicamente durante la realización de esta tesis.

Al CONACYT por la beca otorgada a través del proyecto 3486-N.

A la Dra. Marisol López por el tiempo que empleó en la revisión de este trabajo.

A la Dra. Quintero, el Dr. Camacho, Dr. Tamayo, a los compañeros del Laboratorio 202: Mauricio, Isabel, Paola, Nelly, Lety Luciano, Gaby, Andrea, Aliesha, Christian, Olga, Lupita, Juan Carlos, José, Miguel, Elizabeth, por sus saludos y los agradables momentos que compartimos.

A Mauricio, Lety, Nelly, Isabel y Luciano, por los consejos técnicos que me ayudaron a mejorar este trabajo.

A la Universidad Nacional, que me ha sido mi segundo hogar y me ha hecho muy feliz.

A los maestros de licenciatura y del CELE que mostraron un gran entusiasmo e interés en la transmisión del conocimiento. Siempre serán una parte importante en mi vida.

Este trabajo está dedicado a una mujer muy especial que se fue hace poco tiempo pero que me ha marcado con su ejemplo de fortaleza y alegría. Para ti *Mamá Paz* que siempre quisiste que luchara por ser feliz. Gracias.

Con mucho cariño para *mis padres* que me han llenado de amor. Porque este logro es el resultado de su esfuerzo. Los amo. Gracias, por darme la confianza de ser libre, por estar siempre conmigo y apoyarme sin dudar en las decisiones que he tomado.

Gracias:

A mis hermanos *Erika, Leo y Enrique* por quererme tanto, por extrañarme; por compartir sus alegrías conmigo y por las palabras de aliento en los momentos difíciles.

A mi amiga y hermana *Margarita*. Por volar conmigo y darme un lugar único. Por los cuentos compartidos. Por una amistad libre, pura y verdadera.

A *Isaac*, mi propio sol. Por darme motivos, por amarme y llenarme de alegría. Por devolverme la fe. Te amo.

A mis queridos amigos, porque sin ellos no hubiese podido sobrevivir:

Enrique, que me ayudo a crecer y a darme cuenta que valía la pena aunque algunas veces duele. Por ser un amigo incondicional y un maestro. Por ser el guía más entusiasta de la Ciudad de México.

Marco, "por sintetizar mi alegría" cuando me sentía sola. Por sus consejos tan oportunos y su buen sentido del humor. Gracias.

Dona, por demostrarme que nuestra amistad no es pasajera. Por todo el cariño que me has dado. Gracias Amiga.

Simael, por compartir tus sueños y pensamientos conmigo.

Walda, por transmitirme toda la alegría que existe en ti. Te quiero un titipuchal.

Nidia, por los silencios prolongados, por tu compañía. Gracias.

Alex, por ser un abrigo para cobijarme en cualquier momento. Gracias.

A mi familia *Mendoza Ángeles*, por haberme hecho feliz en mi niñez.

A mi familia *Monroy y Lara*, por ser siempre una opinión, un consejo.

A la familia *Bacsa Calderón*, por abrirme con calidez las puertas de su casa, donde realicé gran parte de este trabajo.

INDICE

1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN	6
3. ANTECEDENTES	8
3.1 Control hormonal de la apoptosis	8
3.1.1 Generalidades	8
3.1.2 Regulación de apoptosis por E ₂ y P ₄	10
3.2 Ciclo estral de la rata	12
3.2.1 Niveles hormonales	12
3.2.2 Proliferación celular del útero durante el ciclo estral	17
3.2.3 Muerte celular del útero durante el ciclo estral	19
3.3 Muerte Celular Programada (PCD) / Apoptosis	21
3.3.1 Definición	21
3.3.2 Bioquímica de la apoptosis	23
3.4 La familia de proteínas Bcl-2	29
3.4.1 Generalidades	29
3.4.2 Bcl-2	35
3.4.3 Bax	38
3.4.4 Bcl-x	44
3. 5 El gen supresor de tumores p53	47
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	53

5. OBJETIVOS	54
5.1 Objetivo General	54
5.2 Objetivos Particulares	54
6. HIPÓTESIS DE TRABAJO	55
7. MATERIAL Y METODOS	56
7.1 Animales de experimentación	56
7.2 Retrotranscripción acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	56
7.2.1 Extracción de RNA total	56
7.2.2 Cuantificación de RNA	57
7.2.3 Electroforésis de RNA	57
7.2.4 Retrotranscripción del RNA (RT)	58
7.2.5 Síntesis de Oligonucleótidos	58
7.2.6 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	59
7.2.7 Electroforésis de los productos de RT-PCR	59
7.2.8 Análisis densitométrico	60
7.2.9 Análisis estadístico	60
7.3 Inmunohistoquímica (IHQ)	60
7.3.1 Procesamiento del tejido	60
7.3.2 Preparación del tejido para IHQ	61
7.3.3. Inmunohistoquímica	61
7.4 Cuantificación Hormonal	62

8. RESULTADOS	63
8.1 Evaluación del ARNm de <i>p53</i> , <i>bcl-2</i> , <i>bax</i> , <i>bcl-x_L</i> y <i>bcl-x_S</i> por RT-PCR	63
8.2 Evaluación de las proteínas: <i>p53</i> , <i>Bcl-2</i> , <i>Bax</i> , <i>Bcl-x_L</i> y <i>Bcl-x_S</i> por inmunohistoquímica	69
8.3 Niveles hormonales	77
9. DISCUSIÓN	79
10. CONCLUSIONES	88
11. REFERENCIAS	90

1.RESUMEN

En este trabajo se estudió la expresión de los genes *p53*, *bcl-2*, *bax*, *bcl-x_L* y *bcl-x_S* a nivel de RNA mensajero (mRNA) y de la proteína en el útero de ratas intactas, el cual presenta regresión mediada por apoptosis en el epitelio luminal y glandular durante la transición de la etapa del proestro al estro del ciclo estral. Para detectar la expresión a nivel de mRNA se utilizó la técnica de Retrotranscripción acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) y para detectar la proteína se usó la técnica de Inmunohistoquímica (IHQ) en cortes transversales del útero de ratas sacrificadas entre las 13:00 horas del día del proestro y las 13:00 horas del día del estro.

La expresión a nivel de mRNA para *p53* se mantiene sin cambios aumentando significativamente su expresión a las 13 h del estro. A nivel de la proteína (*p53*) aumenta significativamente en el citoplasma de ambos epitelios a partir de las 5 h, manteniéndose elevado hasta las 8 h y 13 h del estro. Esto indica que la apoptosis observada en esta etapa del ciclo estral es independiente de *p53*.

Los niveles del mRNA para *bcl-2* encontrados a las 0 h y 2 h del estro son significativamente menores con respecto a las 5 h, 8 h y 13 h del estro estudiadas. En el epitelio luminal, *Bcl-2* disminuye significativamente a las 0 h del estro, elevándose a partir de las 8 h. En el epitelio glandular, esta proteína disminuye significativamente entre las 21 h del proestro y las 0 h del estro, elevándose a las 2 h del estro.

Los niveles de expresión de *bax* a nivel del mRNA permanecen muy uniformes y no presentan cambios significativos durante la transición de la fase del proestro al estro. Sin embargo, la proteína (*Bax*) aumenta significativamente a las

0 h del estro en el epitelio luminal y glandular manteniéndose elevado hasta las 2 h del estro en este último.

La disminución en la expresión del mRNA de *bcl-2* y la falta de variación en los niveles del mRNA de *bax*, dan como resultado un ascenso en la proporción proapoptótica *bax* : *bcl-2* que es significativamente mayor entre las 0 h y 2 h del estro respecto a las 5 h, 8 h y 13 h del estro. La relación entre la concentración de las proteínas de Bax / Bcl-2 presenta un aumento a partir de las 21 h del proestro en ambos epitelios. En el epitelio luminal, esta relación comienza a disminuir a partir de las 5 h del estro, mientras que en el epitelio glandular disminuye a partir de las 2 h del estro.

En el caso de *bcl-x_L*, los niveles del mensajero presentan un valor mínimo a las 0 horas del estro y aumentan a partir de las 2 h para alcanzar la expresión basal a las 8 h de la misma fase. A nivel de la proteína, la expresión de Bcl-x_L disminuye en el epitelio luminal a las 0 h del estro mientras en las glándulas esta disminución se presenta a partir de las 21 h del proestro.

La expresión de *bcl-x_S* no presenta cambios significativos a nivel del mRNA. Sin embargo, la expresión de la isoformas para Bcl-x presentan un aumento significativamente mayor entre las 0 h y 2 h del estro en ambos epitelios. Este aumento parece estar dado por un aumento de Bcl-x_S , ya que Bcl-x_L disminuye a estas horas. La proporción proapoptótica *bcl-x_S* : *bcl-x_L* a nivel de mRNA fue significativamente mayor a las 21 h del proestro con una disminución significativa a partir de las 5 h del estro.

En conclusión, la disminución de la expresión de genes antiapoptóticos y el aumento específico de las proteínas proapoptóticas en el epitelio que se encuentra bajo regresión dependiente de estradiol y progesterona provoca una ganancia de la función proapoptótica que da como consecuencia la muerte en el epitelio luminal y glandular del útero de la rata en la mañana del estro.

2. INTRODUCCIÓN

Durante el ciclo estral, el útero de la rata presenta cambios en estructura y función en forma dependiente de hormonas esteroides. El crecimiento y la regresión cíclica del tracto reproductivo se encuentra controlado por hormonas esteroides como son el 17- β estradiol (E_2) y la progesterona (P_4), a las cuales se les ha atribuido un efecto mitogénico y de diferenciación celular respectivamente, además de obtenerse un efecto antiapoptótico en presencia de ambas hormonas. Las células del epitelio luminal proliferan durante el metaestro, el diestro y el proestro, mientras que el epitelio glandular solamente prolifera durante el metaestro y el diestro (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2002a). El mayor índice apoptótico del epitelio luminal y glandular se presenta en la etapa del estro y es menor en el metaestro siendo casi nulo en el diestro y proestro (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2002b). Este aumento en el índice apoptótico durante el estro se ha relacionado con una disminución en los niveles plasmáticos de estrógeno en la fase tardía del proestro.

Se sabe que la acción de las hormonas esteroides es mediada vía receptores nucleares. Los receptores funcionan como factores de transcripción modulados por un ligando, la hormona, la cual al unirse al receptor forma el complejo hormona-receptor activo y se une a secuencias reguladoras o elementos de respuesta hormonal presentes en la región promotora de genes hormono regulados. Estos receptores se expresan tanto en las células epiteliales como en las células estromales del útero y se ha sugerido que los efectos de proliferación y muerte celular en células epiteliales se encuentran mediadas por la acción parácrina de éstas hormonas (Kurita *et al.*, 2001).

Recientemente se ha estudiado el mecanismo a través del cual se da la apoptosis por la disminución de hormonas esteroides en los órganos blanco de las

mismas durante la decidualización del endometrio (que ocurre durante el tercer trimestre de embarazo), en células del ovario y en líneas celulares como leiomiomas o cáncer de cérvix y de mama que responden a hormonas esteroides ováricas. En estos tejidos se ha atribuido el cambio en la expresión de los genes que pertenecen a la familia de Bcl-2 al cambio en los niveles de E₂ y P₄. Sin embargo, no se conoce el mecanismo por el cual se regula su expresión. Aunque se sabe que p53 regula la expresión de genes como *bax* y que inhibe la expresión de *bcl-2*, no existen estudios en tejidos blanco de hormonas esteroides que reporten dicha regulación en condiciones fisiológicas.

En este trabajo se estudió la expresión de algunos genes pertenecientes a la familia de Bcl-2 involucrados en la apoptosis durante la transición de la fase del proestro al estro, periodo en el cual se presenta una disminución importante en el nivel de E₂ y P₄ afectando la integridad del útero, el cual resulta un modelo fisiológico adecuado para evaluar el papel de estas hormonas esteroides en la regulación de la expresión de genes relacionados con la apoptosis.

El conocimiento sobre los mecanismos que regulan la proliferación y muerte celular nos ayudaran a comprender las vías que se encuentran alteradas en algunos tipos de cáncer en este tejido.

3. ANTECEDENTES

3.1 CONTROL HORMONAL DE LA APOPTOSIS.

3.1.1 Generalidades

La apoptosis es un proceso fisiológico importante que modula el desarrollo normal y la homeostasis en una gran variedad de tejidos. Este proceso se encuentra regulado por hormonas, citocinas y factores de crecimiento que regulan la muerte celular al estimular o inhibir el crecimiento, o al inducir la apoptosis bajo condiciones fisiológicas, patológicas, o ambas (Tabla1). Por ejemplo, se ha visto que las hormonas esteroides regulan la apoptosis en células y tejidos blanco como la glándula mamaria, próstata, ovario, útero, testículo, etc. (Pushkala y Gupta, 2001). Por otro lado, la inhibición de la apoptosis por factores de crecimiento se ha relacionado con su habilidad para hacer que la célula entre al ciclo celular.

Además, se ha visto que la función de un gran número de genes que tienen un papel en la muerte celular está regulada por la concentración de algunos factores de crecimiento. Por ejemplo, la función de c-Myc para inducir la muerte celular puede ser inhibida en presencia de ciertos factores de crecimientos (Harrington *et al.*, 1994). Por otro lado, c-Myc puede inducir la apoptosis a partir del arresto celular provocado por una disminución en la concentración de factores de crecimiento (Hermeking y Eick, 1994).

La apoptosis también puede estar regulada a nivel de la transcripción, esto es por la regulación de la expresión de factores de transcripción. Por ejemplo, puede ocurrir la apoptosis al disminuirse la transcripción de GATA-1, un factor de transcripción necesario para la maduración de precursores eritroides cuando el receptor de estrógenos se une a su ligando en estas células (Blobel y Orkin, 1996).

Tabla 1 Hormonas, citocinas y factores de crecimiento involucrados en la apoptosis ()

Inhibidores de la apoptosis

- Testosterona (T)
- Estradiol (E2)
- Progesterona (P4)
- Factores de Crecimiento (EGF, IGF-1, NGF, PDGF)
- Interleucinas (IL)
- Hormona del Crecimiento (GH)
- Prolactina (PRL)
- Gonadotropinas (LH, FSH)

Inductores potenciales de la apoptosis

- Glucocorticoides
- Progesterona (P4)
- Hormonas tiroideas (T3, T4)
- Disminución de Factores de crecimiento
- Factor de crecimiento transformador β
- Factor de Necrosis Tumoral (TNF)
- Ligando de Fas (FasL)

Las hormonas peptídicas pueden presentar actividad anti o pro-apoptótica. Un ejemplo del primer tipo es la prolactina (PRL), que previene la fragmentación de DNA inducida por dexametasona mediante el receptor de glucocorticoides en células con linfoma Nb2 (Fletcher-Chiappini *et al.*, 1993). También, la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y probablemente otros factores pituitarios pueden estar involucrados en prevenir la apoptosis en las glándulas suprarrenales (Ceccatelli *et al.*, 1995). Por otro lado, una hormona peptídica muy importante para

la diferenciación sexual: la Sustancia Inhibidora Muleriana (MIS) tiene una función antiproliferativa y actúa a través de un programa de muerte celular iniciado vía receptor y es regulada a través de factores trasactivantes como SRY (Sex Determining Region Y) y testosterona (Catlin *et al.*, 1993). A otras hormonas como la gonadotropina coriónica humana (hCG) y la hormona folículo estimulante (FSH) no se les ha atribuido un efecto sobre la apoptosis que no sea un efecto indirecto por el aumento de hormonas esteroides ováricas (Wimalasena *et al.*, 1991).

El conocer los mecanismos por los cuales las hormonas controlan la muerte celular programada permitirá diseñar estrategias para prevenir y tratar enfermedades que afectan a tejidos endócrinos (Lavin y Watters, 1993; Thompson, 1995; Gibbons y Dzau, 1996). Por ejemplo, la inducción de la apoptosis puede ocasionar enfermedades como la diabetes de tipo I, en la cual se eliminan las células beta del páncreas, o una atrofia patológica hormono-dependiente (Denmeade *et al.*, 1996; Sinowatz *et al.*, 1995; Ceccatelli *et al.*, 1995). Así mismo, una falla en la apoptosis puede ocasionar enfermedades autoinmunes o degenerativas como el cáncer y el Alzheimer (Milas *et al.*, 1994; Denmeade *et al.*, 1996; Wolozin *et al.*, 1996).

3.1.2 Regulación de la apoptosis en el útero por hormonas esteroides:

Los estudios en este tejido han demostrado que el crecimiento y la regresión cíclica del tracto reproductivo femenino por apoptosis se encuentran bajo el control de las hormonas esteroides estradiol (E_2) y progesterona (P_4) (Hopwood y Levison, 1976; Sandow *et al.*, 1979). El E_2 tiene un efecto mitogénico en el epitelio uterino, mientras que la P_4 inhibe la proliferación al inhibir la mitosis dirigida por estrógenos (Martin *et al.*, 1970). Así mismo, además de sus funciones como la inducción de la ovulación, la preparación del endometrio para la implantación y el mantenimiento del embarazo, la P_4 inhibe la apoptosis (Terada *et al.*, 1989). Estos efectos anti-apoptóticos se han observado al utilizar como

modelo el útero de la rata. El incremento de los niveles plasmáticos de E₂ induce la proliferación del tejido. Posteriormente, la integridad del tejido se mantiene en parte por el efecto antiapoptótico de la P₄. Si no se produce la fertilización, los niveles de progesterona caen y el epitelio uterino regresa por apoptosis (Sato *et al.*, 1997). De manera similar, estos efectos de proliferación y apoptosis se presentan en ratones ovacteromizados (ovx) tratados con E₂ y P₄ (Martín *et al.*, 1970; Terada *et al.*, 1989). En estos estudios se ha sugerido que la P₄ sola o con E₂ puede reducir la muerte celular independientemente de su acción sobre división celular ya que inhibe la división celular inducida por E₂ (Terada *et al.*, 1989). Sin embargo, a pesar de que se sabe que la disminución en la concentración de estas hormonas es un estímulo que provoca la muerte celular del epitelio uterino, aún no se ha esclarecido el mecanismo molecular a través del cual regulan la apoptosis.

Por otro lado, es bien sabido que el mecanismo de acción de ambas hormonas está mediado vía un receptor nuclear que se activa al unirse con su ligando para funcionar como un factor de transcripción (Evans, 1988). Las células que presentan este receptor tienen regulada por efectos hormonales la expresión de muchos genes. En el útero tanto las células epiteliales como las células estromales presentan receptores a hormonas esteroideas ováricas (Tibbetts *et al.*, 1998). Diferentes estudios *in vivo* sugieren la acción parácrina de estas hormonas. Por ejemplo, al agregar E₂ a un cultivo primario de células epiteliales normales, esta hormona presenta su actividad mitógena (Uchima *et al.*, 1987). El efecto mitogénico del E₂ en epitelio uterino y vaginal se observó solamente al recombinar un cultivo de células epiteliales con células estromales y el tejido recombinante se inserto *in vivo* (Cooke *et al.*, 1986). Otro estudio comprobó que el E₂ inducía la proliferación en el tejido uterino y vaginal cuando se insertaron *in vivo* células de ambos epitelios knockout para el receptor a estrógenos (RE) recombinadas con células estromales tipo silvestres para RE (Buchanan *et al.*, 1998; Cooke *et al.*, 1997). Por lo tanto, estos estudios concluyen que el RE en las células epiteliales no es necesario ni suficiente para llevar a cabo el efecto mitogénico *in vivo* del E₂ en las células epiteliales normales. Una evidencia similar

se ha encontrado para el caso del efecto antimitogénico de la P_4 en el epitelio uterino (Kurita *et al.*, 1998). Se observó que esta hormona inhibía la síntesis de DNA, inducida por E_2 , en células del epitelio uterino de ratón *knockout* para el receptor a progesterona (RP) cuando estas células epiteliales eran combinadas con células del estroma uterino de ratón silvestre. En contraste, la P_4 no bloqueaba la síntesis de DNA, inducida por E_2 , cuando el epitelio uterino RP+ se combinaban con estroma RP- (Kurita *et al.*, 1998). Por otro lado, un estudio realizado por Kurita *et al.* en el 2001 reportó un mecanismo parácrino para la regulación de la apoptosis en el epitelio uterino. Se prepararon tejidos recombinantes que contenían 1. epitelio y estroma tipo silvestre 2. epitelio RP- con estroma silvestre 3. epitelio tipo silvestre con estroma RP- 4. epitelio y estroma *knockout* para RP. Los resultados demostraron que la P_4 inhibía la apoptosis del epitelio uterino solo en tejido recombinante preparado con estroma RP+ y concluyendo que la apoptosis en el epitelio uterino está regulada vía el RP estromal.

Estos hechos sugieren que la proliferación y regresión del epitelio puede estar regulada por la acción parácrina de estas hormonas y podría explicar el por qué el epitelio uterino presenta una regresión durante la fase de transición del proestro al estro del ciclo estral al disminuir los niveles plasmáticos de hormonas ováricas.

3.2 CICLO ESTRAL DE LA RATA

3.2.1 Niveles hormonales

La rata es un mamífero con una ovulación espontánea que ocurre de 4 a 5 días durante todo el año. Su ciclo estral está constituido por cuatro etapas: proestro, estro, metaestro (o diestro temprano) y diestro. En ratas con un ciclo

estral de cuatro días de duración, los niveles plasmáticos del estradiol son basales (8 ± 2 pg/ml) durante la etapa del estro y comienzan a aumentar en la tarde del metaestro llegando a su máximo valor (45 ± 2 pg/ml) a las 9:00 a.m. del proestro. Durante la tarde del proestro los niveles de estradiol caen rápidamente y alcanzan los valores basales en las primeras horas de la mañana del estro. El estradiol es secretado por las células de la teca interna y las células de la granulosa de los folículos De Graaf que se encuentran en desarrollo.

El aumento en la concentración de estrógenos en la sangre desencadena un estímulo neural cíclico que activa la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por el hipotálamo. La GnRH a su vez, desencadena la secreción de la hormona luteinizante (LH) por la hipófisis. Los niveles circulantes de LH empiezan a incrementarse alrededor de las 2 a 3 p.m. del proestro, y alcanzan su nivel máximo (37 ± 5 ng/ml) entre las 5 y 7 p.m. de la misma fase (Figura 1) (Brown-Grant *et al.*, 1970; Butcher *et al.*, 1974; Freeman, 1988).

El incremento de LH induce la ruptura folicular y la ovulación, la cual ocurre en las primeras horas del estro. El nivel plasmático de LH comienza a disminuir en la noche del proestro y alcanza niveles basales (0.5 ± 0.15 ng/ml) en las primeras horas de la mañana del estro y permanece así durante el resto del ciclo estral (Brown-Grant *et al.*, 1970; Butcher *et al.*, 1974; Freeman, 1988). El patrón de secreción de la Hormona Foliculo Estimulante (FSH) y prolactina es similar al patrón que sigue LH durante el ciclo estral (Figura 1).

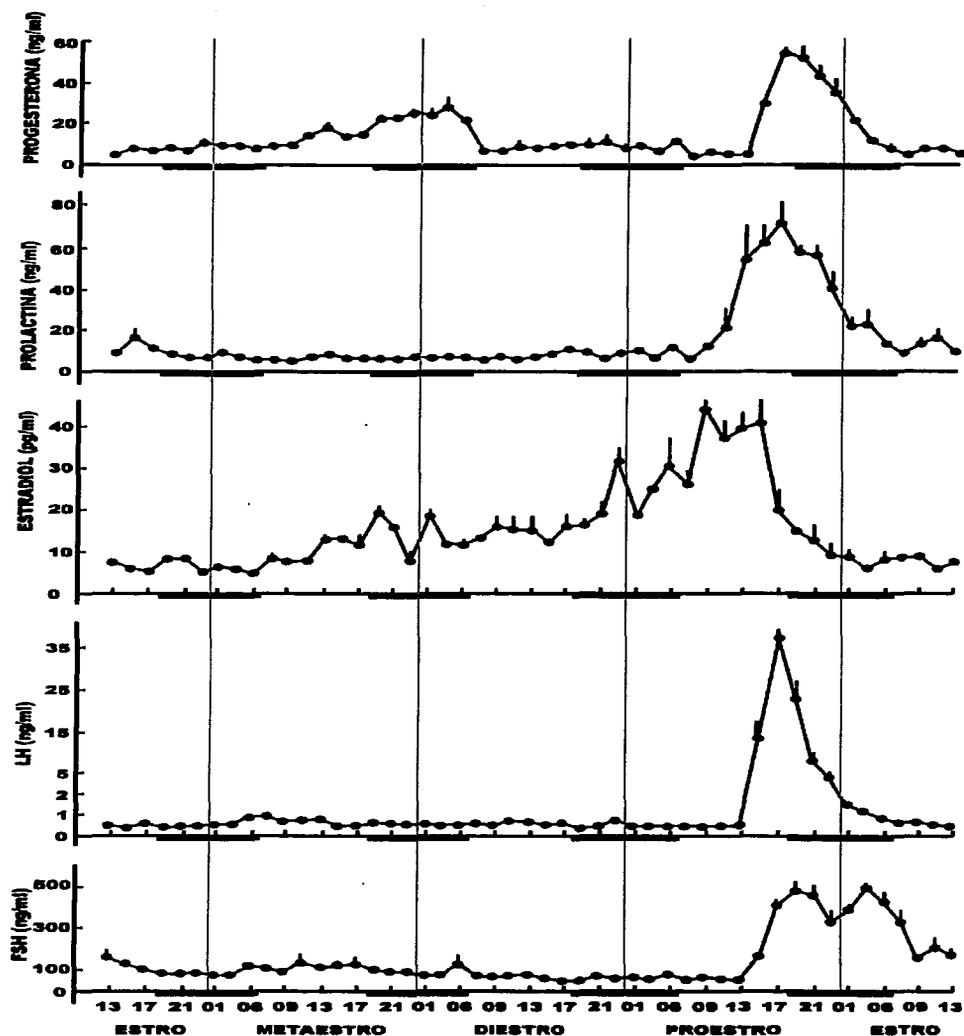


Figura 1. Concentraciones hormonales durante el ciclo estral. Concentración de progesterona, prolactina, estradiol, LH y FSH en plasma periférico obtenido en intervalos de 2 horas a través de los 4 días del ciclo estral de la rata. Las barras negras representan los intervalos de oscuridad en la colonia y los números en la base representan la hora del día (Freeman, 1988).

Durante el ciclo estral se presentan dos incrementos en los niveles de progesterona secretada en el plasma periférico (Figura 1). Durante la tarde del proestro se observa un incremento de progesterona secretada por las células de la granulosa del folículo preovulatorio, la cual alcanza un valor máximo entre las 6 y 9 p.m. (46 ± 7 ng/ml). Este incremento sucede casi simultáneamente al incremento de la LH. Los niveles de progesterona vuelven a ser basales (2 ± 1 ng/ml) para la mañana del estro (Butcher *et al.*, 1974; Freeman, 1988). Un incremento secundario de progesterona de origen lúteo, se presenta alrededor del mediodía del metaestro (24 ± 3 ng/ml), se prolonga hasta las primeras horas de la mañana del diestro y desciende a niveles basales poco tiempo después del amanecer del diestro.

Pocas horas después del incremento de progesterona en la tarde del proestro se presenta un comportamiento característico de lordosis. Es probable que el aumento en los niveles de estrógenos seguido por el aumento de los niveles de progesterona facilite la lordosis en el estro, ya que este comportamiento no se presenta en ninguna otra etapa del ciclo estral.

El cambio en las concentraciones de hormonas durante el ciclo estral tiene efectos en la actividad del oviducto, útero, cérvix y vagina, así como también algunos efectos fisiológicos generalizados.

La forma más común por la cual se determina la etapa del ciclo estral en la rata, es por medio del estudio de los cambios morfológicos en las células del epitelio vaginal. En un frotis vaginal pueden presentarse dos o más tipos celulares, pero el tipo celular que predomina, indica la etapa del ciclo estral en que se encuentra cada rata. Los tres diferentes tipos celulares que se pueden encontrar en un frotis vaginal de rata son: a) células epiteliales nucleadas, b) leucocitos polimorfonucleares y c) células epiteliales cornificadas.

Durante el estro la pared vaginal presenta un aspecto seco, blando y carente de brillo pero cambia durante el metaestro, presentando un aspecto húmedo y rosado. Estos cambios están asociados con la cornificación de las capas superiores durante el estro y con la extensa descamación al final de esta etapa. A medida que se aproxima el proestro, los tipos celulares presentes en los fluidos vaginales consiste de células epiteliales nucleadas y leucocitos y ocasionalmente células cornificadas. Durante el proestro, los leucocitos desaparecen, las células epiteliales nucleadas aumentan en número y son gradualmente reemplazadas por células sin núcleo. El principio del estro ocurre cuando el frotis presenta 75% de células nucleadas y 25% de células cornificadas. Eventualmente, las células cornificadas son la únicas presentes. El metaestro y el diestro se caracterizan por la aparición de un gran número de leucocitos y la desaparición de las células cornificadas (Baker, 1979).

El útero también presenta cambios cíclicos, dependientes de esteroides, tanto en su estructura como en su función. Durante cada ciclo, el útero inicialmente se prepara para recibir y transportar el espermatozoide del cervix al oviducto, y subsecuentemente se prepara para recibir los embriones del oviducto. El útero esta compuesto por dos capas: miometrio y endometrio. El miometrio es la porción muscular de la pared uterina. Consiste de dos capas de músculo liso: una capa gruesa interna que es circular y una capa más delgada externa que es longitudinal. Entre ambas capas se encuentra una capa de tejido conectivo que contiene nervios, vasos linfáticos y sanguíneos. El endometrio consiste de una matriz o estroma, sobre la cual se asienta un epitelio columnar simple bajo con extensiones glandulares que penetran el estroma (Hafez, 1970).

Durante el proestro, el endometrio se encuentra bajo la influencia de los estrógenos producidos por los folículos ováricos (fase folicular), su vascularización se incrementa, el epitelio se convierte en un epitelio columnar bajo y las glándulas presentan cierto crecimiento. La actividad proliferativa del epitelio da lugar a un gran incremento en el área superficial; la proliferación principal es del epitelio

luminal. Las células epiteliales secretan un fluido de constitución líquida que contiene algunas proteínas, principalmente enzimas proteolíticas. En esta etapa aumenta la contractibilidad y excitabilidad del endometrio y el tamaño del estroma se incrementa ya que presenta proliferación celular (lo cual da lugar a la expresión de fase proliferativa del ciclo estral) (Hafez, 1970).

Durante el estro y el metaestro (fase lútea) las estructuras del endometrio están controladas por la progesterona producida por el cuerpo lúteo: el endometrio se expande, el epitelio luminal se convierte a uno de tipo columnar alto y las glándulas crecen hasta su máximo tamaño, las glándulas ahora son activamente secretoras; secretan un fluido rico en glicoproteínas, azúcares y aminoácidos. Las células del estroma se hacen más largas y más hinchadas. La progesterona actúa sobre el miometrio causando el crecimiento de las células y, en contraste con los estrógenos, disminuye la excitabilidad de la musculatura uterina (Hafez, 1970). Al final de la fase lútea, durante el diestro, el epitelio secretor se colapsa, el endometrio se reabsorbe y es reemplazado por una pequeña capa de estroma cubierta con tejido epitelial lista para entrar a un nuevo ciclo (Hafez, 1970).

3.2.2 Proliferación celular del útero durante el ciclo estral

Se ha determinado la proliferación de cada tipo celular del útero durante el ciclo estral a través de la actividad mitótica uterina y se ha reportado que la actividad mitótica en el epitelio luminal es máxima durante el diestro y el proestro temprano y desciende rápidamente, una elevación secundaria se presenta durante el metaestro (Marcus, 1974); otros autores han reportado proliferación de este tipo celular en el día del diestro (Bertalanffy y Lau, 1963). El estudio de Marcus reportó que el epitelio glandular solamente prolifera durante el metaestro, mientras que el de Bertalanffy y Lau reportan que este tipo celular prolifera tanto en metaestro como en diestro. En el estroma endometrial, Marcus reportó que la mitosis ocurre en la tarde del diestro y la mañana del proestro, mientras que Bertalanffy y Lau la

detectan principalmente en el estro y metaestro. En el miometrio, la máxima proliferación ocurre durante el proestro, pero es menos intensa que en el epitelio luminal (Marcus, 1974). Por otro lado, estudios realizados en nuestro laboratorio, mostraron que las células del epitelio luminal proliferan durante el metaestro, el diestro y el proestro, mientras que el epitelio glandular solamente prolifera durante el metaestro y el diestro (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2002a).

Este comportamiento no se observa ni en las ratas inmaduras ni en las ratas adultas ovariectomizadas (ovx) tratadas con estradiol. En las ratas inmaduras una sola dosis de estrógenos (50 ng/rata) induce la proliferación en todos los tejidos uterinos: epitelios, estroma y miometrio (Kaye *et al.*, 1972; Kirkland *et al.*, 1979; Quarmby y Korack, 1984). El índice mitótico en el epitelio luminal alcanza su máximo valor 24 horas después del tratamiento (Kaye *et al.*, 1972; Kirkland *et al.*, 1979). En el estroma y miometrio el máximo índice mitótico se observa entre las 24 horas (Kaye *et al.*, 1972) y 36-48 horas (Kirkland *et al.*, 1979). El útero de la rata adulta no responde de la misma manera a los estrógenos, ya que la mitosis en el estroma de ratas ovariectomizadas solamente se presenta si la rata ha sido pretratada con progesterona (P_4). Las ratas adultas ovariectomizadas que han sido tratadas con 17β -estradiol (0.2 $\mu\text{g}/\text{rata}$) solo presentan mitosis en los epitelios luminal y glandular, pero no en el estroma. En el epitelio luminal el índice mitótico empieza a aumentar 12 h después del tratamiento con 17β -estradiol (E_2), alcanza su máximo valor a las 24 h y regresa a niveles basales a las 36 h. En el epitelio glandular el índice mitótico empieza a aumentar a las 12 h y presenta el máximo valor a las 48 h, regresando a los niveles basales 72 h después del tratamiento con E_2 (Tachi *et al.*, 1972). El pretratamiento con P_4 suprime la acción mitogénica del E_2 tanto en el epitelio luminal como glandular y causa una respuesta mitótica en el estroma en respuesta al E_2 . El estroma comienza a proliferar 12 h después del tratamiento con P_4 (5 mg diarios por 1 a 7 días) + E_2 (0.2 $\mu\text{g}/\text{rata}$), se presenta el máximo índice mitótico a las 24 h y regresa a niveles basales a las 36 h. Las células del estroma que presentan mitosis se ubican principalmente en la región que se encuentra debajo del epitelio luminal. La P_4 sola no produce mitosis en ninguno de los tejidos (Clark, 1971; Tachi *et al.*,

1972). Ya que la proliferación ocurre en todos los tejidos del útero durante el ciclo estral, se debe pensar que la cantidad de P_4 producida durante el metaestro-diestro en la rata tiene un significado fisiológico importante en lo que respecta a la proliferación del miometrio y el estroma.

3.2.3 Muerte celular del útero durante el ciclo estral

En el útero de diversos mamíferos, incluyendo el humano, se presenta la muerte celular por apoptosis (Sandow *et al.*, 1979; Pollard *et al.*, 1987; Spornitz *et al.*, 1994; Spencer *et al.*, 1996). Usando una metodología histomorfológica se ha observado muerte celular por apoptosis en el útero de la rata, en el cual se ha establecido una correlación inversa entre la proliferación y la muerte celular (Spornitz *et al.*, 1994). Varios estudios han reportado la presencia de apoptosis en el útero de la rata durante el ciclo estral, sin embargo, los resultados no coinciden con una etapa exacta en la cual se da el máximo índice apoptótico. (Sato *et al.*, 1997; Burroughs *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2000). El estudio de Sato reporta que el máximo índice apoptótico del epitelio luminal se presenta en el día del metaestro, mientras que el grupo de Burroughs y el de Lai lo reportan en el día del estro. En el epitelio glandular, tanto el grupo de Burroughs como el de Sato reportan el máximo índice apoptótico en el día del estro. En el estroma, el grupo de Burroughs reporta el máximo índice apoptótico en el día del estro mientras que Sato no detecta fluctuaciones durante todo el ciclo. En nuestro laboratorio se encontró el mayor índice apoptótico del epitelio luminal y glandular se presenta en la etapa del estro y es menor en el metaestro siendo casi nulo en el diestro y proestro (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2002b). Por lo tanto, se ha demostrado que la muerte celular programada ocurre tanto en el epitelio luminal y glandular como en células estromales en útero durante el ciclo estral, indicando que la apoptosis se presenta como un fenómeno fisiológico en el tracto reproductivo de la rata.

En otros modelos animales, tales como el útero del hámster, se ha reportado que la muerte celular programada ocurre durante el día del estro (Sandow *et al.*, 1979) y probablemente es el resultado del descenso de los niveles de E_2 en suero y el aumento de los niveles de P_4 durante esta fase del ciclo (West *et al.*, 1978).

Las células apoptóticas en este tejido presentan vacuolas en la superficie membranal, un núcleo irregular con cromatina condensada aglutinada a lo largo de la membrana nuclear, en algunas células se presentan fragmentos nucleares. Estas células son fagocitadas por células epiteliales vecinas no apoptóticas, las cuales presentan un gran contenido de vacuolas fagocíticas. Los cuerpos apoptóticos con o sin fragmentos nucleares en varios estados de digestión se encuentran dentro de vacuolas. No se encuentra infiltración de leucocitos en el epitelio en la etapa del estro, en contraste con una gran cantidad de linfocitos infiltrados junto con algunos macrófagos que penetran por los espacios intercelulares del epitelio uterino en la etapa del metaestro. Las células apoptóticas son en su mayoría fagocitadas por las células mononucleares infiltradas. Los macrófagos muestran gránulos y núcleos con algunas vacuolas que contienen cuerpos apoptóticos en varios etapas de degradación. Las características celulares de la apoptosis durante la regresión del epitelio uterino pueden ser reconocidas por medio de microscopía de luz o electrónica (Sato *et al.*, 1997; Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2002).

A diferencia del útero, la mayoría de las células epiteliales de la vagina presentan muerte celular por diferenciación terminal y no por apoptosis (Sridhar Rao *et al.*, 1998). Sin embargo, algunas células son eliminadas por apoptosis, implicando la fragmentación del DNA. Las células epiteliales de la vagina presentan cambios bioquímicos y morfológicos, durante el ciclo estral, que resultan en su división, diferenciación, cornificación y descamación. Histológicamente, el epitelio vaginal está organizado en compartimentos basales proliferativos, y compartimentos suprabasales de células diferenciadas. Las células de las capas basales migran

hacia el lumen diferenciándose de manera estratificada. Este proceso culmina en la formación de la capa de células muertas cornificadas, que finalmente se descaman hacia el lumen vaginal. Estas células muertas no presentan fragmentación de DNA y sus niveles de expresión de *bcl-2* se mantienen elevados (Sridhar Rao *et al.*, 1998).

3.3 MUERTE CELULAR PROGRAMADA (PCD) / APOPTOSIS

3.3.1 Definición

Existen dos tipos de muerte celular: la apoptosis y la necrosis (Kerr *et al.*, 1972; Ameisen, 1996; Barinaga, 1996), ambas involucran eventos bioquímicos y morfológicos que provocan la muerte celular. La necrosis es producida por un daño mecánico o por la exposición a sustancias tóxicas. Se caracteriza por la ruptura de la membrana celular debido a que el daño causa una alteración en el intercambio de iones y de agua, provocando la salida de los componentes celulares. Se presenta frecuentemente con una inflamación aguda e involucra a grupos celulares adyacentes (Ameisen, 1996). En contraste, la apoptosis o muerte celular programada (PCD) es una muerte que se produce de manera coordinada en células que se encuentran en exceso, que son peligrosas o que se encuentran dañadas (Thompson, 1995; Zörnig *et al.*, 2001). Esta muerte celular ocurre a lo largo de la vida de los organismos multicelulares y se encuentra estrictamente regulada. Tiene un papel muy importante en el desarrollo normal y la homeostasis, así como durante la embriogénesis (Abbadie *et al.*, 1993; Tata, 1994; Lang, 1997) e incluso durante la regresión de los órganos (Hsueh, 1994; Bernal y Nunez, 1995; Chun *et al.*, 1996; Evans-Storms y Cidlowski, 1996; Amsterdam *et al.*, 1997; Moulton *et al.*, 1997), e involucra generalmente células individuales de un tejido.

La PCD es tan importante como la mitosis para el control de la población celular. Algunos ejemplos en que se resalta su importancia son: a) la reabsorción de la cola del renacuajo al llevarse a cabo su metamorfosis en rana ocurre por apoptosis (Tata, 1994), b) en la formación de los dedos y pies en el feto (Lang, 1997) y durante el desarrollo de la mucosa intestinal y de la retina (Haanen y Vermes, 1996), requiere de la remoción de tejido por apoptosis, c) la regresión normal de tejidos dependientes de hormonas es inducida por cambios en las concentraciones de hormonas trópicas es mediada por apoptosis, así como en otros procesos de involución normal como la atresia folicular ovárica (Hsueh, 1994; Chun *et al.*, 1996; Evans-Storms y Cidlowski, 1996; Moulton *et al.*, 1997) y la eliminación del revestimiento interno del útero (endometrio) para iniciar la menstruación (Amsterdam *et al.*, 1997), d) la formación de conexiones entre neuronas (sinapsis) en el cerebro requiere de la eliminación de células en exceso por apoptosis (Bernal y Nunez, 1995).

Además, la PCD es requerida para eliminar células que podrían alterar la integridad del organismo como: a) células infectadas con virus, b) células del sistema inmune que provocarían enfermedades autoinmunes (Migliorati, 1994; Deist *et al.*, 1996), c) células con daño en el DNA, d) células cancerígenas por medio de radio y quimioterapia.

En general, la apoptosis ocurre en dos fases. En la primera etapa o fase de activación: la célula comprometida a morir se encoge, libera el citocromo c (Cyt c) de la mitocondria, aparecen vesículas similares a burbujas en la superficie, se compacta y segrega la cromatina en masas típicamente circunscritas. Existe irregularidad en la membrana del núcleo y de la superficie celular, condensación del citoplasma, mientras que los organelos se mantienen íntegros (Abbadie *et al.*, 1993). En la siguiente etapa o fase de ejecución, se observan los cambios más dramáticos de la muerte celular: el núcleo se fragmenta, el citoplasma se condensa y se forman protuberancias en la superficie celular. La separación de las protuberancias superficiales produce cuerpos apoptóticos de varios tamaños y

diferente composición. La fosfatidilserina un fosfolípido de membrana, se expone en la superficie celular y se une a los receptores de células fagocíticas como macrófagos o células dendríticas. Estas células fagocitan los fragmentos celulares apoptóticos. Estos eventos son tan ordenados que al proceso se le llama frecuentemente **muerte celular programada (PCD)** (Hengartner, 2000).

3.3.2 Bioquímica de la apoptosis.

El proceso de PCD involucra la reprogramación epigenética en la célula que da como resultado una cascada de cambios bioquímicos dependiente de energía. Por lo tanto, la apoptosis es un proceso activo que requiere de ATP. El estímulo apoptótico puede ser extracelular o generarse en el interior de la célula y desencadenar una señal que activa un programa de muerte principalmente ejecutado por una familia de proteasas (caspasas) (Figura 2). La activación de esta cascada de amplificación trae como consecuencia la inactivación de un gran número de proteínas estructurales, de señalización, reguladoras de transcripción y del metabolismo de ácidos nucleicos, lo cual desemboca en la muerte celular (Cohen, 1997).

Los primeros estudios que identificaron a las caspasas como esenciales para la muerte celular se obtuvieron a través de estudios genéticos con el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Yuang *et al.*, 1993). Estas proteínas se han conservado a través de la evolución. En el humano se han identificado más de una docena, de la cual se ha sugerido que dos tercios tienen una función apoptótica (Thornberry y Lazebnik, 1998). Estas proteínas son las principales efectoras de la apoptosis y reciben el nombre de caspasas (**cisteine-aspartic acid proteinases**) porque en el sitio activo tienen un residuo de cisteína y cortan las proteínas después de un residuo de ácido aspártico (Asp-Xxx). La especificidad del sustrato para una caspasa está dada por los cuatro residuos amino terminal a el sitio de hidrólisis del enlace peptídico (Cohen, 1997).

La cascada de caspasas se inicia por un estímulo que activa un zimógeno (pro-caspasa) para dar como resultado una enzima que puede funcionar como activadora de otras caspasas inactivas y así sucesivamente, amplificando el estímulo. Hasta ahora se han reportado al menos tres mecanismos responsables de activación de caspasas (Figura 3):

- a. **Proteólisis cascada arriba**, ya sea por las mismas caspasas o por una granzima B (responsable de la actividad citotóxica de los linfocitos Tc). La proteólisis se lleva a cabo entre los dominios p20 y p10 e incluso entre el prodominio y el dominio p20 de la pro-caspasa, los cuales contienen un residuo Asp-Xxx, sugiriendo una activación autocatalítica (Thornberry *et al.*, 1997). Esta "estrategia" para activar la cascada de caspasas se presenta en las células para activar caspasas con prodominios cortos como las caspasas 3, 6 y 7, las cuales son consideradas como las caspasas más abundantes y activas.
- b. **Proximidad inducida**. La cascada de caspasas se activa vía receptor de muerte con dominios que se acoplan a a pro-caspasas (pro-caspasa 8) mediante moléculas adaptadoras (Salvesen y Dixit, 1999).
- c. **Formación de holoenzima**. Esta activación depende de la liberación de *cyt c* por la mitocondria y la oligomerización dependiente de ATP, de Apaf-1 (una proteína que) al unirse a la procaspasa 9 provocan un cambio conformacional activándola (Rodríguez y Lazebnik, 1999).

Una vez activadas las caspasas, su función no solamente es la degradación de proteínas, sino que en la mayoría de los casos, inactivan o activan proteínas. La activación de éstas se realiza en forma directa por la eliminación de un dominio regulador negativo o en forma indirecta por la inactivación de la subunidad reguladora. Hasta ahora se han identificado varios sustratos importantes para las

caspasas. Un ejemplo de un mecanismo de activación responsable de la famosa escalera nucleosomal, es la activación de la nucleasa activada por caspasa (CAD), la cual existe en la célula formando un complejo con una subunidad inhibidora (ICAD) (Nagata, 2000). La caspasa-3 activa a la CAD mediante la eliminación de la subunidad inhibidora, causando la liberación y activación de la subunidad catalítica (Enari, 1998; Sakahira *et al.*, 1998). El DNA es cortado en sitios inter-nucleosomales por endonucleasas neutras sensibles a Ca^{2+} y Mg^{2+} y pueden ser inhibidas por zinc (Galli *et al.*, 1995). Por otro lado, las células apoptóticas requieren de la síntesis de RNA y proteínas (Thompson, 1995). El retraso o la interrupción de la apoptosis por inhibición de la síntesis macromolecular es bien conocida. Además, se requieren varias enzimas de degradación y proteínas reguladoras que mantienen el control sobre la cascada apoptótica. Las células apoptóticas expresan grandes cantidades de mRNA que codifican para éstas (Lavin y Watters, 1993).

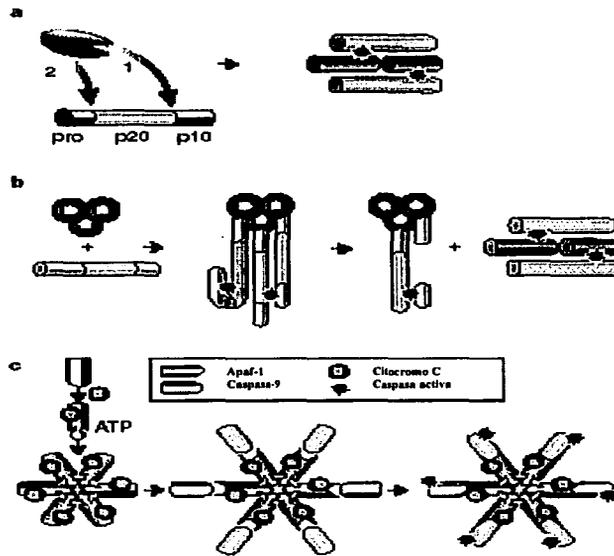


Figura 2. Mecanismos de activación de las caspasas (modificado de Hengartner, 2000).

La regulación de la apoptosis está mediada por señales necesarias para que una célula permanezca viva y señales de muerte. Entre las primeras se encuentra la estimulación continua que recibe una célula de otras células por medio de una adhesión continua a la superficie de aquella que se encuentre en crecimiento. Algunas de éstas son factores de crecimiento y citocinas como las interleucinas (por ejemplo: Interleucina-2). Entre las señales de muerte se encuentra el incremento en los niveles de sustancias oxidantes dentro de la célula, daño al DNA por medio de sustancias oxidantes, agentes físicos como rayos ultravioleta, rayos X, o químicos como los fármacos quimioterapéuticos; moléculas que se unen a receptores específicos en la superficie celular que funcionan como activadores de muerte (ver apoptosis vía receptor). Dos vías apoptóticas han sido identificadas, la vía del receptor de muerte (Schmitz *et al.*, 2000) y la vía mitocondrial que se encuentra regulada por los miembros de la familia de Bcl-2 (Figura 3) (Tsujimoto y Shimizu, 2000).

La vía del receptor de muerte se encuentra controlada por citocinas, una familia de proteínas que regula la proliferación y diferenciación celular por medio de receptores específicos en las células blanco. Estas proteínas forman la familia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) e incluyen el TNF, Ligando de Fas (FasL o CD95L), linfotóxina, ligando 4-1BB, ligando CD40, ligando CD27, ligando CD30 y TRAIL (ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF). Estas proteínas se unen a su respectivo receptor de la familia del receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNFRF) que incluye dos TNFRs (TNFR1 y TNFR2), receptor Fas (conocido también como APO-1 o CD95), el receptor para linfotóxina- β , el receptor NGF (p75), CD40, CD27, CD30 y DR5 (Suda *et al.*, 1993; Nagata y Golstein, 1995). Estos receptores se encuentran ubicados en la membrana citoplasmática y contienen un dominio intracelular que es fundamental para la transducción de la señal apoptótica. Se activan por un ligando específico o por la sobreexpresión de los mismos receptores en ausencia del ligando. La activación del receptor induce la trimerización del mismo, lo cual induce el reclutamiento de proteínas adaptadoras intracelulares y la subsecuente activación de la cascada de caspasas

(Figura 3). Por ejemplo, los factores pro-apoptóticos como TNF o FASL (ligando) producen su señalización a través de receptores de membrana (TNFR o Fas/CD95), que mediante dominios intracelulares de interacción proteica denominados dominios de muerte (DD) interactúan con proteínas intracelulares como la proteína TRADD (en TNFR), y/o proteínas acopladoras como las proteínas FADD (que se une tanto a TNFR como a Fas), las cuales a su vez reclutan a la procaspasa-8 mediante sus dominios efectores de muerte (DED) para finalizar con la activación de la caspasa-8, la cual puede activar la cascada de caspasas por procesamiento proteolítico de la caspasa-10. La caspasa-10, quizás sea activada por factores que dañan al DNA, y también es capaz de procesar a todas las caspasas conocidas (Irmiler *et al.*, 1997).

La vía mitocondrial se induce en respuesta a una estímulo extracelular o señales internas como ocurre en el daño al DNA (Rich *et al.*, 2000) (Figura 3). Ambas vías de señalización apoptóticas convergen en la mitocondria, por la activación de un miembro pro-apoptótico de la familia de proteínas de Bcl-2 mediante proteólisis, desfosforilación o probablemente otros mecanismos (Antonsson, 2001).

Las proteínas Bcl-2 y Bcl-x_L que se encuentran en la mitocondria previniendo la muerte celular, pueden interactuar con proteínas pro-apoptóticas como Bax, Bad, Bim y Bid que se encuentran entre el citosol y los organelos. Las señales pro-apoptóticas reclutan los miembros pro-apoptóticos a la mitocondria, compitiendo con los miembros anti-apoptóticos para regular la salida del Cyt c por un mecanismo que aún se encuentra en discusión (Tsujimoto y Shimizu, 2000) (ver sección 3.4). Si existe una ganancia de la función pro-apoptótica por parte de los miembros de la familia Bcl-2, ocurre la liberación del Cyt c, el cual se une a Apaf-1 y a la pro-caspasa 9 para formar el apoptosoma, una holoenzima. Se ha visto que algunas proteínas de choque térmico (HSP) actúan en múltiples pasos de esta vía para regular la apoptosis (Jaattela, 1999; Xanthoudakis y Nicholson, 2000).

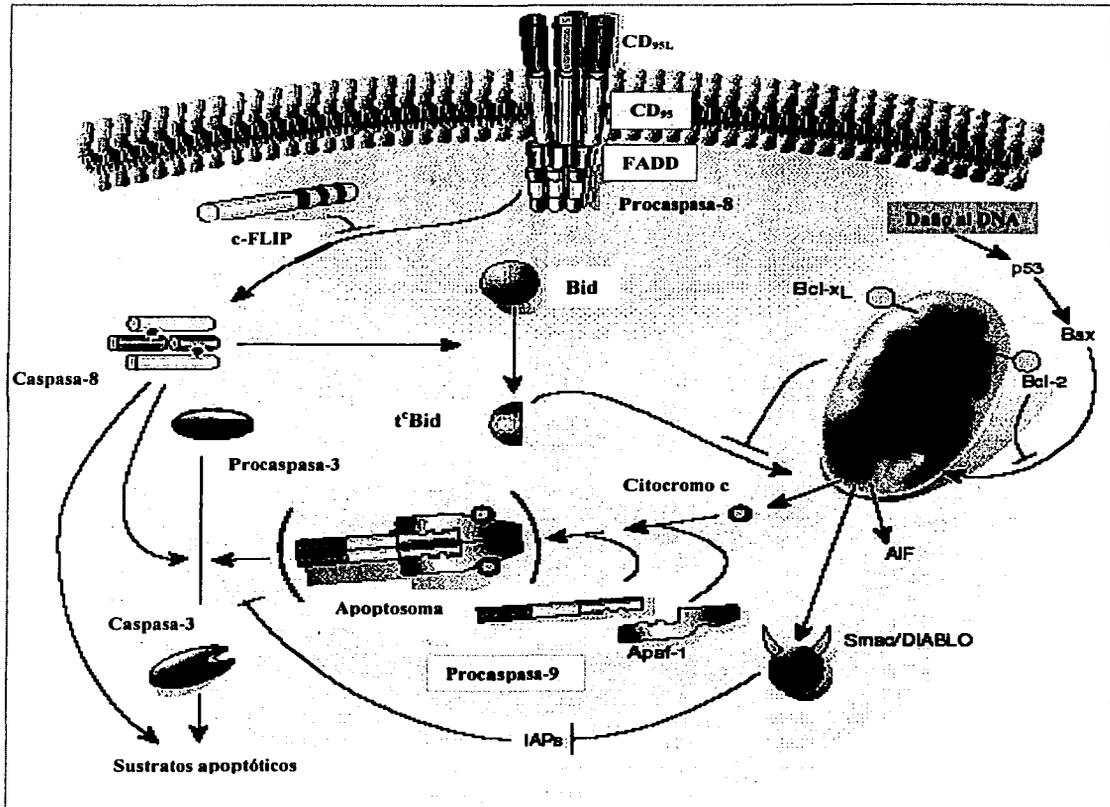


Figura 3. Esquema que simplifica las vías apoptóticas conocidas. Se muestra la parte superior izquierda está representada la vía controlada por el receptor de muerte (CD95 / Fas / APO-1). En la parte superior derecha se muestra la vía mitocondrial. Ambas vías controlan el balance entre los mecanismos de activación e inhibición de las caspasas, proteínas encargadas de llevar a cabo la muerte celular (ver texto) (modificado de Hengartner, 2000).

La vía del receptor de muerte y mitocondrial convergen a nivel de la activación de la caspasa 3. La activación de la caspasa-3 y su actividad es antagonizada por proteínas inhibitoras de la apoptosis (IAPs), las cuales a su vez son antagonizadas por la proteína Smac/DIABLO liberada de la mitocondria. La caspasa-3 se une a la subunidad inhibidora de una nucleasa: la DNAasa activada por caspasa (CAD), activando la subunidad catalítica (Enari *et al.*, 1998; Sakahira *et al.*, 1998), la cual se encuentra en condiciones normales formando un complejo inactivado con su inhibidor llamado (ICAD) (Nagata, 2000).

3.4 LA FAMILIA DE PROTEÍNAS Bcl-2

3.4.1 Generalidades

El mecanismo de la apoptosis es regulado por medio de varios genes. Entre los más caracterizados se encuentra la familia de proteínas similares a Bcl-2 (Adams y Cory, 1998). Tal mecanismo de apoptosis, parece conservarse a través de la evolución, ya que tanto mamíferos como el nemátodo *C. elegans* comparten moléculas con un papel importante en la apoptosis que, además, presentan un mecanismo común para activar a las caspasas (Alnemri *et al.*, 1996; Thornberri y Lazabnik, 1998).

En un principio, se observó que la proteína Bcl-2 inhibía la muerte celular inducida por la disminución de interleucina 3 (IL-3) (Vaux *et al.*, 1998). Después se mostró que inhibía la muerte celular inducida por otros estímulos incluyendo agentes quimioterapéuticos y choque térmico (Tsujimoto, 1989). Recientemente, se han aislado un gran número de proteínas similares a Bcl-2. Esta familia está integrada por más de 12 proteínas que se han dividido en tres grupos funcionales (Figura 4) (Adams y Cory, 1998; Antonsson y Martinou, 2000):

Grupo I. Se caracterizan por tener cuatro dominios conservados homólogos a Bcl-2 (Dominios BH1-BH4), aunque algunos miembros carecen del dominio BH4. Su extremo carboxilo terminal es hidrofóbico (lo cual hace que se localice en la membrana externa de la mitocondria y ocasionalmente en el retículo endoplásmico) con la mayor parte de la proteína en el citosol. Todos los miembros de este grupo tienen actividad antiapoptótica y son: Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, A1 (Bfl-1) y Boo.

Grupo II. Consiste en miembros con actividad pro-apoptótica e incluye a proteínas como Bax, Bak, Bad, Mtd (Bok), Diva. Estas proteínas tienen una estructura muy similar a las proteínas del primer grupo, ya que comparten una secuencia homóloga en BH1, BH2 y BH3 pero no tienen homología en el dominio BH4, aunque se ha encontrado un dominio homólogo a BH4 entre algunos miembros de esta familia como Bcl-rambo (Kataoka *et al.*, 2001).

Grupo III. En éste se encuentran proteínas que sólo tienen una característica en común, la presencia del dominio BH3 que consiste de 12-16 aminoácidos (Adams y Cory, 1998). Estas proteínas tienen una actividad pro-apoptótica e incluye a Bik, Bid, Bim, Hrk (DP5), Blk y Bnip3, Bnip3L.

El dominio BH4 forma una hélice α (α_1). Entre los dominios BH3 y BH2 se forman seis hélices α (α_2 - α_7). Las hélices α_5 y α_6 son hidrofóbicas y se encuentran rodeadas por las hélices anfipáticas. Una región curvada formada entre las hélices α_1 y α_2 de los dominios BH4 y BH3, parece tener un papel regulador en la proteína. El segmento que comprende del dominio BH3 al BH2 es necesario para la dimerización de esta familia de proteínas. El segmento que abarca del dominio BH1 a BH2 es necesario para la formación del canal. Algunos estudios de estructura- función sugieren que regiones relativamente grandes de la proteína, incluyendo las dos grandes hélices α que participan en la inserción a la membrana, pueden determinar la interacción entre los miembros (Reed, 1997).



Figura 4. Representación esquemática de los grupos de la familia de proteínas Bcl-2. El Grupo I está formado por proteínas antiapoptóticas que contienen los dominios BH1-BH4. El Grupo II presenta una secuencia conservada para los dominios BH3, BH1 y BH2, los miembros de este grupo son proapoptóticos. El Grupo III solamente presenta una secuencia conservada en el dominio BH3, el cual es necesario para producir la apoptosis. Un dominio que se ancla a la membrana de la mitocondria (dominio transmembranal –TM–), no se encuentra presente en todos los miembros de la familia (modificado de Hengartner, 2000).

Esta interacción entre los miembros de la familia Bcl-2 se ha estudiado con técnicas como la co-inmunoprecipitación, ensayos de unión *in vitro* y experimentos *crosslinking* (Oltvai *et al.*, 1993; Zha *et al.*, 1997; Hirotsu *et al.*, 1999; Minn *et al.*, 1999). Se piensa que la formación de complejos de homo y heterodímeros puede regular la actividad de estas proteínas que a su vez regulan la apoptosis. Sin embargo, basándose en observaciones con ratones transgénicos y *knockout* se ha sugerido que algunas proteínas regulan la apoptosis independientemente de los otros miembros (Knudson y Korsmeyer, 1997). La heterodimerización está mediada por la inserción de la región BH3 de una proteína pro-apoptótica en la porción hidrofóbica formada por las regiones BH1, BH2 y BH3 de una proteína anti-apoptótica (Sattler, 1997). Hasta ahora se ha demostrado que la regulación de la apoptosis se puede llevar a cabo a través de modificaciones postraduccionales que inducen cambios conformacionales en estas proteínas y por lo tanto modulan

su translocación en la mitocondria o su afinidad de dimerización (Desagher *et al.*, 1999; Haldar *et al.*, 1995) al causar la exposición del dominio BH3 de proteínas pro-apoptóticas por medio de mecanismos como la fosforilación provocada al encenderse las señales proapoptóticas (Zha *et al.*, 1996). Más adelante se hablará sobre los cambios postraduccionales específicos conocido hasta ahora de las proteínas estudiadas en esta tesis.

El mecanismo de acción de los miembros anti-apoptóticos en las células vivientes, es la prevención de cambios mitocondriales como la liberación de factores apoptogénicos (citocromo *c* y el factor inductor de la apoptosis –AIF-) del espacio intermembranal al citoplasma (Susin *et al.*, 1999). Sin embargo, no se sabe cuál es el mecanismo exacto, por el cual los miembros de la familia Bcl-2 actúan para liberar al Cyt *c*, la proteína pro-apoptótica más conocida que además de tener la función de acarrear electrones y de participar en la fosforilación oxidativa, es necesaria en el citosol para formar una holoenzima junto con la caspasa 9 y Apaf-1 llamada apoptosoma, la cual activa la cascada de caspasas para activar finalmente a la caspasa-3, que es considerada como la caspasa central en la fase de ejecución, en la cual convergen las vía apoptótica mitocondrial con la vía del receptor de muerte (Figura 3).

Se han sugerido varios mecanismos de acción (Figura 5) para la función de las proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 para la liberación del Cyt *c* :

- La formación de un poro en la membrana mitocondrial externa, a través del cual el Cyt *c* y otras proteínas intermembranales pueden salir al citosol. Por ejemplo, proteínas pro-apoptóticas como Bax y Bak, forman un poro en membranas sintéticas que altera la permeabilidad de las mismas causando la liberación de Cyt *c* y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial acompañada de la liberación AIF. Además, se ha visto que estos cambios pueden ser inhibidos por Bcl-2 y Bcl-x_L (Jurgensmeier *et al.*, 1998; Narita *et al.*, 1998; Shimizu *et al.*, 1998).

- Formación de un heterodímero con los miembros pro- y anti-apoptóticos (Sattler, 1997). La estructura similar de las proteínas de la familia Bcl-2 con la toxina diftérica y colicinas, sugiere que las proteínas pueden formar un canal en la mitocondria (Antonsson *et al.*, 1997; Minn *et al.*, 1997; Schlesinger *et al.*, 1997). Esto, además se ha comprobado en membranas sintéticas (Jurgensmeier *et al.*, 1998; Narita *et al.*, 1998; Shimizu *et al.*, 1998).

- Regulación directa de las caspasas por medio de moléculas adaptadoras, como se ha descrito para *C. elegans*. En mamíferos se han encontrado proteínas adaptadoras tales como BAR (Zhang, 2000), la proteína localizada en el retículo endoplásmico Bap31 (Ng, 1997) y Aven (Chau *et al.*, 2000).

- Interacción con otras proteínas mitocondriales como el canal de aniones dependiente del voltaje (VDAC) y el transportador del nucleótido de adenosina (ANT), lo cual permite la liberación de Cyt *c* o modular la homeostasis mitocondrial (por ejemplo, al abrir el poro de transición de la permeabilidad -PTP-) (Marzo *et al.*, 1998).

- Oligomerización de una proteína para formar un canal iónico débilmente selectivo. Se ha descrito que la proteína recombinante de Bax, puede formar canales capaces de liberar al cyt *c* de membranas sintéticas sin requerir ninguna otra proteína, por la formación *in vitro* de oligómeros de 80 y 160 kDa (Antonsson, 1997).

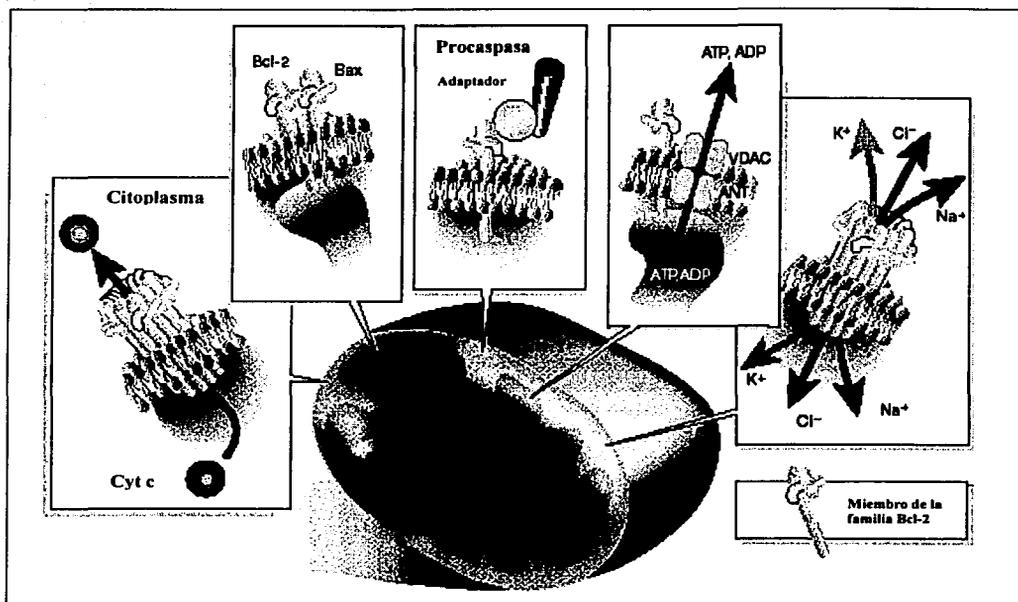


Figura 5. Posibles mecanismos de acción de los miembros de la familia Bcl-2 para provocar la translocación del Cyt c al citosol desde el espacio intermembranal de la mitocondria (Hengartner, 2000).

Es difícil considerar que una sola proteína induzca la muerte celular por apoptosis. Por ello se piensa que ésta es resultado de un posible punto de convergencia para varias señales de vida o muerte dadas por proteínas la familia Bcl-2 (Tsujimoto, 1998). Esto sugiere que la presencia de los diferentes miembros de la familia Bcl-2 es un factor importante sobre el control de la apoptosis.

3.4.2 Bcl-2

El gen *bcl-2* (Linfoma de células B/leucemia 2) fué descubierto por Tsujimoto y col. en la translocación cromosomal t(14;18) de linfomas no-Hodgkinianos de células B (Tsujimoto *et al.*, 1985). Esta translocación provoca una desregulación de la expresión del gen *bcl-2* debido a su yuxtaposición con el *locus* del gen que codifica para la cadena pesada de la inmunoglobulina. El gen de *bcl-2* codifica para una proteína de 24 kDa, la cual es la mejor caracterizada de la familia Bcl-2 (Reed, 1994; Yang y Korsmeyer, 1996). La porción amino terminal incluye el dominio BH4 entre los aminoácidos 10 y 30, necesario para la homodimerización de Bcl-2. Sin embargo, se ha visto que los dominios BH1 (aminoácidos: 136-155) y BH2 (aminoácidos: 187-202) son indispensables, ya que forman una estructura reconocida por el dominio BH4 (Hanada *et al.*, 1995). La capacidad de Bcl-2 para translocarse en la membrana mitocondrial se ha atribuido a la presencia del dominio transmembranal (TM) ubicado en la porción carboxilo terminal entre los aminoácidos hidrofóbicos 219 y 237, y orientado hacia el citoplasma (Chen-Levy *et al.*, 1989; Jacobson *et al.*, 1993).

En un estudio para identificar y caracterizar esta proteína realizado por Chen-Levy y col. (1989), se encontró que ésta es de una naturaleza lipofílica y se encuentra asociada a la membrana de compartimentos subcelulares como el retículo endoplásmico y la membrana nuclear. En otros estudios sobre su localización en células B utilizando microscopía confocal con láser y estudios de fraccionamiento, se encontró como una proteína integral en la membrana mitocondrial (Hockenbery *et al.*, 1990). Además, el análisis de la secuencia de aminoácidos mostró que la proteína no puede participar en la transducción de señales y que además no puede ser glucosilada, estas características estructurales son similares al citocromo *b5*, una proteína mitocondrial involucrada en el transporte de electrones (Chen-Levy *et al.*, 1989).

El mecanismo exacto por el cual Bcl-2 inhibe la apoptosis al evitar la liberación del Cyt c de la mitocondria y consecuentemente la activación de

caspasas aún no se conoce. No se sabe si la homodimerización de Bcl-2 puede tener un efecto directo sobre la muerte celular. Sin embargo, en experimentos de dos híbridos en levadura se observó que Bcl-2 formaba dímeros consigo mismo así como heterodímeros con Bax, Bcl-x_L, Bcl-x_S y Mcl-1 debido a la presencia del dominio BH4, el cual se requería para inhibir la acción de proteínas pro-apoptóticas (Bax y Bcl-x_S) (Sato, 1994; Yin *et al.*, 1994; Hanada *et al.*, 1995). Esto comprobó los resultados obtenidos por Oltvai y col. en experimentos de co-inmunoprecipitación, donde se observó que Bcl-2 formaba heterodímeros o heteromultímeros con Bax. En estudios más recientes, se ha comprobado que Bcl-2 inhibe la activación y oligomerización de Bax (Antonsson *et al.*, 2001; Mikhailov *et al.*, 2001). Sin embargo, aunque el mecanismo permanece aun sin esclarecerse y debe depender de cada tipo celular o de el estímulo apoptótico, es bien sabido que Bcl-2 puede inhibir la apoptosis ya sea por la formación de heterodímeros con miembros pro-apoptóticos de la familia de proteínas de Bcl-2 o por evitar modificaciones postraduccionales necesarias para la activación de proteínas pro-apoptóticas.

Además, la función anti-apoptótica de Bcl-2 se ha reportado en una gran variedad de células bajo condiciones fisiológicas, patológicas y experimentales. Por ejemplo, la sobre-expresión de Bcl-2 puede inhibir la muerte celular inducida por p53 (Reed, 1994; Bissonnette *et al.*, 1992). Así mismo, Bcl-2 puede proteger de la apoptosis a cultivos celulares neuronales primarios (García *et al.*, 1992) como a células PC12 cuando existe una disminución del factor de crecimiento (Hockenbery *et al.*, 1990). Timocitos de ratón que sobre-expresan Bcl-2 fueron resistentes a la muerte inducida por glucocorticoides y rayos γ como por el receptor anti-células T (Sentman *et al.*, 1991; Strasser *et al.*, 1991). Sin embargo, en algunas circunstancias la sobre-expresión de Bcl-2 no es suficiente para prevenir la apoptosis. Un ejemplo de esto se ha observado durante la selección negativa de clones de timocitos autorreactivos (Nuñez, 1990; Allsopp *et al.*, 1993; Cuende *et al.*, 1993) o en muestras cancerígenas de pacientes que muestran niveles altos de la proteína durante una respuesta adecuada a la quimioterapia

(Ruvolo *et al.*, 2001). Esto indica que la simple expresión de Bcl-2 puede no tener una acción antiapoptótica debido a la existencia de una vía de regulación de la muerte celular fisiológica independiente de Bcl-2. De hecho, se ha visto que la apoptosis puede ser regulada por la fosforilación de Bcl-2 (Haldar *et al.*, 1995). La fosforilación de la proteína en el sitio serina 70 afecta la capacidad de Bcl-2 para formar dímeros, dando como resultado la pérdida de su función anti-apoptótica. La fosforilación de Bcl-2 puede inducirse por fármacos anti mitóticos como el paclitaxel y afectar su función (Ruvolo *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha sugerido la regulación de la expresión de *bcl-2* en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, el nivel de expresión de Bcl-2 se ha visto involucrado durante la involución en respuesta a un estímulo hormonal o factores de crecimiento. En epitelio complejo como la piel o intestino, Bcl-2 se encuentra restringido a las células o zonas en proliferación (Hockenbery *et al.*, 1990). Por lo que Bcl-2 puede ser necesario para mantener un estado vivo en las células. Sin embargo, a pesar del progreso en la definición del papel de Bcl-2 en condiciones fisiológicas, las bases moleculares de su acción aún no se conocen.

Bcl-2 es el primer miembro de una familia de proteínas homólogas que regulan la apoptosis. Se han observado altos niveles de la proteína en muchos tipos de cáncer, incluyendo en 90% de cáncer colorectal, en 30-60% de adenocarcinomas de próstata, en 70% de cáncer de mama, en 20% de carcinomas de pulmón y en 65% de linfomas (Reed, 1994). *In vitro*, los niveles de Bcl-2 tienen una función importante en la regulación de la respuesta de células tumorales a la inducción de apoptosis por fármacos quimioterapéuticos y radiación. La sobre-expresión de Bcl-2 se ha asociado con una resistencia a agentes terapéuticos, así mismo una disminución en su expresión se ha correlacionado con un incremento en la sensibilidad a tratamientos anticancerígenos (Miyashita y Reed, 1992, 1993; Kitada *et al.*, 1994; Campos *et al.*, 1994). *In vivo*, la expresión de Bcl-2 se ha asociado con una respuesta débil de pacientes con cáncer (Yunis *et al.*, 1989; McDonnell *et al.*, 1992). Por ello, el estudio de la participación de Bcl-2 en la apoptosis y su interacción

con otros miembros de la familia de Bcl-2, puede ser de gran ayuda para mejorar el tratamiento para cáncer.

3.4.3 Bax

La proteína X asociada a Bcl-2 (Bax), fue la primera proteína aislada mediante co-inmunoprecipitación con Bcl-2 (Oltvai *et al.*, 1993). La proteína está codificada por seis exones que pueden dar lugar a una proteína de membrana de 21 kDa (α) y dos proteínas citosólicas (β y γ) (Oltvai *et al.*, 1993). Además, se han descrito variantes de esta proteína formados por splicing alternativo (Apte *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 1999). Bax es una proteína pro-apoptótica multidominio, contiene dominios conservados de Bcl-2: BH1, BH2, BH3 y TM; los cuales se encuentran ubicados entre los aminoácidos 98 y 118, 150 y 165, 59 y 73, 169 y 188, respectivamente. Los dominios BH1 y BH2 son necesarios para la homodimerización y la heterodimerización con Bcl-2 y Bcl-x_L (Yin *et al.*, 1994; Sadlak *et al.*, 1995). El dominio BH3, es requerido para la función pro-apoptótica, después de la activación de Bax, éste es expuesto para permitir la formación de complejos pro-apoptóticos (Suzuki *et al.*, 2000) u oligómeros localizados en la membrana mitocondrial (Antonsson *et al.*, 2001). En algunos estudios sobre la estructura de Bax, se ha encontrado que es la única proteína que presenta una hélice hidrofóbica en el extremo carboxilo necesaria para interactuar con la hendidura formada por el dominio BH3 de las otras proteínas de la familia Bcl-2 (Petros *et al.*, 2001). Esto sugiere una capacidad extra de Bax para interactuar y formar complejos.

En células o tejidos normales, Bax se localiza en el citosol como un monómero se ha observado la translocación de Bax del citosol a la mitocondria después de un estímulo apoptótico, la cual está acompañada por un cambio conformacional en su estructura cuaternaria (Hsu y Youle, 1998; Antonsson *et al.*, 2000). Esta translocación se ha visto acompañada por cambios conformacionales

que promueven la formación de complejos proteicos de Bax en la mitocondria. Estos complejos proteicos pueden ser inhibidos por Bcl-2, ya que cuando este último se sobre-expresa inhibe la oligomerización de Bax (Mikhailov *et al.*, 2001).

La activación de Bax produce un cambio conformacional que remueve el dominio carboxilo terminal insertado en el dominio BH3 y hace que éste se encuentre accesible para interactuar con otras proteínas y permitir la oligomerización (Suzuki *et al.*, 2000). Por otro lado, se ha visto que la oligomerización de Bax se requiere para que ésta pueda formar canales en la mitocondria. Estos canales presentan múltiples niveles de conductancia, son sensibles a pH, ligeramente selectivos a cationes e insensibles al calcio (Antonsson *et al.*, 1997; Schlesinger *et al.*, 1997). Un estudio sobre la oligomerización de Bax inducida en forma artificial por detergentes, mostró que la proteína podía formar complejos de 80 kDa, los cuales a su vez podían formar dímeros de 160 kDa que corresponderían a tetrámeros y octámeros de Bax, respectivamente (Antonsson *et al.*, 2000). Sin embargo, esta formación de complejos dependía de la concentración del detergente. En un estudio realizado por Saito y *col.* (2000) se demostró que los tetrámeros de Bax eran capaces de liberar al Cyt c de liposomas. Sin embargo, varios estudios realizados para analizar la proteína utilizando SDS-PAGE han identificado a dímeros de Bax en extractos de células apoptóticas, sugiriendo que ésta puede ser su estructura activa (Simonian *et al.*, 1996; Zha *et al.*, 1996; Gross *et al.*, 1998). Sin embargo, estas estructuras podrían ser resistentes a las condiciones de SDS-PAGE y ser derivadas de oligómeros.

Una vez que Bax se encuentra en la mitocondria, lleva a cabo la liberación del Cyt c y otras proteínas como AIF, adenilato cinasa, endonucleasa G y Smac/DIABLO del espacio intermembranal (Daugas *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001). Varios modelos se han sugerido para la liberación del Cyt c basados en información obtenida en diferentes estudios: la formación de canales por Bax con homodímeros o con otras proteínas como el canal aniónico

dependiente de voltaje (VDAC) o el transportador del nucleótido de adenosina (ANT), la formación de poros por Bax que desestabilizan la membrana mitocondrial externa reduciendo la tensión linear sin la formación de canales iónicos (Basanez *et al.*, 1999) y la apertura del poro de transición de la permeabilidad (PTP) por Bax. Se ha obtenido evidencia de que proteínas recombinantes de Bax pueden formar canales en membranas artificiales sin necesidad de adicionar otras proteínas y pueden liberar el *Cyt c* (Antonsson *et al.*, 1997). Sin embargo, al extraer los complejos formados por Bax en la mitocondria de células HeLa o HEK apoptóticas se encontró que Bax podía formar oligómeros de diferente tamaño (Antonsson *et al.*, 2001) o complejos proteínicos que no eran múltiplos de Bax. El tamaño de los oligómeros recombinantes era de 80 - 160 kDa y los extraídos de la mitocondria de un tamaño de 96 - 250 kDa. Lo cual indica que el número de subunidades de Bax es diferente o que los oligómeros aislados de la mitocondria contienen proteínas adicionales. Además, en un estudio reciente con microscopía confocal y electrónica se observó que durante la apoptosis Bax se agrupaba en la membrana mitocondrial con Bak (una proteína que se encuentra normalmente dispersa en la membrana mitocondrial externa) pero aún no se ha determinado su función fisiológica (Nechustan *et al.*, 2001). Esta agrupación fue prevenida por la coexpresión de Bcl-x_L. Por el contrario, varios estudios han propuesto que Bax puede tener una actividad permeabilizadora al abrir el poro de transición de la permeabilidad (PTP). El PTP es un complejo formado por el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) en la membrana externa, el transportador del nucleótido de adenosina (ANT) en la membrana interna, ciclofilina D como proteína matriz, cratincinasa del espacio intermembranal y hexocinasa citosólica. La actividad permeabilizadora de Bax a través de PTP se ha atribuido a ésta debido a la disminución del potencial de membrana y a la inhibición de la liberación del *Cyt c* por ciclosporina A (un inhibidor del PTP) durante la apoptosis inducida por Bax (Narita *et al.*, 1998). Además de que se ha demostrado la interacción del complejo PTP con algunos miembros de la familia Bcl-2 como Bax, Bcl-2 y Bcl-x_L (Beutner *et al.*, 1998; Marzo *et al.*, 1998b; Crompton *et al.*, 1999). Sin embargo, en la mayoría de los estudios de apoptosis, la mitocondria

permanece intacta, lo cual sugiere que la activación del PTP no está involucrada. Además la actividad permeabilizadora de Bax no se altera por la adición de inhibidores del PTP como ciclosporina A, EDTA, o Mg^{2+} . De hecho, el Mg^{2+} aumenta la liberación del *Cyt c* por Bax (Eskes *et al.*, 1998). Por otro lado, cuando Bax se sobre-expresa o se adiciona a la mitocondria aislada, los cambios en la mitocondria como la disminución en el potencial transmembranal se recuperan después de 30 a 60 minutos (Waterhouse *et al.*, 2001). En algunos estudios Bax sólo es activo en presencia de calcio (Ca^{2+}). Sin embargo, éste es capaz de abrir por sí mismo el PTP e inducir la liberación del *Cyt c*.

En algunos estudios, se ha sugerido que Bax puede interactuar con proteínas adicionales como el canal de aniones dependiente del voltaje (VDAC) en la apoptosis inducida por Bax, funcionando como una proteína receptora en la membrana mitocondrial y dando cierta especificidad a la mitocondria como blanco de Bax durante la apoptosis. Si VDAC es necesaria para la liberación del *Cyt c* o es parte de la estructura que forma el canal aún permanece sin esclarecerse. Ya que algunos estudios reportan que VDAC se requiere para la liberación del *Cyt c* (Shimizu *et al.*, 2000) mientras que otros muestran que los oligómeros de Bax por sí mismos son capaces de liberar el *Cyt c* (Saito *et al.*, 2000). Una explicación a esta diferencia podría ser que la estructura cuaternaria de Bax puede influir en la capacidad para formar canales ya que los monómeros no forman canales. Por otro lado, un estudio con levaduras deficientes de canal de aniones dependiente del voltaje (VDAC), mostró que la liberación del *Cyt c* por acción de Bax es eficiente independientemente de la presencia de VDAC (Priault *et al.*, 1999). Se ha demostrado por co-inmunoprecipitación y sistema de dos híbridos en levadura que Bax interactúa con el transportador del nucleótido de adenosina (ANT), una proteína de la membrana mitocondrial interna que forma parte del complejo PTP. Bax sólo indujo la muerte celular en presencia de ANT en levaduras (Marzo *et al.*, 1998a). Además, Bax aumenta la actividad de ANT, la cual forma canales en membranas lipídicas y este efecto se ve inhibido por Bcl-2 (Brenner *et al.*, 2000). La importancia fisiológica de la interacción de ambas proteínas no se conoce, ni

tampoco se conoce algún inhibidor fisiológico requerido para mantener esta actividad inhibida a concentraciones fisiológicas de ATP.

Por otro lado, se ha sugerido que Bax puede tener un efecto adicional a la actividad pro-apoptótica en la mitocondria. Ya que se ha visto que Bax puede intervenir en la cadena respiratoria. La activación de Bax induce cambios en el pH intracelular: alcalinización del espacio intermembranal y acidificación del citosol. En un estudio sobre la translocación de Bax provocada por una disminución en la concentración de interleucina-7, se observó un incremento en el pH intracelular (Khaled *et al.*, 1999). Otro estudio mostro que durante la apoptosis por vía mitocondrial ocurre una acidificación del citosol y una alcalinización mitocondrial. Estos cambios no se encontraron durante la apoptosis inducida vía receptor de muerte (Matsuyama *et al.*, 2000). Sin embargo aún no se sabe si los cambios intracelulares de pH son una causa o un resultado de la apoptosis por vía mitocondrial. La formación de canales de Bax ocurre a pH neutro, mientras que otras proteínas anti-apoptóticas solo tienen actividad a pH bajo (Antonsson *et al.*, 1997; Minn *et al.*, 1997; Schlesinger *et al.*, 1997). Además varios estudios han demostrado que la muerte celular inducida por Bax y sus efectos como la liberación del Cyt c pueden ser inhibidos al bloquear la respiración mitocondrial o la actividad de la ATPasa (Tzagoloff, 1970; Eguchi *et al.*, 2000; Harris *et al.*, 2000; Ikemoto *et al.*, 2000; Matsuyama *et al.*, 2000).

En cuanto a la regulación de Bax, se ha reportado que los niveles de expresión de la proteína cambian durante la apoptosis en varios tipos celulares (Krajewski *et al.*, 1995; Ekegren *et al.*, 1999). Por otro lado, se ha visto que la proteína supresora de tumores p53 media la activación transcripcional del promotor de Bax humano, causando una sobre expresión de la proteína (Miyashita y Reed, 1995). En un artículo reciente, se mostró que p53 necesita de factores adicionales similares a Sp para la activación transcripcional del gen *bax* (Thornborrow y Manfredi, 2001). Esto indica que al perderse la actividad de p53 en células cancerígenas, su función reguladora sobre la expresión de Bax y proteínas

con dominio BH3 contribuye a que estas células resistan la apoptosis. La regulación de Bax y otras proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 también puede llevarse a cabo a través de modificaciones postraduccionales como proteólisis, fosforilación y localización subcelular. Por ejemplo, parece que las proteínas del grupo III que solo contienen el dominio BH3 conservado activan a proteínas del grupo II como Bax (Gross *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2001) o facilitan su inserción en la mitocondria. Se ha visto que Bax puede ser activada por la translocación a la mitocondria de un fragmento del extremo carboxilo terminal de Bid (proteína que comparte sólo el dominio BH3) "t^oBid" (Gross *et al.*, 1999), el cual se forma a través de una modificación proteolítica por la activación de Bid en células de clase II durante la apoptosis inducida por Fas (Li *et al.*, 1998; Schmitz *et al.*, 2000). Un cambio en el dominio amino terminal de Bax se presenta al interactuar con Bid (Desagher *et al.*, 1999). Sin embargo, aunque Bax comparte estructuras similares con Bid, se ha visto que tienen funciones diferentes en la señalización de la cascada apoptótica y que por si mismas muestran un efecto desestabilizador en la membrana mitocondrial (Kudla *et al.*, 2000). Por otro lado, algunos reportes han sugerido que la actividad de Bax podría estar regulada por modificaciones proteolíticas, ya que se ha detectado inmunorreactividad de Bax de bajo peso molecular en extractos celulares apoptóticos. Sin embargo, debe ser interpretado con cuidado, ya que pudiera existir degradación inespecífica durante el proceso de preparación de la muestra, aunque un fragmento de 18 kDa de Bax ha mostrado un incremento en la citotoxicidad al ser comparado con Bax completo. Lo anterior puede indicar que la proteólisis de Bax debe funcionar como una amplificación de la apoptosis. Esto mismo se ha visto cuando el dominio amino terminal de proteínas anti-apoptóticas es degradado, lo cual las convierte en proteínas pro-apoptóticas (Cheng *et al.*, 1997; Clem *et al.*, 1998).

Los primeros experimentos sobre Bax, mostraron que la proteína podía interactuar con Bcl-2 y Bcl-x_L. Cuando ambas proteínas anti-apoptóticas se encontraban en exceso, podían inhibir la actividad pro-apoptótica de Bax. De manera contraria, cuando Bax se encontraba en exceso y dominan los

homodímeros de Bax, las células muestran alta susceptibilidad a la apoptosis (Oltvai *et al.*, 1993). Por lo tanto, la proporción de Bax/Bcl-2 y no sólo la concentración de cada proteína, representa mejor la susceptibilidad de la célula a morir. Es decir, al aumentarse la proporción de Bax/Bcl-2 el efecto anti-apoptótico de Bcl-2 es inhibido y las células pueden presentar apoptosis. Esto se ha comprobado en diversos experimentos (Oltvai *et al.*, 1993; Boise *et al.*, 1993; Williams y Smith, 1993; Barinaga, 1994). Por ejemplo, en experimentos con cultivos de células lúteas, al aumentar la proporción de *bax/bcl-2*, el efecto inhibitorio de *bcl-2* sobre la apoptosis inducida por la expresión del gen *c-myc* se encuentra bloqueado y la expresión de *bax* en exceso provocan la apoptosis, y las células presentan fragmentación de DNA (Leng *et al.*, 2000).

3.4.4 Bcl-x

Otro miembro de la familia de genes *bcl-2*, es *bcl-x*. Fué identificado por medio de la hibridación cruzada de bibliotecas genómicas usando como prueba a *bcl-2* (Boise *et al.*, 1993). Se han identificado dos tipos de mRNA con una función biológicamente opuesta: *bcl-x_L* (forma larga) y *bcl-x_S* (forma corta), en el humano y el ratón. Además se han descrito dos formas adicionales en rata y/o ratón: *bcl-x_β* y *bcl-x_{ΔTM}*, pero aún no se conoce su función biológica. Algunas de estas isoformas parecen tener una expresión ubicua mientras que otras son expresada de manera tejido-específico o en respuesta a un estímulo específico (Shiraiwa *et al.*, 1996). La proteína Bcl-x_{ΔTM}, previene la muerte celular programada y la cuarta isoforma Bcl-x_β, promueve la apoptosis y parece ser específica para cerebelo, corazón y timo. Finalmente, Bcl-x_γ se identificó recientemente como una proteína antiapoptótica, la cual es inducida en los linfocitos y se relaciona con la expresión del receptor de células T (TCR) (Yang *et al.*, 1997).

El gen *bcl-x* está compuesto por tres exones, el primer exón no es traducido, mientras que los otros dos exones codifican para tres mRNA diferentes :

bcl-x_L, *bcl-x_S* y *bcl-x_{βm}* y sus productos correspondientes se obtienen por medio de *splicing* alternativo. Además, se identificó un intron de 283-pb y un gran intrón que separaba a los dos exones codificantes. La estructura genómica de *bcl-x* en el ratón se parece a la de *bcl-2* de humano y de ratón. Ambos tienen tres exones, con el exón II y III como exones codificantes y contienen dos intrones que separan a los exones (Grillot, 1997). La comparación de los diferentes DNA complementarios en otro estudio, reveló que la proteína Bcl-x_L se encuentra codificada por los exones II y III. El mRNA de *bcl-x_S* es generado por un sitio de *splicing* alternativo localizado en la posición 375 del exón II. El sitio donador GT alternativo de *bcl-x_S* es desplazado al sitio aceptor AG del exón III para formar el mRNA de *bcl-x_S*. Es por esto, que el mRNA de *bcl-x_L* y *bcl-x_S* difieren en el exón II en la región de 189 pb localizada en 3', pero comparten la secuencia al exón III (Grillot, 1997).

La proteína Bcl-x_L muestra una alta homología con Bcl-2, contiene 233 aminoácidos con dominios similares a los de Bcl-2. El dominio BH4 abarca del aminoácido 5 al 24, el dominio BH3 se encuentra ubicado entre los aminoácidos 86 y 100. Los dominios BH1 y BH2 abarcan del aminoácido 128 al 148 y del 180 al 195, respectivamente, los cuales son necesarios para la función anti-apoptótica de la proteína (Sedlak *et al.*, 1995). El dominio transmembranal TM se encuentra ubicado entre los aminoácidos 213 y 231.

Bcl-x_L se localiza en la membrana nuclear, en la envoltura perinuclear y en la membrana externa de la mitocondria (González-García *et al.*, 1994), e inhibe la apoptosis inducida por una gran cantidad de estímulos (Boise *et al.*, 1993; González-García *et al.*, 1994; Fang *et al.*, 1994). En los primeros experimentos con las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-x_L mostraron que su sobre-expresión podía inhibir la actividad pro-apoptótica de Bax (Korsmeyer *et al.*, 1993). La formación de oligómeros de Bax es prevenida por la expresión de Bcl-x_L y por lo tanto inhibir la liberación de Cyt c inducida por Bax (Nechustan *et al.*, 2001). Sin embargo, la actividad anti-apoptótica de Bcl-x_L se ha visto inhibida por su

interacción con otras proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2. Por ejemplo, Bcl-x_L puede unirse con mayor afinidad a Bad (miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2). De hecho, en células que sobre-expresaron ambas proteínas anti-apoptóticas, se presentaron heterodímeros Bcl-x_L/Bad y Bcl-2/Bax, sin presentarse heterodímeros Bcl-x_L/Bax (Yang *et al.*, 1995). Además, la actividad anti-apoptótica de Bcl-x_L también puede ser neutralizada por Bad (proteína con dominio BH3), cuando esta proteína pro-apoptótica es fosforilada en dos residuos de serina (Ser 112 y Ser 136). A la heterodimerización de Bcl-x_L/Bad también se le ha atribuido el arresto celular G0/G1, lo cual sugiere una relación entre el control del ciclo celular y la regulación de la apoptosis (Chattopadhyay *et al.*, 2001). Otra nueva proteína pro-apoptótica con dominio BH3: PUMA, interactúa con Bcl-x_L en la mitocondria inhibiendo su actividad anti-apoptótica e induce la liberación del Cyt c. Así mismo, se ha visto que Bcl-x_L puede neutralizar la actividad apoptótica de Bak (proteína del grupo III) en la mitocondria y después de un estímulo apoptótico disociarse de ésta debido a un cambio conformacional, dejando a Bak libre para ejercer su actividad pro-apoptótica (Griffiths *et al.*, 1999).

Además, un análisis de la estructura tridimensional de la proteína Bcl-x_L, mostró una similitud entre los dominios formadores del poro con la toxina diftérica y colicinas bacteriales, sugiriendo que las proteínas de la familia Bcl-2 podrían actuar formando canales en la mitocondria (Muchmore *et al.*, 1996). Esta similitud entre Bcl-x_L y Bcl-2 muestra la importancia del primero en el control de la apoptosis. Aún más, Bcl-x_L se ha encontrado en una gran variedad de células con patrones de expresión diferentes a Bcl-2 e incluyen los órganos reproductivos como epitelio mamario, epitelio secretor y células basales de la próstata y células del endometrio (Krajewski *et al.*, 1994). Sugiriendo que ambos genes regulan de forma diferente o en diferentes células, la muerte celular.

En contraste, *bcl-x_S* codifica para una proteína de 170 aminoácidos en la cual la región más semejante a Bcl-2 ha sido eliminada. La proteína de Bcl-x_S es una excepción del grupo II de miembros pro-apoptóticos, ya que contiene sólo los

dominios BH3 y BH4, los cuales se localizan entre los aminoácidos 5 –24 y 86-100, respectivamente. La proteína Bcl-x_S contiene el dominio TM localizado entre los aminoácidos 129 y 147. En cuanto a su función, promueve la apoptosis por la interacción con Bcl-2 y Bcl-x_L (Boise *et al.*, 1993; Minn, *et al.*, 1996) aunque no se conoce bien como actúa. Algunos estudios han reportado que podría estar inhibiendo la función antiapoptótica por la formación de heterodímeros con Bcl-x_L aumentando la función proapoptótica de otras proteínas como Bax. Sin embargo, existe evidencia de que Bcl-x_S puede localizarse en el citosol de células PC12 y translocarse a la mitocondria como una proteína multidominio cuando se sobreexpresa. Lo anterior ha sugerido su acción pro-apoptótica en este organelo (Lindenboim *et al.*, 2000).

3.5 EL GEN SUPRESOR DE TUMORES p53

La proteína p53 tiene una secuencia primaria compuesta por 393 aminoácidos la cual ha sido dividida en cuatro dominios funcionales. El extremo amino terminal contiene el dominio de activación de la transcripción y está ubicado en los primeros 42 aminoácidos, es muy ácido con carga neta similar a la que presentan los transactivadores de la transcripción como la proteína Gal-4. Este extremo interactúa con la maquinaria basal de la transcripción regulando positivamente la expresión de diferentes genes (p21/Waf1, MDM2, GADD45, ciclina G, bax, PIGs e IGF-BP3, entre otros). En los primeros estudios sobre su posible función como regulador de la transcripción se fusionó p53 con el dominio de Gal-4 que se une al DNA y el gen fusionado p53/Gal-4 dio lugar a una gran inducción de la actividad del gen reportero comparada con la actividad inducida únicamente con Gal-4 (Unger *et al.*, 1990). Estos resultados indicaron que p53 puede funcionar como transactivador de la transcripción cuando es fusionado a un dominio que se une al DNA. Se ha visto que los aminoácidos F19, L22 y W23 se requieren para la activación de la transcripción de la proteína *in vivo* (Lin *et al.*,

1995) y son responsables de su interacción con la caja TATA (TBP) y con otros factores asociados a TBP (Horikoshi *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1995; Thut *et al.*, 1995). La actividad transcripcional se regula negativamente por la proteína E1B-55Kd de adenovirus y la proteína MDM2 de humano a través de la interacción con los aminoácidos 22 y 23 (Lin *et al.*, 1995).

El extremo carboxilo terminal es rico en aminoácidos básicos similar a aquellos que se unen al DNA y tiene tres señales de localización nuclear (NLS). El dominio de unión al DNA ocupa casi 2/4 partes de la proteína y se encuentra ubicado entre los residuos 102 a 292. La proteína tetramérica de p53 se une a cuatro repeticiones de una secuencia consenso del DNA: 5'-Pu Pu Pu C (A/T)-3'. Esta secuencia se repite en dos pares, cada una arreglada como repeticiones inversas (Cho *et al.*, 1994). Basándose en ésta secuencia se ha especulado que p53 se une al DNA ya sea como homodímero, homotetrádimero. Se ha demostrado que la proteína requiere de un cambio estructural para activar su unión al DNA.

La unión de p53 al DNA es activada por la fosforilación de los residuos S378 y S392 por la cinasa C y la caseína cinasa II, respectivamente, o por la desfosforilación del residuo S376, o la acetilación, por la proteína CBP/p300, de los residuos K373 y K382, o por la delección de este dominio carboxilo terminal básico y/o la unión del anticuerpo Pab421 a los residuos 370-378 (Caspari, 2000; Jayaraman y Pives, 1994). Estos datos han llevado a postular que el extremo carboxilo terminal determina la conversión de p53 entre las formas que están inactivas y formas que están activas para su unión al DNA, en forma alostérica (Waterman *et al.*, 1995).

Esta proteína tiene una vida media corta (usualmente menos de 30 minutos), la cual puede influenciar la expresión génica por medio de la transactivación positiva de genes que contienen en su secuencia de DNA un elemento de respuesta para p53 y en forma negativa por medio de la supresión de

la transcripción de algunos genes que no contienen dicho sitio de respuesta a p53. Estas observaciones predicen un modelo para la función de p53 en la supresión de tumores inhibiendo el crecimiento de células tumorales en cultivo por inhibición de la transcripción de genes que promueven el crecimiento tales como *c-fos* y *c-jun*, y la inducción de genes que están involucrados en el control negativo del crecimiento y de la diferenciación como *bax*.

La proteína p53 induce la apoptosis en varios tipos celulares, particularmente en las células de línea hematopoyética (Oren, 1994). Así mismo, diversos estímulos pueden causar apoptosis dependiente de p53 tales como el daño al DNA (Lowe *et al.*, 1993a), expresión de oncogenes virales (i.e. E1A de adenovirus (Debbas y White, 1993) o E7 de papilomavirus (Howes *et al.*, 1994)), expresión de oncogenes celulares (i.e. *myc* (Wagner, 1994)), pérdida de factores de crecimiento (Canman *et al.*, 1995) o de interleucinas (Gottlieb *et al.*, 1994), o por pérdida de genes supresores de tumores (i.e. Rb (Wu y Levine, 1994)) (Schuler y Green, 2001). La muerte celular inducida por p53 involucra a una multitud de vías moleculares como la transactivación de genes blanco y eventos de señalización directa (Levine, 1997; Harris, 1996; Gottlieb y Oren, 1998).

Una gran cantidad de genes inducidos por p53 podrían participar en la acción apoptótica de este gen como son: Bax (Miyashita y Reed, 1995), Fas/APO-1 (Owen-Schaub *et al.*, 1995; Muller *et al.*, 1998) y KILER/DR5 (Wu *et al.*, 1999), o genes inducidos por p53 (PIGs), genes que aún no tienen un papel definido en la señalización (positiva y negativa) tales como p85 subunidad reguladora de la fosfatidil-3-OH cinasa durante la apoptosis oxidativa (Yin *et al.*, 1998) y proteína de unión a factores de crecimiento similares a la insulina (Buckbinder *et al.*, 1995), entre otros que comienzan a descubrirse por técnicas más sensibles (por ejemplo PIR121) (Saller *et al.*, 1999).

Los genes inducidos por p53 (PIGs) son 13 genes involucrados en el control redox, y son activados antes de la apoptosis mediada por p53. Con esta

información se ha postulado que p53 induce transcripcionalmente la expresión de PIGs causando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que causan daño oxidativo a la mitocondria, lo cual activa la cascada de caspasas para inducir la apoptosis (Figura 6) (Polyac *et al.*, 1997).

La proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina 3 (IGF-BP3) afecta el crecimiento, y el gen que codifica para esta proteína se regula por p53 (Figura 6). Al unirse ésta proteína a IGF previene la interacción con su receptor (IGFR), bloqueando la vía de señalización de IGF que induce la mitosis (Buckbinder *et al.*, 1995).

Fas y DR5 pertenecen a la familia del receptor de necrosis tumoral (TNRF). Estas proteínas se encuentran ubicadas en la membrana citoplasmática y contienen un dominio intracelular que es fundamental para la transducción de la señal apoptótica. Estos receptores son activados por un ligando; FAS es activado por FASL y DR5 por TRAIL (ligando que induce apoptosis relacionado con TNF). Estos receptores también se pueden activar en ausencia del ligando por la sobreexpresión del receptor. La activación el receptor, dependiente o independiente de ligando, induce la trimerización del receptor, lo cual induce el reclutamiento de proteínas adaptadoras intracelulares y la subsecuente activación de la cascada de caspasas (Figura 6) (Sheik y Fornace, 2000)

En el caso de bcl-2, éste es inhibido por p53 (en algunos tipos celulares). La sobre expresión de Bcl-2 puede bloquear la apoptosis inducida por p53.

La proteína p53 puede inducir la apoptosis tanto por medio de su función transactivadora, como por una actividad que no requiere de dicha función. Esto último se ha observado en varios tipos celulares, en donde la apoptosis mediada por p53 iniciada por daño al DNA ocurre en ausencia de síntesis de RNA o proteínas o en presencia de p53 con deficiente función transactivadora (Haupt *et al.*, 1995). Sin embargo, la inducción de apoptosis también puede ocurrir por vías

independientes de p53 (Lowe *et al.*, 1993b; Gottlieb y Oren, 1998; Caelles *et al.*, 1994). Además, no se ha mostrado la función de p53 como un efector crítico de la apoptosis funcionando de manera análoga al gen Waf1 durante el arresto celular en la fase G1, por ejemplo se ha visto que p53 puede inducir apoptosis independientemente de la presencia de Bax (Saller *et al.*, 1999; McCurrach *et al.*, 1997, Knudson *et al.*, 1995; Clarke *et al.*, 1993, Donehowe *et al.*, 1992).

Como se puede observar, p53 media la apoptosis por múltiples mecanismos. Recientemente se han descrito otras proteínas homólogas a p53 como son p73 y p63 que pueden inducir la apoptosis por mecanismos usados por p53. Sin embargo, estas proteínas tienen características capaces de llevar a cabo la apoptosis por vías diferentes de p53. Por ejemplo, p73, inducido por E2F-1, es capaz de provocar la apoptosis en ausencia de p53 en fibroblastos de embrión de ratones *knockout* para p53 o en líneas celulares tumorales deficientes de p53 (Irwin *et al.*, 2000).

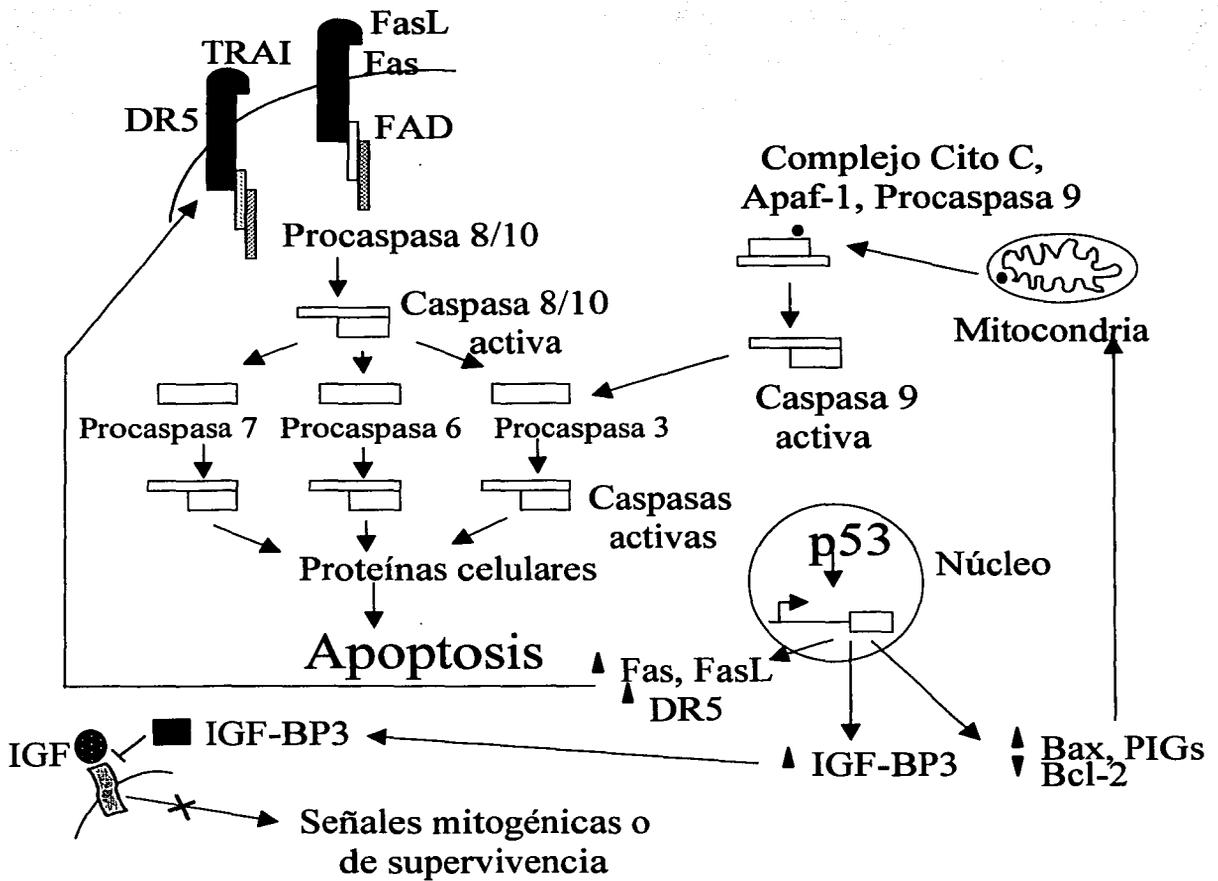


Figura 6. Regulación de la apoptosis por p53. La proteína p53 activa la cascada de caspasas ya sea por vía de los receptores de muerte (Fas/DR5) o por medio de la liberación del citocromo c de la mitocondria regulado por los genes inducidos por p53 (PIGs) o por la familia de Bcl-2. p53 también puede inducir apoptosis al interferir con la vía de señales mitogénicas o de supervivencia mediadas por IGF (Mendoza-Rodríguez, *et al.*, 2001).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El epitelio uterino de la rata presenta una regresión cíclica mediante apoptosis o muerte celular programada (PCD) después de presentarse una disminución en los niveles plasmáticos de estradiol (E_2) y progesterona (P_4). A pesar de conocerse su efecto antiapoptótico, hasta ahora el mecanismo por el cual estas hormonas regulan la apoptosis en este tejido permanece sin esclarecerse. Se han realizado estudios que demuestran que existe un control hormonal sobre la expresión de genes anti- y pro- apoptóticos que pertenecen a la familia *bcl-2*. Sin embargo, la mayoría de estos estudios se enfocan a la expresión del gen *bcl-2* y en ocasiones se relaciona con su antagonista a nivel proteico *bax* en el endometrio humano durante el ciclo menstrual. Además, se ha estudiado por separado la regulación de la expresión de las isoformas de *bcl-x* por tratamiento hormonal. No se han realizado estudios que correlacionen la expresión de estos genes con el nivel de expresión de *p53* en un tejido que presenta apoptosis en condiciones fisiológicas.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

- Determinar la expresión de *p53*, *bcl-2*, *bax* y las isoformas de *bcl-x* en el útero de la rata durante el periodo de regresión del epitelio.

5.2 Objetivos Particulares

- Conocer el patrón de expresión de los genes *p53*, *bcl-2*, *bax*, *bcl-x_L* y *bcl-x_S* a nivel de mRNA en el útero de la rata.
- Conocer el patrón de expresión de los genes *p53*, *bcl-2*, *bax*, *bcl-x_L* y *bcl-x_S* a nivel de la proteína en el epitelio luminal y glandular que se encuentra en regresión.
- Establecer una correlación entre la expresión de los genes de la familia Bcl-2 estudiados con la expresión de *p53* a nivel de mRNA en el útero de la rata y a nivel de la proteína en el epitelio luminal y glandular.
- Establecer una correlación entre la expresión de genes antiapoptóticos con genes proapoptóticos para evaluar su función en la apoptosis presente durante la regresión del epitelio uterino.

6.HIPÓTESIS DE TRABAJO

Debido a que el útero de la rata se encuentra sujeto a cambios cíclicos dependientes de la concentración plasmática de E_2 y P_4 y sabiendo que ambas hormonas tienen un efecto antiapoptótico, se espera encontrar un nivel alto de expresión de genes antiapoptóticos cuando los niveles de E_2 y P_4 se encuentren elevados (durante el día del proestro). Así mismo, se espera encontrar un mayor nivel de expresión de genes proapoptóticos al disminuir la concentración hormonal y antes de presentarse la muerte celular que se observa en la etapa del estro del ciclo estral.

7. MATERIAL Y METODOS

7.1 Animales de experimentación

Para este estudio se utilizaron ratas hembras adultas de la cepa Wistar con 200-250 g de peso, las cuales se mantuvieron en un ciclo de luz:oscuridad 12:12 con agua y comida *ad libitum*.

Se utilizaron las ratas que presentaron por lo menos 3 ciclos regulares con una duración de cuatro días, los cuales se determinaron por medio del análisis microscópico de frotis vaginales diarios. Se sacrificaron por decapitación a diferentes horas durante la transición de la fase del proestro al estro: 13:00 y 21:00 horas del proestro, y 0:00, 2:00, 5:00, 8:00 y 13:00 horas del estro. Se usaron 3 animales por cada hora de estudio. Inmediatamente después de sacrificar al animal se disectaron ambos cuernos uterinos para procesarlos, uno de ellos para extracción de RNA total y el otro para inclusión en parafina.

7.2 Retrotranscripción acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

7.2.1 Extracción de RNA total

Para cada grupo de ratas se extrajo el RNA total como se describe a continuación: los tejidos se homogenizaron con un politrón en TRIzol a 4°C (1 ml de TRIzol por cada 100mg de tejido) en tubos estériles prelavados con agua destilada y con solución de dietil pirocarbonato al 0.1% (agua-DEPC). Se lavó el politrón con agua-DEPC (inhibidor de RNAsas) entre la homogenización de cada muestra.

Se extrajo el RNA con cloroformo a partir del homogenado (200µl de cloroformo por cada ml de homogenado). Se agitó 30 segundos en vortex. Se dejó

reposar por 5 minutos en hielo y se centrifugaron las muestras a 12,000 rpm a 4°C por 15 minutos. La fase acuosa contiene el RNA, mientras que el DNA y las proteínas se mantienen en la interfase y la fase orgánica. A la fase acuosa se le agregó un volumen igual de isopropanol y se almacenó a 4°C durante toda la noche para permitir que precipitara el RNA.

Se centrifugaron las muestras a 12,000 rpm a 4°C por 15 minutos para obtener la pastilla blanca amarillenta de RNA. Se removió el sobrenadante y se le agregó etanol al 80%, preparado con agua-DEPC. Se centrifugó a 7,500 rpm a 4°C durante 8 minutos.

Se removió el sobrenadante y se quitó el exceso de humedad escurriendo los tubos en sentido inverso sobre una gasa estéril, sin secar por completo la pastilla para evitar su insolubilidad. Se agregó 30µl de agua-DEPC (inhibidor de RNAsas) para disolver la pastilla.

7.2.2 Cuantificación de RNA

Se realizaron diluciones 1:500 y se leyó la absorbancia de las muestras a las longitudes de onda de 260 nm y 280 nm. Para obtener la concentración de RNA en cada muestra se utilizó la fórmula: 1 D.O. a 260 nm = 40 µg de RNA/ml. Además, se determinó la pureza del RNA por medio de la relación de absorbancias obtenidas a 260 nm y 280 nm.

7.2.3 Electroforesis de RNA

Se preparó un gel desnaturalizante de agarosa al 1% con formaldehído 6% y MOPS al 1X. Se disolvió la agarosa en el agua-DEPC y posteriormente se agregó el formaldehído y el MOPS, se mezcló y se vertió en un molde de electroforesis. Las muestras se prepararon para el corrimiento electroforético con

formamida al 50%, formaldehído al 6.5%, MOPS 1X, amortiguador de carga para RNA 1X y bromuro de etidio 5µg, para 3 µg de RNA. El RNA se mezcló con la formamida, el formaldehído y el MOPS, y se calentó a 65°C durante 15 minutos. Después de reposar en hielo 5 minutos, se agregó el amortiguador y el bromuro de etidio. Las muestras se cargaron en el gel y se corrieron a 70 volts por 120 minutos. El gel se analizó en un transiluminador de luz ultravioleta.

7.2.4 Retrotranscripción del RNA (RT)

Se realizó la retrotranscripción de RNA para obtener el DNA complementario (cDNA), para lo cual se preparó una mezcla de reacción que contenía 4µg de RNA, Amortiguador RT(1X), DTT(10 mM), dNTPs (0.5 mM de cada uno), Oligo(dT) primers (0.05 µg), RT M-MLV (400 U) y agua (cbp 5µl). Se mezclaron los reactivos en un microtubo y se incubó a 37°C durante una hora.

7.2.5 Síntesis de Oligonucleótidos

Para detectar la expresión de *p53*, *bcl-2*, *bax*, *bcl-x_L* y *bcl-x_S* se utilizaron los siguientes pares de oligonucleótidos sintetizados y purificados por Accesolab, Life Technologies:

Tabla 2.

	Oligo sentido	Oligo antisentido
<i>p53</i>	5'-GCATGGGGGGCATGAACCGCCG-3'	5'-GGTCTTCGGGTAGCTGGAGTGAGC-3'
<i>bcl-2</i>	5'-GCAACCGAACGCCCCGCTG TG-3'	5'-GTGATGCAGGCCCCACCAG-3'
<i>Bax</i>	5'-TGGCGATGAACTGGACAACAAC-3'	5'-CCCGAAGTAGGAAAGGAGGC-3'
<i>bcl-x</i>	5'-AGG CTGGCGATGAGTTTGAA-3'	5'-CGGCTCTCGGCTGCTGCATT-3'
<i>GAPDH</i>	5'-CCTGCACCACCAACTGC-3'	5'-CAATGCCAGCCCCAGCA-3'

Los oligonucleótidos delimitan un fragmento de 389 pb del cDNA de *p53* de rata que abarca de +718 a +1107 (Soussi *et al.*, 1988), un fragmento de 473 pb del cDNA de *bcl-2* de rata que abarca de +398 a +871 (Kim *et al.*, 2000), un fragmento de 300 pb del cDNA de *bax* que abarca de +198 a +498 (Igase *et al.*, 1999), un fragmento de 346 pb del cDNA de *bcl-x_L* que abarca de +245 a +422 y este mismo oligonucleótido delimita un fragmento de 147 pb del cDNA de *bcl-x_S* que abarca de +275 a +630 (Dubal *et al.*, 1999), un fragmento de 453 del cDNA de *GAPDH* (Lau K.M. *et al.*, 1998).

7.2.6 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Mediante esta técnica se amplificó un fragmento de los genes, realizando la mezcla de reacción con Amortiguador PCR (1X), MgCl₂ (1mM), dNTPs (0.2 mM de cada dNTP), Oligo Sentido (0.5 µM), Oligo Antisentido (0.5 µM), Taq DNA polimerasa (2.5 U) H₂O (cbp 35 µl). A 5 µl de reacción RT se le agregó 35µl de la mezcla para PCR. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer Cetus Modelo 9600. Se realizó un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por cinco minutos, seguido por 25 ciclos de reacción dentro de la fase exponencial de la amplificación con 1 minuto de desnaturalización a 95°C, 1 minuto de alineación de los oligonucleótidos iniciadores a 60 °C para *p53*, *bax*, *bcl-x_S*, *bcl-x_L* y *GAPDH* y 68°C para *bcl-2*, y un minuto de extensión a 72°C. Al finalizar los 25 ciclos, se realizó un ciclo de extensión a 72 °C por 5 minutos.

7.2.7 Electroforesis de los productos de RT-PCR

Se corrieron 15 µl de los productos obtenidos del PCR en un gel de agarosa al 2.0%, disolviendo en éste bromuro de etidio para una concentración final de 0.5 µg/ml. A cada muestra se le adicionó 2 µl de amortiguador de carga para DNA. El

gel se corrió en un amortiguador TBE 1X a 90 volts durante 90 minutos. Se analizó el gel en un transiluminador de luz ultravioleta y se tomó una fotografía.

7.2.8 Análisis densitométrico

Se realizó el análisis densitométrico mediante el programa Scion Image, se analizó el área bajo la curva para las diferentes muestras a diversas horas durante la transición de la fase del proestro al estro. La expresión relativa se considera en base a la expresión constitutiva del gen GAPDH.

7.2.9 Análisis estadístico.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado, y los datos se procesaron con un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguida por una prueba de comparación múltiple de Tukey. Se usó el programa Prism 2.01 para calcular los valores de probabilidad y los errores estándar de la media (\pm ESM).

7.3 Inmunohistoquímica (IHQ)

7.3.1 Procesamiento del tejido

Una vez que se disectaron los tejidos, se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS durante 2 horas. Posteriormente se sometieron a un proceso de deshidratación, con soluciones de etanol al 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% preparadas con agua DEPC, y en etanol y xilol al 100%. Se impregnaron en parafina a 60°C durante 30 minutos y toda la noche; posteriormente fueron incluidos en parafina.

7.3.2 Preparación del tejido para IHQ

Se realizaron cortes de 5 μm de grosor en microtomo y se colocaron en laminillas tratadas con Poli-L-lisina (Sigma). Los cortes histológicos se desparafinaron durante 15 minutos a 60°C y se rehidrataron.

7.3.3. Inmunohistoquímica

Para recuperar el antígeno de interés, los tejidos se trataron con en citrato de sodio 10 mM pH 6 hirviendo durante 20 minutos con un descanso intermedio de 5 minutos entre cada 10 minutos. Se bloqueó la peroxidasa endógena con H_2O_2 al 3% durante 30 minutos. Posteriormente se permeabilizó con triton X-100 al 0.5 % durante 30 minutos. Entre cada tratamiento se realizaron 2 lavados de 5 minutos con PBS.

Se bloqueó con suero anti-conejo o anti-cabra al 5 % con H_2O_2 al 1 % dependiendo de la naturaleza del anticuerpo primario (tabla 3). Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario dirigido contra la proteína investigada (p53: sc-6243c, Bcl-2: sc-492, Bax: sc-526, Bcl-x_L: sc-7122, Bcl-x_{S/L}: sc-634; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) por 24 h a 4 °C.

Para obtener el control negativo, se omitió el anticuerpo primario en el caso de p53 en PBS con Tritón 3%, mientras que los demás anticuerpos se adsorbieron previamente con su respectivo péptido bloqueador. Para ello, se determinó la dilución mayor del anticuerpo necesaria para obtener un resultado consistentemente positivo. Se combinó el anticuerpo con el péptido bloqueador en exceso (5 veces más en peso), incubando la mezcla durante 2 horas a temperatura ambiente en un pequeño volumen de PBS para favorecer la reacción antígeno-anticuerpo. Después de la neutralización, se diluyó la mezcla según la dilución de trabajo apropiada y se procedió con el protocolo experimental.

Tabla 3. Especificidad del anticuerpo

Especificidad del Anticuerpo primario	Naturaleza del Anticuerpo	Dilución (PBS con Triton 3%)
P53 de ratón, rata y humano	IgG Policlonal de conejo	1:100
Bcl-2 de ratón, rata y humano	IgG Policlonal de cabra	1:750
Bax de ratón, rata y humano	IgG Policlonal de cabra	1:250
Bcl-x _L de ratón, rata y humano	IgG Policlonal de cabra	1:250
Bcl-x _S y Bcl-x _L de ratón, rata y humano	IgG Policlonal de conejo	1:250

El anticuerpo primario se detectó por un anticuerpo secundario biotinilado que se incubó por 2 h y después con el complejo avidina-biotina por 1 h. La reacción se reveló con diaminobencidina y se contratiñó con hematoxilina. Las células marcadas se observaron en un microscopio de luz. La intensidad de reacción inmunopositiva obtenida en el epitelio luminal y glandular se determinó con ayuda del programa Zeiss, capturando las imágenes de tres úteros diferentes por cada hora estudiada y analizando todas las células de los epitelios asignando un valor de densidad en una escala de 0 - 255 (0 = blanco 255 = negro) a la intensidad de la tinción.

7.3 Cuantificación Hormonal

Se llevó a cabo la cuantificación del nivel hormonal en plasma sanguíneo por radioinmunoanálisis (RIA) (Abraham, 1975). Se cuantificaron los niveles de estradiol y progesterona de los animales sacrificados a diferentes horas durante la transición de la fase del proestro al estro: 13:00 y 21:00 horas del proestro, y 0:00, 2:00, 5:00, 8:00 y 13:00 horas del estro. La sensibilidad del ensayo fue de 5.4 pg/ml para el estradiol y de 8.3 ng/ml para la progesterona. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de $5.3 \pm 8\%$ y $6.5 \pm 10\%$, respectivamente.

8.RESULTADOS

8.1 EXPRESIÓN DE LOS GENES *p53*, *bcl-2*, *bax*, *bcl-x_L* y *bcl-x_S* A NIVEL DE mRNA

Para conocer la expresión de los genes *p53*, *bcl-2*, *bax*, *bcl-x_L* y *bcl-x_S* a nivel del mRNA en el útero de la rata, durante la transición de la etapa del proestro al estro, se utilizaron ratas que presentaron por lo menos tres ciclos estrales regulares de cuatro días de duración, los cuales fueron determinados por medio del análisis microscópico de frotis vaginales diarios. Se sacrificaron los animales a las 13 y 21 horas del proestro y a las 0, 2, 5, 8 y 13 horas del estro. Inmediatamente después de sacrificar al animal, se disectaron ambos cuernos uterinos. Uno de ellos se utilizó para la extracción de RNA total y otro para investigar la expresión de la proteína.

La extracción del RNA total se realizó por la técnica de isotiocianato de guanidina/fenol/cloroformo. Cada muestra se corrió por electroforesis en un gel desnaturante de agarosa para observar su integridad (Figura 7). En la figura 7, se muestra la electroforesis de los RNAs obtenidos del útero de la rata en cada hora. Se observan bandas de RNA que corresponde a los RNA ribosomal de 28s, 18s, y 5s, los cuales se muestran íntegros.

A partir de los RNAs obtenidos, se realizó el RT-PCR para amplificar la señal del mRNA de cada gen estudiado, utilizando GAPDH como gen de expresión constitutiva. Se realizó la electroforesis de 15µl del producto de RT-PCR y se observó su corrimiento en un gel de agarosa al 2.5% con la ayuda de un transiluminador. Esta concentración se utilizó para observar una buena resolución de las bandas estudiadas, ya que los fragmentos de cDNA obtenidos fueron menores de 500 pb. Las bandas obtenidas para cada RT-PCR de cada gen correspondieron al tamaño del fragmento esperado: *bcl-2* de 473 pb, *bax* de 300 pb, *bcl-x_L* de 346 pb, *bcl-x_S* de 147 pb, *p53* de 389 pb y *GAPDH* de 453 pb.

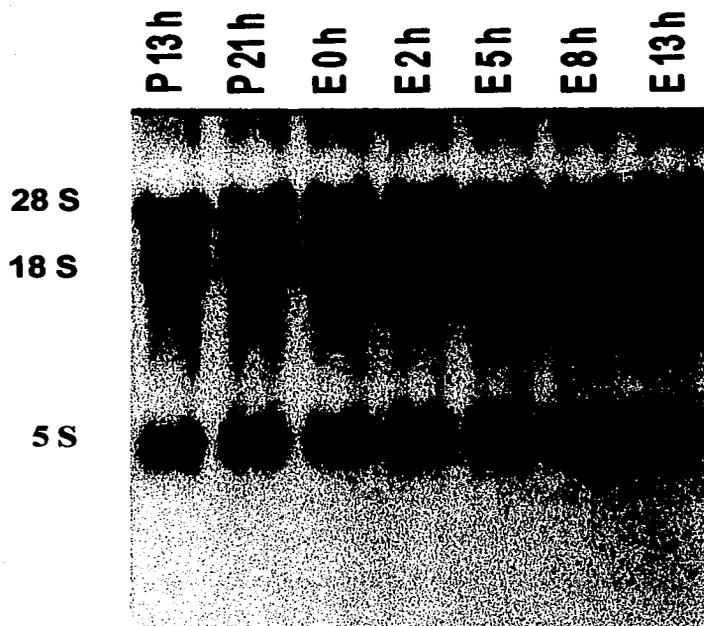


Figura 7. Electroforesis del mRNA del útero de la rata corrido en un gel desnaturalizante de agarosa. Se muestran los RNAs ribosomales 28s, 18s y 5s de útero de ratas sacrificadas a las 13 h (P 13 h) y 21 horas (P 21 h) del proestro y a las 0, 2, 5, 8 y 13 horas del estro (E 0 h, E 2 h, E 5 h, E 8 h, E 13 h).

Se realizó la densitometría de las bandas obtenidas para cuatro experimentos diferentes. En la figura 8, se observa un gel representativo de los productos de RT-PCR de cada gen estudiado, usando como gen de expresión constitutiva el gen de GAPDH. La expresión relativa del mensajero se obtuvo al corregir la expresión de cada gen con la de GAPDH.

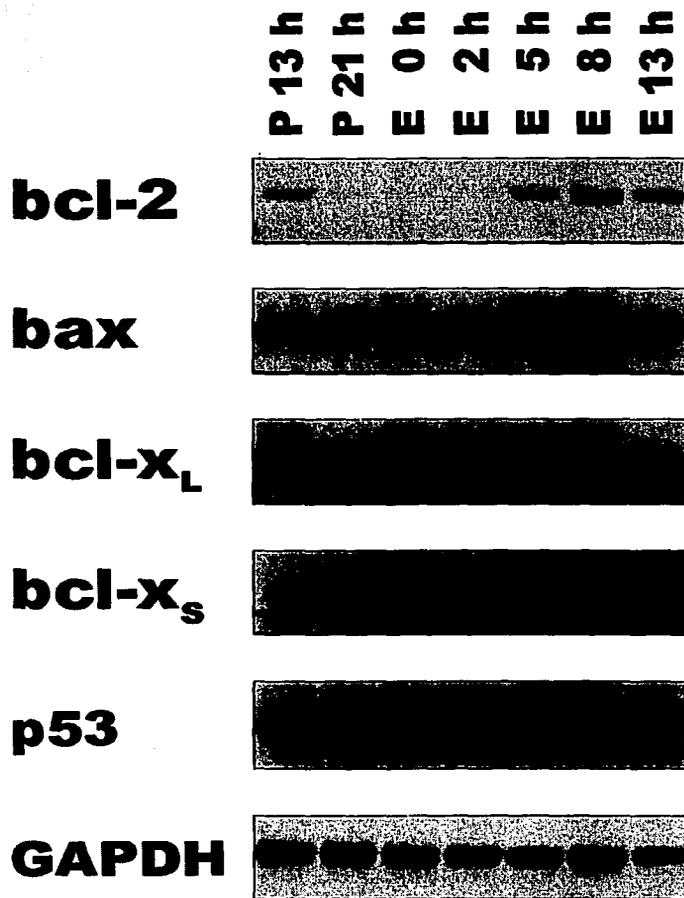


Figura 8. Expresión del mRNA de los genes *p53*, *bcl-2*, *bax*, *bcl-x_L* y *bcl-x_S* durante la fase de transición del proestro al estro del ciclo estral. Se muestra un gel representativo de los productos de RT-PCR para evaluar la expresión de cada gen. Cada RT-PCR se realizó a partir del RNA total obtenido del útero de la rata a las horas de proestro y estro estudiadas. Se utilizó como gen control de expresión constitutiva el gen de GAPDH.

En la figura 9, se muestra la expresión relativa del mRNA de *p53*, *bcl-2*, *bax*, *bcl-x_L* y *bcl-x_S*. La expresión de *bcl-2* presenta una disminución significativa a las 0 h y 2 h del estro respecto a las 5 h, 8 h y 13 h del estro. La expresión de *bax* no presenta cambios significativos a las horas del ciclo estral estudiadas. La expresión de *bcl-x_L* presenta un valor mínimo a las 0 h del estro. Sin embargo, esta disminución no es significativamente diferente con las demás horas estudiadas. La expresión de *bcl-x_S* no presenta cambios significativos dentro de las horas del proestro al estro. La expresión de *p53* se mantiene sin cambios significativos a lo largo de la fase de transición del proestro al estro del ciclo estral y aumenta significativamente a las 13 horas de la fase del estro con respecto a las 13h y 21 h del proestro y 0 h, 2 h y 5 h del estro.

Se realizó la proporción de la expresión relativa de los RNAs mensajeros de *bax* sobre *bcl-2* para analizar la función pro-apoptótica de *bax* en el útero de la rata durante las horas que preceden a la muerte celular que se observa en la etapa del estro del ciclo estral. Se encontró que la proporción aumenta significativamente a partir de las 0 h del estro y tiene un valor máximo a las 2 h del estro. Posteriormente, la proporción disminuye a partir de las 5 h del estro (Figura 10). También, se obtuvo la relación de *bcl-x_S* sobre *bcl-x_L* de la expresión relativa de cada gen. Esta relación aumenta significativamente de a las 21 h del proestro con respecto a las 13 h de la misma fase y posteriormente disminuye progresivamente hacia las 13 h del estro (Figura 10).

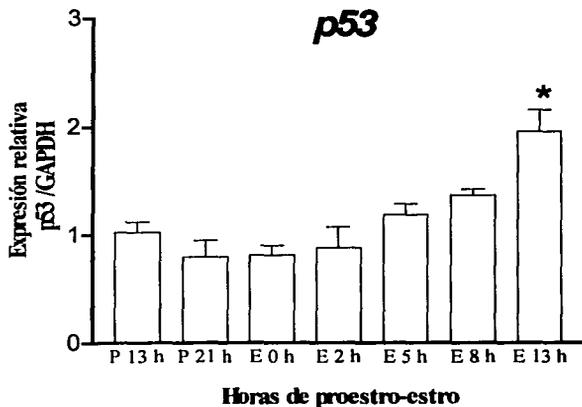
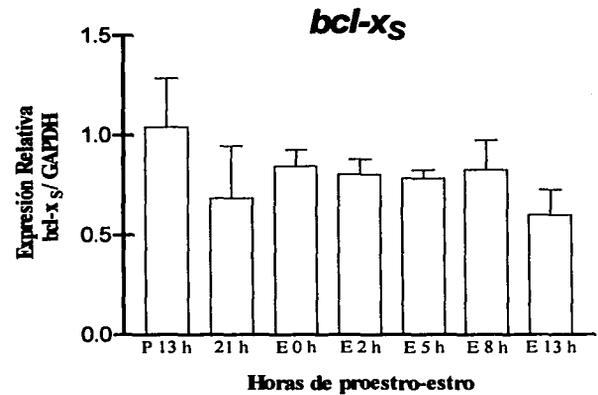
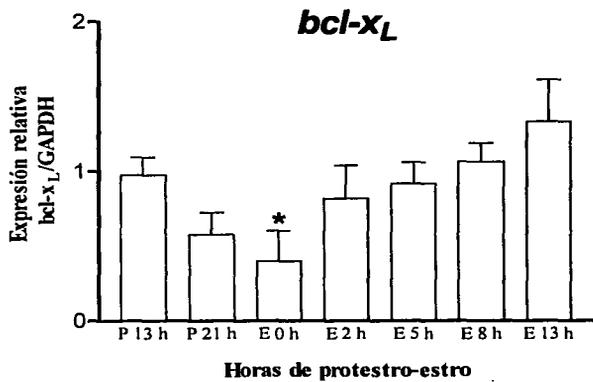
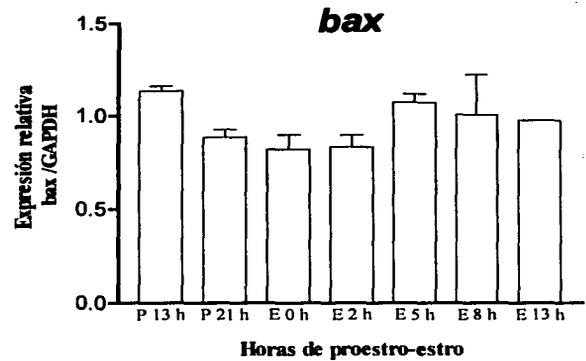
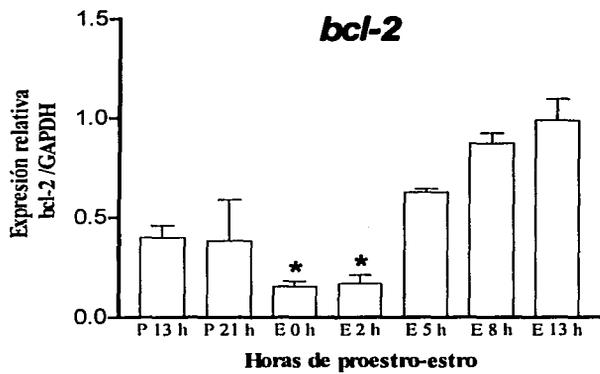


Figura 9. Expresión relativa del mRNA de los genes *p53*, *bcl-2*, *bax*, *bcl-X_L* y *bcl-X_S* en el útero de rata durante la fase de transición del proestro (P) al estrus (E) del ciclo estral. Los resultados se presentan como datos densitométricos de las fotografías. La expresión relativa se obtuvo al corregir la expresión de los genes estudiados con los de GAPDH. Los valores representan la media \pm E.S.M.

Para *bcl-2* * $p_{E 0h} < 0.05$ contra E 5h y < 0.01 contra E 8h y E 13h. * $p_{E 2h} < 0.01$ para E 8h y E 13h.

Para *p53* * $p < 0.05$ con respecto a P 13h y < 0.01 contra P 21h, E 0h, E 2h y E 5h.

Para *bcl-x_L*, * $p < 0.05$ con respecto a E 13h.

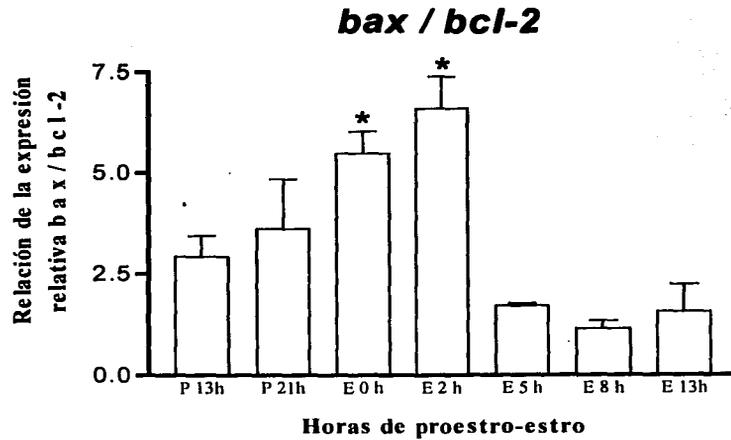
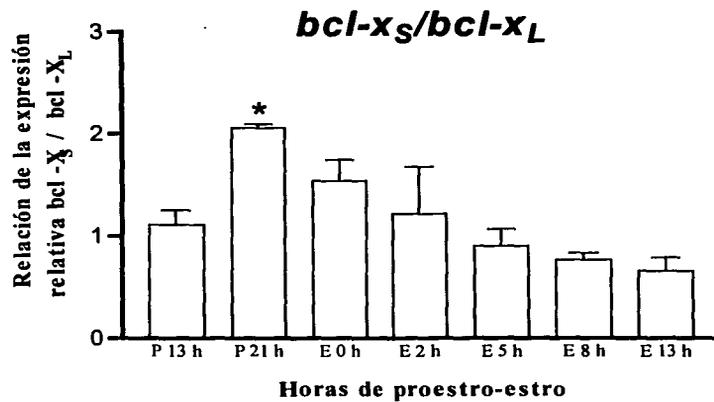
A**B**

Figura 10. Relación de la expresión relativa de los mRNAs de genes proapoptóticos *bax* y *bcl-x_S* entre genes antiapoptóticos *bcl-2* y *bcl-x_L*, durante la transición de la fase del proestro al estró del ciclo estral. Se evaluó la expresión de cada gen por RT-PCR utilizando GAPDH como gen control de expresión constitutiva. La gráfica muestra la relación de la expresión de:

A. *bax* entre *bcl-2* en * $p_{E\ 0h} < 0.05$ y * $p_{E\ 2h} < 0.01$, ambos con respecto a E 5 h, E 8 h y 13 h.

B. *bcl-x_S* entre *bcl-x_L* en * $p_{P\ 21h} < 0.05$ con respecto a E 8 h y 13 h.

Los resultados se expresan como la Media \pm ESM de los valores obtenidos para 3 experimentos diferentes.

8.2 EXPRESIÓN DE LOS GENES *p53*, *bcl-2*, *bax*, *bcl-x_L* y *bcl-x_S* A NIVEL DE LA PROTEÍNA.

Para conocer el patrón de expresión de las proteínas p53, Bcl-2, Bax, Bcl-x_L y Bcl-x_S específicamente en las células del epitelio uterino que se encuentra en regresión, se realizó la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) dirigiendo un anticuerpo policlonal en contra de la proteína presente en el tejido. Un segundo anticuerpo biotinilado reconoció la presencia del anticuerpo primario en el tejido. Este último se reveló con el complejo avidina-biotina y posteriormente con diaminobencidina. La expresión de las proteínas se analizó con un microscopio de luz y se cuantificó la presencia de la proteína por densitometría. La IHQ para las proteínas p53, Bcl-2, Bax, Bcl-x_L y Bcl-x_S en el epitelio luminal y glandular se presentan en las figuras 11 y 12 para las horas en que se encontraron cambios significativos en su expresión.

La proteína Bcl-2 se detectó en el citoplasma celular de los epitelios uterinos (Figura 11 y 12). En el epitelio luminal se presentó un valor menor de inmunoreactividad para la proteína a las 0 h, 2 h y 5 h del estro con respecto a las 13 h y 21 h del proestro y 8 h y 13 h del estro. Posteriormente, la expresión aumentó a las 8 h y 13 h del estro (Figura 13). Este fenómeno también se observó en el epitelio glandular, donde la expresión de la proteína disminuye a partir de las 21 h del proestro y se mantiene bajo hasta las 2 h del estro después de lo cual aumenta a las 5 h, 8 h y 13 h del estro (Figura 14).

Se observaron cambios interesantes en la localización de la proteína Bax a lo largo de las horas estudiadas, ya que durante el proestro se encuentra predominantemente en el citoplasma de las células estromales del útero, mientras que las células del epitelio son débilmente reactivas. Posteriormente aumenta su expresión a las 0 h en el epitelio uterino y la inmunoreactividad se concentra en las células del estroma periluminal (Figura 11 y 12).

Al llevar a cabo la cuantificación densitométrica, se observó que los niveles de la proteína Bax en el epitelio luminal fueron mínimos a las 13 h del proestro. Posteriormente, los niveles de la proteína aumentan hasta llegar a su valor máximo a las 0 h del estro, después de lo cual presentan una pequeña disminución hasta las 8 h del estro (Figura 13). A las 13 h del estro se observó un aumento en la expresión de la proteína (Figura 13). Sin embargo, este aumento no es significativo contra las 0 h del estro. Al realizar la relación de Bax entre Bcl-2, se observó que la función pro-apoptótica de Bax es mayor entre las 0 h y 5 h del estro (Figura 15). En el epitelio glandular se observó un comportamiento similar de la proteína de Bax. El valor más bajo de esta proteína se presentó a las 13 h del proestro y posteriormente aumentó hasta llegar a sus valores máximos a las 0 h y 2 h del estro. Posteriormente se observó una disminución de la proteína a las 5 h y 8 h del estro y a las 13 h se observa un incremento. Al realizar la relación de la cantidad de Bax sobre Bcl-2, se encontró que ésta presenta su valor máximo a las 0 h y 2 h del estro y disminuye posteriormente a las 13 h del estro (Figura 15).

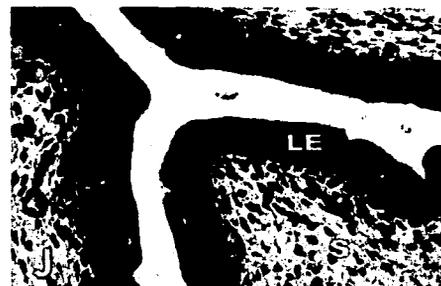
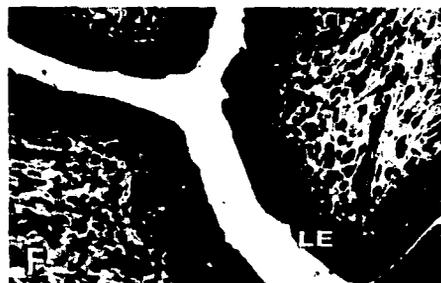
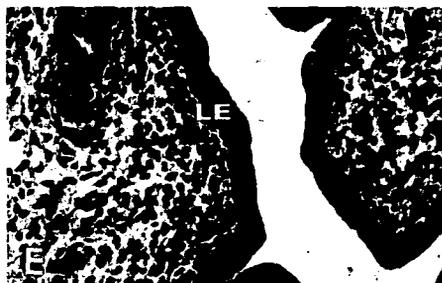
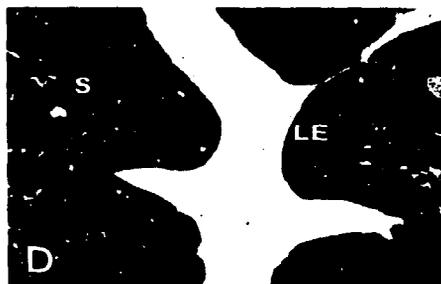
En el caso de Bcl-x_L, se encontró una disminución significativa a las 0 h del estro con respecto a las 13 h y 21 h del proestro y 2 h, 5 h, 8 h y 13 h del estro en el epitelio luminal. Posteriormente, se encontró un aumento de la proteína a las 8 h y 13 h del estro respecto a las 0 h, 2 h y 5 h del estro (Figura 13). En el epitelio glandular, el nivel de Bcl-x_L presentó su valor más bajo a las 5 h del estro, el cual es significativamente diferente al de proestro 13 h y 21 h y estro 0 h, 8 h y 13 h (Figura 14).

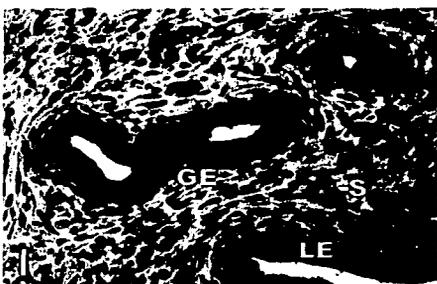
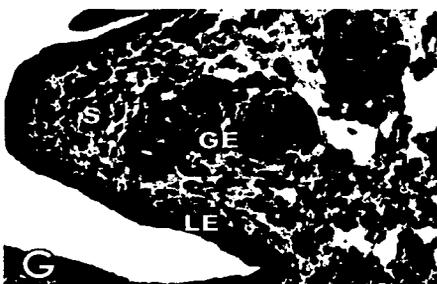
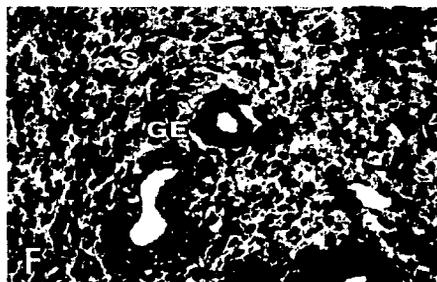
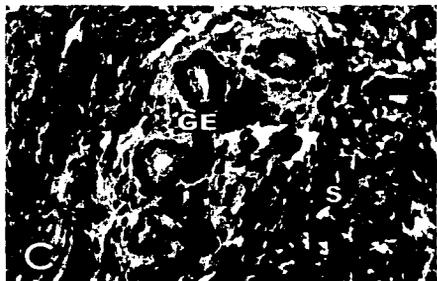
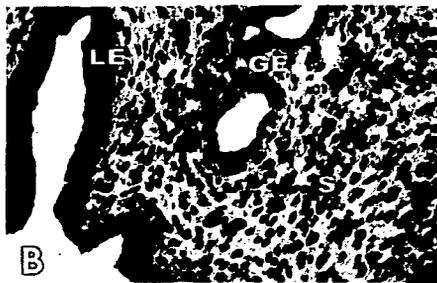
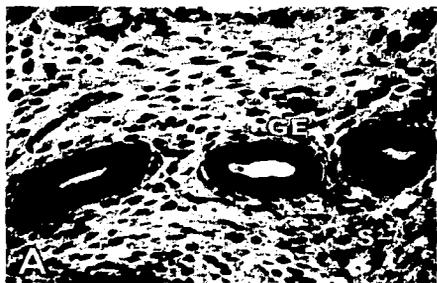
Se realizó una inmunohistoquímica para detectar la presencia de las proteínas Bcl-x_L y Bcl-x_S, a través de un anticuerpo dirigido contra el extremo amino terminal que comparten ambas proteínas. Se observó mayor inmunoreactividad de las proteínas a las 0 y 2 h del estro en el epitelio luminal. Mientras que en el epitelio glandular el máximo valor se obtuvo a las 2 h, el cual es significativamente mayor incluso que a las 0 h.

Se encontró inmunoreactividad para la proteína de p53 en el citoplasma tanto de las células epiteliales luminales como glandulares. No se presentaron cambios significativos durante las horas del proestro estudiadas y las primeras horas del estro. Posteriormente se presenta un aumento significativo en la expresión de la proteína en ambos epitelios a partir de las 5 horas del estro (Figuras 13 y 14). No se detectó la presencia de esta proteína en el núcleo de las células epiteliales en las horas estudiadas.

Figura 11.(Página 72) Localización de la proteína Bcl-2 (A, B); Bax (C, D); Bcl-x_L(E, F); Bcl-x_{S/L} (G, H) y p53 (I, J) por inmunohistoquímica en el epitelio luminal del útero de la rata durante la regresión del epitelio uterino. Se presenta la inmunoreacción para las horas en que se presentaron cambios significativos en la expresión de la proteína: Bcl-2 (A. estro 2 h), Bax (C. proestro 13h), Bcl-x_L (E. estro 0h), Bcl-x_{S/L} (G. estro 2 h) y p53 (I. estro 0 h); B, D, F, H y J muestran la inmunoreactividad de la proteína a las 13 h del estro.
LE= Epitelio Luminal. S= Estroma

Figura 12. (Página 73) Localización de la proteína Bcl-2 (A, B); Bax (C, D); Bcl-x_L(E, F); Bcl-x_{S/L} (G, H) y p53 (I, J) por inmunohistoquímica en el epitelio glandular del útero de la rata durante la regresión del epitelio uterino. Se presenta la inmunoreacción para las horas en que se presentaron cambios significativos en la expresión de la proteína: Bcl-2 (A. proestro 13 h y B. estro 5 h), Bax (C. proestro 13 h y D. Estro 0 h), Bcl-x_L (E. proestro 13 h y F. Estro 5 h), Bcl-x_{S/L} (G. estro 0 h y H. estro 13 h) y p53 (I. proestro 13 h y J. estro 8h).
LE= Epitelio Luminal. S= Estroma





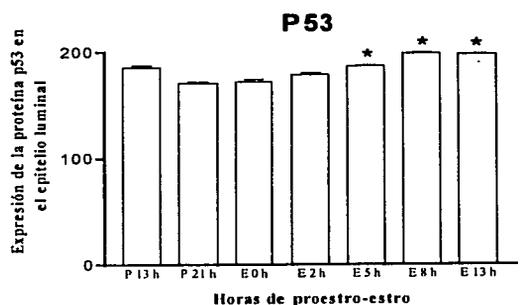
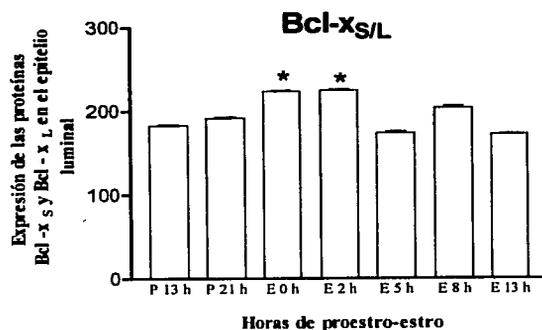
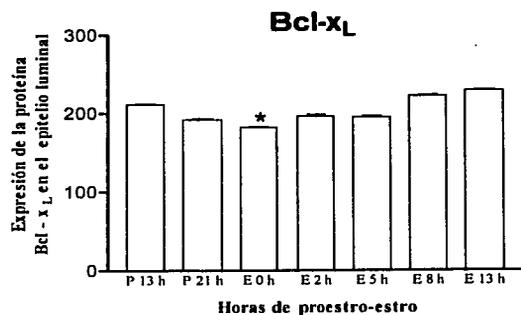
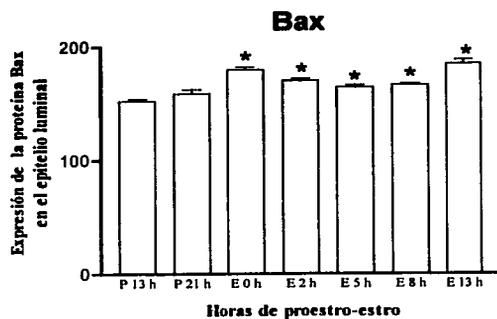
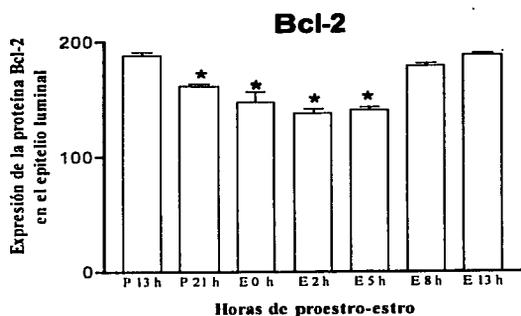


Figura 13. Patrón de expresión de las proteínas P53, Bcl-2, Bax, Bcl-x_L y Bcl-x_{S/L} en el epitelio luminal durante la transición de la fase de proestro a estro del ciclo estral. Los resultados se expresan como la Media \pm ESM de los valores obtenidos para 3 experimentos diferentes. La gráfica muestra la densidad óptica de la inmunoreactividad para cada proteína estudiada. Los valores obtenidos corresponden a una escala de densidad, donde el blanco corresponde al valor 0 y el negro al 255. Las diferencias obtenidas para cada proteína son:

Bcl-2: * $p_{P21h} < 0.001$ respecto a P 13 h y E 13 h, y de < 0.05 respecto a E 8 h. * $p_{E0h} < 0.001$ respecto a P 13 h, E 8 h y E 13 h. * $p_{E2h} < 0.001$ respecto a P 13 h, P 21 h, E 8 h y E 13 h. * $p_{E5h} < 0.001$ respecto a P 21 h, E 8 h y E 13 h y < 0.01 respecto a P 13 h. **Bax:** * $p_{E0h} < 0.001$ y * $p_{E2h, E5h, E8h, E13h} < 0.01$ respecto a P 13 h, P 21 h. **Bcl-x_L:** * $p_{E0h} < 0.001$ respecto a P 13 h, P 21 h, E 2 h, E 5 h, E 8 h y E 13 h. **Bcl-x_{S/L}:** * $p < 0.001$ para E 0 h y E 2 h respecto a las demás horas estudiadas. **p53:** * $p < 0.001$ para E 5 h, E 8 h y E 13 h respecto a las demás horas estudiadas

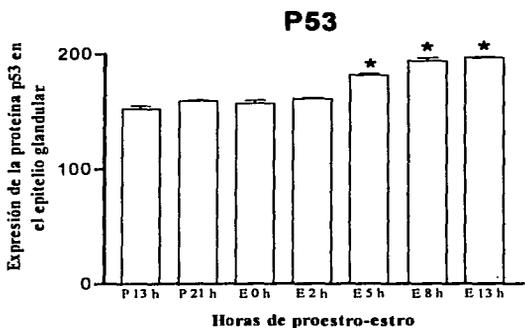
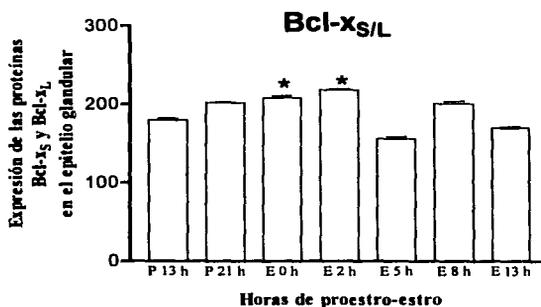
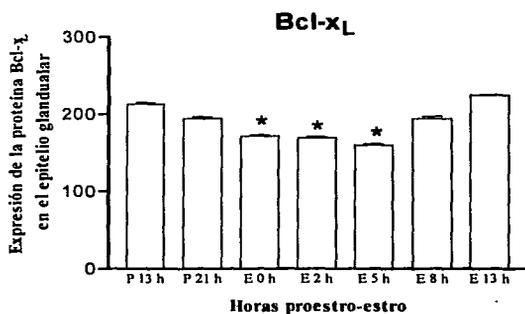
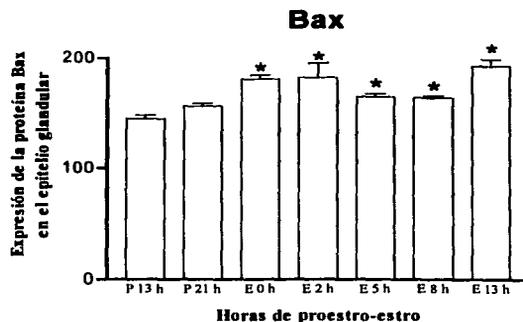
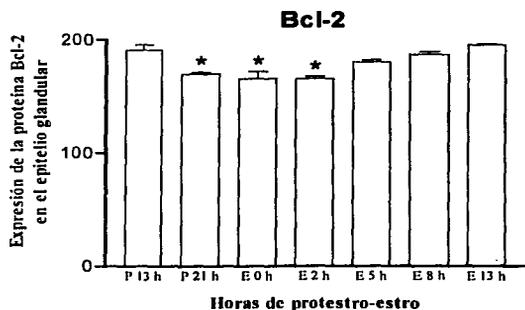


Figura 14. Patrón de expresión de las proteínas P53, Bcl-2, Bax, Bcl-x_L y Bcl-x_{S/L} en el epitelio glandular durante la transición de la fase de proestro a estro del ciclo estral. Los resultados se expresan como la Media ± ESM de los valores obtenidos para 3 experimentos diferentes. La gráfica muestra la densidad óptica de la inmunoreactividad para cada proteína estudiada. Los valores obtenidos corresponden a una escala de densidad, donde el blanco corresponde al valor 0 y el negro al 255.

Bcl-2: * p_{P21h} < 0.05 y * p_{E0h} < 0.01 respecto a P 13 h, E 8 h y E 13 h, * p_{E2h} < 0.001 con respecto a P13h, E 5 h, E 8 h y E 13 h. **Bax:** * p_{E0h} < 0.001 con respecto a P 13 h y p 21 h, y < 0.05 con respecto a E 2 h. * p_{E2h} < 0.001 con respecto a P 13 h, P 21 h, E 5 h, E 8 h. * p < 0.05 de E 5 h y E 8 h respecto a P 13 h, * p_{E13h} < 0.001 respecto a P13 h y P 21 h. **Bcl-x_L:** * p < 0.001 con respecto a P 13 h, P 21 h, E 8 h y E 13 h. p < 0.05 respecto a E 0 h. **Bcl-x_{S/L}:** * p < 0.001 de E 0 h y E 2 h respecto a P 13 h, P 21 h, E 5 h, E 8 h y E 13 h. p_{E2h} < 0.05 con respecto a E 0 h. **p53:** * p < 0.001 de E 5 h, E 8 h y E 13 h con respecto a las demás horas.

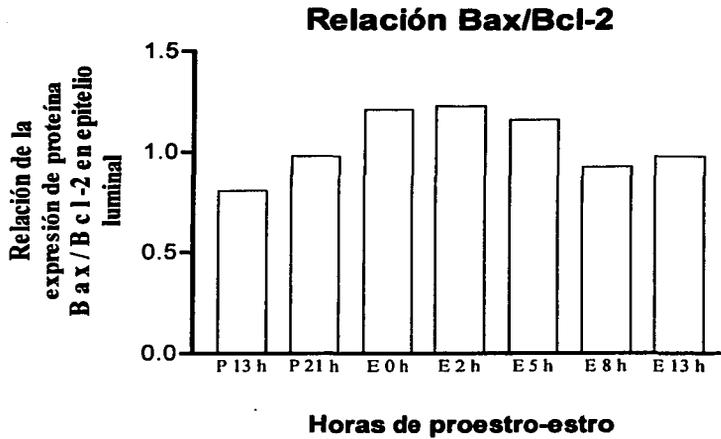
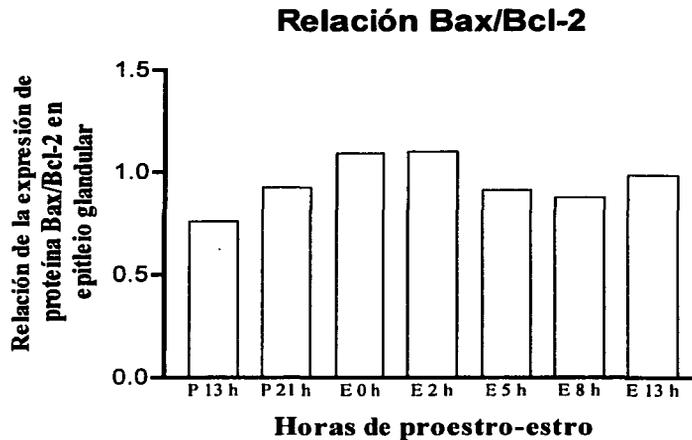
A**B**

Figura 15. Relación de la expresión de la proteína Bax entre Bcl-2 en el epitelio luminal (A) y en el epitelio glandular (B), en el útero durante la regresión del epitelio uterino. Se realizó la inmunohistoquímica en útero de 3 animales diferentes por cada hora de la etapa de proestro (P) y estró (E) estudiada. Los resultados se expresan como la relación de las medias de la inmunoreactividad para cada proteína a cada hora estudiada.

8.3 NIVELES HORMONALES

Se realizó la cuantificación de los niveles plasmáticos de E₂ y P₄ de las ratas sacrificadas para verificar que éstos coincidieran con la concentración hormonal reportadas en la literatura. Los niveles hormonales se obtuvieron por RIA (Figura 16) y coinciden con las concentraciones reportadas en la literatura. A las 13 h del proestro, los niveles plasmáticos del estradiol el E₂ tienen el valor más alto de todo el ciclo (45 ± 2 pg/ml). Durante la tarde del proestro caen rápidamente y alcanzan los valores basales (8 ± 2 pg/ml) en las primeras horas de la mañana del estro. (Figura 1). Durante la tarde del proestro el nivel de progesterona alcanza un valor máximo entre las 16 y 21 h (46 ± 7 ng/ml). Para la mañana del estro los niveles de progesterona vuelven a ser basales (2 ± 1 ng/ml).

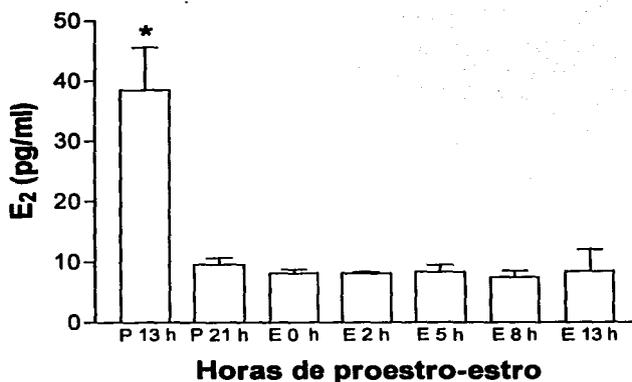
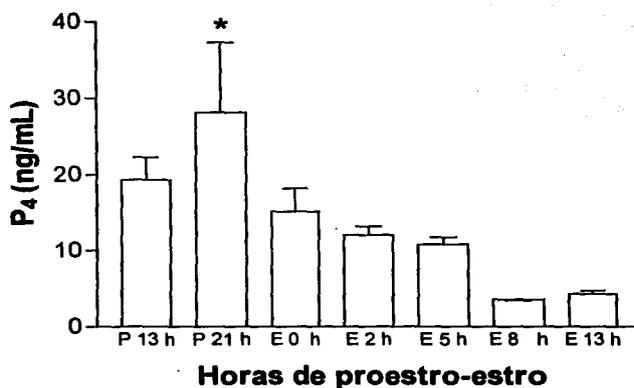
A**B**

Figura 16. Concentración sérica de estradiol (A) y progesterona (B) durante la transición de la etapa de proestro al estró del ciclo estral. Los niveles hormonales fueron determinados por RIA.

A. * $p_{P13h} < 0.001$ respecto a P21 h, E 0 h, E 5 h y * $p < 0.01$ respecto a E 2 h, E 8 h y E 13 h.

B. * $p_{P21h} < 0.001$ respecto a E 8 h y E 13 h.

Los resultados están expresados como la Media \pm ESM de los valores obtenidos de 3 animales por cada hora.

9. DISCUSIÓN

En esta tesis se demostró que existe un cambio en los niveles de expresión de genes anti-apoptóticos *bcl-2* y *bcl-x_L* y pro-apoptóticos *bax* y *bcl-x_S* durante la regresión del epitelio uterino de la rata que favorece las señales pro-apoptóticas que dan lugar a la muerte celular observada en las células del epitelio luminal y glandular del útero en la etapa del estro del ciclo estral .

Estudios previos han señalado que la apoptosis en tejidos hormono dependientes a E₂ y P₄ ocurre por una disminución en la concentración plasmática de estas hormonas (Pecci *et al.*, 1997; Burroughs *et al.*, 2000). Este fenómeno fisiológico se asocia con cambios en la programación epigenética de la célula como la inducción o supresión de genes que controlan la proliferación y la muerte celular, entre los cuales se encuentran la familia de genes de *bcl-2* (Bissonnette *et al.*, 1992; Gompel *et al.*, 2000; Lea *et al.*, 1999; Leng *et al.*, 2000; Maruo *et al.*, 2001). Aunque se ha estudiado la expresión de los genes de la familia *bcl-2* en condiciones fisiológicas, no existen estudios que asocien la expresión de estos genes con la muerte celular que se presenta en la regresión cíclica del epitelio uterino.

En esta tesis se determinó la expresión relativa del mRNA de los genes *p53*, *bcl-2*, *bax*, *bcl-x_L* y *bcl-x_S* en el útero de la rata utilizando la técnica de Transcripción Reversa acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Esta técnica es muy sensible y permite detectar cambios pequeños en la concentración del mRNA de cualquier gen. Se realizó el PCR dentro de la fase exponencial de la amplificación para asegurar que se distinguieran los cambios en la expresión de los genes estudiados. Los fragmentos de cDNA obtenidos correspondieron al tamaño que se esperaba. Solo se observó una banda para cada gen amplificado. En el caso del PCR para *bcl-x* se observaron dos bandas, ya que los oligonucleóticos están diseñados para amplificar las isoformas del mRNA *bcl-x_L* y *bcl-x_S*. Estas isoformas tienen una función contraria en la regulación de la

apoptosis. En los controles negativos no se observó banda alguna, lo cual nos asegura que no existen problemas de contaminación.

En este estudio la expresión de *bcl-2* presentó una disminución a partir de las 0 h del estro a nivel de mRNA. A partir de las 5h del estro la concentración del mensajero comenzó a aumentar (Figura 13). La expresión a nivel de la proteína disminuyó a partir de las 21 h del proestro y presentó su nivel más bajo a las 2 h del estro tanto en el epitelio luminal como en el glandular. A las 8 h del estro los niveles de la proteína se elevaron en ambos epitelios (Figura 14). El patrón de expresión de la proteína coincide con la expresión del RNA mensajero. Además la disminución en la expresión de *bcl-2* coincide con el regreso de E₂ al nivel basal de concentración plasmática y con la disminución de P₄ (Figura 16) que ocurre a partir de las 0 h del estro.

Un patrón de expresión similar de *bcl-2* a nivel de la proteína se ha reportado en el útero humano normal durante el ciclo menstrual. Bcl-2 resultó ser más abundante durante la fase proliferativa en la capa basal del epitelio. Las células con la más baja inmunoreactividad para la proteína Bcl-2 se presentaron en la fase secretora, la cual precede a la menstruación. Se piensa que estas células inmunoreactivas promueven la supervivencia del epitelio uterino en el próximo ciclo uterino (Tao *et al.*, 1997). Se ha observado una predominancia de la proteína en las células glandulares durante el final de la fase folicular y la expresión disminuye durante la fase secretora. También se han visto que existen variaciones cíclicas en la expresión de Bcl-2 en el estroma, epitelio superficial y vasos de arterias (Gompel *et al.*, 1994). En otros estudios se ha relacionado la expresión máxima de *bcl-2* con la presencia de hormonas ováricas en el endometrio (Gompel *et al.*, 1994; Koh *et al.*, 1995). Por otro lado, esta dependencia se ha demostrado con la administración de progestinas, las cuales tienen un efecto proapoptótico en las células de mama normales por causar una disminución de la proteína Bcl-2 (Gompel *et al.*, 2000). Además, la disminución de la expresión de *bcl-2* se ha relacionado con la disminución en la expresión de los receptores para

estrógenos y progesterona (RE y RP, respectivamente) durante la aparición de células apoptóticas en la fase secretora del ciclo uterino humano (Otsuki *et al.*, 1994). Lo cual indica que la expresión de *bcl-2* en el endometrio tiene una relación directa con la concentración de hormonas ováricas y con sus receptores. Por lo tanto, nuestros resultados confirman que existe una regulación a la baja *in vivo* de la expresión *bcl-2* inducida por la disminución de E₂ y P₄ que precede a la muerte celular en el epitelio uterino observada en la etapa del estro (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2002).

La expresión de *bax* permanece sin cambios significativos a nivel del mRNA durante la transición de la fase del proestro al estro (Figura 13). Sin embargo, la expresión a nivel de la proteína en el epitelio luminal y glandular aumenta a partir de las 21 h del proestro, presentando su nivel máximo entre las 0 h y 2 h del estro (Figura 14). A pesar de que la expresión de la proteína tiene un patrón diferente a la expresión del mensajero, ésta coincide con el aumento de la señal pro-apoptótica que se da a las 0 h y 2 h del estro debido a la disminución de la expresión de *bcl-2*. Este mismo patrón de expresión de *bax* se ha observado a nivel de la proteína en el útero humano durante el ciclo menstrual. *Bax* se localiza en muy pocas células en el epitelio durante el ciclo menstrual y solamente durante la fase secretora ocurre reacción inmunopositiva para *Bax* antes de presentarse la regresión del tejido (Tao *et al.*, 1997). En otros estudios donde se ha tratado de ver si este gen se encuentra regulado por hormonas esteroides en tejidos hormono dependientes se ha encontrado que la expresión del RNA mensajero de *bax* permanece sin cambios en presencia de E₂ en células de cáncer de mama (Gompel *et al.*, 2000). Tampoco se han visto cambios con la administración de P₄ y antiprogestinas aunque se mantenga alta la concentración de *bcl-2* y RE (Critchley *et al.*, 1999).

Por otro lado, la mayoría de los estudios que han analizado la expresión de los genes *bax* y *bcl-2* han relacionado la función pro-apoptótica de *Bax* con la relación de la expresión de *bax* respecto a *bcl-2* (*basx/bcl-2*). El significado

funcional de la relación *bax/bcl-2* deriva del potencial para la formación de heterodímeros entre Bax y Bcl-2. Una relación alta de Bax:Bcl-2 aumenta la probabilidad de formación de homodímeros de Bax y por lo tanto, la inducción de señales de muerte celular; mientras que un incremento de Bcl-2 favorece la formación de heterodímeros Bax/Bcl-2 y homodímeros de Bcl-2, los cuales promueven la sobrevivencia celular. Por ejemplo, durante la regresión de células estromales del útero que ocurre durante la decidualización del endometrio en el primer trimestre del embarazo, se ha encontrado que la proporción pro-apoptótica de la expresión *bax* sobre *bcl-2* aumenta para favorecer la apoptosis (Tao *et al.*, 1997; Dai *et al.*, 2000). Este fenómeno se cree que está regulado por la acción de la P₄ en el útero durante el embarazo y se ha asociado con una disminución de los receptores funcionales de ésta. Esta misma inducción de la señal pro-apoptótica se ha visto en células de la granulosa durante la regresión del cuerpo lúteo (Tilly *et al.*, 1995). En esta tesis se demuestra que la apoptosis del epitelio uterino observada en la mañana del estro parece estar ocasionada por una inducción en la expresión *bax* y por una disminución de la expresión de *bcl-2*. Por lo tanto, el incremento en la proporción *bax/bcl-2* que ocurre durante las primeras horas del estro podría inducir la muerte de ambos epitelios en la mañana del estro.

En cuanto al análisis de la expresión del gen *bcl-x*, se observaron cambios a nivel de las proteínas Bcl-x_L y Bcl-x_S, las cuales están presentes en la rata (Shiraiwa *et al.*, 1996). El mensajero de *bcl-x_L* presenta una disminución de su expresión a las 0 h del estro, aunque solamente es significativamente diferente al valor observado en E 13 h (Figura 9). Sin embargo, la expresión de la proteína si presenta una disminución significativa a las 0 h del estro en el epitelio luminal (Figura 13) y a las 5 h del estro en el epitelio glandular (Figura 14). En ambos epitelios, la proteína aumenta significativamente a partir de las 8 h del estro con respecto a 0 h, 2 h y 5 h de la misma etapa (Figura 13 y 14).

Como puede observarse, el patron de expresión de esta isoforma coincide con el de *bcl-2*. Nuestros resultados confirman los datos reportados de la similitud

entre expresión de esta isoforma y la expresión de *bcl-2* durante el ciclo menstrual del útero humano (Tao *et al.*, 1997). Además, al igual que *bcl-2*, se ha reportado que la expresión de *bcl-x_L* depende de la presencia de E₂. Por ejemplo, en líneas celulares de cáncer de mama, se ha visto que el estradiol aumenta la expresión de *bcl-x_L* (Gompel *et al.*, 2000). Por lo tanto la disminución de los niveles de expresión de *bcl-x_L* al igual que de *bcl-2* puede estar dada por la disminución en la concentración de E₂ que ocurre durante la transición de la etapa del estro al proestro del ciclo estral.

La expresión de la isoforma *bcl-x_S* a nivel de mRNA permanece sin cambios significativos durante las horas estudiadas (Figura 9). Sin embargo, a nivel de la proteína, un aumento en la inmunoreactividad se obtuvo para las dos isoformas ocurre en el epitelio uterino a las 0 h y 2 h del estro (Figura 13 y 14), al mismo tiempo que la inmunoreactividad para la proteína Bcl-x_L disminuye (Figura 13 y 14). Por lo tanto, este incremento se debe a un aumento de la isoforma Bcl-x_S. Además este aumento coincide con un incremento de la proporción de la expresión del RNA mensajero de *bcl-x_S* sobre *bcl-x_L* (Figura 10), por lo que se puede observar que la función pro-apoptótica se encuentra aumentada a las 0 h del estro. Este incremento en la expresión de Bcl-x_S podría producir una señal pro-apoptótica en el epitelio del útero en las primeras horas del estro. La regulación hormonal de la expresión del gen *bcl-x* se ha visto *in vitro* en líneas celulares epiteliales de endometrio. Donde la proporción apoptótica de *bcl-x_S* sobre *bcl-x_L* se ha atribuido a un cambio en la expresión de las isoformas del gen *bcl-x* inducida por una disminución de los niveles de progesterona o por la administración de progestinas (Pecci *et al.*, 1997). Por lo tanto, el cambio en la expresión de las isoformas de *bcl-x* que se presenta antes de la muerte del epitelio uterino puede funcionar como una señal de muerte al aumentar la expresión de la proteína pro-apoptótica, la cual se ha visto que también puede inhibir la función de Bcl-2 (Sumantran y Ealovega, 1995).

La concentración de mRNA de *p53* se mantiene sin cambios significativos en las primeras horas del estro. El mRNA de este gen aumenta al doble en la fase tardía del estro. Al investigar la presencia de la proteína en el epitelio uterino, se observó que la concentración aumenta significativamente a partir de las 5 h del estro y se localiza en el citoplasma de las células en todas las horas estudiadas. Como puede observarse, el aumento de la proteína en las horas del estro coinciden con el aumento en la expresión del mensajero.

A pesar de que *p53* es conocido como un factor de transcripción que participa activamente en la apoptosis, ciclo celular, replicación y reparación del DNA, se ha reportado que *p53* aumenta tanto a nivel de mRNA como de la proteína localizada en el núcleo de las células durante la fase proliferativa del ciclo estral; es decir, de la etapa del metaestro al proestro, encontrándose un menor nivel de expresión en la etapa del estro (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2002).

En este estudio la proteína *p53* se localizó predominantemente en el citoplasma. Algunos estudios han reportado que durante la apoptosis dependiente de *p53*, esta proteína se encuentra en el citoplasma y puede tener una actividad directa sobre la muerte celular en la vía mitocondrial. Sin embargo, la expresión de *p53* permanece sin cambios significativos aún cuando aumentan los niveles de las proteínas proapoptóticas durante las horas que preceden a la muerte celular en el epitelio uterino observada en la etapa del estro. Por lo tanto, la apoptosis en las células epiteliales del útero de la rata, ocasionada por una disminución en la concentración plasmática de hormonas esteroides ováricas parece ser independiente de *p53* y confirma la teoría de que la proteína más bien esta involucrada en la regulación de la proliferación del útero. Estos resultados concuerdan con los datos reportados sobre la regulación de *p53* por hormonas esteroides ováricas. Se ha visto que *p53* se expresa en forma inversa a los genes proapoptóticos. Por ejemplo, en células de cáncer de mama la expresión de *p53* es inducida por el estradiol y disminuida al mismo tiempo que aumenta el nivel de caspasa 3, una proteína presente en la fase de ejecución de la apoptosis por

progestinas, las cuales resultaron ser pro-apoptóticas (Gompel *et al.*, 2000). Esto quiere decir que p53 se encuentra regulado por el E₂ y se asocia con un estado proliferativo en células de tejidos hormono dependientes.

Como se puede observar de los resultados, el cambio en la expresión de genes de la familia *bcl-2* regula la muerte celular del epitelio uterino observada en la etapa del estro del ciclo estral y este fenómeno parece estar dado por un estímulo causado por la disminución de hormonas esteoides ováricas. Por un lado la disminución de la expresión de genes anti-apoptóticos *bcl-2* y *bcl-x_L* y por otro lado, aproximadamente a la misma hora el aumento en la expresión de genes pro-apoptóticos *bax* y *bcl-x_S* aumenta la relación de la expresión de genes pro-apoptóticos sobre antiapoptóticos y se presenta la ganancia de la función pro-apoptóticas de las proteínas Bax y Bcl-x_S. Aunque la mayoría de los estudios reportados relacionan la apoptosis de un tejido dependiente de E₂ y P₄ con un aumento en la proporción de *bax/bcl-2* hay que tomar en cuenta que estos genes no son los únicos involucrados en la regulación de la apoptosis. Por ello, en esta tesis se estudió la expresión de las isoformas de *bcl-x*, ya que estos genes de la familia de *bcl-2* dan lugar a proteínas que controlan la apoptosis por medio de la liberación del *Cyt c* de la mitocondria. Se ha visto que la expresión de *bcl-x* puede estar regulando la apoptosis en forma independiente o complementaria a *bcl-2*, y muchas veces esta regulación depende del tipo celular (Boise *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1995). Además, Bcl-x_L puede funcionar como un inhibidor de apoptosis inducida por Bax (Cheng *et al.*, 1996). Tampoco se puede descartar la posibilidad de que la expresión de otros genes relacionados con la proliferación y muerte celular no intervengan en la señal de la relación pro-apoptótica. Por ejemplo, se ha visto que la interacción entre *c-myc* y los miembros de la familia *bcl-2*, puede tener un papel importante en el control de la apoptosis (Bissonnette *et al.*, 1992) y un aumento en la expresión de *c-myc* puede estar relacionado con un aumento en la relación *bax/bcl-2* a nivel de mRNA por un aumento de *bax* después de inducir la apoptosis en células luteas al tratarlas con droloxifen (Leng *et al.*, 2000). Se ha reportado que el aumento de la proteína Bax ocurre del primer al tercer trimestre

de embarazo cuando la P_4 tiene un papel muy importante, se presenta apoptosis en todos los tipos celulares de la placenta. Sin embargo, aunque ésta se atribuye a la regulación por un cambio crítico en la proporción *bax/bcl-2* en este tejido, la acción de mayor importancia se le ha atribuido a $TNF\alpha$ (Lea *et al.*, 1999). Tendrían que realizarse estudios para saber si esta citocina tiene un papel importante sobre la regulación de la apoptosis que ocurre durante la regresión cíclica del epitelio uterino.

El cambio en la expresión de estos genes de la familia *bcl-2* que participan en el proceso de muerte celular debe estar regulado por elementos de respuesta a hormonas esteroides o por la acción de algunos factores de crecimiento. Sin embargo, no se sabe si existen elementos reguladores en las regiones promotoras de genes *bax* (Toshiyuki y Reed, 1995). En estudios recientes se ha encontrado elemento de respuesta a estrógenos (ERE) en el gen de *bcl-2* (Dong *et al.*, 1999; Perillo *et al.*, 2000). Por otro lado, las hormonas esteroides ováricas pueden modular la síntesis local y/o la acción de varios factores de crecimiento en el útero (Pollard, 1990; Brigstock, 1991; Das *et al.*, 1992;). Por ejemplo el factor transformador $\beta 2$ miembro de la familia de crecimiento transformador, puede inducir la apoptosis en células de estroma *in vitro* por un mecanismo autócrino / parácrino (Moulton, 1994). De estos hechos ha surgido la posibilidad de que la apoptosis en las células epiteliales este mediada por la acción parácrina de las hormonas esteroides (Kurita *et al.*, 2001). Por ejemplo, se ha visto que la expresión de *bcl-x_L* puede estar regulada por receptores a factores de crecimiento o sustratos de adhesión celular (Rodeck, 1997).

En este trabajo, se determinó si los genes de la familia *bcl-2* y *p53* participan en la cascada de eventos que preceden a la muerte celular en el epitelio uterino que se presenta en la mañana de la etapa del estro. El útero de la rata resulta ser un buen modelo para estudiar los mecanismos moleculares por medio de los cuales las hormonas esteroides regulan la muerte celular en condiciones fisiológicas. Ya que este fenómeno se ha estudiado utilizando varios modelos. Por

ejemplo, leiomiomas uterinos de rata, en los que se ha visto que las hormonas esteroideas regulan el crecimiento de estos tumores benignos. Sin embargo, en éstos existe una desregulación en la proliferación y muerte celular (Burroughs *et al.*, 2000). Aunque se ha utilizado como modelo para estudiar a la apoptosis la deciduización de células estromales durante el primer trimestre de embarazo, el efecto que producen las hormonas esteroideas no pueden asociarse con la acción de éstas durante la regresión cíclica del epitelio uterino. Además, se ha visto que en líneas celulares del endometrio el uso de tratamientos hormonales puede ocasionar una sobre regulación de la expresión de genes anti-apoptóticos, causando su acumulación y dificultando la detección de genes pro-apoptóticos (Lotem y Sachs, 1995). Por el contrario, el modelo de regresión de epitelio uterino nos permite conocer como se regula la apoptosis y nos puede dar información de cómo se altera la homeostasis en condiciones fisiológicas y cómo se puede dar lugar a un crecimiento neoplásico por su alteración.

Desde hace algunos años, los investigadores han tratado de entender las causas del crecimiento de tumores enfocándose a procesos involucrados en la división celular. Sin embargo, el estudio de la apoptosis se ha considerado importante para entender los mecanismos por los cuales las células tumorales pueden prolongar su vida. Por ello, conocer los mecanismos moleculares que regulan la apoptosis en la regresión del epitelio uterino puede ayudarnos a comprender las causas del cáncer en este tejido y debe ser una vía efectiva para mejorar la terapia antitumoral, ya sea aumentando la respuesta apoptótica de tejidos cancerígenos o por inhibición de la misma en tejidos normales. La expresión de genes de la familia *bcl-2* se ha relacionado con el pronóstico de cáncer de mama (Daidone *et al.*, 1999; Schor *et al.*, 1999). Considerando esto, en este trabajo se demuestra que estos genes también pueden ser utilizados para el pronóstico de cáncer en el útero.

10. CONCLUSIONES

En este trabajo se estudió el patrón de expresión de genes *p53*, *bcl-2*, *bax*, *bcl-x_L* y *bcl-x_S* involucrados en la muerte celular que ocurre durante la regresión del epitelio uterino. Los resultados obtenidos indican que:

1. La expresión de *bcl-2* presenta una disminución a partir de las 0 h tanto a nivel de mRNA como de proteína y la expresión aumenta a partir de las 5 h y 8 h del estro, respectivamente.
2. La expresión de *bax* permanece sin cambios significativos a nivel del mRNA, mientras que la expresión de la proteína en el epitelio luminal y glandular aumenta a partir de las 0 h del estro.
3. Se observaron cambios en la expresión de *bcl-x*. El mRNA y la proteína, tanto en el epitelio luminal como glandular, de *bcl-x_L* presenta una disminución a las 0 h del estro y aumentar a hacia las siguientes horas del estro. La expresión de la isoforma *bcl-x_S* a nivel de mRNA permanece sin cambios significativos. Mientras un aumento de la inmunoreactividad a las 0 h y 2 h del estro se atribuye a la proteína Bcl-x_S.
4. Un aumento en la relación pro-apoptótica se da a las 0 h y 2 h del estro para *bax / bcl-2* disminuyendo drásticamente a partir de las 5 h de la misma etapa. Mientras que para *bcl-x_S / bcl-x_L* se presenta a las 21 h del proestro y disminuye progresivamente hacia las 13 h del estro. Esto mismo se observa a nivel de la proteína.
5. La expresión de *p53* tanto a nivel de mRNA como de la proteína se mantiene sin cambios significativos en las primeras horas del estro. Posteriormente, la expresión aumenta en la fase tardía del estro.

6. No se encontró relación alguna entre la inducción de genes apoptóticos y la expresión de *p53*. Por lo tanto, la apoptosis observada en el epitelio luminal y glandular en la etapa del estro parece ser independiente de *p53*.

7. Al disminuir la expresión de los genes antiapoptóticos *bcl-2* y *bcl-x_L* y aumentar la expresión de genes pro-apoptóticos *bax* y *bcl-x_S* en el epitelio uterino se provoca una ganancia de la función proapoptótica, que activa la cascada de caspasas y da como resultado la muerte celular del epitelio luminal y glandular del útero de la rata observada en la etapa del estro del ciclo estral.

11. REFERENCIAS

- Abbadie C, Kabrun N, Bouali F, Smardova J, Stehelin D y Vandebunder B (1993) High levels of c-rel expression are associated with programmed cell death in the developing avian embryo and in bone marrow cells *in vitro*. *Cell* 75, 899.
- Adams JM y Cory S (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322.
- Allsopp TE, Wyatt S, Paterson HF y Davies AM (1993) The proto-oncogene *bcl-2* can selectively rescue neurotrophic factor-dependent neurons from apoptosis. *Cell* 73, 295.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW y Yuan J (1996) Human ICE/CED 3-protease nomenclature. *Cell* 87, 171.
- Ameisen JC (1996) The origin of programmed cell death. *Science* 272, 1278.
- Amsterdam A, Dantes A, Selvaraj N y Aharoni D (1997) Apoptosis in steroidogenic cells: structure-function analysis. *Steroids* 62, 207.
- Antonsson B (2001) Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim, the mitochondrion. *Cell Tissue Res* 306, 347.
- Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermoud JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R y Martinou JC (1997) Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 277, 370.
- Antonsson B y Martinou JC (2000) The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 256, 50.
- Apte SS, Mattei MG y Olsen BR (1995) Mapping of the human bax gene to chromosome 19q13.3-q14.4 and isolation of a novel alternatively spliced transcript, bax- δ . *Genomics* 26, 592.
- Baker DEJ (1979) Reproduction and breeding : The laboratory rat. *Biology and diseases* (Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH ed) pp 154, Academic Press, New York.
- Barinaga M (1994) Cell suicide by ICE, not fire. *Science* 263, 754.
- Barinaga M (1996) Forging a path to cell death. *Science* 273, 735.
- Basanez G, Nechustan A, Drozhinin O, Chanturiya A, Choe E, Tutt S, Wood KA; Hsu Y Zimmergerg J y Youle Rj (1999) Bax, but no Bcl-xL decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci* 96, 5492.

- Bernal J y Nunez J (1995) Thyroid hormones and brain development. *Eur J Endocrinol* 133, 390.
- Bertalanffy FD y Lau C (1963) Mitotic rates, renewal times, and cytodinamics of the female genital tract epithelia in the rat. *Acta Anat* 54, 39.
- Beutner G, Ruck A, Riede B y Brdiczka D (1998) Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatinkinase and adenylate translocator display properties of the permability transition pore. Implication of regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim Biophys Acta* 1368, 7.
- Bissonnette RP, Exheverri F, Mahboubi A y Green DR (1992) Apoptotic cell death induced by *c-myc* is inhibited by *bcl-2*. *Nature* 359, 552.
- Blobel GA y Orkin SH (1996) Estrogen induced apoptosis by inhibiion of the erythroid transcription factor GATA-1. *Mol Cell Biol* 16,1687.
- Boise LH, González-García M y Postema CE (1993) *bcl-x*, a *bcl-2* related gene that functions as dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74, 597.
- Bosch J, Horn D, Ruller S y Schlaak M (1992) Modulation of tumor cell susceptibility to cytokine-induced cell death by hormones, growth factors, and cell density. *J Cell Physiol* 151, 395.
- Brenner C, Kadiou H, Vieira HL, Samsami N, Marzo I, Xie Z, Leber B, Andreus D, Duclohier H, Reed JC y Kroemer G (2000) Bcl-2 and Bax regulate of the channel activity of the mitochondrial adenin nucleotide translocator. *Oncogene* 19, 329.
- Brigstock DR (1991) Growth factors in the uterus: steroidal regulation and biological actions. *Bailliere Clin Endocr Metabol* 5, 791.
- Brown-Grant K, Exley D y Naftolin F (1970) Peripheral plasma oestradiol and luteinizing hormone concentrations during the oestrus cycle of the rat. *J Endocr* 48, 295.
- Buchanan DL, Kurita T, Taylor JA, Lubahn DB, Cunha GR y Cooke PS (1998) Role of stromal and epithelial estrogen receptors in vaginal epithelial proliferation, stratification, and cornification. *Endocrinology* 139, 4345.
- Buckbinder L, Talbott R, Velesco-Migueill S, Takenaka I, Faha B, Seizinberg BR y Kley N (1995) Induction of the growth inhibitor IGF-binding proteiinn 3 by p53. *Nature* 377, 646.

- Burroughs KD, Fuchs-Young R, Davis B, Walker CL (2000) Altered hormonal responsiveness of proliferation and apoptosis during myometrial maturation and the development of uterine leiomyomas in the rat. *Biol Rep* 63, 1322.
- Butcher RL, Collins WE y Fugo NW (1974) Plasma concentrations of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 β throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 94, 1704.
- Caelles C, Heimberg A y Karin M (1994) p53-dependent apoptosis in the absence of p53-target genes. *Nature* 370, 220.
- Campos L, Sabido O, Roualult JP y Guyotat D (1994) Effects of Bcl-2 antisense oligodeoxynucleotides on in vitro proliferation and survival of normal marrow progenitors and leukemic cells. *Blood* 84, 595.
- Canman CE, Gilmer TM, Coutts SB y Kastan MB (1995) Growth factor modulation of p53 mediated growth arrest versus apoptosis. *Genes & Dev* 9, 600.
- Caspari T (2000) Checkpoints: How to active p 53. *Current Biol* 10, 12315.
- Catlin EA, MacLaughlin DT y Donahoe PK (1993) Mullerian inhibiting substance: new perspectives and future directions. *Micros Res Tech* 25, 121.
- Ceccatelli S, Diana A, Villar MJ y Nicotera P (1995) Adrenocortical apoptosis in hypophysectomized rats is selectively reduced by ACTH. *Neuroreport*. 6, 342.
- Chattopadhyay A, Chiang EW y Yang E (2001) Bad/Bcl-xL heterodimerization leads to bypass of G0/G1 arrest. *Oncogene* 20, 4507.
- Chau BN, Cheng EH, Kerr DA y Hardwick JM (2000) Aven, a novel inhibitor of caspase activation binds Bcl-xL and Apaf-1. *Mol Cell* 6, 31.
- Cheng EH, Kirsh DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Uenok y Hardwick JM (1997) Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278, 1966.
- Cheng EH, Levine B, Boise LH, Thokmpson CB y Hardwick JM (1996) Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-xL. *Nature* 379, 554.
- Chen-Levy, Nourse ZJ, y Cleary ML (1989) The Bcl-2 candidate proto-oncogene product is a 24-kilodalton integral-membrane protein highly expressed in lymphoid cell lines and lymphomas carrying the t(14; 18). *Mol Cell Biol* 9, 701.
- Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD y Pauletich NP (1994) Cristal structure of a p53 tumor supresor DNA complex; understanding tumorigenic mutations. *Science* 265, 346.

- Chun S-Y, Eisenhauer KM, Minami S, Billig H, Perlas E y Hsueh AJW (1996) Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles FSH as a major survival factor. *Endocrinology* 137, 1447.
- Clark BF (1971) The effects of oestrogen and progesterone on uterine cell division and epithelial morphology in spayed, adrenalectomized rats. *J Endocr* 50, 527.
- Clarke AR, Purdie CA, Harrisoon DJ, Morris RG, Bird CC, Hoper ML y Wyllie AH (1993) Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 362, 849.
- Clem RJ, Cheng EH, Karp CL, Kirsh DG, Uenok, Takahashi A, Kastan MB, Griffin DE, Earnshaw WC, Velluona MA y Hardwick JM (1998) Modulation of cell death by Bcl-xL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci* 95, 554.
- Cohen GM (1997) Caspases: The executioners of apoptosis. *Biochem J* 326, 1.
- Cooke P, Buchanan D, Young P, Setiaean T, Brody J, Korach K, Taylor J, Lubahn D y Cunha G (1997) Stromal estrogen receptors (RE) mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. *Proc Natl Acad Sci* 94, 6535.
- Cooke PS, Uchima F-DA, Fujii DK, Bern HA y Cunha GR (1986) Restoration of normal morphology and estrogen responsiveness in cultured vaginal and uterine epithelia transplanted with stroma. *Proc Natl Acad Sci* 83, 2109.
- Critchley HO, Tong S, Cameron ST, Drudy TA, Kelly RW y Baird DT (1999) Regulation of bcl-2 gene family members in human endometrium by antiprogestin administration in vivo. *J Reprod Fertil* 115, 389.
- Crompton M, Virji S, Doyle B, Jhonson N y Iward JM (1999) The mitochondrial permeability transition pore. *Biochem Soc Symp* 66, 167.
- Cuende E, Ales-Martinez JE, Dg L, González-García M, Martinez-AC y Nuñez G (1993) Programmed cell death by *bcl-2* dependent and independent mechanisms in B lymphoma cells. *EMBO J* 12, 155.
- Dai D, Moulton BC y Ogle TF (2000) Regression of the decidualized mesometrium and decidual cell apoptosis are associated with a shift in expression of Bcl-2 family members. *Biol Reprod* 63, 188.
- Daidone MG, Luisi A, Veroni S, Benini E y Silvestrini R (1999) Clinical studies of Bcl-2 and treatment benefit in breast cancer patients. *Endocr Relat Ccancer* 6, 61.

- Das SK, Flanders KI, Andrews GK y Dey SK (1992) Expression of transforming growth factor- β isoforms in the mouse uterus: analysis of the periimplantation period and effects of ovarian steroids. *Endocrinology* 130, 3459.
- Daugas E, Susin SA, Samsami N, Ferri KF, Irinopoulo T, Larochete N, Prevost MC, Leber B, Andreus D, Penninger J y Kroemer G (2000) Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis *FASEB J* 14, 729.
- Debbas M y White E (1993) Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A which is inhibited by E1B. *Genes & Dev* 7, 546.
- Deist F, Emilii JE, Rieux-Laucat P, Ben kerrou M, Roberts I, Brousse N y Fisher A (1996) Clinical immunological and pathological consequences of Fas deficient conditions. *Lancet* 348, 719.
- Denmeade SR, Lin XS, e Isaacs JT (1996) Role of programmed apoptotic cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *Prostate* 28, 251.
- Desagher S, Osen-Sand A, Montessuit S, Magnenat E, Bilboise F, Hoschman A, Hournot L, Antonsson B y Martinou JC (2001) Fosforilation of Bid in caseinkinasa I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol Cell* 8, 601.
- Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B y Martinou JC (1999) Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* 144, 891.
- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Butel JS y Bradley A (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. *Nature* 356, 215.
- Dubal DB, Shughrue PJ, Wilson ME, Merchenthaler I y Wise PM (1999) Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. *J Neuroscience* 19, 6385.
- Eguchi Y, Shimizu S y Tsujimoto Y (1997) intracellular ATP levels determine cell death fater by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 57, 1835.
- Ekegren T, Groundstrom E, Lindholm D y Aquilonius SM (1999) Up regulation of Bax protein and increased DNA degradation in ALS spinal cord motor neurons. *Acta Neurons Scan* 100, 317.

- Enari M (1998) A caspase-activated Dnase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43.
- Eskes R, Antonsson B, Osen-Sand A, Montesiut S, Richter C, Sadoul R, Masei G, Nichols A y Martinou JC (1998) Bax-induced cytochrome c release from mitochondrial is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions. *J Cell Biol* 143, 217.
- Evans RM (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889.
- Evans-Storms RB y Cidlowski JA (1996) Regulation of apoptosis by steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53, 1.
- Fang W, Rivard JJ, Mueller DL y Behrens TW (1994) Cloning and molecular characterization of mouse *bcl-x* in B and T lymphocytes. *J Immunol* 153, 4388.
- Fletcher-Chiappini SE, Compton MM, La Voie HA, Day EB, Witorsch RJ y Compton MM (1993) Glucocorticoid-prolactin interactions in Nb 2 lymphoma cells: antiproliferative versus anticytolytic effects. *Proc Soc Exp Biol Med* 202, 3291.
- Freeman ME (1988) The ovarian cycle of the rat. En *The Physiology of Reproduction* (E Knobil y J Neill, ed) pp 1893, Raven Press, Ltd, New York.
- Galli C, Meucci O, Scorziello A, Werge TM, Calissano P y Schettini F. (1995) Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, fosfokolin, and IGF-I through distinct mechanisms of action; the involvement of intracellular calcium and RNA synthesis. *J Neuroscience* 15, 1172.
- García I, Martinou I, Tsujimoto Y y Martinou JC (1992) Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the *bcl-2* proto-oncogene. *Science* 258, 302.
- Gibbons GH y Dzau VJ (1996) Molecular therapies for vascular diseases. *Science* 272, 689.
- Gompel A, Sabourin JC, Martin A, Yaneva H, Audoin J, Decoix Y y Poitout P (1994) Bcl-2 expression in normal endometrium during the menstrual cycle. *Am J Pathol* 144, 1195.
- Gompel A, Somai S, Chaouat M, Kazem A, Kloossterboer HJ, Beusman I, Forgez P, Mimoun M y Rostene W (2000) Hormonal regulation of apoptosis in breast cells and tissues. *Steroids* 65, 593.

- Gonzalez-García M, Pérez-Ballesteros, Ding L, Duan L, Boise LH, Thompson CB y Núñez-G (1994) Bcl-xL is the major Bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to the mitochondria. *Development* 120, 3033.
- Goping IS, Gross A, Laboie JN, Nguyen M, Jemerson R, Rod K, Korsmeyer SJ y Shore GC (1998) Regulated targeting of Bax to mitochondria. *J Cell Biol* 143, 207.
- Gottlieb E, Haffner R, von Ruden T, Wagner EF, Oren M (1994) Down regulation of wildtype p53 interferes with apoptosis of IL-3-depend withdrawal. *EMBO J* 13, 1368.
- Gottlieb TM y Oren M (1998) p53 and apoptosis. *Semin Cancer Biol* 8, 359.
- Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan CP, Jones NA, Whitehouse J, Corfe BM, Dive C y Kickman JA (1999) Enforced dimerization of Bax results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J* 17, 3878.
- Grillot DA, González-García M, Ekhterae D, Duan L, Inohara N, Ohta S, Seldin MF y Núñez G (1997) Genomic organization, promoter region and analysis, and chromosome localization of the mouse bcl-x gene. *J Immunol* 158, 4750.
- Gross A, Jockel J, Wei MC y Korsmeyer SJ (1998) Enforced dimerization of Bax results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J* 17, 3878.
- Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Millman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P y Korsmeyer SJ (1999) Caspase cleaved Bid targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while bcl-xL prevents this release but no tumor necrosis factor-R1 FAS. *J Biol Chem* 274, 1156.
- Haanen C y Vermes I (1996) Apoptosis: programmed cell death in fetal development. *European Journal of Obstetrics, Gynecol Reproduc Biol* 64, 129.
- Hafez ESE (1970) Female reproductive organs. En: *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals* (Hafez ESE, ed) pp 74, Lea y Febiger, USA.
- Haldar S, Jena N y Croce CM (1995) Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci* 92, 4507.
- Hanada M, Aimé-Sempé C, Sato T y Reed JC (1995) Structure-Function Analysis of Bcl-2 Protein. *J Biol Chem* 270, 11962.
- Harrington EA, Bennett MR, Fanidi A y Evan GE (1994) c-Myc induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines. *EMBO J* 13, 3286.

- Harris HM, Vander Heiden MK, Kron SJ y Thompson CV (2000) Role of oxidative phosphorylation in Bax toxicity. *Mol Cell Biol* 20, 3590.
- Haupt Y, Rowan S, Shaulian E, Vousden K y Oren M (1995) Induction of apoptosis in HeLa cells by transactivation-deficient p53. *Genes & Dev* 9, 2170.
- Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770.
- Hermeking H y Eick D (1994) Mediation of c-Myc induced apoptosis by p53. *Science* 265, 2091.
- Hirota M, Zhang Y, Fujita N, Naito M y Tsuruo T (1999) NH₂-terminal BH4 domain of Bcl-2 is functional for heterodimerization with Bax and inhibition of apoptosis. *J Biol Chem* 274, 20415.
- Hockenbery D, Nuñez G, Millman C, Schreiber RD y Korsmeyer SJ (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348, 334.
- Hopwood D y Levison DA (1976) Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. *J Pathol* 119, 159.
- Horikoshi N, Usheva A, Chen L y Levine AJ (1995) Two domains of p53 interact with the TATA-binding protein and the adenovirus protein disrupts the association, relieving p53-mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 15, 227.
- Howes KA, Ransom N, Pepermaster DS, Lasudry JGH, Albert DM y Windle JJ (1994) Apoptosis of retinoblastoma: alternative fates of photoreceptors expressing the HPV-16 E7 gene in the presence or absence of p53. *Genes & Dev* 8, 1300.
- Hsu YT y Youle RJ (1998) Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displaces differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem* 273, 10777.
- Hsueh AJW, Billig H y Tsafiri A (1994) Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev* 15, 707.
- Igase M, Okura T, Kitami Y y Hiwada K (1999) Apoptosis and bcl-x_s in the intimal thickening of balloon-injured carotid arteries. *Clin Sci* 96, 605.
- Ikemoto H, Tani E, Osaki I, Kitagawa H y Arita N (2000) Calphostin-c mediates translocation and integration of Bax in mitochondria and induces cytochrome c release before mitochondrial dysfunction. *Cell Death Differ* 7, 511.
- Irmier M (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 1309.

- Jaattela M (1999) Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res* 248, 30.
- Jacobson MD, Burne JF, King MP, Miyashita T, Reed JC y Raff MC (1993) Bcl-2 clocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* 361, 365.
- Jayaramann L y Prives C (1995) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by shokrt single strands of DNA requires the p53 C-terminus. *Cell* 81, 1021.
- Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D y Reed JC (1998) Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci* 95, 14681.
- Kataoka T, Holler N, Micheau O, Marinon F, Tinel A, Hofmann K y Tschopp J (2001) Bcl-rambo, a novel Bcl-2 homologue that induces apoptosis via its unique C-terminal extension. *J Biol Chem* 276, 19548.
- Kaye AM, Sheratzky D, Lindner HR (1972) Kinetics of DNA synthesis in immature rat uterus: age dependence and estradiol stimulation. *Biochim Biophys Acta* 261, 475.
- Kerr JF, Wyllie AH y Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 238.
- Khaled AR, Kim K, Hofmeister R, Muegge K y Durum SK (1999) Withdrawl of IL-7 induces Bax translocation from cytosol to mitochondrial through a rise in intracellular pH. *Proc Natl Acad Sci* 96, 14476.
- Kim HS, Houseman DB, Compton MM, Dean RJ, Martin RJ, Houseman GJ, HartzlIdlibaile CA (2000) Induction of apoptosis by all-trans-retinoic acid and C2-ceramide. *Treatment in rat stromal-vascular cultures bioch biophys research com.* 270, 76.
- Kirkland JL, LaPointe L, Justin E, Stancel GM (1979) Effects of estrogen on mitosis in individual cell types of the immature rat uterus. *Biol Reprod* 21, 269.
- Kitada S, Takayama S, DeRiel K, Tanaka S y Reed JC (1994) Reversal of chemoresistance of lymphoma cells by antisense-mediated reduction of bcl-2 gene expression. *Antisense Res Dev* 4, 71.
- Knudson CM y Korsmeyer SJ (1997) Bcl-2 in transgenic mice regulates apoptosis by heterodimerization independent mechanisms. *Nature Genet* 16, 358.
- Knudson CM, Tung KS, Tourtellote WG, Brown GA y Korsmeyer SJ (1995) Bax deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 270, 96.

- Koh EA, Illingworth PJ, Duncan WC y Critchley (1995) Immunolocalization of bcl-2 protein in human endometrium in the menstrual cycle and simulated early pregnancy. *Hum Reprod* 10, 1557.
- Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, Wang HG y Reed JC (1994) Investigation of the tissues distribution of the bcl-2 oncprotein. *Cancer Res* 54, 550.
- Krajewski S, Mai JK, Krajewska M, Sikorska M, Mosakowski MJ y Reed JC (1995) Upregulation of Bax protein levels in neurons following cerebral isquemia. *J Neuroscience* 15, 6364.
- Kudla G, Montessuit S, Eskes R, Berrier C, Martinou JC, Ghazi A y Antonsson B (2000) The destabilization of lipid membranes induced by the C-terminal fragment of caspase 8 cleaved Bid is inhibited by N-terminal fragment. *J Biochem* 275, 2273.
- Kurita T, Wang YZ, Donjacour AA, Zhao C, Lydon JP, O'Malley BW, Isaacs JT, Dahiya R y Cunha GR (2001) Paracrine regulation of apoptosis by steroid hormones in the male and female reproductive system. *Cell Differ* 8, 192.
- Kurita T, Young P, Brody JR, Loydon JP, O'Malley BW y Cunha GR (1998) Sromal progesterone receptors mediate the inhibitory effects of progesterone on estrogen-induced uterine epithelial cell desoxiribonucleic acid synthesis. *Endocrinology* 139, 4708.
- Lai MD, Lee LR, Cheng KS, Wing LYC (2000) Expression of proliferating cell nuclear antigen in luminal epithelium during the growth and regression of rat uterus. *J Endocrinol* 166, 87.
- Lang RA (1997) Apoptosis in mammalian eye development: lens morphogenesis, vascular regression and immune privilege. *Cell Death Differ* 4,12.
- Lau KM, Leav I y Ho SM (1998) Rat estrogen receptor- α and- β , and progesterone receptor mRNA expression in various prostatic lobes and microdissected nkormal and dysplastic epithelial tissues of the noble rats, *Endocrinology* 139, 424.
- Lavin M y Watters D (1993) Programmed cell death – the cellular and molecular biology of apoptosis. Chur. Switzaerland: Harwood Academic Publ
- Lea RG, Riley SC, Antipatis C, Hannah L, Ashworth CJ, Clarck DA y Critchley HO (1999) Cytocines and regulation of apoptosis in reproductive tissues: a review *Amm J Reprod Immunol* 42, 100.

- Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S y Nicotera P (1997) Intracellular adenosine triphosphate a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 185, 1481.
- Leng Y, Gu Z y Lin C (2000) Apoptosis induced by droloxifene and *c-myc*, *bax* and *bcl-2* mRNA expression in cultured luteal cells of rats. *Eur J Pharm* 409, 123.
- Levine AJ (1997) p 53 the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323.
- Li H, Zhu H, Xu CJ y Yuan J (1998) Cleavage of Bid by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491.
- Li LY, Lou X y Ywang X (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when release from mitochondria. *Nature* 412, 95.
- Lin J, Wu X, Chen Chang A y Levine AJ (1995) Functions of the p53 protein in growth regulation and tumor suppression. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 215.
- Lindenboim L, Yuan J y Steiin R (2000) Bcl-xS and Bax induce different apoptotic pathways in PC12 cells. *Oncogene* 19, 1783.
- Lotem J y Sachs L (1995) Regulation of bcl-2, bcl-xL and bax in control of apoptosis by hematopoietic cytokines and dexamethasone. *Cell Growth Differ* 6, 647.
- Lowe SW, Ruley HE, Jacks T y Houseman DE (1993a) p53-Dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74, 957.
- Lowe SW, Schimitt EM, Smith SW, Osborne BA y Jacks T (1993b) p53 is required for radiation induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362, 847.
- Lu H y Levine AJ (1995) TAF31 protein is a transcriptional coactivator of p53 protein. *Proc Natl Acad Sci* 92, 5154.
- Marcus GJ (1974) Mitosis in the rat uterus during the estrous cycle, early pregnancy, and early pseudopregnancy. *Biol Reprod* 10, 447.
- Marou T, Laoag-Fernandez JB, Pakarinen P, Murakoshi H, Spitz IM y Johansson E (2001) Effects of levonorgestrel-relasin intrauterine system of proliferation and apoptosis in the endometrium, *Hum Reprod* 16, 2103.
- Martin L, Finn CA y Carter J (1970) Effects of progesterone and oestradiol-17 beta on the luminal epithelium of the mouse uterus. *J Reprod Fertil* 21, 461.

- Martinou I, Desagher S, Eskes R, Antonsson B, Andre E, Fakan S y Martinou JCK (1999) The release of cytochrome c from mitochondria during apoptosis of NGF-deprived sympathetic neurons is a reversible event. *J Cell Biol* 144, 833.
- Marzo I, Brener C, Zamazami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Viera HL, Prevost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC y Kroemer G (1998a) Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 281, 2027.
- Marzo I, Brenner C, Zamazami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HK, Prevost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemer G (1998b) The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2 related proteins. *J Exp Med Biol* 2, 318.
- Matsuyama S, Yopis J, Deberaux QL, Tsien RY y Reed JC (2000) Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nat Cell Biol* 2, 318.
- McCurrach ME, Connor TM, Knudson CM, Korsmeyer SJ y Lowe SW (1997) Bax deficiency promotes drug resistance and oncogenic transformation by attenuating p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* 94, 2345.
- McDonnell TJ, Troncoso P, Brisbay SM, Logothetis C, Chung LWK, Hsieh JT, Tu SM y Campbell ML (1992) Expression of the bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res* 52, 6940.
- Mendoza-Rodríguez CA, Cerbón MA (2001) El gen supresor de tumores p53: mecanismo de acción en la proliferación y muerte celular. *Rev Inv Clin* 53, 266
- Mendoza-Rodríguez CA, Merchant-Larios H, Segura-Valdez ML, Moreno-Mendoza N, Cruz ME, Arteaga-López P, Camacho-Arroyo I, Domínguez R, Cerbón M (2002) Expression of p53 in luminal and glandular epithelium during the growth and regression of rat uterus during the estrous cycle. *Mol Reprod Develop* 61, 445.
- Migliorati G, Nicoletti I, D'Adamio F, Spreca A, Pagliacci MC y Riccardi C (1994) Dexametasone induces apoptosis in mouse natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes. *Immunology* 81, 21.

- Mikhailov V, Mikhailova M, Pulkrabek DJ, Dong Z, Venkatachalam MA y Saikumar P (2001) Bcl-2 prevents bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 276, 18361.
- Milas L, Stephens LC y Meyn RE (1994) Relation of apoptosis to cancer therapy. *In vivo* 8, 665.
- Minn AJ, Boise LH y Thompson CB (1996) Bcl-xS antagonizes the protective effects of Bcl-xL. *J Biol Chem* 271, 6306.
- Minn AJ, Kettlun CS, Liang H, Kelekar A, Vander Heiden MG, Chang BS, Fesik SW, Fill M y Thompson CB (1999) Bcl-xL regulates apoptosis by heterodimerization-dependent and -in-dependent mechanisms. *EMBO J* 18, 632.
- Minn AJ, Velez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW, Fill M y Thompson CB (1997) Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 385, 353.
- Miyashita T y Reed JC (1992) bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEHI7.2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. *Cancer Res* 52, 5407.
- Miyashita T y Reed JC (1993) Bcl-2 oncprotein blocks chemotherapy induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 81, 151.
- Miyashita T y Reed JC (1995) Tumor supresor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293.
- Miyashita T y Reed JC (1995) Tumor supresor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293.
- Moulton BC (1994) Transforming growth factor β stimulates endometrial stromal apoptosis in vitro. *Endocrinology* 134, 1055.
- Moulton BC, Motz J, Serdoncillo C, Akcali KC y Khan SA (1997) Progesterone withdrawal and RU-486 treatment stimulate apoptosis in specific uterine decidual cells. *Cell Death Differ* 4, 76.
- Muchmoree JE y Fesik SW (1996) X-ray and NMR structure of human Bcl-xL and inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381, 335.
- Muller M, Wilder S, Bannasch D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SL, Galle PR, Stremmel W, Oren M y Krammer PH (1998) p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to damage by anticancer drugs. *J Exp Med* 1882033.

- Nagata S (2000) Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 256, 12.
- Nagata S y Golstein P (1995) The Fas death factor. *Science* 267, 1449.
- Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H y Tsujimoto Y (1998) Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci* 95, 14681.
- Nechushtan A, Smith CL, Lamensdorf I, Yoon SH y Youle RJ (2001) Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol* 153, 1265.
- Ng FW (1997) p28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-XL- and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 139, 327.
- Nuñez G, London L, Hockenberry D; Alexander M, Mckearn IP y Korsmeyer SJ (1990) Deregulated bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor derived hematopoietic cell lines. *J Immunol* 144, 3602.
- Oltvai ZN, Millman CL y Korsmeyer SJ (1993) bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609.
- Oren M (1994) Relationship of p53 to the control of apoptotic cell death. *Semin Cancer Biol* 5, 221.
- Otsuki Y, Misaki D, Sugimoto O, Ito Y, Tsujimoto Y y Akao Y (1994) Cyclic bcl-2 gene expression in human uterine endometrium during menstrual cycle. *Lancet* 344, 28.
- Owen-Shaub LB, Zhang W, Cusack JC, Angelo LS, Santee SM, Fujiwara T, Roth JA, Deisseroth AB, Zang WW, Kruzel E y Radiinsky R (1995) Wild type p53 and temperature sensitive mutant induce Fas/Apo-1 expression. *Mol Cell Biol* 15, 3032.
- Pampfer S y Doonay I (1999) Apoptosis at the time of embryo implantation in mouse and rat. *Cell Death Differ* 6, 533.
- Pecci A, Scholz A; Pelster D y Beato M (1997) Progestins prevent apoptosis in a rat endometrial cell line and increase the ratio of bcl-xL to bcl-xS, *J Biol Chem* 272, 1191.
- Petros AM, Medek A, Nettesheim DG, Kim DH, Yoon HS, Swift K, Matayoshi ED, Oltersdorf T y Fesik SW (2001) Solution structure of the antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci* 98, 3012.

- Pollard JW (1990) Regulation of polypeptide growth factor synthesis and growth factor-related gene expression in the rat and mouse before the implantation. *J Reprod Fertil* 88, 721.
- Pollard JW, Pacey J, Cheng SVY, Jordan EG (1987) Estrogens and cell death in murine uterine luminal epithelium. *Cell Tissue Res* 249, 533.
- Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW y Vogelstein B (1997) A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389, 300.
- Priault M, Chaudhuri B, Clow A, Camougrand N y Manon S (1999) Investigation of Bax-induced release of cytochrome c from yeast mitochondrial permeability of mitochondrial membranes, role of PDAC and ATP requeriment. *Eur J Biochem* 260, 684.
- Pushkala K y Gupta PD (2001) Steroid hormones regulate programmed cell death: a review. *Cytobios* 106 , 413.
- Quarmby VE, Korach KS (1984) The influence of 17 β -estradiol on patterns of cell division in the uterus. *Endocrinology* 114, 694.
- Reed JC (1994) Bcl-2 and the regulation of programmed cell death in *Caenorgabditis elegans*. *J Cell Biol* 124, 1.
- Reed JC (1997) Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387, 773.
- Rich T, Allen RL y Wyllie AH (2000) Defying death after DNA damage. *Nature* 407, 777.
- Rodeck U, Jost M, DuHadaway J, Kari C, Jensen PJ, Risse B y Ewet DL (1997) Regulation of Bcl-xL expression in human keratinocytes by cell substratum adhesion and the epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci* 94, 5067.
- Rodríguez J y Lazebnik Y. (1999) Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* 13, 3179.
- Ruvolo PP, Deng X y May WS (2001) Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia* 15, 515.
- Sadlak TW, Oltvai ZN, Yang E, Wang K, Boise LH, Thompsom CB y Korsmeyer SJ (1995) Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerization with Bax. *Proc Natl Acad Sci* 92, 7834.
- Saito M, Korsmeyer SJ y Schlesinger PH (2000) Bax-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat Cell Biol* 2, 553.

- Sakahira H, Enari M y Nagata S (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 96.
- Saller E, Tom E, Brunori M Otter M, Estreicher A, Mack DH y Iggo R (1999) Increased apoptosis induction by 121F mutant p53. *EMBO J* 18, 4424.
- Salvesen GS y Dixit VM (1999) Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci* 96, 10964.
- Sandow BA, West NB, Norman RI y Brenner RM (1979) Hormonal control of apoptosis in hamster uterine luminal epithelium. *Am J Anat* 156, 15.
- Sato T, Fukazawa Y, Kojima H, Enari M, Iguchi T y Ohta Y (1997) Apoptotic cell death during the estrous cycle in the rat uterus and vagina. *Anat Rec* 248, 76.
- Sato T, Hanada M, Bodrug S, Irie S, Iwama N, Boise LH, Thompson CB, Golemis E, Fong L, Wang HG y Reed JC (1994) Interactions among members of the Bcl-2 protein family analizad with a yeast two hibrids system. *Proc Natl Acad Sci* 91, 9238.
- Sattler M (1997) Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 275, 983.
- Schlesinger PH, Gross A, Yin XM, Yamamoto K, Saito M, Waksman G y Korsmeyer SJ (1997) Comparasion of the ion channel characteristics of rproapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci* 94, 11357.
- Schmitz I, Kirchhoff S y Krammer PH (2000) Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int. J Biochem Cell Biol* 32, 1123.
- Schorr K, Li M, Krajewski S, Reed JC y Furth PA (1999) Bcl-2 family and related proteins in mammary gland involution and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplassia* 4, 153.
- Sentman CL, Shutter JR, Hbery D, Kanagawa O y Kors mayer SJ (1991) Bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes . *Cell* 67, 879.
- Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Funahashi Y, Mignon A, Lacronique V, Matsuda H y Tsujimoto Y (1998) Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proc Natl Acad Sci* 95, 1455.

- Shimizu S, Ide T, Yanagida T y Tsujimoto Y (2000) Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *J Biol Chem* 275, 12321.
- Shiraiwa N; Inhara N, Okada S, Yuzaki M, Shojii S y Ohta S (1996) An additional form of rat Bcl-x, Bcl-x β , generated by an unspliced RNA, promotes apoptosis in promyeloid cells. *J Biol Chem* 271, 13258.
- Simonian PL, Grillot DA, Andrews DW, Leber B y Nunez G (1996) Bax homodimerization is not required for Bax to accelerate chemotherapy-induced cell death. *J Biol Chem* 271, 32073.
- Singleton JR, Dixit VM y Feldman EL (1996) Type I IGF receptro activation regulates apoptotic proteins. *J Biol Chem* 271, 31791.
- Sinowatz F, Amselgruber W, Plendl J, Kolle S, Neumuller C y Boss G (1995) Effects of hormones on the prostate in adult and aging men and animals. *Micros Res Tech* 30, 282.
- Spencer SJ, Cataldo NA, Jaffe RB (1996) Apoptosis in the human female reproductive tract. *Obstet Gynecol Surv* 51, 314.
- Spornitz UM, Rinderknecht BP, Edelmann A, Scheidegger B, Cairoli F (1994) Ultrastructure as a basis for dating of rat endometrium. *Anat Rec* 238, 163.
- Sridhar Rao K, Zanotti S, Reddy AG, Rauch F, Mannherz HG, Gupta PD (1998) Oestradiol regulated programmed cell death in rat vagina: terminal differentiation or apoptosis? *Cell Biol Int* 22, 105.
- Strasser A, Harris AW y Cory S (1991) *bcl-2* transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorschip. *Cell* 67, 889.
- Suda T, Takahashi T, Golstein P y Nagata S (1993) Molecular cloning and expression of the Fas ligand: a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75, 1169.
- Sumantran VN, Ealovega MW, Núñez G, Clarke MF y Wicha MS (1995) *Cancer Res* 55, 2507.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamazami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Constantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM y Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441.

- Suzuki M, Youle RJ y Tjandra N (2000) Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 103, 645.
- Tachi C, Tachi S, Lindner HR (1972) Modification by progesterone of oestradiol-induced cell proliferation, RNA synthesis and oestradiol distribution in the rat uterus. *J Reprod Fert* 31, 59.
- Tao XJ, Tilly KI, Marravei DV, Maravei DV, Shritren JK, Krajewski S, Reed JC, Tilly JL e Isaacson KB (1997) Differential expression of members of the bcl-2 gene family in proliferative and secretory human endometrium: glandular epithelial cell apoptosis is associated with increased expression of bax. *J Clin Endocr Metabol* 82, 2738.
- Tata JR (1994) Hormonal regulation of programmed cell death during amphibian metamorphosis. *Biochem Cell Biol* 72, 581.
- Terada N, Yamamoto R, Takada T, Miyake T, Terakawa N, Wakimoto H, Taniguchi H Li W, Kitamura Y y Matsumoto K (1989) Inhibitory effect of progesterone on cell death of mouse uterine epithelium. *J Steroid Biochem* 33, 1091.
- Thomas AL, Price C, Martin SG, Carmichael J y Murray JC (1999) Identification of two novel mRNA splice variants of bax. *Cell Death Differ* 6, 97.
- Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456.
- Thornberry NA (1997) A combinatorial approach defines specificities of members of the caspases family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272, 17907.
- Thornberry NA y Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312.
- Thornborrow EC y Manfredi JJ (2001) The tumor suppressor protein p53 requires a cofactor to transcriptionally activate the human bax promoter. *J Biol Chem* 276, 15594.
- Thut CJ, Chen JL, Klemin R y Tijan R (1995) p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAF1140 and TAF1160. *Science* 267, 100.
- Tibbetts TA, Mendoza-Meneses M, O'Malley BW y Conneely OM (1998) Mutual and intercompartmental regulation of estrogen receptor and progesterone receptor expression in the mouse uterus. *Biol Reprod* 59, 1143.

- Tilly JK, Tilly KI, Kenton ML y Johnson AL (1995) Expression of members of the bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-x long messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 136, 1232.
- Toshiyuki M y Reed JC (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293.
- Tsujimoto Y (1989) *Oncogene* 4, 1331.
- Tsujimoto Y (1998) Role of Bcl-2 family proteins and apoptosis: apoptosomes or mitochondria?. *Genes Cell* 3, 697.
- Tsujimoto Y y Shimizu S (2000) Bcl-2 family: Life-or-death switch. *FEBS Letters* 466, 6.
- Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E y Croce CM (1985) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 1440.
- Tzagoloff A (1970) Assembly of the mitochondrial membrane system. 3. Function and synthesis of the oligomycin sensitivity-conferring protein of yeast mitochondria. *J Biol Chem* 245, 1545.
- Uchima F-DA, Edery M, Iguchi R, Larson L y Bern HA (1987) Growth of mouse vaginal epithelial cells in culture: Functional integrity of the estrogen receptor system and failure of estrogen to induce proliferation. *Cancer Lett* 35, 277.
- Vaux, DL, Cory S y Adams JM (1998) bcl-2 gene promotes haematopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440.
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ y Vaux DL (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102, 43.
- Wagner AJ, Kokontis JM y Hay N (1994) MYC-mediated apoptosis requires wild-type p53 in a manner independent of cell cycle arrest and the ability of p53 to induce p21^{waf1/cip1}. *Genes & Dev* 8, 2817.
- Waterhouse NJ, Goldstein JC, Ahsen O von, Schuler M, Newmeyer DD y Green DR (2001) Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *J Cell Biol* 153, 319.

- Waterman JL, Shenk JI y Halazonetis TD (1995) The dihedral symmetry of the p53 tetramerization domain mandates a conformational switch upon DNA binding. *EMBO J* 14, 512.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsetn T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB y Korsmeyer SJ (2001) Proapoptotic Bax and Bak: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727.
- West NB, Norman RL, Sandow BA, Brenner RM (1978) Hormonal control of nuclear estradiol receptor content and the luminal epithelium in the uterus of the golden hamster. *Endocrinology* 103, 1732.
- Williams GT y Smith CA (1993) Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell* 74, 774.
- Wimalasena J, Meehan D y Cavallo C (1991) Human epithelial ovarian cancer cell steroid secretion and its control by gonadotropins. *Gynecologic Oncology* 41, 56.
- Wolozin B, Iwasaki K, Vito P, Ganjei JK, Lacana E, Sunderland T, Zhao B, Kusiak JW, Wasco W y D'Asamio L. (1996) Participation of presenilin 2 in apoptosis: enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation. *Science* 274, 1710.
- Wood DE y Newcomb EW (2000) Cleavage of Bax enhances its cell death function. *Exp Cell Res* 256, 375.
- Wood DE, Thomas A; Devi LA, Berman Y, Bevis RC, Reed JC y Newcomb EW (1998) Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis. *Oncogene* 17, 1069.
- Wu GS, Burns TF, McDonald ER, Jiang W, Meng R, Krantz ID, Kao G, Gan DDZhou JY, Muschel R, Hamilton SR, Spinner NB, Markowitz S, Wu G y El-Deiry WS (1997) Induction on the TRAIL receptor KILLER/DR5 in p53 dependent apoptosis but not growth arrest. *Nat Genet* 17, 141.
- Wu X y Levine AJ (1994) p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* 91, 3602.
- Xanthoudakis S y Nicholson DW (2000) Heat shock proteins as death determinants. *Nature Cell Biol* 2, E163.
- Yang E y Korsmeyer SJ (1996) Molecular thanatopsis: a discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood* 88, 386.

- Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB y Korsmeyer SJ (1995) Bad, a heterodimeric partner for Bcl-x_L and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80, 285.
- Yin XM, Oltvai ZN y Korsmeyer SJ (1994) BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369, 321.
- Yin Y, Teratuchi Y, Solomon GG, Aizawa S, Rangarajan PN, Yazaki Y, Kadowaki T y Barrett JC (1998) Involvement of p83 in p53-dependent apoptotic response to oxidative stress. *Nature* 391, 707.
- Yuang J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM y Horvitz (1993) The *C. Elegans* cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β converting enzyme. *Cell* 75, 641.
- Yunis JJ, Mayer MG, Arensen MA, Aeppli DP, Oken MM y Frizzera G (1989) Distintive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non-Hodkin's lymphoma. *N Engl J Med* 320, 11047.
- Zha H, Aime-Sempe C, Sato T y Reed JC (1996) Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *J Biol Chem* 271, 7440.
- Zha J, Harada H, Osipov K, Jockel J, Waksman G y Korsmeyer SJ (1997) BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity. *J Biol Chem* 272, 24101.
- Zhang H (2000) BAR: an apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins. *Proc Natl Acad Sci* 97, 2597.
- Zhang J, Harada H, Osipov K, Jockel J, Waksman G y Korsmeyer SJ (1997) BH3 domain of Bad is required for heterodimerization with Bcl-xL and pro-apoptotic activity. *J Biol Chem* 272, 24101.
- Zhou M, Demo SD; McClure TN, Crea R y Bitler CM (1998) A novel splice variant of the cell death-promoting protein Bax. *J Biol Chem* 273, 11930.
- Zörnig M, Hueber AO, Baum W, Evan G (2001) Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1551, F1.