

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Investigaciones Biomédicas

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

*LA INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN ASOCIADA A ESTRÉS OXIDATIVO
Y EL DAÑO AL ADN ANTECEDE A LA MUERTE CELULAR MEDIADA POR
EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA.*

PRESENTA : BIÓL. JOSE LUIS VENTURA GALLEGOS

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

México, D.F.

Abril, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

- Dr. Julio Eduardo Morán Andrade, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
- Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
- Dr. Alejandro Zentella Dehesa, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Instituto Nacional de la Nutrición S.Z., SSA.
- Dra. Rebeca López Marure, Instituto Nacional de Cardiología, SSA.
- Dr. Rolando Hernández Muñoz, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

•A MI PEQUEÑA FAMILIA:

A Marisela, por la gran ayuda y disposición en la escritura de la tesis, por su apoyo y comprensión en las ausencias por el trabajo de laboratorio, y principalmente por encargarse de la administración y cuidados de la casa y los niños. Muchos besos.

A mis pequeñines, Luis Eduardo y Sebastián, quienes son mi motivación principal para superarme, y gracias a ellos por enseñarme el verdadero significado de la vida, también pido disculpas por robarles un poco de su tiempo como padre.

•A MIS PADRES:

A Francisco, quién ya no está con nosotros, pero nos dejaste una gran familia que quiero y respeto mucho.

A Evarista, gracias por todo lo que me has enseñado y por todos los momentos de apoyo y comprensión como madre.

•A MIS HERMANOS:

Concepción, Francisco, Audón, Angela, María Elena, Carmen, Valentina y Alfredo, gracias por su apoyo en la realización de mis metas y porque siempre están atentos a lo que yo he realizado en mi corta vida.

•Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa:

Agradezco de antemano su calidad humana, comprensión y que me permita trabajar en su laboratorio (haciendo y deshaciendo), así como la enseñanza que me ha dado a lo largo de los años tanto laboral como académicamente.

•Al comité tutorial y Jurado:

A la Dra. Eugenia Gonsebatt (comité tutorial) nuestra jefa de Departamento en Biomédicas. Al Dr. Rolando Hernández (comité tutorial). Al Dr. Julio Morán (presidente del jurado), y especialmente a la Dra. Rebeca López por sus observaciones detalladas en la revisión de la tesis.

•A la Sra. Rocio Camarillo, quién laboralmente ya no está con nosotros, pero sus servicios de laboratorista en el IFC fueron de gran ayuda, así como su calidad humana, suerte en su nueva etapa, en verdad hicimos un gran equipo en el IFC.

•A todos los estudiantes del IFC que han pasado y dejado parte de si mismos en el laboratorio, lo cual agradezco, ya que he aprendido mucho con ellos.

- A la Dra. Martha Legorreta Herrera, por su amistad sincera y su gran ayudototota por un año.
- A la Dra. Mina y su grupo en la UAM-Iztapalapa, por incluirme en sus proyectos.

- A la güera, Adriana Estrada, quién fue mi cómplice en muchas cosas de laboratorio, y a quién deseo la mejor de la suerte en su nueva faceta de "Esposa", y académicamente lo mejor para ti y Richarman.

- A Fernando Hernández (polloman), por su objetividad por la vida y calidad humana.

- A Melchor, quién al enseñarle mis conocimientos, el también me enseñó su extraordinaria calidez y graciosa simpatía.

- A Dmontes, Delina, quién me ha enseñado que con muchas ganas se pueden lograr cosas grandes, tu tenacidad es digna de reconocerse.

- A Josué, una persona con tenacidad y mucha suerte, ahora ya se está realizando con los baturros.

- A Irma Mitre, gracias por tu amistad desinteresada y por tu calidad humana, y por enseñarme que la verdadera amistad no es cuestión de tiempo.

- A los estudiantes y prospectos en el Departamento de Bioquímica de "Nutrición": Adrián, Francisco, Susana, Ámbar, Héctor, Cesar, Gabriela, Vicky, Omar, a las niñas Eli (chaparro) y Maribel (arriba Guerrero). Por su comprensión y tolerancia, que a pesar de los regaños y la falta de tacto que en ocasiones no tengo, me sonrían al día siguiente.

- Al personal de Nutrición: Doña Manue, Doña Mary, Greta, Carmita, Edith, Jaime y Araceli.

- A todas las personas que olvidé mencionar.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
INTRODUCCIÓN.....	12
MARCO TEÓRICO.....	13
1.-FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- α).....	13
-a) Antecedentes históricos.....	13
-b) Descripción molecular.....	14
1) Localización y estructura del gen.....	14
2) Producción y estructura de la proteína.....	15
-c) Receptores (TNFR1 y TNFR2).....	16
-d) Transducción de la señal.....	17
2.- TENSIÓN OXIDATIVA (ESTRÉS OXIDATIVO).....	19
-a) Radical libre.....	19
-b) Estrés oxidativo.....	20
-c).....	
Antioxidantes.....	21
-Primera línea de defensa antioxidante.....	22
-Segunda línea de defensa antioxidante.....	22
i) Antioxidantes no enzimáticos.....	22
ii) Antioxidantes enzimáticos.....	23
3.- DAÑO OXIDATIVO A LAS BIOMOLÉCULAS.....	26
a) Lípidos.....	26
b) Proteínas.....	27
c) ADN.....	27
4.- DAÑO AL ADN Y REPARACIÓN.....	28
a) Daño al ADN y sus consecuencias.....	28
b) Reparación del ADN.....	31
i) Reparación por escisión de base (BER).....	32
ii) Reparación por escisión de nucleótido (NER).....	33
5.- EL GEN SUPRESOR DE TUMORES: p53.....	34
a) Estructura de p53.....	35
b) Regulación y activación de p53.....	40
c) Regulación de la estabilidad de p53.....	42
d) Regulación de la localización de la proteína p53.....	43
e) Regulación de la actividad de p53.....	43
f) Genes que se transcriben en respuesta a p53.....	45

6.- CICLO CELULAR Y SU REGULACIÓN.....	45
a) Cinasas dependientes de ciclinas (CDK´s).....	47
b) Ciclinas.....	48
c) Regulación del ciclo celular.....	49
d) Puntos de control o“Checkpoints”.....	51
JUSTIFICACIÓN.....	54
HIPÓTESIS.....	55
OBJETIVOS.....	55
MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
RESULTADOS.....	63
DISCUSIÓN.....	88
CONCLUSIONES.....	94
BIBLIOGRAFÍA.....	95
APÉNDICES.....	106

ABREVIATURAS

BCG	Bacilo Calmette-Guerin
LPS	Lipopolisacárido
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
LT- α	Linfotoxina alfa
LT- β	Linfotoxina beta
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
CRE	Elemento de respuesta a AMP cíclico
TLR	Receptor tipo "Toll"
TPA	Ester de forbol
ROS	Especies reactivas de oxígeno
TACE	Enzima convertasa del TNF- α
Fas-L	Ligando de Fas (receptor CD95 o APO1)
RANK-L	Ligando del receptor activador de NF- κ B
TRAILS	Ligandos inductores de apoptosis relacionados al TNF- α
TNFR1	Receptor de TNF- α tipo I
TNFR2	Receptor de TNF- α tipo II
TRADD	Dominio de muerte asociado al receptor de TNFR1
FADD	Dominio de muerte de Fas
FLICE	Factor tipo ICE
ICE	Enzima convertasa de IL-1
Apaf1	Factor activador de apoptosis tipo I
Apaf2	Factor activador de apoptosis de tipo II
ICAD	Nucleasa dependiente de caspasa-inhibidor
CAD	Nucleasa dependiente de caspasa
GSH	Glutatión
SOD	Superóxido dismutasa
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
BER	Reparación por escisión de base
HAP1	Endonucleasa AP de tipo I
XPC, XPA, XPD y XPB	Endonucleasas de reparación en NER
MDM2	Proteína murina doble minuto de tipo 2
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
PIG	Proteína inducida por p53
GADD45	Proteína de paro del crecimiento inducida por daño al ADN
DNA-PK	Proteína cinasa dependiente de ADN
ATM	Ataxia telangiectasia mutada
SV40	Virus del simio 40
E2F	Factor de elongación 2
CAK	Complejo CDK7-ciclina H
ARF	Proteínas de marco de lectura alternado (supresor tumoral)
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolio
DCF-DA	Di acetato de dicloro fluoresceína

RESUMEN

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), es una citocina capaz de inducir una señal de muerte la cual incluye la fragmentación del ADN, la activación de proteasas ("caspasas") y la generación de estrés oxidativo. La transducción de la señal inducida por el TNF- α ha sido intensamente estudiada, pero una de las vías inductoras de muerte poco estudiada es aquella en la que participa el supresor tumoral p53. El objetivo de este trabajo fue determinar el mecanismo mediado por TNF- α responsable de la inhibición de la proliferación que precede a la muerte celular en las líneas de fibroblastos de ratón L929 y de adenocarcinoma mamario humano MCF-7. Los resultados obtenidos definen la existencia de un umbral donde la célula pasa de un estado de paro del ciclo celular a la muerte de la misma. La inhibición de la proliferación coincide con un marcado incremento en la incorporación de timidina-[3 H] por célula tratada con TNF- α que sugiere un proceso de reparación de ADN, lo anterior también coincide con el incremento de ARNm y proteína de p53, para las dos líneas celulares. Las células L929 se detienen en la fase G2-M indicando que en este punto se está llevando a cabo el paro del ciclo celular; Sin embargo, los niveles de proteína de p53 no coinciden con los niveles bajos de expresión de la proteína p21 en la ventana de tiempo donde la acumulación de la fase G2-M es máxima. Las células MCF-7 no se detienen en ninguna fase del ciclo celular, pero sí se observó un incremento de p21, que a pesar de inhibir a los complejos ciclina/CDK no correlaciona con inhibición del paso de G1 a S. La generación de estrés oxidativo correlaciona con el posible daño al ADN, evaluada por la incorporación de timidina-[3 H] y con la consecuente inhibición de la proliferación que antecede la muerte celular inducida por esta citocina.

ABSTRACT

Tumor Necrosis Factor (TNF- α) induces a signal of death which include DNA fragmentation, "caspase" activation and oxidative stress generation. The signal transduction induced by TNF- α is a field that has been intensely studied, but little is known about TNF- α signaling leading to the protein p53 accumulation. The objective of this study was to evaluate the mechanism responsible of the cell cycle arrest previous to the cell death in L929 and MCF-7 cells. The results indicate the existence of a threshold where cell transit from cell cycle arrest to the death. The proliferative inhibition coincides with increased incorporation of labeled thymidine-[^3H] by cell TNF- α treated. This suggests a reparation process of DNA, and coincides with increased expression of p53 both at mRNA and protein level in both cells lines. The L929 cells arrest in G2-M fase, however p53 expression did not coincide with the p21 low level when G2-M arrest is highest. The MCF-7 cells were not arrested in any fase of the cell cycle. The increase in p21 protein level should have resulted in inhibition of the CDK/cyclin complex, however, the consecutive arrest in G1 was not observed. Oxidative stress generation coincides with possible DNA damage, evaluated by incorporation of thymidine-[^3H], and with the inhibition of the proliferation previous of the cell death induces by this cytokine.

INTRODUCCIÓN

Uno de los mayores logros de la naturaleza es la propia vida, y su contraposición a los procesos de desgaste y/o desorganización que llevan a la muerte. Esta dualidad ha llevado a decir que cuando un organismo superior inicia su vida se dice que empieza a morir. De hecho el reconocimiento de la existencia de múltiples procesos de muerte celular fisiológica ha demostrado que la muerte celular es muy importante desde etapas muy tempranas del desarrollo embrionario en la mayoría de organismos multicelulares.

Actualmente se acepta que tanto el desarrollo embriológico como el mantenimiento de los órganos y tejidos adultos resulta de procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular. Se ha identificado una variedad de moléculas que inducen o desencadenan un programa de muerte en la unidad más simple de todo organismo, la célula. Dentro de su información genética todas las células de animales tienen codificada la capacidad de promover su propia destrucción. En la mayoría de los casos, este programa parece estar "armado" pero se mantiene bloqueado en espera de la señal precisa para llevarse a cabo.

La muerte celular programada por apoptosis es un proceso organizado, cuya característica más sobresaliente es la activación secuencial de una familia particular de proteasas, así como la degradación de moléculas importantes para el metabolismo normal. En respuesta a agentes inductores de muerte, se desencadenan señales de muerte que resultan de agregación de proteínas "pro-apoptóticas" que culmina con la activación de una cascada de cisteinil aspartil proteasas ácidas llamadas actualmente "caspasas".

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), es capaz de inducir una señal apoptótica en diversas células, y existe una amplia literatura sobre su mecanismo de acción, aunque paradójicamente no en

todos los sistemas celulares donde actúa el TNF- α se produce la muerte celular. Por haber sido el primer factor inductor de apoptosis identificado y dada la amplia distribución de sus receptores, la transducción de la señal inducida por el TNF- α es un campo que se ha estudiado intensamente. Actualmente, se están evaluando y describiendo las diferentes vías que se activan en respuesta a este factor para tratar de integrar lo que hoy en día se conoce de sus vías de señalización. Una de las vías inductoras de muerte apoptótica inducida por TNF- α que ha sido poco estudiada es aquella en la que participa el supresor tumoral p53; El presente trabajo se enfoca a este aspecto de la muerte celular inducida por TNF- α .

MARCO TEÓRICO

1.- FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- α)

a) Antecedentes históricos

En 1975, Lloyd Old y sus colaboradores (Carswell, 1975) demostraron que el tratamiento de ratones o conejos con el bacilo Calmette-Guérin (BCG), al que sigue una inyección de lipopolisacárido (LPS), producía la liberación a la circulación de una proteína que llamaron factor de necrosis tumoral (TNF). La principal aportación del grupo de Old fue demostrar que la actividad necrozante de tumores era un factor que se derivaba del hospedero y no del bacilo, y proponer que la fuente principal del factor eran los macrófagos. También se demostró que el TNF tenía un efecto tóxico sobre células tumorales en cultivo y que en ratones con sarcoma inducido por metilcolantreno provocaba una necrosis hemorrágica rápida y regresión tumoral.

A principios de los 80's, Cerami y colaboradores tenían interés en identificar el agente o agentes causales de la pérdida de masa corporal, característica de pacientes con infecciones crónicas o con cáncer, condición que se conoce como caquexia (Beisel, 1975). Ellos demostraron que una condición muy similar a la caquexia se reproducía en ratones que se trataban con endotoxina bacteriana; además, el suero de estos animales podía causar caquexia si se

transfería a un ratón singénico sano, lo que sugería que la endotoxina inducía la liberación de factores endógenos que promueven este des-balance fisiológico. En 1985 aislaron un factor, que producen los macrófagos e inducible por endotoxina, capaz de suprimir la actividad de la lipoproteína lipasa en la línea de adipositos 3T3/L1 (Beutler, 1985). El factor fue llamado caquectina por su supuesto papel en el origen de la caquexia; sorprendentemente, la secuencia de aminoácidos fue altamente homóloga a la secuencia de TNF- α humano que se determinó unos meses antes. Por lo tanto, la caquectina y el TNF- α , como se nombra hoy a esta proteína, resultaron ser la misma molécula (Aggarwal, 1992). El TNF- α pertenece a una clase de proteínas –similares a hormonas- llamadas citocinas, que incluyen los interferones, interleucinas y los factores de crecimiento hematopoyéticos (CSF's).

La clonación del gen y la purificación de la proteína recombinante se tradujeron en una verdadera explosión informativa. Se hizo evidente que el TNF- α , que originalmente se definió por su actividad antitumoral, ejercía distintos efectos sobre células normales y era mediador de la respuesta inflamatoria y de la respuesta inmune innata (Aggarwal, 1985; Beutler, 1985; Aggarwal, 1992).

b) Descripción molecular

1.-Localización y estructura del gen

En humanos, el gen de TNF- α tiene tres intrones (Nedwin, 1985) y se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 (cerca del centromero, entre 6p21.1 y 6p21.3), contiguo al locus HLA-B en la región del complejo principal de histocompatibilidad (Spies, 1989). En el ratón, el contexto cromosomal del TNF- α es muy similar; el gen del TNF- α murino se encuentra en el cromosoma 17, cerca del locus H2-D, el equivalente murino de HLA-B (Muller, 1987). Este gen y los que codifican para las moléculas de linfotoxina α y β (LT- α y LT- β), citocinas cercanamente emparentadas, se encuentran adyacentes dentro de la región de histocompatibilidad y presentan un alto grado de similitud entre sí.

El TNF- α tiene cuatro exones que se distribuyen a lo largo de aproximadamente

3 Kb de ADN. Más del 80% de la secuencia del TNF- α maduro está codificada en el cuarto exón, mientras que los exones I y II codifican casi en su totalidad para la secuencia del péptido líder, que generalmente se procesa.

La región reguladora que flanquea el extremo 5' del gen del TNF- α contiene, además de una caja TATA y una caja GC, sitios consensos de unión a varios factores de transcripción. La secuencia incluye sitios para NF- κ B, ATF-2, c-jun/AP1, AP-2, SP-1, Krox-24 y NF-AT, una caja rica en purinas (PU.1) y un elemento de respuesta a AMP cíclico (CRE). En macrófagos, la producción del TNF- α se regula por NF- κ B en respuesta a LPS y al propio TNF- α (Shakov, 1990), aunque actualmente se conoce que además participan otros factores transcripcionales. La propiedad de regulación positiva por el mismo TNF- α es importante para la amplificación de las respuestas inflamatorias.

2.-Producción y estructura de la proteína

El TNF- α es producido y liberado principalmente por macrófagos y monocitos residentes activados, y en menor proporción, pero de manera significativa, por células que completan el sistema inmune como linfocitos, granulocitos, así como por células no hematopoyéticas (fibroblastos y endotelio) e incluso por algunas células tumorales (Aggarwal, 1992). Su inducción puede ocurrir a través de diversos estímulos que activan receptores de la familia TLR (Toll Like Receptor), como infección viral (Aderka, 1986), LPS, TPA (Aggarwal, 1985), citocinas, flujos de calcio y especies reactivas de oxígeno (ERO) (Valen, 1999).

El factor de transcripción NF- κ B es de los factores principales que influye en la expresión de TNF- α sobre todo en monocitos en donde el TLR-4 se activa con LPS. Pero al parecer, la regulación transcripcional del gen del TNF- α no tiene un papel tan importante en la síntesis de la proteína, como lo es la estabilización de su ARNm, proceso que se denomina represión de la traducción. La traducción del mensajero del TNF- α se regula por la cinasa p38 que se activa por estrés y también controla la estabilidad de otros mensajeros de proteínas pro-inflamatorias (Brook, 2000). En macrófagos, inmediatamente después de

una señal extracelular adecuada, el ARNm para el TNF- α puede incrementarse hasta 100 veces y la síntesis de proteína hasta 10,000 veces, ésto debido a la estabilidad de su mensajero. Cuando la señal extracelular concluye, se inicia la represión de la traducción que conduce a un rápido declive en la tasa de biosíntesis.

Esta citocina se sintetiza como una proteína de membrana y es liberada al medio como resultado de la actividad de una proteasa cuya actividad se encuentra en la lámina externa de la membrana celular. La metaloproteasa TACE (del inglés, TNF- α Converting Enzyme) es la responsable de procesar a la proforma unida a la membrana (26 KDa) entre los residuos de aminoácidos Ala⁷⁶ y Val⁷⁷, y da lugar a la forma soluble y madura de 17 KDa (Mohan, 2002). La mayoría de los efectos biológicos los lleva a cabo la forma procesada, que forma un trímero con una masa molecular de alrededor de 52 KDa (Smith, 1987). El pro-TNF- α transmembranal humano también tiene una estructura trimérica que se ensambla intracelularmente antes de transportarse a la superficie. La formación del trímero es un requisito indispensable para su actividad biológica, igual que para el TNF- α maduro (Tang, 1996).

El TNF- α forma parte de la superfamilia de ligandos que incluye a Fas-L (ligando de Fas, CD95 o APO-1), LT- α y LT- β (linfotóxina alfa y beta), RANK-L (ligando de RANK), TRAILS (Ligandos inductores de apoptosis relacionados al TNF- α) y otros (Smith, 1994). En el caso de Fas-L, CD40 y algunos miembros de la familia de TRAIL se encontró que activan mecanismos pro-apoptóticos a través de sistemas de transducción semejantes a los que evoca el TNF- α (Dempsey, 2003).

c) Receptores (TNFR1 y TNFR2):

La transducción de la señal iniciada por el TNF- α se lleva a cabo por dos receptores de superficie de la membrana citoplasmática, denominados comúnmente p55 (Tipo I, TNFR1, CD120a, p60) y p75 (Tipo II, TNFR2, CD120b, p80). Los dos receptores se encuentran presentes en todos los tipos celulares que se conocen y su número varía entre 100 y 10, 000 por célula, lo que implica que la

mayoría de las células tiene la capacidad de responder a esta citocina. Ambos receptores muestran la más alta similitud (28%) en su dominio extracelular, el de unión al TNF- α , y son completamente distintos en sus porciones intramembranal y citosólica, lo que ha llevado a proponer que activan vías de transducción distintas. Actualmente, se sabe que p55 es el receptor principal, responsable de la inducción del efecto citotóxico, y se tiene la teoría de que p75 colabora como señuelo ya que tiene una mayor afinidad por el ligando. Ya que el p75 es más abundante en células hematopoyéticas se ha propuesto que su relevancia reside en respuestas del sistema inmune, y no precisamente como una señal de muerte. Ambos receptores son capaces de unir al TNF- α de forma independiente formando una agregación trimérica. Actualmente, sabemos que su principal diferencia se encuentra en sus respectivos dominios citoplasmáticos al unir o reclutar proteínas transductoras o efectoras cuyas características están relacionados con señales de sobrevivencia y/o proliferación como las que se asocian a p75 (TNFRII), o señales de muerte, sobrevivencia e inflamación como en el receptor p55 (TNFRI) (Figura 1)(Baud, 2001; Locksley, 2001).

d) Transducción de la señal:

Cuando las células se exponen al TNF- α se pueden iniciar varias vías, una de las más estudiadas es la activación de los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B que a su vez, inducen genes que participan en la respuesta inflamatoria crónica y aguda. A la fecha se ignora si existen genes que respondan a cada uno de estos factores o si bien en todos los casos los genes requieren de ambos factores de transcripción. Por otro lado, el TNF- α induce la activación de una cascada de proteasas llamadas caspasas que conducen a la muerte celular por apoptosis al procesar proteolíticamente muchos sustratos específicos (Figura 1)(Thornberry, 1998). Algunos de los genes que son inducidos por AP-1 y NF- κ B son supresores de apoptosis, de esta manera se explica porqué la inhibición de la síntesis de ARN o de proteínas por actinomicina D o cicloheximida,

respectivamente, aceleran la muerte celular (Tang, 2001).

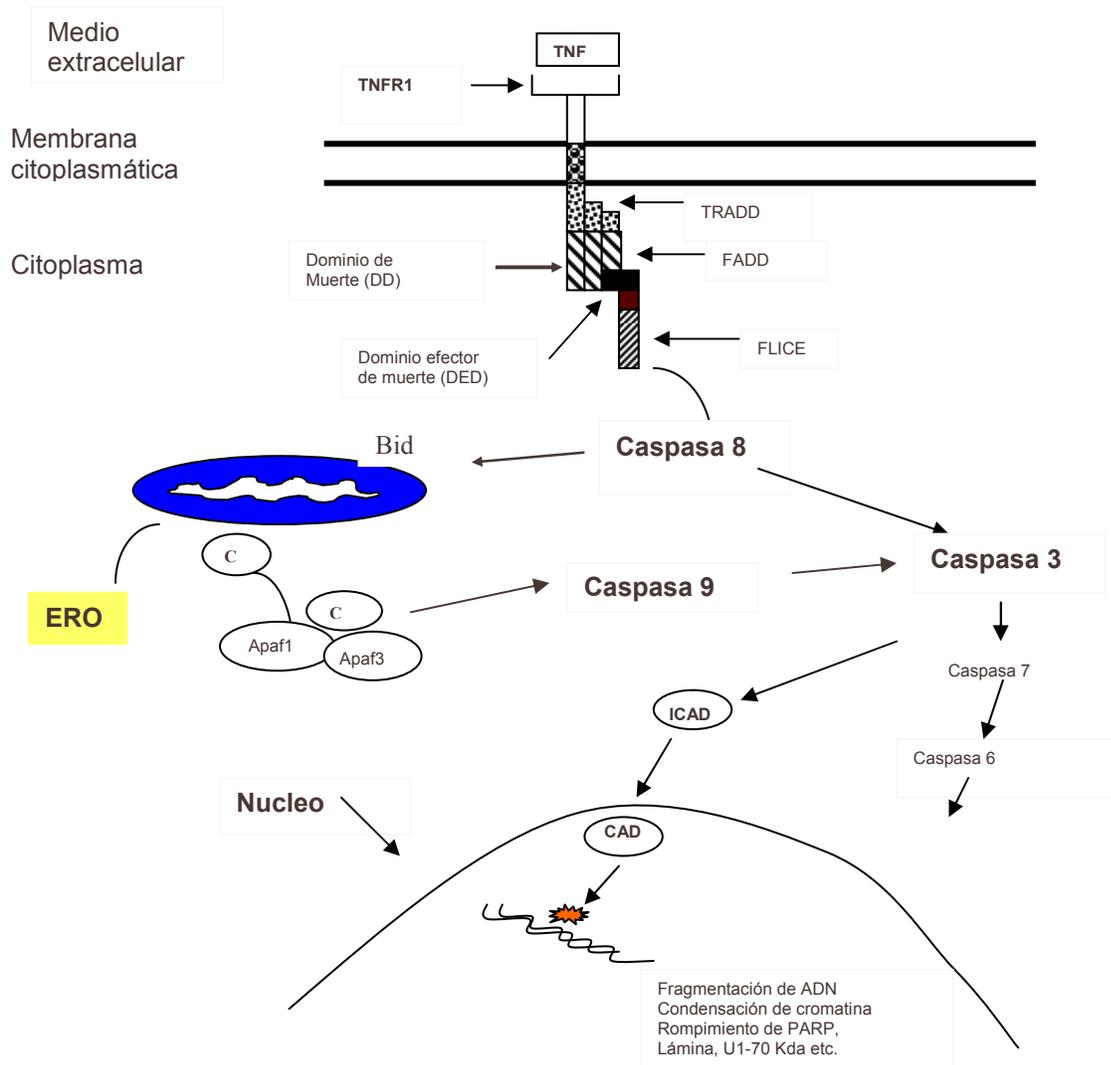


Figura 1: Transducción de la señal de TNF- α en la muerte celular. Cascada de caspasas que induce el TNF, la cual culmina en el procesamiento de proteínas importantes para el metabolismo celular, y fragmentación internucleosomal del ADN. ERO: especies reactivas del oxígeno, ICAD: nucleasa dependiente de caspasa-inhibidor, CAD: nucleasa dependiente de caspasa.

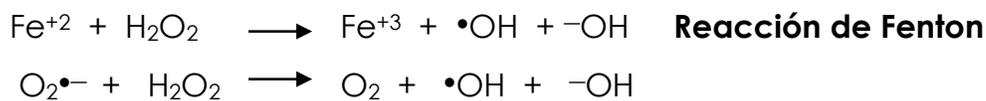
2.- TENSION OXIDATIVA (ESTRES OXIDATIVO)

a) Radical libre:

En la mayoría de los elementos y de las moléculas, los electrones se encuentran apareados dentro de un orbital y cada electrón de un par muestra una rotación o giro opuesto. Un radical libre es una especie química que contiene uno o más electrones desapareados. Así el dióxígeno en su estado basal es un diradical. La presencia de electrones desapareados modifica la reactividad química de un átomo o de una molécula y la hace generalmente más reactiva que su correspondiente no radical. Sin embargo, la reactividad química de los diferentes tipos de radicales libres es muy variable (Halliwell, 1999).

Para fines prácticos los radicales libres detectados en las células se agrupan de la siguiente manera: los derivados del oxígeno, los metales de transición y el resto de los radicales libres. Los tres tienen funciones importantes en las células. La mayoría de los radicales libres de interés biológico son los derivados del oxígeno entre ellos el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el radical hidroxilo ($\bullet OH$). Además es conveniente contabilizar al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que no es un radical libre, pero está estrechamente relacionado porque es el principal precursor del radical hidroxilo. Los radicales libres se producen continuamente en el organismo debido a diversas reacciones propias del metabolismo que participan en la generación de energía acoplada al transporte de electrones, como la cadena respiratoria mitocondrial. Se propone que la fuga de electrones se lleva a cabo en los complejos I (reductasa de NADH y coenzima Q) y III (reductasa de ubiquinol citocromo c) de la cadena respiratoria mitocondrial, donde la semiquinona puede ceder su electrón directamente al O_2 para formar quinona y el radical superóxido (Turrens, 1985; Lenaz, 1998). El superóxido en presencia de metales como el hierro o el cobre lleva a cabo una serie de reacciones de óxido-reducción, denominadas reacciones de Haber-Weiss, en donde el superóxido es capaz de transferir un segundo electrón que

genera el H₂O₂. El ion Fe⁺² o el ion Cu⁺ que se encuentran en la célula, principalmente como cofactores unidos a proteínas, son capaces de transferir un tercer electrón al H₂O₂ (reacción de Fenton) para formar un anión y un radical •OH que dan lugar a radicales libres con efectos dañinos en la célula (Halliwell, 1991).



El radical •OH es muy reactivo, sustrayendo electrones de compuestos con dobles ligaduras lo que da inicio a la reacción de lipoperoxidación, el rompimiento de las hebras o el daño a las bases del ADN, y oxidar cualquier otra molécula orgánica. A diferencia del H₂O₂ que difunde libremente a través de las membranas, por su elevada reactividad el radical •OH sólo actúa en el lugar donde se genera (McCord, 1993).

b) Estrés oxidativo:

En condiciones metabólicas normales, existe un balance entre los eventos oxidantes (producción de las ERO) y los sistemas de defensa (antioxidante y/o atrapadores de radicales libres) que mantiene la homeostasis celular y la regulación del estado redox intracelular. Esto permite un control versátil en las expresiones génicas y de transducción de señales (Arakaki, 1999).

Cuando este balance no se mantiene, ya sea por la pérdida o la disminución del sistema protector, por un aumento en la producción de las ERO o por ambos eventos simultáneos, se dice que existe un estado de tensión o estrés oxidativo (Fahn, 1992). Si se mantienen las células bajo estrés oxidativo, se

puede tener como resultado severas disfunciones metabólicas.

c) Antioxidantes:

La célula cuenta con varios mecanismos para transformar las ERO en productos menos tóxicos o no tóxicos (Figura 2).

La protección de las células contra las ERO comprende no sólo la captura de los mismos, sino también la prevención de su formación, la inhibición de su propagación y la reparación de las lesiones generadas (Mates, 2000).

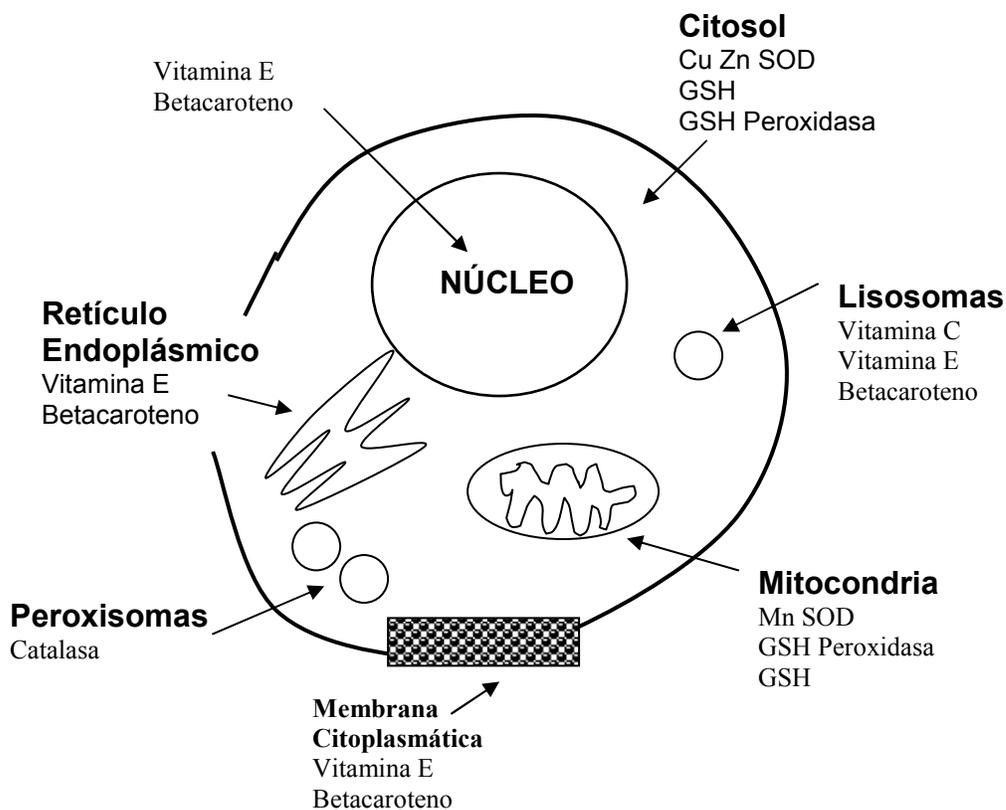


Figura 2: Sitios en la célula donde participan los mecanismos antioxidantes (Gurer, 2000). GSH: Glutati3n, SOD: Super3xido dismutasa.

-Primera línea de defensa antioxidante:

La primera línea de defensa del organismo contra los radicales libres es la prevención del daño oxidativo. Esto implica acciones que previenen su formación, como es el caso de las proteínas que unen metales de manera que no pueden participar en reacciones de óxido-reducción (ferritina, transferrina, ceruloplasmina, la albúmina y las metalotioneínas).

-Segunda línea de defensa antioxidante:

En un segundo nivel de protección está la acción de los antioxidantes, que eliminan los radicales. Estos agentes se pueden dividir en dos categorías: no enzimáticos y enzimáticos.

i) Antioxidantes no enzimáticos:

El α -tocoferol (vitamina E), el β -caroteno, el ascorbato (vitamina C), el glutatión, el urato, la bilirrubina y los flavonoides son antioxidantes celulares. La vitamina E, el β -caroteno y la vitamina C son nutrientes esenciales que reaccionan directamente con los radicales libres. La vitamina C es soluble en agua y se ubica en el citoplasma, mientras que la vitamina E y el β -caroteno son solubles en lípidos y se ubican en la membrana plasmática. El α -tocoferol está presente en las membranas celulares y en las lipoproteínas plasmáticas. Se caracteriza por presentar en su estructura un grupo $-OH$ del cual el átomo de hidrógeno se puede remover fácilmente. Los radicales peroxilo formados durante la lipoperoxidación poseen una mayor afinidad por el α -tocoferol que por las cadenas de los ácidos grasos adyacentes. La reacción convierte al α -tocoferol en un radical, que es poco activo e incapaz de reaccionar con otros ácidos grasos y de esta manera detiene la cadena de reacciones de la lipoperoxidación (Bjorneboe, 1990).

La vitamina C regenera a la vitamina E. Además, la vitamina C tiene la capacidad de reaccionar por sí misma con el superóxido, el oxígeno singulete,

el radical hidroxilo, el perhidroxilo y al Fe^{+3} en Fe^{+2} (muy lentamente). Se considera que la vitamina C está en la fase acuosa y es la defensa más importante contra las ERO (Liebler, 1993), eliminándolas de los compartimentos hidrofílicos de la célula, de la matriz extracelular y del sistema circulatorio, que es donde se le puede encontrar. Además, participa en la protección de las moléculas hidrofóbicas como las lipoproteínas del plasma sanguíneo y de los lípidos membranales.

El glutatión juega un papel importante en la protección celular contra el daño oxidativo de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Presenta una interacción sinérgica con otros agentes antioxidantes como las vitaminas C y E, y las dismutasas de superóxido. El glutatión captura radicales hidroxilo y oxígeno en singulete, además de tener la capacidad de reactivar algunas enzimas que son inhibidas al ser expuestas a altas concentraciones de oxígeno. Así mismo, el glutatión protege contra el daño oxidativo reduciendo la concentración de las ERO. Otros ejemplos de antioxidantes no enzimáticos son los flavonoides que por su parte actúan como inhibidores de lipoperoxidación, por su capacidad de interactuar directamente con las ERO y como agentes quelantes para iones divalentes (Mates, 2000). En protozoarios también se han identificado péptidos análogos al glutatión como la tripano tioneina que funciona en forma similar al glutatión.

ii) Antioxidantes enzimáticos:

Con respecto a los mecanismos antioxidantes enzimáticos, podemos encontrar cuatro sistemas principales de enzimas antioxidantes: la dismutasa de superóxido, la catalasa, la peroxidasa de glutatión y la reductasa de glutatión.

Dismutasa de superóxido.

Las dismutasas de superóxido (SOD), son un grupo de metaloenzimas presentes frecuentemente en organismos aeróbicos, aerotolerantes y algunos anaeróbicos obligados (Liochev, 2000).

En los eucariontes existen tres tipos de dismutasas de superóxido que se

localizan en diferentes compartimentos celulares y son: Mn-SOD mitocondrial, CuZn-SOD citosólica y CuZn-SOD extracelular.

Estas enzimas catalizan la conversión del radical $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 y oxígeno molecular (O_2), en una de las reacciones catalizadas por enzimas más rápida que se conoce.



La enzima catalasa .

La catalasa (CAT), es una de las enzimas más abundantes en la naturaleza. A nivel celular se localiza en las mitocondrias y en los peroxisomas (Krouff, 2003).

La catalasa como parte del sistema antioxidante está involucrada en la destrucción del H_2O_2 que se genera durante el metabolismo celular. Esta enzima se caracteriza por su alta velocidad de reacción pero relativamente baja afinidad por el sustrato. La reacción se lleva a cabo en dos pasos, el primero concluye con la reducción del sustrato, generando los productos del sustrato reducido en agua y en enzima oxidada. En un segundo paso el donador de electrones es otra molécula de H_2O_2 , siendo los productos dos moléculas de agua, oxígeno y la enzima en su forma inicial (Céspedes-Miranda, 1996).

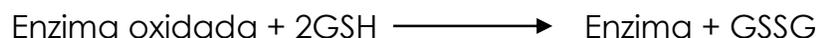


La enzima peroxidasa de glutatión.

La peroxidasa de glutatión (GPx) pertenece a un grupo de enzimas antioxidantes selenio dependientes: una forma intracelular o celular (GPx-c) que se localiza en citosol y mitocondria, una extracelular plasmática (GPx-p) y otra con actividad específica para los fosfolipoperóxidos (GPx-PH) que por lo general está asociada a la membrana celular y aunque la actividad de las tres es la misma, poseen diferencias estructurales (Patrick, 2004)

La GPx cataliza la reducción del H₂O₂ o lipoperóxido (L-OOH) utilizando como agente reductor el glutatión reducido (GSH). Se sabe que los L-OOH son tóxicos en tejidos animales ya que dan lugar a especies reactivas de oxígeno como los radicales peróxido (L-OO•). La GPx como parte del mecanismo de defensa antioxidante, evita la oxidación de los L-OOH• , reduciéndolos en presencia de GSH. Esta reacción produce hidróxidos que son elementos potencialmente dañinos y que al oxidarse se convierten en radicales alcoholóxidos, para los que no se conoce enzima que pueda metabolizarlos (Mates , 2000).

La formación del complejo enzima-sustrato se produce debido a que en el sitio activo tienen lugar una serie de transformaciones como resultado de las cuales se forma un puente metálico cíclico. El proceso se describe en 2 reacciones consecutivas:



La enzima reductasa de glutatión.

La reductasa de glutatión (GR) es una flavoenzima dependiente de dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato reducido (NADPH). La GR

cataliza la reducción del GSSG a GSH el cual es utilizado por la GPx para la reducción del peróxido de hidrógeno y de lipoperóxidos. Esta enzima se encuentra en todos los organismos aeróbicos así como en plantas superiores por lo que aparenta ser una enzima casi universal (Halliwell , 1994).

La GR contiene FAD y un disulfuro en su sitio activo. La reacción catalítica requiere de la reducción del sitio activo por el NADPH, produciendo una semiquinona del FAD, un radical sulfuro y un tiól. Después de la reducción del centro activo por el NADPH, el NADP puede ser liberado antes o después del paso catalítico que involucra al glutatión (Cisneros, 1995).

3.- DAÑO OXIDATIVO A LAS BIOMOLÉCULAS

Como ya hemos descrito anteriormente, cuando los sistemas antioxidantes no son lo suficientemente eficientes para contender con las ERO se presenta un estado de estrés oxidativo celular, ocasionando daño a los tres grupos de biomoléculas como son: lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (ADN principalmente).

a) Lípidos.

La alteración más importante inducida por las ERO sobre los lípidos está dada por los daños generados sobre las membranas en un proceso llamado lipoperoxidación. Existen diversas maneras para terminar este evento, como son la dismutación, la β -escisión y la ciclización. Así como la inactivación de los radicales libres por medio del sistema de defensa antioxidante constituido por la vitamina E, la vitamina C y el glutatión (GSH). En la mayoría de los casos, los productos que se generan modifican a la membrana y causan alteraciones importantes como cambios de fluidez y permeabilidad. En el primer caso, se altera la estructura de las proteínas transmembranales, perdiéndose la afinidad ligando-receptor y los mecanismos de segundos mensajeros, por lo que se altera la función de hormonas y neurotransmisores. En el segundo caso, se pierde la facultad de ser barrera iónica y osmótica (Rikans, 1997, Grune, 2001).

b) Proteínas.

Uno de los fenómenos más importantes durante la oxidación de proteínas es la formación de carbonilos, la cual puede estar ligada a la transformación de un residuo aminoacídico en otro y a la amidación. Por ejemplo, una histidina puede transformarse en una prolina o un ácido glutámico y, al mismo tiempo, generar un carbonilo en la cadena lateral de un residuo vecino. Los grupos carbonilos son distintivos de proteínas oxidadas y las hacen susceptibles a proteólisis. Otra alteración relacionada con las ERO es el entrecruzamiento intra e intermolecular, dada por la oxidación de los grupos SH en los residuos de cisteínas, induciendo la formación de puentes disulfuro en sitios donde no deberían de existir.

Estos cambios en la estructura primaria (que se reflejan en cambios en la estructura secundaria y terciaria) dan como resultado alteraciones en la inmunogenicidad de las proteínas del sistema inmune, cambios en la hidrofobicidad de las proteínas de membrana, y alteraciones generales en la estructura de todas las proteínas y enzimas oxidadas. Todo ello con la consecuente pérdida de la función y mayor susceptibilidad a la proteólisis (Roberfroid, 1994).

c) ADN

Se ha aceptado que en condiciones fisiológicas las especies como el $O_2^{\bullet-}$, el H_2O_2 o el óxido nítrico (NO) tienen muy poca o nula capacidad para reaccionar con el ADN, por lo que se considera que es el radical OH^\bullet el que lo hace de manera preferente. Los daños directos sobre el ADN pueden ocurrir sobre las bases púricas y pirimídicas y/o sobre azúcares (desoxirribosa). Cuando el radical OH^\bullet ataca a las bases nitrogenadas, no hay abstracción del H^+ como en el caso de los lípidos o las proteínas, en cambio el OH^\bullet se une de manera directa a la base nitrogenada formando un aducto. Hasta la fecha se han descrito más de 20 diferentes aductos formados durante la oxidación del ADN. Uno de los más estudiados es el caso de la guanosina, donde se sabe que

el $\text{OH}\cdot$ se puede unir a las posiciones 4, 5 u 8 del anillo púrico. La adición al carbono 8 produce un aducto radical C-8-OH, llamado 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina o bien 8-OhdG, que es el más estable y por lo tanto el que se cuantifica. La generación de los aductos induce alteraciones en puentes de hidrógeno que estabilizan la complementarización en la doble cadena del ADN, de manera tal que durante el proceso de duplicación, la enzima ADN-polimerasa puede tener errores y generar transversiones y translocaciones. Los aductos originan por lo tanto, mutaciones puntuales en el ADN (Cheng, 1992). El daño en los azúcares sigue un mecanismo similar al de la lipoperoxidación, iniciando con la abstracción de un H^+ y el ataque de un oxígeno singulete, que finaliza con el rompimiento del enlace fosfodiéster dando como resultado escisiones de cadena doble o sencilla.

4.- DAÑO AL ADN Y REPARACIÓN

Los recientes avances han mostrado que los procesos de reparación del ADN es un tema central a un número de mecanismos moleculares relacionados al ADN, y actualmente es de gran interés el explorar si hay relación entre deficiencia de reparación y cáncer. En años recientes, se ha aprendido más acerca de la complejidad de los procesos de reparación, y se han desarrollado técnicas nuevas para analizar más detalladamente estos procesos de reparación con mayor refinamiento. Al parecer, las vías de reparación del ADN interactúan íntimamente con la regulación del ciclo celular, vías de señalización y la transcripción (Ehrlich, 2000).

a) Daño al ADN y sus consecuencias

Uno de los mejores argumentos para involucrar la reparación de ADN en la prevención del cáncer es la fuerte evidencia del papel causal del daño al ADN en el desarrollo del cáncer, como se ejemplifica en las consecuencias de exposición a luz UV y la exposición a estrés oxidativo. La irradiación UV introduce fotolesiones específicas o aductos y dímeros de pirimidina en el ADN. Estas

lesiones pueden conducir a cáncer. Pacientes cuya maquinaria celular es defectuosa en remover estos aductos tienen una mayor probabilidad de desarrollar cáncer. También, mutaciones causadas por la falta de reparación de estos aductos pueden ocurrir en genes supresores de tumor y en particular p53, frecuente en cáncer de piel en áreas expuestas al sol (Brash, 1997).

Los organismos vivos están constantemente expuestos a estrés oxidativo de agentes ambientales y de procesos del metabolismo endógeno. Las ERO resultantes atacan proteínas, lípidos y ADN; aunque las proteínas y lípidos sean rápidamente degradados y resintetizados, la consecuencia más significativa de estrés oxidativo se piensa que está en las modificaciones del ADN, las cuales pueden establecerse de una forma permanente a través de la formación de mutaciones y otros tipos de inestabilidad genómica (Ehrlich, 2000)..

El ataque endógeno en el ADN por las ERO genera un nivel basal bajo de aductos de ADN que han sido detectados en el ADN de células humanas (Dizdaroglu, 1993). Se han identificado alrededor de 100 diferentes bases oxidadas que pueden ocurrir en el ADN, la más ampliamente estudiada es la 8-hidroxi guanosina (8-oxoG).

En la figura 3 se muestran algunas de las consecuencias del daño al ADN, en la cual se ilustra que el daño al ADN puede ser inducido por fuentes endógenas o exógenas; la irradiación UV o la radiación ionizante son ejemplos de fuentes exógenas de estrés. Las ERO generadas por la fosforilación oxidativa, que ocurren en la mitocondria, son ejemplos de un tipo de estrés endógeno. Las mutaciones en el ADN pueden ocurrir a través de la duplicación del ADN dañado, y las lesiones "bypass", o por errores de duplicación que pueden dar lugar a otras formas de inestabilidad genómica. Las lesiones en el ADN pueden bloquear la transcripción completamente, dando lugar a transcritos truncados en la transcripción, o incluso pueden causar errores en la transcripción. Alternativamente, el ADN dañado induce nuevos transcritos; de hecho, se ha mostrado que son inducidos por varias formas de estrés celular. Las lesiones al

ADN también pueden conducir a la activación de la vía de p53, conduciendo al paro del ciclo celular o a la apoptosis. Estas lesiones incluso pueden causar directamente rompimientos en las cadenas del ADN, lo cual parece ser la señal para varias enzimas importantes y para vías involucradas en la reparación del ADN, control del ciclo celular, o apoptosis (Bohr, 2000).

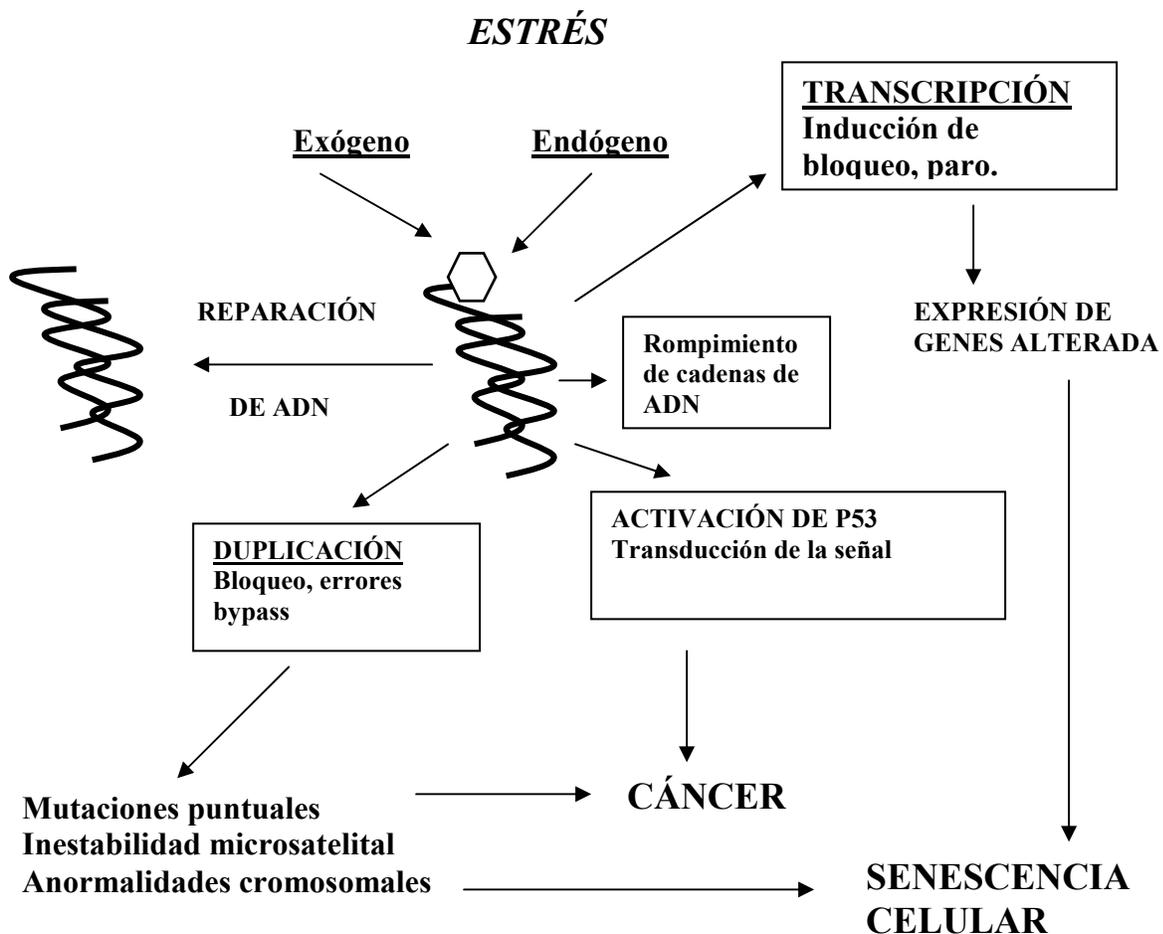


Figura 3: Consecuencias de daño al ADN. Se muestra un número de eventos que pueden conducir a cáncer y senescencia celular (Bohr, 2000).

Se ha estimado que hay cientos de alteraciones en el ADN en cada una de nuestras células por día, que son causadas por estrés endógeno y exógeno. Por lo tanto, si no existiera un proceso eficiente de reparación, nuestro material genético debería ser destruido por estos procesos en el transcurso de un tiempo de vida normal (Lindahl, 1993).

b) Reparación del ADN

Las células de mamífero pueden hacer uso de una variedad de vías de reparación del ADN (Tabla 1). La tabla muestra algunos tipos de lesiones que son removidas por vías enzimáticas particulares. Estudios realizados en los últimos años han asumido que las vías de reparación del ADN listadas fueron confinadas para remover ciertos tipos de lesiones. Por ejemplo, la reparación por escisión de nucleótidos (NER, del inglés nucleotide excision repair), es el sistema que remueve lesiones grandes en el ADN tales como dímeros de pirimidina, aductos de cisplatino, y otras lesiones que dramáticamente cambian la estructura del ADN. En contraste, la reparación por escisión de base (BER, del inglés base excision repair), es el proceso responsable para la remoción de lesiones simples en el ADN. Estas alteraciones se ejemplifican por lesiones de alquilación tales como metil-guaninas o modificaciones a bases oxidadas que causan solo pequeños cambios estructurales en el ADN, por lo cual, quizás no representan un mayor bloqueo en la transcripción y la duplicación.

Actualmente existe el concepto de que las vías de reparación listadas en la Tabla 1 se traslapan y comparten componentes.

VIA	EJEMPLO
Reparación por escisión de base	Remoción de lesiones simples
Reparación por recombinación	Remoción de entrecruzamiento entre cadenas
Reparación postduplicación	Después de la duplicación (bacteriana)
Reparación por escisión de nucleótido	Remoción de lesiones grandes
-Reparaciones totales	Reparación en ADN inactivo
-Reparación gen-específico	Reparación en genes
-Reparación, acoplamiento de transcripción (TCR)	Reparación cadena-específico

Tabla 1: Vías de reparación del ADN (Borh, 2000).

i) Reparación por escisión de base (BER)

La reparación por escisión de base por daño oxidativo al ADN es iniciado por ADN glicosilasas, que son una clase de enzimas que reconocen y remueven bases dañadas del ADN por rompimiento hidrolítico de la unión base-azúcar dejando un sitio abásico (sitio AP) (Lindahl, 1997). Varias ADN glicosilasas que reconocen y procesan productos oxidados de purinas y pirimidinas se han identificados en células humanas. El homólogo humano de la endonucleasa III bacteriana (NTH1) se ha clonado y purificado, y tiene una homología estructural y funcional a la enzima bacteriana y posee una actividad de ADN glicosilasa específica para una variedad de pirimidinas oxidadas (Aspinwall, 1997). Dos genes humanos, OGG1 y OGG2, también se han clonado, y sus productos reconocen y procesan la 8-oxoG en el ADN (Radicella, 1997; Roldán-Arjona, 1997; Rosenquist, 1997).

Después del rompimiento glicolítico, permanece un sitioapurínico o apirimídico (AP). Subsecuentemente, hay al menos dos vías para procesar el sitio AP originado. Una de éstas es catalizada por una AP endonucleasa, HAP1 (Ape, Apex; Ames, 1989), la cual rompe el enlace fosfodiéster 5' al sitio AP y genera un 5'-azúcar-fosfato y un extremo 3'-OH libre dejando una mella en la cadena de ADN (Demple, 1994). La remoción del residuo 5'-desoxiribosafosfato-terminal resulta en un hueco de un nucleótido simple que es entonces rellenado por una ADN polimerasa y sellado por una ADN ligasa (Dianov, 1994; Kubota, 1996; Singhal, 1995). En células de mamífero, la ADN polimerasa β (pol β) es la polimerasa más eficaz involucrada en la vía de reparación de escisión de un simple nucleótido (Sobol, 1996). Recientemente se ha demostrado que la ADN polimerasa β tiene una actividad intrínseca de AP liasa que remueve el 5'-azúcar-fosfato por eliminación β , para después rellenar, por medio de su actividad de polimerasa β el hueco del nucleótido (Matsumoto, 1995).

ii) Reparación por escisión de nucleótido (NER)

Los pasos enzimáticos involucrados en NER son: i) reconocimiento de la lesión, ii) incisión del ADN, iii) escisión del templado del ADN dañado, iv) resíntesis de la nueva base de ADN sobre el templado intacto, y v) ligación de la nueva cadena formada. El reconocimiento del ADN dañado involucra las proteínas XPC y XPA, así como la proteína A de replicación (RPA, del inglés "replication protein A"). La incisión involucra la endonucleasa estructura-específica XPF-ERCC1 y XPG, así como el factor básico de transcripción TFIIH que contiene las proteínas de reparación XPD y XPB entre sus nueve componentes. Este proceso de incisión involucra proteínas de transcripción, así como proteínas de reparación, ilustrando por lo tanto la unión entre estos dos procesos. Después de la incisión, hay escisión y resíntesis realizada por la ADN polimerasa seguida de ligación (Friedberg, 1996; Frosina, 1996).

5.- El gen supresor de tumores: p53

Los genes mutados relacionados al cáncer se han dividido en dos grandes categorías, oncogenes y genes supresores tumorales, que tienen funciones opuestas. En ambos casos se han identificado versiones silvestres de estos genes que funcionan normalmente controlando el ciclo de división celular. A las versiones no mutadas de los oncogenes se les ha denominado protooncogenes. Mientras que el efecto funcional de las mutaciones presentes en un oncogen se manifiestan como un acelerador de la proliferación celular, las mutaciones presentes en un gen supresor tumoral se manifiestan como la falta de un freno de la proliferación. Bajo condiciones normales, ambos tipos de genes silvestres realizan funciones que son importantes para regular la proliferación adecuada de las células. Sin embargo, cuando estos genes son mutados, como en el caso del cáncer, se lleva a cabo una proliferación descontrolada de las células (Oliner, 1994; Kubbutat, 1994; Chen, 1997). Las mutaciones de los oncogenes generalmente resultan en ganancia de función, por lo que basta con una mutación dominante en un solo alelo. Por el contrario, las mutaciones en genes supresores de tumores suelen ser recesivas y por tanto se ven afectados los dos alelos, por lo que se habla de una inactivación de la supresión tumoral (Oliner, 1994; Soussi 1996).

Si bien el primer supresor de tumores identificado fue la proteína Rb, la proteína p53 es el supresor de tumores que mayor atención ha recibido, ya que se ha identificado su inactivación en un poco más de la mitad de todos los tipos de tumores malignos estudiados en humanos. Varias líneas de evidencia soportan la idea de que el gen p53 funciona como un supresor tumoral. Un importante hallazgo es que en muchos tumores con alteraciones en p53, tienen mutaciones en ambos alelos. Para probar directamente si p53 suprime la proliferación, varios grupos han realizado experimentos fundamentales para entender la función normal del producto génico de p53. Se han introducido copias de este gen de tipo silvestre (no mutado) en células donde el p53 está

mutado. En las células resultantes se producen altos niveles de p53 silvestre y se reduce significativamente la habilidad para dividirse (Raycrof, 1990). Se han realizado experimentos que sugieren que el papel de supresión de crecimiento de p53 no es requerido para la viabilidad de la célula en el desarrollo o en la vida adulta. Por ejemplo, ratones que no tienen el gen de p53 maduran normalmente en el útero, y al nacer son normales en todos los aspectos a excepción de uno, los ratones son propensos a desarrollar tumores desde etapas tempranas (Raycrof, 1990). De manera similar, humanos que heredan una línea germinal con mutaciones en p53 (una condición rara referida como el síndrome Li-Fraumeni) son propensos a la formación de tumores de diversos tipos (Srivistava, 1990). Bajo esta visión se detectó una aparente contradicción; si bien la función de p53 no es evidente para la regulación de la proliferación normal, su función es importante en la prevención de la proliferación desregulada. Actualmente, se cree que la función de la proteína p53 está relacionada con la prevención de la duplicación cromosómica bajo circunstancias específicas, en particular cuando hay daño al ADN (Srivistava, 1990).

a) Estructura de p53

El gen se encuentra en el cromosoma 17 p13.1. Está constituido por 11 exones (20 kb) y da lugar a un ARNm de 2.5 Kb. En la proteína se han localizado 3 regiones: 1) la región amino terminal, 2) la región central y 3) la región carboxilo terminal (Figura 4).

1) Región amino terminal: El extremo amino terminal de p53 está altamente fosforilado y es el blanco de una gran variedad de cinasas, cada una de las cuales es activada en respuesta a estrés celular (como daño al ADN o cambios externos que interfieren con el crecimiento).

Esta región de la proteína comprende dos dominios discretos pero complementariamente funcionales: 1) un dominio de transactivación (aminoácidos 1-14) que cuando se une a un dominio de unión a ADN heterólogo, puede funcionar independiente del resto de la molécula de p53

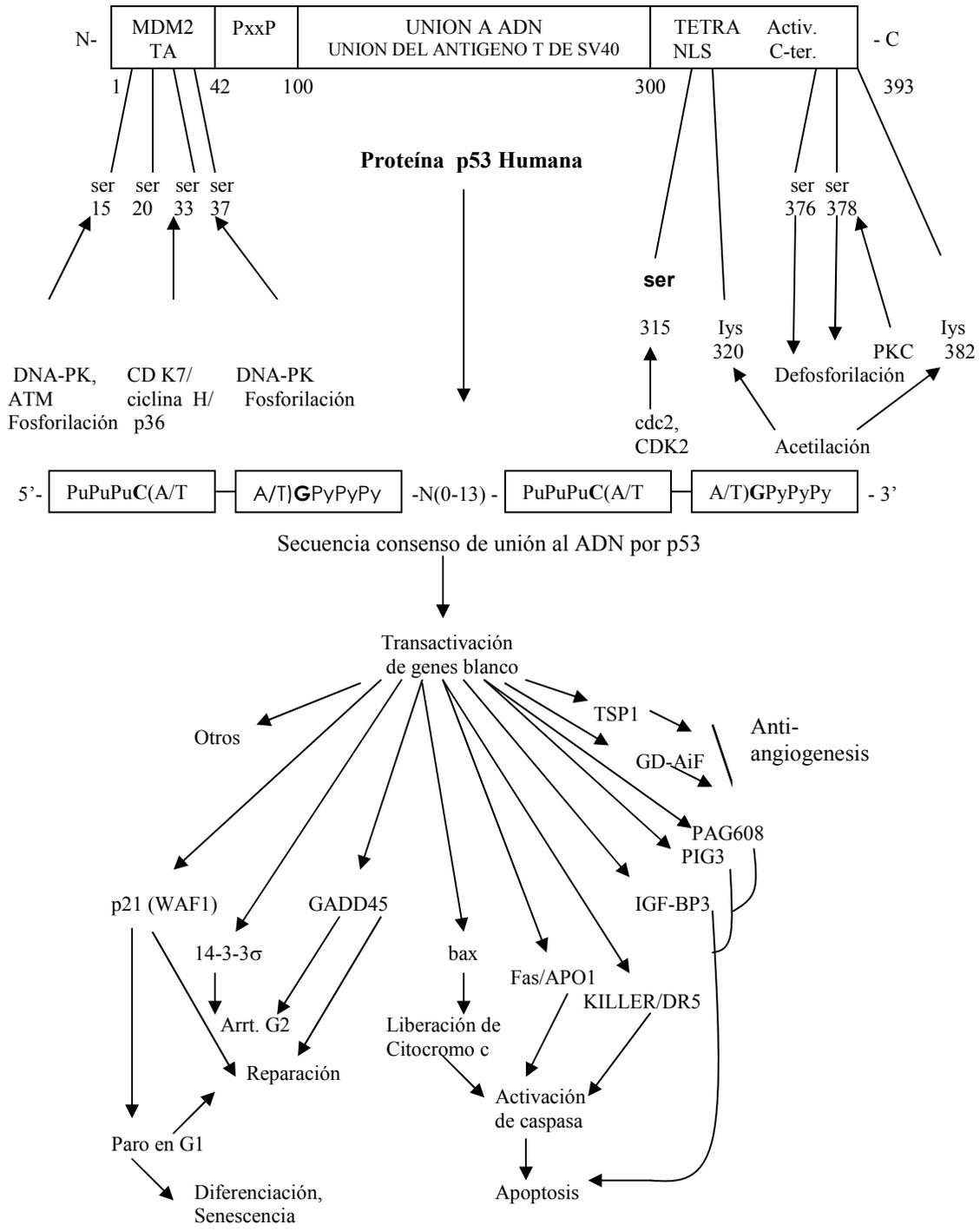


Figura 4: Esquema de los cuatro dominios de la proteína humana p53 en cuanto a su estructura, residuos de aminoácidos específicos que están sujetos a fosforilación, desfosforilación o acetilación cuando las células presentan un daño en el ADN, así como su secuencia consenso de unión al ADN y los genes blanco que transcribe p53. La proteína p53 humana de 393 aminoácidos está dividida en 4 dominios, el primer dominio incluye los residuos de aminoácidos 1-42 el cual presenta el dominio de transactivación y unión a MDM2. Un dominio rico en prolina (42-100), el tercer dominio comprendido entre los residuos de aminoácidos 100-300 presenta el sitio de unión a secuencias de ADN que además contiene un sitio de unión al antígeno grande T del virus SV40, y el último dominio situado en el carboxilo terminal (residuos de aminoácidos 300-393) es fosforilado o desfosforilado en algunos residuos de serina o acetilado en residuos de lisina. P53 es un factor de transcripción y sus genes blanco están involucrados en paro del ciclo celular, apoptosis, diferenciación, y efectores anti-angiogénicos (El-Deiry, 1998; Oren, 1999).

(Raycroft, 1991) y 2) un dominio independiente de transactivación, rico en prolina (aminoácidos 63-93), que es necesario para una eficiente supresión de crecimiento (Walker, 1996). Por lo tanto, el extremo amino de p53 puede funcionar como un sensor que integra las señales de cambios de ambiente intra y extra-celulares.

La región que contiene los dominios de transactivación (aminoácidos 1-42) permite que p53 interactúe con componentes de la maquinaria transcripcional (Unger, 1992). También se encuentra una región pequeña y conservada, BOX-1, la cual interactúa directamente con otras proteínas entre las que se encuentra: 1) la proteína p300 que actúa como una proteína adaptadora de la transcripción, requerida para la expresión dependiente de p53, 2) TAF11 31 o TAF11 70 que son factores asociados a TBP (TATA Binding Protein) (Avantaggiati, 1997; Scolnick, 1997).

El extremo amino de p53 también interactúa con la proteína RP-A de unión a una sola cadena de ADN, y a la unidad p62 del factor de reparación TFIIH (Dutta, 1993; He, 1993). La proteína de adenovirus E1B-55 kDa, la proteína MDM2 y la proteína X del adenovirus de la hepatitis B, se unen a la región amino terminal de p53 e inhiben su función de transactivación (Yew, 1992; Oliner, 1993). Los residuos de los aminoácidos 22 y 23 desempeñan un papel clave en la unión de p53 a las proteínas E1B-55 y a MDM2. Además los residuos de aminoácidos 19, 22 y 23 son esenciales para la activación transcripcional mediada por p53 *in vivo* (Lin, 1994).

El extremo amino también contiene una región rica en prolina (residuos de aminoácidos 63-97) con alta homología a las proteínas de unión SH3. Esta región es necesaria en algunos modelos experimentales para mediar la apoptosis (Sakamuro, 1997), para la supresión del crecimiento de células tumorales (Walker, 1996), y para la degradación de p53 mediada por la proteína del papiloma humano E6 (Li, 1996).

El hecho que esta región sea rica en prolina y contenga cinco motivos de

unión repetidos de SH3 (PXXP) sugiere que puede estar involucrada en la interacción física con los elementos de vías de transducción de señales de cable. Por último, se ha observado que la pérdida de los dominios de prolinas no afectan la transactivación de algunos promotores como WAF-1, MDM2 y BAX (Venot, 1998).

2) Región central: la parte central de la proteína está comprendida entre los residuos de aminoácidos 102-292 donde se encuentran cuatro dominios conservados (II-V). Es en esta región donde se localiza el 80-90% de las mutaciones de p53 asociadas a diferentes tipos de tumores. Aquí también se encuentran los dominios de unión al ADN que se unen a secuencias blanco (El-Deiry, 1992).

Se ha observado que este dominio es resistente a la proteólisis por enzimas como la termolisina o subtilisina (Bargonetti, 1993; Pavletich, 1993). A esta región se unen proteínas como el antígeno grande T del virus SV40 (Jenkins, 1988) y las proteínas celulares 53BP1 y 53BP2 (Ruppert, 1993; Gorina, 1996).

La estructura del dominio de unión a ADN consiste en una cadena β -plegada que forma una hendidura que actúa como un andamio de tres asas ("loop"). La hendidura está formada por dos cadenas β -plegadas antiparalelas que contiene cuatro y cinco cadenas β , respectivamente. La primera asa L1 (por sus siglas en inglés LHS: "loop-sheet-helix") une el ADN a la hendidura principal. La segunda L2 une al ADN a la hendidura menor. La tercera asa L3 presiona contra la L1 y estabiliza la unión p53-ADN (Cho, 1994)(Figura 4).

Las asas L2 y L3 están conectadas por un átomo de zinc tetrahédrico coordinado en los residuos de los aminoácidos Cys¹⁷⁶, His¹⁷⁹, Cys²³⁸ y Cys²⁴². Este átomo de zinc estabiliza la estructura de las asas (Hainaut, 1993).

Cuando se analizaron las diferentes mutaciones que presenta p53 se encontró que las mutaciones más frecuentes se localizan en la región de unión a ADN (Figura 4).

Se ha encontrado que de acuerdo a la estructura, existen dos clases de

mutaciones: Las mutaciones clase I afectan residuos que interactúan directamente con el ADN. Estas incluyen los aminoácidos Arg²⁴⁸ y Arg²⁷³ los cuales se encuentran frecuentemente mutados. Las mutaciones clase II afectan residuos que no tienen contacto con el ADN pero que tienen contacto con otros residuos que ayudan en la estabilización de la proteína (May, 1998).

Por ejemplo, algunas formas mutantes de p53 forman tetrámeros con p53 silvestre e interfieren con su unión al ADN (Monti, 2002; Vries, 2002). Otras mutantes alteran la conformación de la proteína y producen proteínas que no reaccionan con determinados anticuerpos, lo que indica que los epítopes blancos no están accesibles (Stephen, 1992).

3) Región carboxilo terminal: Residuos 300-393. Incluyen dos subdominios bien caracterizados: 1) un dominio de unión flexible (residuos de aminoácidos 300-318) que conecta el dominio central con la región carboxilo terminal y 2) un dominio de tetramerización (aminoácidos 323-356) (Kraiss, 1988).

La estructura del dominio de tetramerización ha sido deducida por resonancia magnética nuclear (Clowse, 1994). La tetramerización es requerida para la transactivación eficiente *in vivo* y para la supresión mediada por p53 del crecimiento de células tumorales (Pietenpol, 1994).

En esta región se han encontrado tres secuencias de Localización Nuclear (NLS), y se ha demostrado experimentalmente que si se producen mutaciones dirigidas en sitios de NLS1, la proteína se presenta totalmente citoplasmática. Por otro lado, las mutaciones dirigidas en NLS2 y NLS3 resultan en la localización citoplasmática y nuclear, respectivamente (Dang, 1989; Shaulsky, 1990).

Junto al dominio de tetramerización se encuentra una región (residuos de aminoácidos 363-393) que se ha referido como un dominio apoptótico (Wang, 1996) y también como un dominio de regulación transcripcional (Wang, 1995)

Se conocen varias proteínas virales y celulares que se unen al extremo carboxilo de p53. Estas incluyen la proteína X del virus de la hepatitis B; las subunidades XPD y XPB de TFIIH (que actúan como helicasas *in vitro*) (Wang, 1996; Horikoshi,

1995); una tercera helicasa, llamada CBS también se une al extremo carboxilo y está involucrada en la reparación de ADN (Ko, 1996). Se ha observado que este extremo también puede unirse a las regiones extrahelicales del ADN dañado involucrado en la formación de imparidad dada por delección o inserción (Lee, 1995).

Este extremo une específicamente a extremos de ADN y cataliza la transferencia y renaturalización de las cadenas de ADN (Reed, 1995).

b) Regulación y Activación de p53

La activación de p53 es un evento central en respuesta a diferentes tipos de estrés o estímulos que involucran la estabilización y posterior activación de proteínas por una variedad de mecanismos moleculares (Figura 5).

P53 es un factor de transcripción que regula varios mecanismos mediante la activación o supresión de genes específicos. Por ejemplo, estudios recientes muestran que un gen de p53 deficiente para la transcripción, por medio de recombinación homóloga, provoca la pérdida de su actividad inhibidora en la proliferación celular (Chao, 2000; Jiménez, 2000).

Aunque la regulación transcripcional mediada por p53 es quizá su principal función, otras funciones mediadas por esta proteína han sido poco exploradas como son la re-localización de los receptores de muerte en la superficie celular (Bennett, 1998), el papel directo de p53 en la mitocondria (Marchenko, 2000), y la habilidad de p53 para regular la traducción por unión directa a la región 5' de ciertos RNA's mensajeros (Miller, 2000).

Como p53 también es un potente inhibidor de la proliferación celular, esta función debe ser controlada a través de varios mecanismos que incluyen: 1) regulación de transcripción y traducción; 2) estabilidad de la proteína; 3) localización celular y actividad. La inducción rápida de la función de p53 es llevada a cabo en respuesta a las diferentes formas de estrés celular por medio de mecanismos post-transcripcionales que conducen a la estabilización y la activación de la proteína p53.

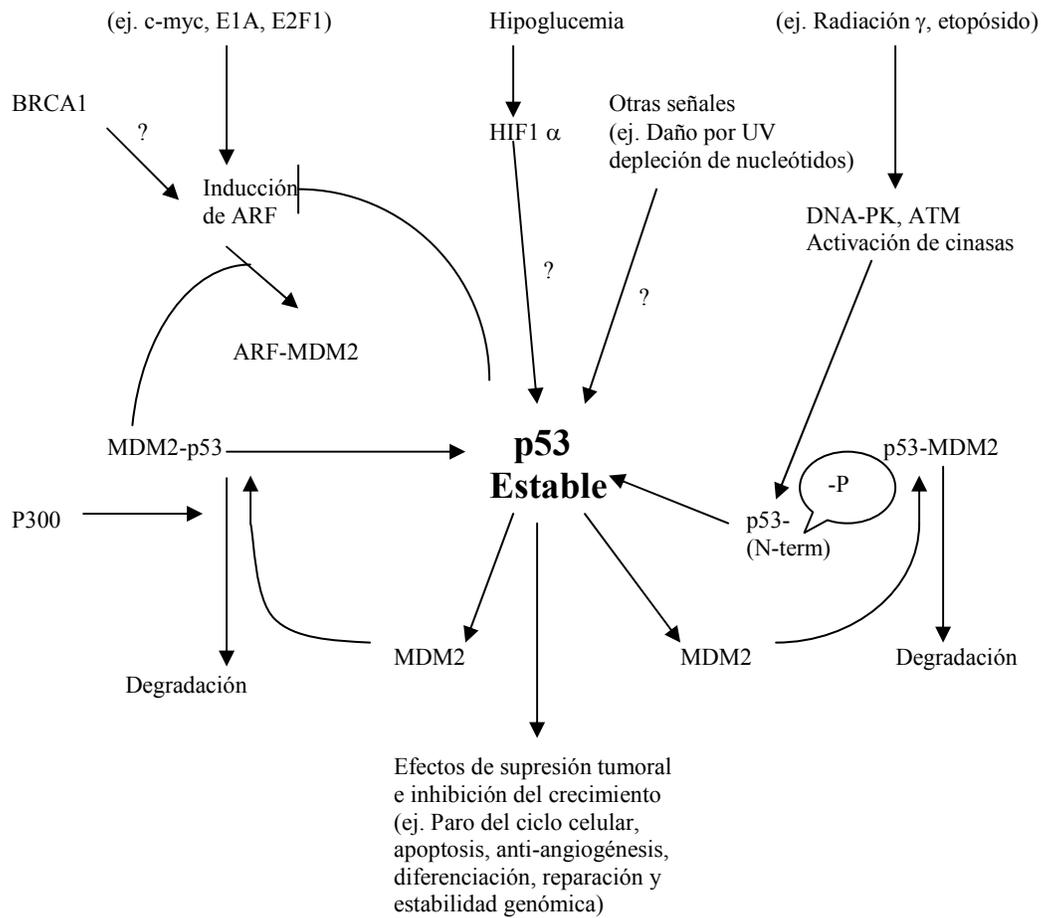


Figura 5: Señales bioquímicas que conducen a la estabilización de p53. La proteína p53 es estabilizada cuando las células de mamífero son expuestas a una gran variedad de agentes que producen estrés incluyendo daño al ADN, hipoxia, luz UV, depleción de nucleótidos o activación de oncogenes. Proteínas celulares tales como ARF, HIF1α, DNA-PK y ATM se requieren para la transducción de la señal emitida por algún estímulo de estrés. En el caso de estímulo oncogénico están involucrados c-myc, E1A, ras y E2F1. ARF parece estabilizar a p53 a través de la interacción con MDM2. P300 parece mediar la degradación de p53 dependiente de MDM2. ARF parece ser regulado negativamente por p53. Después de exposición a radiación gamma o etopósido, p53 es fosforilada por ATM y DNA-PK. La fosforilación en el residuo de serina 15 estabiliza a p53 e inhibe la interacción con MDM2. Los mediadores involucrados en la estabilización posterior a tratamiento con luz UV o depleción de nucleótidos son desconocidos. El mecanismo de estabilización de p53 mediado por BRCA1 o por el factor inducible por hipoxia es desconocido (Chen, 1997; Kubbutat, 1998). N-term: extremo amino ; -P: fosforilación.

c) Regulación de la estabilidad de p53

Uno de los principales reguladores de p53 es la proteína MDM2, que puede inhibir la actividad transcripcional de p53 e inducir su degradación. Para esta función MDM2 actúa como una E3 ligasa, que une a la p53 con ubiquitina para su degradación por la vía del proteasoma. A su vez, MDM2 es un blanco transcripcional de p53. En los casos de estrés celular la inducción de p53 involucra la inhibición de MDM2, y sólo se lleva a cabo a través de diferentes vías dependientes de la señal de estrés (Woods, 2001) (Figura 5).

La importancia de este circuito se hizo evidente en ratones en los que la expresión deficiente de MDM2 conduce a la muerte embrionaria causada por apoptosis aberrante inducida por p53 (de Rozières, 2000). Por el contrario, en la ausencia de p53, los ratones deficientes en MDM2 se desarrollan normalmente. Estos experimentos demuestran el papel crítico de MDM2 en la regulación negativa de p53 durante el desarrollo.

Los mecanismos que regulan la degradación de p53 mediada por MDM2 incluyen: 1) la represión directa de MDM2; 2) las modificaciones post-traduccionales de p53 y MDM2; 3) la expresión de proteínas que inhiben la función de p53 y 4) la regulación de la localización celular de p53 o de MDM2. A continuación se dan algunos ejemplos de las vías señaladas: A) se ha observado que las cinasas Chk1 y Chk2 pueden fosforilar un sitio del extremo N-terminal de p53. Esta fosforilación inhibe la interacción de p53 y MDM2 y por lo tanto previene la degradación de p53 (Chehab, 2000; Shieh, 2000). B) Otro mecanismo establecido para la degradación de p53 es mediante la proteína E6. Esta proteína es producto de un gen viral perteneciente a los papiloma virus humanos (HPV) y tiene el papel de una ligasa de ubiquitina. La proteína E6 forma un complejo con p53 marcándola para su degradación eficiente. En los experimentos *in vitro* e *in vivo* las células que expresan E6 son incapaces de mantener niveles basales de p53 debido a que la proteína p53 no puede ser estabilizada (Nuber, 1998).

d) Regulación de la localización de la proteína p53

La función de p53 depende de su localización nuclear, por ello la importación y exportación del núcleo son altamente reguladas (Vousden, 2000). La importación al núcleo de p53 es dependiente de su interacción con la red de microtúbulos y de una proteína nuclear conocida como dineína (Giannakaki, 2000). Esto indica que p53 es importada activamente hacia el núcleo. La importación es dependiente de las señales de localización nuclear encontradas en el extremo carboxilo de la proteína p53, donde también se encuentran señales de exportación al citoplasma (Stommel, 1999). Otros estudios recientes también han demostrado que la actividad de ligasa de ubiquitina de MDM2 es crítica para la exportación de p53 al citoplasma (Boyd, 2000). Se ha observado que la ubiquitinación de p53 ocurre en el extremo carboxilo y que si se presentan mutaciones en algunos residuos de lisina de esta región, esto inhibe el transporte nuclear dependiente de MDM2 (Geyer, 2000).

e) Regulación de la actividad de p53

Además de los mecanismos de regulación de la estabilidad y localización de la proteína p53, existen mecanismos para modular la capacidad de unión de p53 al ADN. Varias modificaciones post-transcripcionales en el extremo carboxilo terminal de p53 generan un aumento de su unión a secuencias específicas de ADN. Estas modificaciones son principalmente: fosforilación y acetilación (Figura 4).

A) Fosforilación: varias cinasas pueden fosforilar residuos distintos en los diferentes dominios de p53 *in vitro*. Por ejemplo, la ADN-PK ("DNA-Activated Kinase") fosforilan diferentes sitios del extremo de transactivación amino-terminal de p53 (Chernov, 1998).

Estos eventos de fosforilación afectan la función de transactivación de p53. Por ejemplo, la mutación de tres residuos de serina de extremo N-terminal que son blancos de esta cinasa (antes mencionada) resultan en un decremento significativo en la función supresora y transactivadora mediada por p53 (Mayr,

1995). También las mutaciones de varios residuos de serinas tienen un efecto diferencial en la velocidad de unión de p53 de varios promotores blanco (Lohrum, 1996).

B) Acetilación: La acetilación de los residuos de lisina en el extremo carboxilo de p53 es mediado por acetiltransferasas como p300/CBP y pCAF, que también pueden unirse al extremo amino-terminal de p53 (Gu, 1997; Liu, 1999). La fosforilación en el extremo amino-terminal de p53 aumenta la interacción con las acetiltransferasas, estableciéndose así una cascada de fosforilación/acetilación que resulta en un aumento de la actividad de p53 (Sakaguchi, 1998).

Además de regular la actividad transcripcional de p53, las modificaciones post-transcripcionales de p53 juegan un papel importante en la respuesta celular correcta para la activación de p53.

Varios estudios han demostrado que p53 participa en la determinación de la respuesta por activación diferencial de distintos grupos de genes para inducir un paro del ciclo celular o la apoptosis, según las circunstancias y el grado de daño genotóxico (Figura 4).

La regulación de la represión transcripcional por p53 es otro mecanismo por medio del cual las respuestas apoptóticas y de ciclo celular pueden ser reguladas independientemente. La represión transcripcional por p53 puede ser mediada por una interacción con mSin3a y desacetilasas de histonas que incrementan su actividad apoptótica. Además de marcar a p53 para su degradación, la unión de MDM2 al dominio amino-terminal de transactivación de p53 conduce a una inhibición de la unión a ADN (Murphy, 1999).

En resumen, tanto la transcripción del gen de p53, como la función y degradación de su proteína, están finamente controladas por múltiples mecanismos que se activan dependiendo de los estímulos a los que sea sometida una célula. Además, según las circunstancias, p53 inducirá sus efectos sobre el ciclo celular, proliferación, reparación de ADN o apoptosis (Figura 4).

f) Genes que se transcriben en respuesta a p53

Análisis de los sitios potenciales de unión de p53 a sus genes blanco sugiere que existen al menos de 200 a 400 de estos genes o quizás más (Canman, 1998).

Por otro lado, es conveniente agrupar a los genes transcritos por p53 de acuerdo a su funcionalidad, aunque cabe aclarar que posiblemente no todos los mecanismos se lleven a cabo simultáneamente, y que los mecanismos de activación de p53 depende del tipo de estímulo. Finalmente, estos mecanismos convergen en una respuesta común, evitar la proliferación celular descontrolada, previniendo la transmisión de mutaciones a las células hijas. Bajo condiciones normales, cuando no se lleva a cabo una reparación adecuada del daño al ADN, la misma p53 puede inducir la muerte celular por apoptosis.

6.- CICLO CELULAR Y SU REGULACIÓN

Las células de mamífero se propagan por mitosis. Cuando una célula se divide se obtienen dos células hijas y cada una lleva consigo una carga genética de cromosomas idéntica a la célula parental. Después de un intervalo de tiempo las células hijas también se dividirán por mitosis.

El tiempo entre las divisiones es conocido como ciclo mitótico somático. Este ciclo mitótico consiste en cuatro fases: fase Gap 1 ó G1, cuando la célula se prepara para sintetizar ADN; fase de Síntesis o fase S, en la cual la célula sintetiza ADN y se duplica un número idéntico de cromosomas; fase G2, en la cual la célula se prepara para la división; y la mitosis o fase M, en la que la célula se divide en dos células con idéntica carga genética. Todas las fases están reguladas por unas proteínas llamadas Cinasas Dependiente de Ciclinas (CDK's) que forman heterodímeros con otras proteínas llamadas ciclinas, estos heterodímeros, a su vez son regulados principalmente por cinasas (Figura 6). La mitosis a su vez se subdivide en 4 fases; profase: cuando se condensan los cromosomas; metafase: cuando los miembros de cada par de cromátidas se unen a los microtúbulos; anafase: cuando las cromátidas hermanas se separan

a los extremos opuestos por los microtúbulos; telofase: se forma el núcleo y se descondensan los cromosomas (Martínez, 2001) (Figura 6).

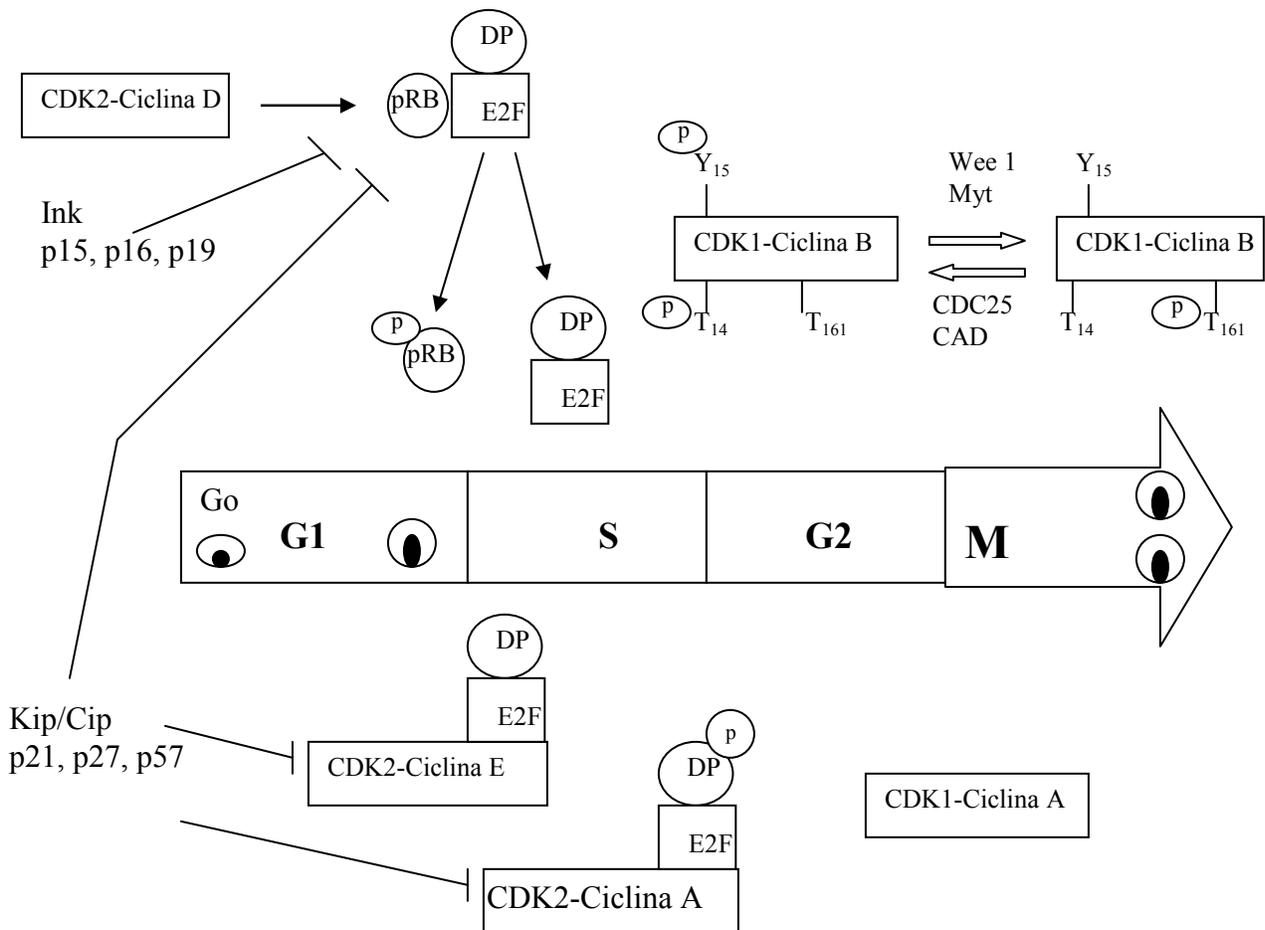


Figura 6: Diagrama que muestra las vías más importantes de la activación e inactivación de varios complejos CDK´s-ciclina que gobiernan las diferentes fases del ciclo celular en células eucariotas. ^PT₁₄: residuo de treonina fosforilado, T₁₄: residuo de treonina no fosforilado, ^PY₁₅: residuo de tirosina fosforilado, Y₁₅ residuo de tirosina no fosforilado.

a) Cinasas Dependientes de Ciclinas (CDK's)

La progresión a través de un ciclo celular es regulada por una compleja red de señales extra- e intracelulares, que activan o desactivan de manera coordinada y secuencial a la maquinaria básica de reguladores clave conocidos como CDK's, todos los miembros de estas enzimas pertenecen a la familia de las cinasas de residuos de serinas-treoninas (Zhang, 1999; Martínez, 2001).

Estas CDK's son inactivas como monómeros y requieren de fosforilación y asociación con otras proteínas reguladoras llamadas ciclinas para ser funcionales. Solo el heterodímero ciclina-CDK proporciona la actividad a estos complejos que son ensamblados y activados a tiempos diferentes durante el ciclo celular (Tabla 2). Así los diferentes complejos ciclina-CDK controlan actividades específicas del ciclo celular como la síntesis de ADN y mitosis, entre otras (Nigg, 1995).

En la actualidad se conocen trece distintos tipos de ciclinas y diez de CDK's. Cada CDK interactúa con un grupo específico de ciclinas. Por lo que, aquí sólo citaremos las más relevantes involucradas en el ciclo celular.

-CDK4 y CDK6: Estas CDK's se unen selectivamente a las ciclinas de tipo D durante la fase G1 y regulan la fosforilación de pRB en la fase G1/S del ciclo celular.

-CDK3: Ha sido propuesta como una cinasa reguladora de fase G1 tardía (Matsuoka, 2000). Contribuye a la activación de los factores de transcripción E2F-1, E2F-2 y parcialmente a la de E2F-3. Por lo tanto contribuye en el inicio de la fase S (Hofmann, 1996). También se ha encontrado que CDK2 o CDK3 pueden promover la apoptosis por interferencia con la respuesta celular a los factores de sobrevivencia (Braun, 1998).

-CDK2 : Esta CDK en unión a la ciclina E interviene en el término de la fase G1 y tempranamente en la fase S del ciclo celular. Se ha encontrado recientemente que esta proteína es esencial para la duplicación del centrosoma en células de

mamíferos (Meraldi, 1999).

-CDK1 (Cdc2) : juega un papel importante en la fase mitótica del ciclo celular. Es conocido que CDK1 está unida a la ciclina B y puede fosforilar al extremo C-terminal de la RNA pol II (Desai, 1995) y la proteína Eg5. Esta última es requerida para la separación adecuada de los centrosomas y el ensamble del huso mitótico (Blangy, 1995). Otro papel que recientemente se le ha atribuido a CDK1 es el paro del ciclo celular en la fase G2/M (Roulblevskaia, 2000).

-CDK7: Esta proteína se une a ciclina H y forman un complejo llamado CAK (Clarke, 1995), que fosforila y activa otros complejos Ciclina's-CDK's. Este complejo en mamíferos, puede fosforilar a CDK1 y CDK2 cuando se encuentran formando complejos con sus respectivas ciclinas (Poon, 1993).

-CDK5: Aparentemente, CDK5 no tiene un papel importante en el control del ciclo celular.

b) Ciclinas

Las ciclinas son un grupo de proteínas altamente conservadas a través de la evolución en diferentes especies. La homología entre ciclinas se encuentra en el dominio responsable de la unión y activación a CDK's (Lees, 1993) y se ha demostrado que las mutaciones en esta región inhiben ambas actividades. Cada CDK interactúa con un grupo específico de ciclinas, para controlar las funciones que determinan el progreso de las fases del ciclo celular (Tabla 2).

La función de las ciclinas, es controlada principalmente por cambios en niveles de ARNm en las células de mamíferos, habiéndose demostrado la oscilación secuencial de los niveles de las principales ciclinas (E, A y B) (Pines, 1991). Estos datos han permitido documentar el papel de cada una de ellas durante el ciclo celular, en particular el complejo ciclina E-CDK2 tiene un papel crítico en el avance de G1 a la fase S; el complejo ciclina A-CDK2 uno en la fase S y otro en la fase G2-M; y el complejo ciclina B-CDK1 es activado en la parte final de la fase G2 por la fosfatasa Cdc25 .

Cinasa	Subunidad reguladora	Sustratos	Función
CDK1 (Cdc2)	Ciclinas A y B	pRB, NF, Histona H1	G2/M
CDK2	Ciclinas A, E y D	pRB, p27	G1/S, S
CDK3	Ciclina E	E2F1/DP1	G1/S
CDK4	Ciclinas D1, D2 y D3	pRB	G1/S
CDK5	p35, Ciclitas D1 y D3	NF, Tau	Dif. Neuronal
CDK6	Ciclitas, D1, D2 y D3	pRB	G1/S
CDK7	Ciclina H	CDC2, CDK2/4/6	CAK
CDK8	Ciclina C	RNA polimerasa II	Reg. Transcripción
CDK9	Ciclina T	pRB, MBP	G1/S

Tabla 2: CDK's y proteínas asociadas a la regulación del ciclo celular en eucariotas. Dif. Neuronal: diferenciación neuronal; Reg. Transcripción: Regula transcripción.

c) Regulación del ciclo celular

Los niveles en la expresión de las ciclitas son controlados por 3 factores principales que son: 1) a nivel transcripcional; 2) por modificaciones post-traduccionales y 3) la proteólisis dependiente de ubiquitinación (Martínez, 2001). Dentro de las modificaciones post-traduccionales se encuentran, por ejemplo:

- Fosforilaciones de CDK's para adquirir su actividad catalítica, estas fosforilaciones afectan el sitio de unión a la ciclita aumentando su afeidez para formar algunos complejos CDK-ciclita (Ducommun, 1991).

- Los complejos ciclina-CDK's pueden inactivarse por fosforilaciones en uno o dos de los sitios que se encuentran cerca del sitio de unión a ATP de las CDK's (p. ej. los residuos treonina 14 y tirosina 15 en CDK1 y CDK2 humanas, respectivamente). Un ejemplo de este tipo de fosforilaciones se lleva a cabo como un punto de control en la fase G2/M en el caso de daño a ADN (Figuras 5 y 7). Los residuos conservados de tirosina en varias CDK's pueden ser fosforiladas por la cinasa Wee1/Mik1 y el residuo de treonina por Myt1 (Coleman, 1993)(Figura 6).

- Las fosfatasas de la familia Cdc25 son las encargadas de activar el complejo ciclina-CDK al remover los grupos fosfatos de los residuos de tirosina y treonina en el sitio de unión de ATP de las CDK's. A la fecha se conocen tres miembros de esta familia de fosfatasas en células de mamífero, éstas son: Cdc25C, que está relacionada a la activación del complejo ciclina B-CDK1 en la mitosis; Cdc25A que regula la progresión de la fase G1 y que puede ser fosforilada y activada por la ciclina E-CDK2 en el inicio de la síntesis de ADN, y por último, Cdc25B cuyo papel es desconocido hasta el momento (Galaktionov, 1991).

- También se conocen dos familias de inhibidores de CDK's específicos que pertenecen a las familias CIP/KIP e INK4 (Tabla 3). Algunos de estos inhibidores pueden actuar como factores de ensamble entre algunas ciclinas y sus CDK's (Hengest, 1998; Carnero, 1998). Los miembros de esta familia son inhibidores generales de todos los complejos y se acumulan en respuesta a un amplio rango de estímulos antiproliferativos. Estas proteínas se asocian de preferencia con el complejo CDK-ciclina y su sobreexpresión induce el paro de las células en diferentes fases del ciclo celular. Los miembros de la familia CIP/KIP más conocidos son las proteínas p21, p27 y p57. Estas moléculas son consideradas inhibidores universales debido a que éstas pueden unirse e inhibir la actividad de cinasa de diferentes complejos formados por las cinasas dependientes de ciclinas CDK2, CDK4 y CDK6.

Fase del ciclo celular	Complejo CDK-Ciclina	INK4				Kip/Cip		
		p15	p16	p18	p19	p21	p27	p57
G1	Ciclina D/CDK4-6	+	+	+	+	+	+	±
G1/S	Ciclina E/CDK2	-	-	-	-	+	±	+
S	Ciclina A/CDK2	-	-	-	-	+	-	+
G2/M	Ciclina B/CDK1	-	-	-	-	+	-	-

Tabla 3: Inhibidores de CDK's. (-) ausente, (+) presente y (±) presente en bajas cantidades durante las fases del ciclo celular indicadas.

d) Puntos de control ó "Checkpoints"

El ciclo celular requiere de la coordinación precisa de una variedad de eventos que van desde la síntesis macromolecular, el ensamble de reguladores y la degradación proteica. El ADN debe ser duplicado, los cromosomas condensados y segregados. El huso mitótico debe ser duplicado y separado para migrar, los cambios en la membrana celular y nuclear deben completar una duplicación correcta (Carnero, 2000).

La progresión del ciclo celular debe ser entonces finamente controlada por la integración de señales positivas y negativas. Dentro de estas últimas están los llamados puntos de control o "Checkpoints" que son puntos de monitoreo y control, formados por vías de trasducción específicas para impedir la progresión del ciclo celular en respuesta al daño genotóxico (Figura 4) (Lowndes, 2000).

El concepto de un punto de control o "Checkpoint" fue introducido por Hartwell, para referirse a los mecanismos celulares envueltos en la fidelidad de

la transmisión genética. Un “checkpoint” de daño al ADN es un mecanismo de vigilancia que evalúa la integridad del genoma. De esta forma, los puntos de control inhiben la progresión del ciclo celular hasta que las anomalías del genoma son reparadas (Hartwell, 1989).

La demora o paro del ciclo celular está frecuentemente mediada por la desregulación de la actividad de las CDK's, que como se mencionó anteriormente son esenciales para la ejecución de la mayoría de los puntos de control (Grana, 1995). Algunos puntos de control conocidos son:

- 1) “START”: integra las señales tempranas intrínsecas y externas en G1 para determinar si la célula puede continuar con otro ciclo de duplicación (Pardee, 1989).
- 2) Punto de control de daño a ADN en G1: la célula se detiene antes de la fase S para permitir la reparación de una lesión potencialmente mutagénica en el ADN (Kaufmann, 1996). La mayoría de los estudios sobre el papel de las oncoproteínas en la progresión del ciclo celular se habían concentrado en los puntos de revisión de START y G1 (Figura 4). Esto fue debido a que en la transformación maligna, se encuentra frecuentemente asociada a la pérdida de los puntos de control de G1, en la cual se involucran mutaciones o alteraciones en la regulación de proteínas esenciales como pRB y E2F, donde este último actúa como un promotor de transcripción necesario para el avance del ciclo. La liberación de E2F se regula por la proteína p21, la cual junto con p27 pueden regular negativamente la función de los heterodímeros CDK's-ciclina's y así poder detener el ciclo celular en la fase S (Kamb, 1995; Martínez, 2001).
- 3) Punto de control de daño en la fase S: previene la iniciación de los replicones posterior al daño a ADN sin interrumpir la síntesis de ADN. Aquí se ha visto involucrada la proteína inhibidora p53, la cual no permite la liberación de los factores de transcripción necesarios para avanzar en la

fase S (Kaufmann, 1996).

- 4) Punto de control de duplicación de ADN (S/M): revisa el estado de duplicación del ADN para evaluar que células no entren a mitosis por una duplicación incompleta de sus cromosomas (Anderson, 1992).
- 5) Punto de control de reparación G2: previene la entrada a mitosis si no se ha reparado el daño a ADN que podría resultar en anomalías de segregación cromosomal durante la mitosis (Kaufmann, 1996). El paro de la fase G2/M ocurre tardíamente y normalmente está asociado a la muerte celular.

Más recientemente se ha concentrado el interés sobre el punto de control de la fase G2/M. Se sabe que la mitosis no avanza sin la completa activación del complejo CDK1-ciclina B. Esta activación requiere de la fosforilación en el residuo tirosina 161 de la CDK1, de la desfosforilación de los residuos de treonina 14 y tirosina 15 la cual es llevada a cabo por Cdc25 (la fosforilación de inhibición de los residuos de treonina 14 y tirosina 15 se lleva a cabo por Wee1) y de que el residuo de treonina 162 de la CDK1 se fosforile por la cinasa CAK (cinasa activadora de CDK) para que el complejo sea completamente funcional.

Se ha visto que p53 también juega un papel muy importante en este punto de control. Por ejemplo, se sabe que p53 bloquea el ciclo celular al inhibir directamente a la CDK1, por tres genes blanco de p53 que son: Gadd45, p21 y 14-3-3 σ (Bunz, 1998; Jin, 2000; peng, 1997). En este punto de control se han encontrado tres nuevas familias de proteínas que son reguladores negativos del complejo CDK1-Ciclina B: Cds1 (Chk2/Rad53), Chk (CHK1 p56) y las proteínas 14-3-3 (Rad 24/Rad25) (Martínez, 2001; Winters, 1998).

Aún quedan varias incógnitas en las vías de señalización que inducen el paro en G2 bajo ciertas circunstancias. Más recientemente se ha empezado a evaluar vías de paro en G2 que son independientes de p53 (Bache, 1999).

JUSTIFICACIÓN

El TNF- α es una citocina pleiotrópica, capaz de producir diferenciación, proliferación y muerte celular programada o "apoptosis". La apoptosis producida por el TNF- α es un mecanismo sincronizado de eventos celulares, los cuales incluyen fragmentación del ADN, activación de caspasas y la generación de estrés oxidativo. A pesar de la amplia literatura sobre la transducción de la señal inducida por el TNF- α , una de las vías de muerte poco estudiada es aquella en la que participa p53. Por una parte, teniendo el antecedente de la generación de estrés oxidativo por TNF- α , y que en este estrés oxidativo podemos encontrar ERO como son: hidróxidos, peróxidos y superóxidos, por otra parte se sabe que las ERO pueden producir daño al ADN, inicialmente produciendo aductos oxidados de las bases. Dicho daño podría conducir a la expresión y activación de supresores tumorales como la proteína p53, y de esta manera interferir con el ciclo celular a través de uno de sus genes blanco como lo es p21, para dar lugar a la reparación de las secuencias con bases (nucleotídeos) dañadas. La falta de un proceso adecuado de reparación aunado a la activación de moléculas efectoras de muerte puede conducir a la ejecución de un programa de muerte por apoptosis.

HIPÓTESIS

La generación de estrés oxidativo producida por el TNF- α está relacionado con el daño al ADN y con la consecuente inhibición de la proliferación que antecede la muerte celular inducida por esta citocina.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el mecanismo mediado por TNF- α responsable de la inhibición de la proliferación que precede a la muerte celular en las líneas de fibroblastos de ratón L929 y de adenocarcinoma mamario humano MCF-7.

Objetivos particulares:

1) Evaluar el efecto citotóxico del TNF- α en células L-929 y MCF-7 a lo largo del tiempo .

a.- Determinar el número de células vivas a través de la exclusión de azul de tripano.

b.- Determinar la viabilidad celular a través de la tinción con cristal violeta

2) Evaluar el estrés oxidativo inducido por el TNF- α en células L929 y MCF-7

a.- Evaluar el estrés oxidativo a través de una trampa de electrones desapareados como es la reducción de MTT (superóxidos)

b.- Evaluar el estrés oxidativo midiendo la fluorescencia emitida por la oxidación del DCF (peróxidos) por citometría de flujo

3) Evaluar inhibición de la proliferación celular en células L929 y MCF-7 tratadas con TNF- α .

a.- Evaluar la incorporación de timidina tritiada antes y después de iniciada la muerte celular

b.- Evaluar por citometría de flujo el contenido de ADN, determinando gráficamente las regiones que pertenecen a las fases del ciclo celular (G1, S y G2 M) y cuantificar el porcentaje de células en cada una de las fases.

4) Evaluar los niveles de la proteína p53 en ambos tipos celulares tratados o no con TNF- α

a.- Evaluar los niveles de expresión del ARNm de p53 a través de ensayos de hibridación tipo "Northern blot".

b.- Evaluar los niveles de proteína de p53 a través de inmunoensayo tipo "Western blot".

5) Evaluar los niveles de la proteína p21 en ambos tipos celulares tratados o no con TNF- α .

a.- Evaluar los niveles de la proteína p21 a través de inmunoensayo tipo "Western blot".

MATERIAL Y MÉTODOS

a) Cultivo celular

Las líneas celulares L-929 y MCF-7 se cultivaron en el medio de cultivo definido MEM y RPMI-1640, respectivamente (GIBCO, USA), suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB, GIBCO), antibióticos (penicilina y estreptomicina) y antimicóticos (anfotericina B) y 2 mM de glutamina (GIBCO, USA). Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire y de humedad saturada.

b) Viabilidad celular

Las células se sembraron a una densidad de 40x10³ células/cm² en una placa de cultivo de 48 pozos un día antes del inicio del experimento. Las células L929 se trataron con 5 ng/ml de TNF- α recombinante murino (R&D Systems, USA) y las células MCF-7 con 10 ng/ml de TNF- α recombinante humano (R&D Systems, USA) por diferentes periodos de tiempo para evaluar la muerte celular. Al término del experimento se retiró el medio de cultivo y las células se fijaron con glutaraldehído al 1.1 % (Merck, Mex) diluído en medio de cultivo suplementado con 2.5% de suero de ternera. Las células fijadas se lavaron con agua corriente y se secaron a temperatura ambiente. Las células fijadas se tiñeron con solución de cristal violeta (ver apéndice A) por 1 h con agitación constante, se retiró el cristal violeta y las células se lavaron con agua corriente y se dejaron secar a temperatura ambiente. El cristal violeta se disolvió con ácido acético al 10% (Baker, Mex). Se midió la densidad óptica en un lector de placas de ELISA a una longitud de 595 nm.

Por otra parte, para evaluar el número de células vivas, éstas se despegaron de los pozos al finalizar el experimento con 100 μ l de una solución de tripsina (SIGMA, USA) al 0.1% en verseno (ver apéndice B). Después de 5 min de incubación se neutralizó la tripsina con un volúmen igual de medio de cultivo suplementado con 10% de SFB. Se tomaron 50 μ l de células en suspensión y se diluyó con un volumen similar de azul de tripano (SIGMA, USA) al 0.4% en

solución amortiguadora de fosfatos (ver apéndice C). Las células se contaron en un hemocitómetro, y se reportaron las células que excluyen el azul de tripano.

c) Ensayo de estrés oxidativo

Reducción de MTT: Las células se incubaron con medio de cultivo suplementado con 10% de SFB y con MTT (200 $\mu\text{g/ml}$) por 4 h. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo. Las placas se secaron a temperatura ambiente y la sal de formazán precipitada se disolvió en isopropanol acidificado (HCl 0.2 mM) en agitación constante y una vez disuelto se agregó un volumen similar de PBS. La cantidad de sal de formazán disuelta se evaluó midiendo la densidad óptica en un lector de placas de ELISA a una longitud de 570 nm (Mosmann, 1983).

Oxidación de $\text{H}_2\text{DCF-DA}$: Al término del experimento las células se despegaron con una solución de tripsina/verseno y se centrifugaron a 1500 rpm, se eliminó el sobrenadante y se lavaron con 1 ml PBS para volver a centrifugar otra vez. Las células se resuspendieron en 1 ml de PBS y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min con diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) a una concentración final de 8 μM , las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 1 ml de PBS. Al final de esta incubación la fluorescencia de las células se evaluó en un citómetro de flujo (FACScalibur, Becton Dickinson). Se evaluaron 1×10^4 eventos por cada ensayo. La adquisición y el análisis de los datos se realizaron con el programa CellQuest en el canal de emisión de 530 nm (FL1-H).

d) Ensayo de incorporación de timidina tritiada

Las células se pulsaron con medio de cultivo suplementado con 10% de SFB y 1 $\mu\text{Ci/ml}$ de timidina tritiada [^3H](NEN, USA) por 4h. Al terminar esta incubación se retiró el medio de cultivo para posteriormente lavar con PBS. Las células se fijaron con metanol (Baker, Mex) al 95% en PBS, se retiró el metanol para volver a lavar con PBS, tanto la fijación como el lavado se llevaron a cabo a 4 °C. Las

células fijadas se trataron con una solución de NaOH (SIGMA, USA) al 0.2 N y se incubó por 24 h a 37 °C en atmósfera de humedad saturante. El hidrolizado se mezcló con 3 ml de líquido de centelleo y se registraron las cuentas por minuto (CPM) en un contador de centelleo para emisiones beta (Beckman).

e) Ciclo celular

Las células se sembraron en cajas petri de 60 mm de diámetro (27 cm²) a una densidad celular de 20x10³ células/cm². Al siguiente día se trataron con TNF- α por diferentes periodos de tiempo, al término del experimento las células se despegaron con una solución de tripsina al 0.1% en verseno, y se centrifugaron por 5 min a 1000 rpm. Las células se lavaron con PBS por una sola ocasión y se centrifugaron una vez más. Posteriormente, las células fueron tratadas según el procedimiento del estuche Cycletest™ (Becton Dickinson) para extraer los núcleos de las células y teñir su ADN con yoduro de propidio (IP) (apendice D). El contenido de ADN de los núcleos se evaluó por citometría de flujo en el programa CellQuest (Becton Dickinson). Se colectaron 2x10⁴ eventos por ocasión, y el análisis de la intensidad de fluorescencia del IP fue determinado en el canal de emisión de 585 nm (FL2-A).

f) Extracción de plásmidos

Se cultivaron bacterias E. coli de la cepa DH5- α transformadas con el plásmido pCMV-p53 donado por el Dr. Bert Vogelstein (John Hopkins Oncology Center) en medio de cultivo LB (triptona 10 g, extracto de levadura 5 g y cloruro de sodio 5 g por litro) suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina (Sigma, USA) durante 14 h. La extracción y purificación de ADN plasmídico se realizó con el paquete Maxiprep de Quiagen (Quiagen, USA). La construcción tiene 8.4 Kpb y se realizó una restricción con la enzima BamH1 para liberar el inserto de 1.8 Kpb que corresponde al cADN de p53 el cual fue utilizado como sonda en ensayos de "Northern blot" para identificar las especies de ARNm de p53.

g) Northern blot

El ARN total de células tratadas con TNF- α o control se extrajo por el método de

Chomczynski y Sacchi (Chomczynski, 1987) empleando isotiocianato de guanidinio y fenol, para tal proceso utilizamos la solución comercial Tripure® (ROCHE, Alemania), siguiendo el procedimiento sugerido por la compañía (Apéndice E). El ARN total se separó en geles desnaturalizantes de agarosa al 1.2 % en presencia de formaldehído. La electroforesis se llevó a cabo por 3 h en solución amortiguadora de MOPS (Apéndice F) en una cámara horizontal de electroforesis (Hoffer HE33). Al término de la corrida los geles se lavaron por 1 h con agua desionizada. El ARN separado en los geles se transfirió a una membrana de Nylon embebida con nitrocelulosa (MCI, USA) con poro de 0.2 μm por la técnica de capilaridad (Ausubel, 1994). El ARN se unió covalentemente a la membrana con luz ultravioleta en un equipo “crosslinker” (Stratagene, USA). Las membranas se bloquearon con la solución de hibridación (ver apéndice F) durante 6 h a 42 °C y posteriormente se agregó la sonda del cADN de p53 marcada radiactivamente con $[\alpha^{32}\text{P}]$ dCTP a través del estuche de reparación al azar (random primers DNA labelling system, GIBCO-BRL, USA). El ARN separado se hibridó por 48 h a 42 °C, al término del cual se lavaron las membranas 2 veces con una solución de SCC al 2X (ver apéndice F) conteniendo SDS al 0.1% por 15 min, y posteriormente se lavaron 2 veces más con SCC 0.2X conteniendo SDS al 0.1% durante 15 min. La señal obtenida fue revelada por exposición con pantalla de flúor, y posteriormente fue evaluada en un equipo fosforimager STORM (Molecular Dynamic, USA) en el programa Imagequant de la misma casa comercial. Las membranas se rehibridaron con cADN de GAPDH para normalizar el cargado de las muestras.

h) Western blot

Proteína p53: Al término del experimento las células se lavaron 2 veces con PBS, y se lisaron en un amortiguador de lisis (ver apéndice G) conteniendo inhibidores de proteasas 10 $\mu\text{g/ml}$ de leupeptina, 10 $\mu\text{g/ml}$ de aprotinina y 1 mM de PMSF (SIGMA, USA). Las células se rasparon con un gendarme y se centrifugaron a 14000 rpm en una microcentrífuga eppendorf durante 15 min a

4 °C, y el sobrenadante se almacenó a -20 °C hasta el momento de su uso. Las proteínas (100 µg) obtenidas fueron separadas en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE al 10%) (Laemmli, 1970). Las proteínas separadas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa (MSI, USA) según el método empleado por Towbin (Towbin, 1979). Las membranas se bloquearon por 1 h con TBS-Tween 0.1% conteniendo 5% de leche descremada (Svelty de Nestle). Las membranas se incubaron durante 1.5 h con anticuerpos específicos contra la proteína p53 (dilución 1:500) (Roche, Alemania), el cual está conjugado con peroxidasa de rabano (HRP), y se lavaron 3 veces durante 15 min por ocasión con TBS-Tween-leche. Las proteínas se evidenciaron mediante el reactivo Supersignal (Pierce, GB) el cual proporcionó un sustrato para la peroxidasa y luminol para producir quimioluminiscencia, y un estabilizador para prolongar la emisión de luz. La quimioluminiscencia se evidenció en una película Kodak sensible al azul, la cual es especial para este tipo de emisión.

Proteína p21: Para el análisis de expresión de la proteína p21 por "Western blot", se obtuvieron las proteínas de forma similar a las de p53, y las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 13%, transferidas a membrana de nitrocelulosa y bloqueadas de igual manera. Las membranas se incubaron durante 2 h con anticuerpos específicos contra la proteína p21 (dilución 1:100) (Santa Cruz, USA), al término las membranas se lavaron 2 veces por 10 min seguidas por 3 veces de 5 min en TBS-Tween 0.1% conteniendo 5% de leche descremada. Las membranas se incubaron adicionalmente por 1 h con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (HRP) (Pierce, UK), al término de la incubación las membranas se lavaron de igual manera que el anticuerpo primario y se revelaron de la misma manera que el protocolo para p53.

Proteína actina: Para normalizar el cargado de las proteínas p53 y p21 se evaluaron los niveles de actina presentes en los extractos proteicos, utilizando la misma cantidad de proteína total. Se utilizó un anticuerpo anti-actina, el cual

reconoce a todas las subunidades (dilución 1:10000), donado por el Dr. Manuel Hernández del CINVESTAV-IPN (Hernández, 1989), las condiciones del “Western blot” fueron similares como en la evaluación de p21, se utilizó el mismo anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (dilución 1:10000).

i) Análisis estadístico

Cada experimento fue realizado por triplicado y como mínimo fueron evaluados 3 experimentos independientes. En los ensayos tipo “Northern blot”, “Western blot” y citometrías de flujo se realizaron 2 experimentos independientes, y solo se muestra una figura representativa. Se realizaron promedios de los datos obtenidos y se presenta su desviación estandar en las gráficas de barras (+/-). En los datos de normalización de reducción de MTT e incorporación de timidina por célula viable, se tomaron los datos independientes de viabilidad para cada tratamiento, por lo tanto, resulta de la división del dato promedio en porcentaje de MTT o de incorporación de timidina entre el porcentaje de viabilidad.

RESULTADOS

a) Efecto citotóxico de TNF- α

Los resultados obtenidos se centran sobre el efecto del TNF- α en las líneas L929 y MCF-7, como ya se ha dicho, estas líneas celulares son muy sensibles al efecto citotóxico del TNF- α . En la figura 7A se muestra que la viabilidad de las células L929 después de 24 h de tratamiento con TNF- α disminuyó 85% con respecto al control y en la figura 7B se muestra que la incorporación de timidina-[3 H] disminuyó sólo 45% con respecto al control. En las figuras 8A y 8B se muestra el efecto de TNF- α sobre la viabilidad celular que cayó en un 70% y sobre la incorporación de timidina-[3 H] en células MCF-7 que tuvo el mismo valor con y sin tratamiento con TNF- α . El conjunto de gráficos muestra una marcada reducción en el número de células de ambas líneas celulares después de 24 h (L929) y 72 h (MCF-7) de tratamiento con TNF- α (figura 7A y 8A). La observación al microscopio mostró que en ambas líneas celulares se redujeron considerablemente las figuras mitóticas (datos no presentados). Por otro lado, también se observaron cambios morfológicos característicos de la muerte celular en ambas líneas, como la retracción de las prolongaciones celulares y la aparición de un cuerpo celular más redondeado, así como células despegadas y detritus celular. Todo esto parece indicar que las células dejan de proliferar y que paralelamente se inicia un proceso de muerte.

Por otra parte, cuando cultivos paralelos de células se incubaron con timidina-[3 H], la incorporación de ésta (evaluada en cuentas por minuto, CPM) al ADN en células tratadas con TNF- α cayó, pero no en la proporción en la que disminuyó el número de células viables evaluadas en paralelo (panel "B" de las figuras 7 y 8).

Al evaluar la viabilidad celular con un ensayo basado en la reducción de MTT en células L929 y MCF-7 los resultados observados tampoco coincidieron con el número de células viables observadas en cultivos paralelos control o tratados con TNF- α . En el caso de las células L929 la reducción de MTT aumentó 4.2 veces

después de 24 h de tratamiento con TNF- α (figura 7C), mientras que el número celular cayó en un 85% (figura 7A). En las células MCF-7 el tratamiento produjo un aumento de 3.1 veces en la reducción de MTT (figura 8C) comparado con una disminución en el número de células de 70% (figura 8A).

Claramente existe una discrepancia entre el número de células y la reducción de MTT. Con el propósito de establecer una relación entre las células vivas al momento del análisis y la reducción de MTT se normalizaron los resultados para expresar la reducción de MTT por célula viable. Cabe mencionar que la reducción de MTT fue inicialmente introducida por Mossman (Mossman, 1981) como un ensayo para evaluar proliferación celular en sobrenadantes de cultivos de células (medios condicionados) que poseían actividad de factor de crecimiento (citocinas con actividad proliferadora). El MTT acepta electrones derivados del metabolismo aeróbico de las células y forma una sal insoluble de formazán. Por lo tanto, la medida de la reducción de MTT también puede verse como un índice de estrés oxidativo (Gómez, 1996). Las figuras 7C y 8C muestran como este índice de estrés oxidativo se incrementa considerablemente en células tratadas con TNF- α en ambas líneas celulares, 4.2 veces para células L929 y 3.1 veces para las células MCF-7.

En principio, la incorporación de timidina-[^3H] tampoco puede ser correlacionada con el número de células observadas. Por tanto, también pensamos que la manera más adecuada para expresar estos datos es normalizarlos como incorporación de timidina-[^3H] por célula viable. El significado del incremento en la incorporación de timidina-[^3H] en células tratadas con TNF- α podría reflejar una actividad de reparación del ADN. En las figuras 7D y 8D podemos observar que la incorporación de timidina-[^3H] por célula tratada con TNF- α se incrementa considerablemente, 4.1 veces para las células L929 y 3.3 veces para las células MCF-7. Este incremento en la incorporación normalizada de timidina-[^3H] se correlaciona con el incremento de la reducción de MTT, 4.2 veces para células L929 y 3.1 veces para las células

MCF-7 (figuras 7C y 8C)

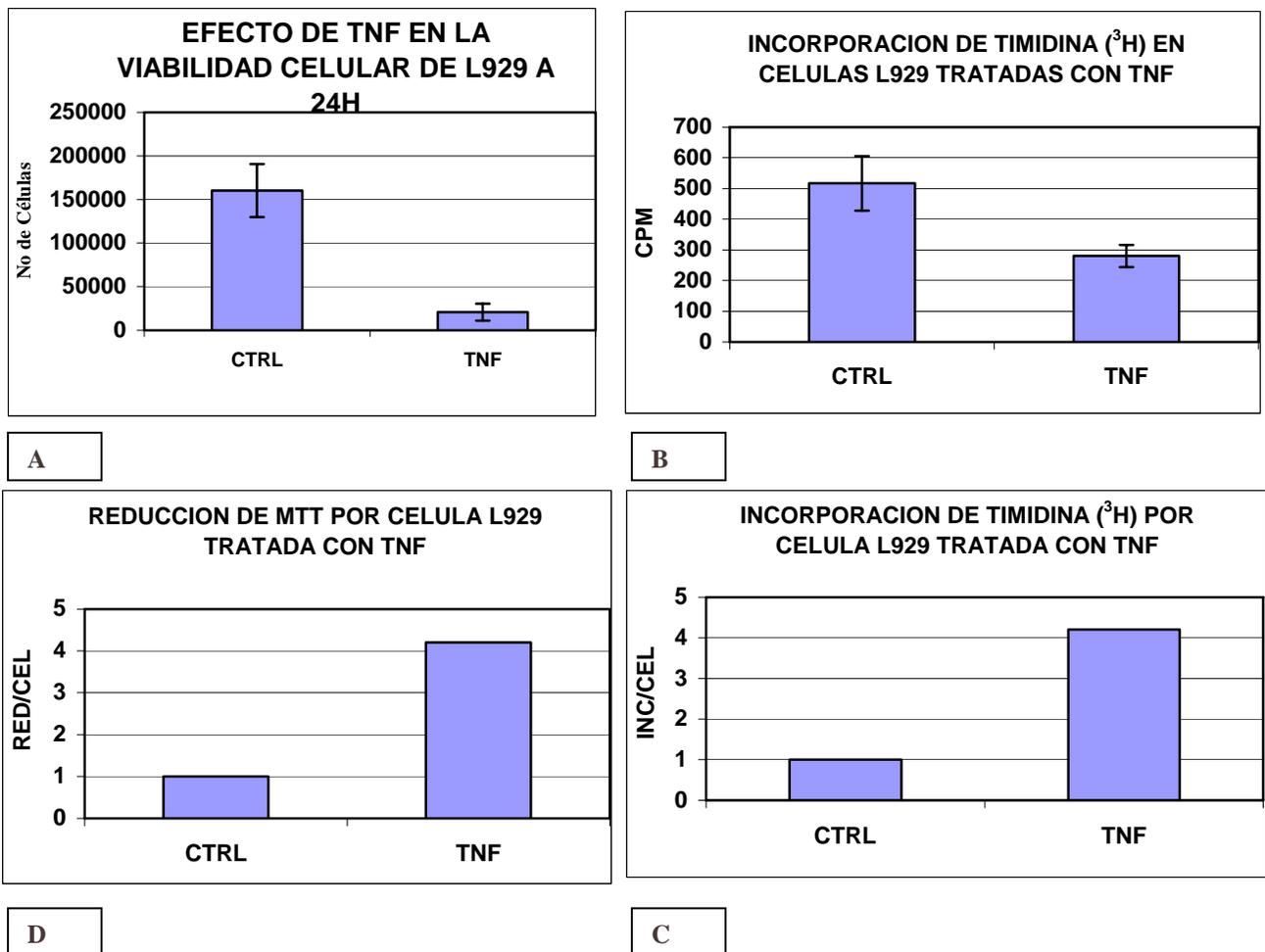


Figura 7: Efecto de TNF en células L929 después de 24 h de tratamiento. A) número de células viables, B) incorporación de timidina-^{[3}H], C) incorporación de timidina-^{[3}H] por célula viable, D) reducción de MTT por célula viable. En las gráficas A y B se presenta la desviación estandar de un experimento representativo realizado por triplicado, y en las gráficas C y D se presenta un índice de normalización entre la incorporación de timidina por célula viable, así como la reducción de MTT por célula viable, respectivamente. INC/CEL: valor normalizado de la incorporación de timidina-^{[3}H] por célula viable. RED/CEL: valor normalizado de la reducción de MTT por número de células viables.

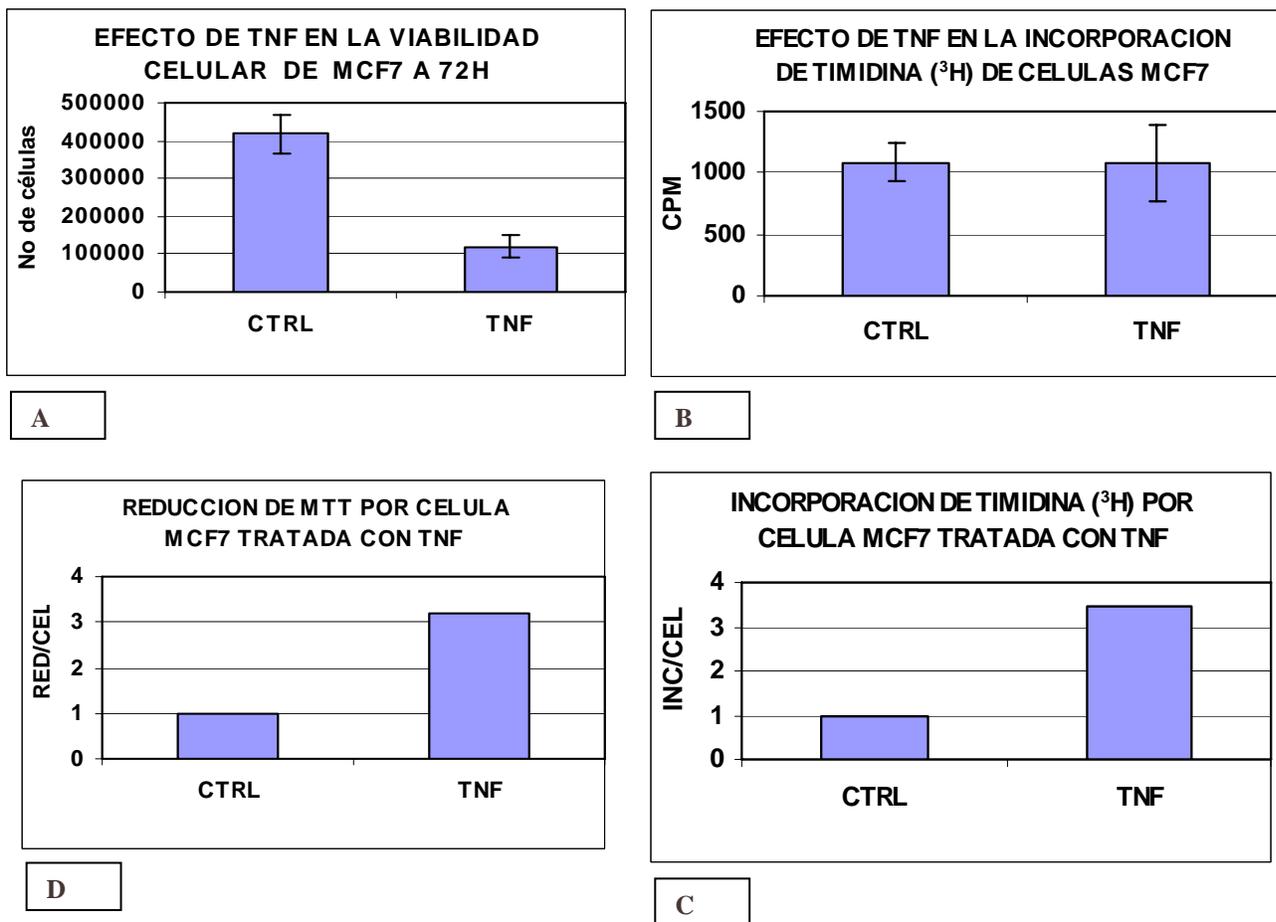
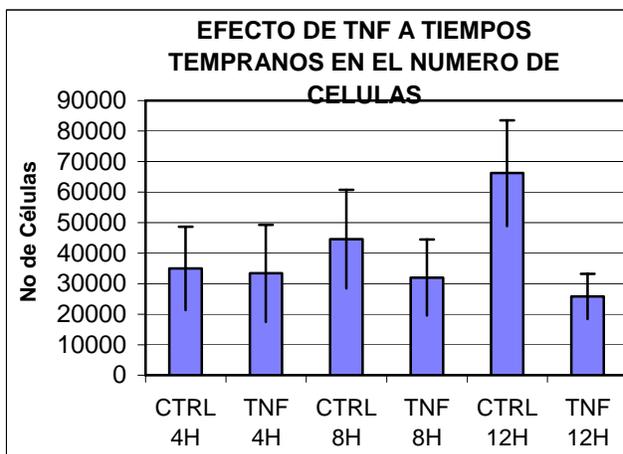


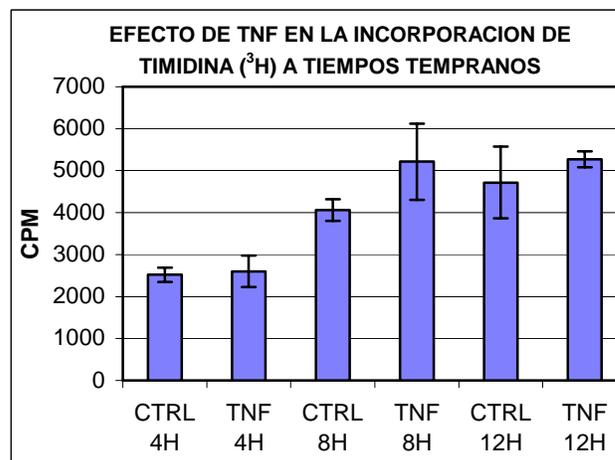
Figura 8: Efecto de TNF en células MCF-7 después de 72 h de tratamiento, A) viabilidad celular, B) Incorporación de timidina-[³H], C) Incorporación de timidina-[³H] por célula tratada, D) reducción de MTT por célula tratada. En las gráficas A y B se presenta la desviación estandar de un experimento representativo realizado por triplicado, y en las gráficas C y D se presenta un índice de normalización de la incorporación de timidina por célula viable, así como la reducción de MTT por célula viable, respectivamente. INC/CEL: valor normalizado de la incorporación de timidina-[³H] por célula viable. RED/CEL: valor normalizado de la reducción de MTT por número de células viables.

b) Efecto de TNF- α a tiempos tempranos

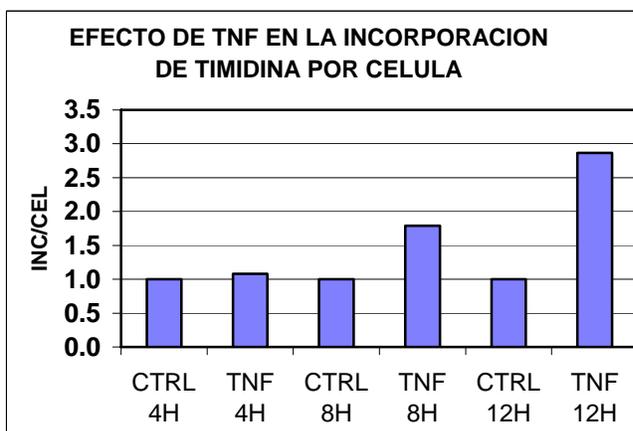
Para determinar el efecto del TNF- α en ventanas de tiempo donde no se observa muerte celular realizamos un curso temporal el cual incluyó tiempos de 4, 8 y 12 h de tratamiento en la línea celular L929. En la figura 9A se observa que mientras que las células control proliferan a lo largo de 12 h, las células tratadas no lo hacen. La diferencia en número celular se observó a partir de 8 h de tratamiento, la cual corresponde a un 25%, y a partir de 12 h de tratamiento se encontró una diferencia del 60% con respecto al cultivo control, además es a partir de este tiempo que las células tratadas empiezan a perder su viabilidad, evaluadas por exclusión de azul de tripano. Cuando se evaluó la incorporación de timidina-[³H] en estas células se observó que las CPM de las células tratadas con TNF- α se incrementan igual o más que las células control (figura 9B). Por otro lado, para representar el fenómeno de incremento de incorporación de timidina-[³H] en células tratadas con TNF- α se expresó como veces de incorporación de timidina-[³H] por célula viable (como en las figuras 7D y 8D). En la figura 9C se muestra que la incorporación de timidina-[³H] por célula viable se incrementa considerablemente desde las 8 h de tratamiento (1.8 veces), y alcanza un nivel máximo a las 12 h (2.9 veces).



A



B

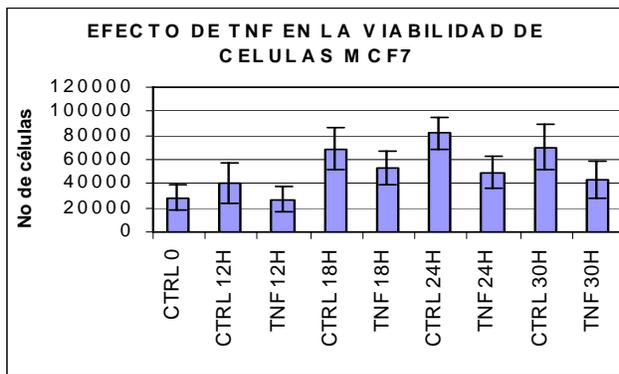


C

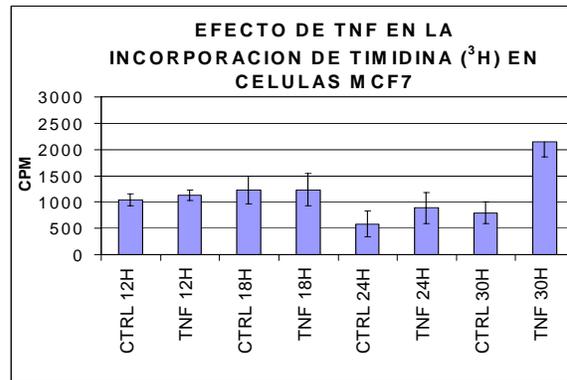
Figura 9: Efecto de TNF en células L929 tratadas por periodos cortos. A) viabilidad celular, B) incorporación de timidina- $[^3\text{H}]$, C) incorporación de timidina- $[^3\text{H}]$ (INC) por célula tratada. En células control (CTRL) o tratadas con TNF (5 ng/ml) por las horas indicadas (H). En las gráficas A y B se presenta la desviación estándar de un experimento representativo realizado por triplicado, y en la gráfica C se presenta un índice de normalización entre la incorporación de timidina por célula viable, respectivamente. INC/Cel: valor normalizado de incorporación de timidina- $[^3\text{H}]$ por célula viable.

Para las células MCF-7 se realizó un curso temporal a intervalos de tiempo de 6 h, iniciando desde 12 h hasta 30 h. El curso temporal fue distinto para las células L929, porque en la línea celular MCF-7 la muerte se inicia después de 24 h, sugiriendo que todo el proceso es más lento. Como se muestra en la figura 10A las células tratadas con TNF- α completan por lo menos un ciclo celular que iniciaron posiblemente antes de la adición de TNF- α , ya que para las 18 h de tratamiento el número celular se duplica. A partir de las 18 h de tratamiento las células dejan de proliferar, observándose daño celular considerable a partir de las 30 h en la cual la diferencia es de 40%. En contraste, la incorporación de timidina-[3 H] es constante tanto en células control como en células tratadas hasta las 24 h. Posteriormente, se observó un incremento considerable en la incorporación de timidina-[3 H] en células tratadas por 30 h (casi 100%)(figura 10B). La incorporación de timidina-[3 H] por célula viable tratada con TNF- α se incrementó considerablemente en células MCF-7 a partir de las 24 h de tratamiento (2.5 veces) con un incremento máximo a las 30 h que casi triplicó el valor del control (4.5 veces)(figura 10C).

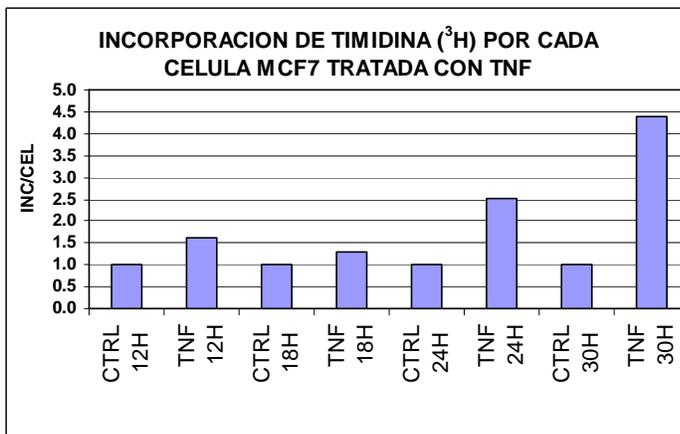
En las figuras 11 y 12 mostramos las fotografías de los tiempos de tratamiento con TNF- α en células L929 (figura 11) y en células MCF-7 (figura 12). Como se observa, es a partir de las 12 h de tratamiento con TNF- α en células L929 cuando se puede apreciar una diferencia visible en la densidad celular, la cual también refleja la aparición de células con características de daño, como la retracción de las prolongaciones celulares y la aparición de un cuerpo celular más redondeado, así como células despegadas y un poco de detritus celular. En células MCF-7 se puede observar una diferencia de densidad celular hasta las 24 h de tratamiento, y esta diferencia es más pronunciada 6 h después (30 h).



A



B



C

Figura 10: Efecto de TNF en células MCF-7 tratadas con TNF por periodos cortos, A) viabilidad celular, B) Incorporación de timidina-^{[3}H], C) Incorporación de timidina-^{[3}H] por célula tratada. En células control (CTRL) o tratadas con TNF por los tiempos indicados en horas (H). En las gráficas A y B se presenta la desviación estándar de un experimento representativo realizado por triplicado, y en la gráfica C se presenta un índice de normalización entre la incorporación de timidina por célula viable. INC/CEL: valor normalizado de incorporación de timidina-^{[3}H] por célula viable.

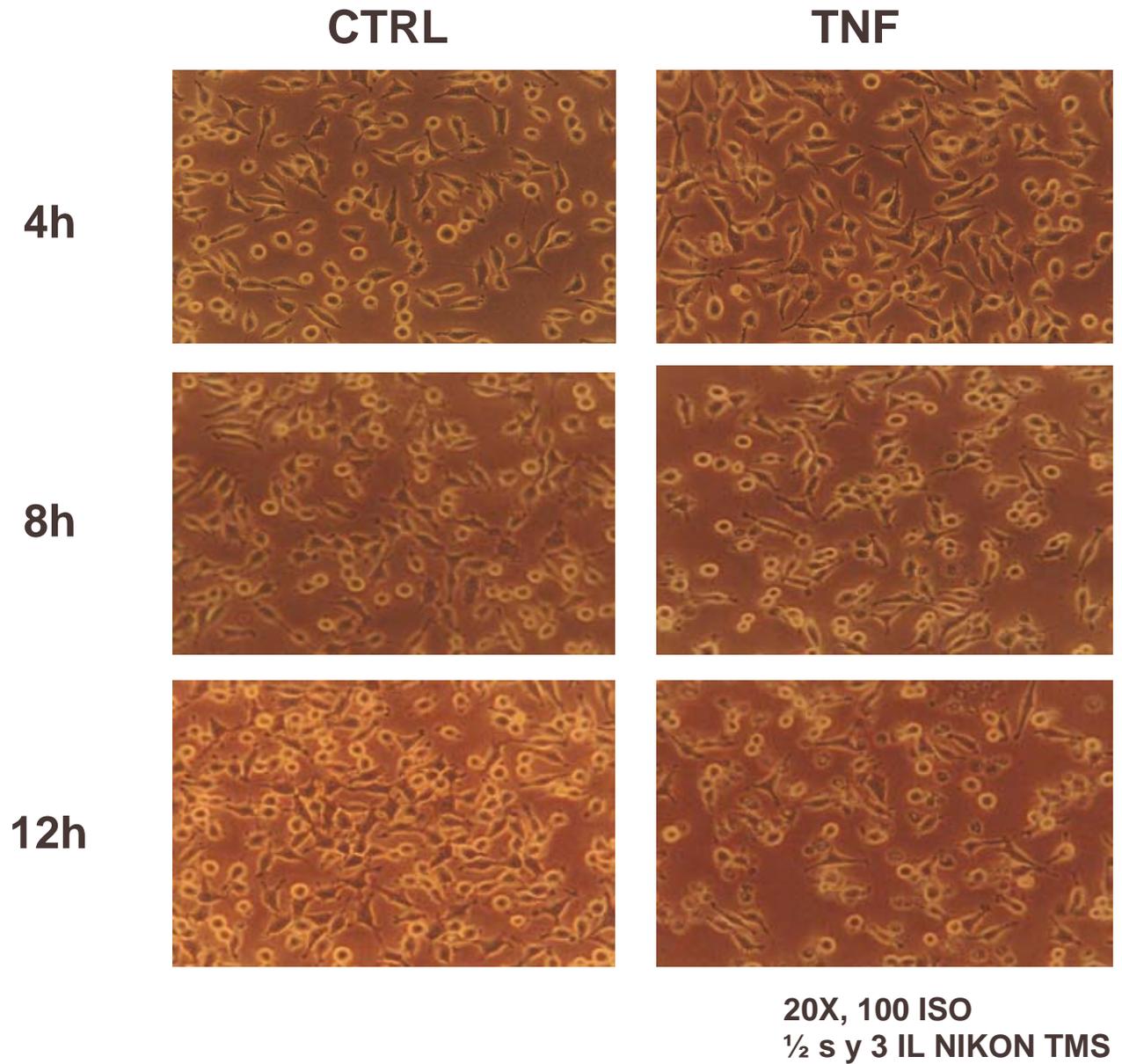
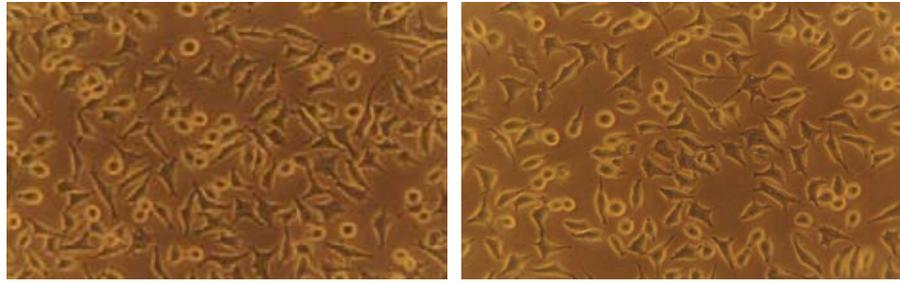
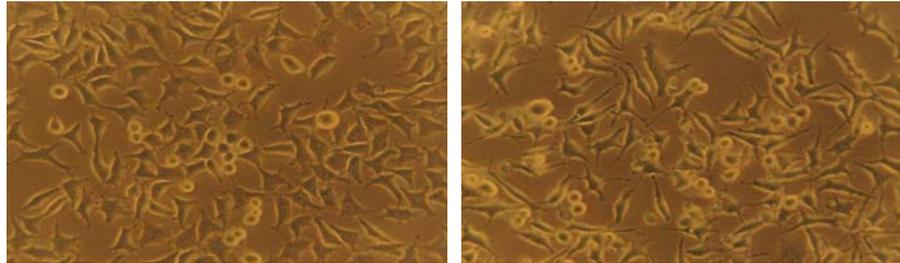


Figura 11: Células L929 tratadas por 4, 8 y 12 h con TNF. El panel de la izquierda: micrografías de cultivos control (CTRL), panel de la derecha: micrografías de cultivos tratados con TNF.

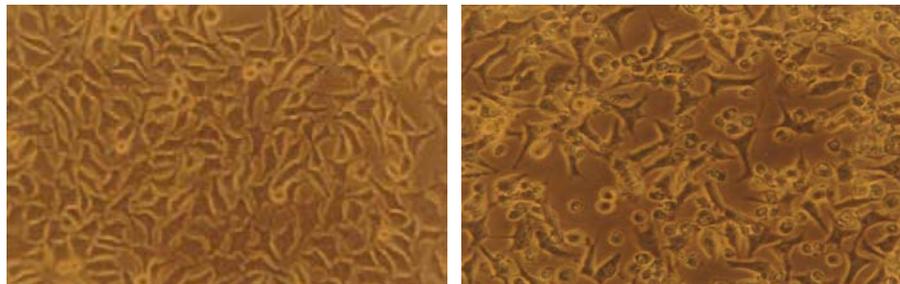
12 h



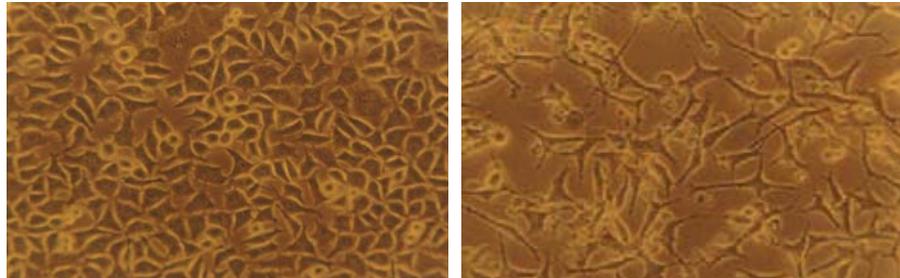
18 h



24 h



30 h



**20X, 100 ISO
1/2 s Y 3 IL
NIKON TMS**

Figura 12: Células MCF-7 tratadas por 12, 18, 24 y 30 h. El panel de la izquierda: micrografías de cultivos control (CTRL), panel de la derecha: micrografías de cultivos tratados con TNF.

c) Análisis de expresión de ARNm y proteína de p53

Se sabe que p53 es una proteína que se expresa cuando se expone a las células frente a un agente que produce daño al ADN. El TNF- α se ha descrito como una citocina que induce estrés oxidativo y fragmentación del ADN cuando se lleva a cabo apoptosis. En células L929 y MCF-7 aún no se ha determinado si este estrés oxidativo es una señal primaria en la inducción de apoptosis o si bien forma parte de la ejecución de la muerte de la célula. El mecanismo responsable del incremento en estrés oxidativo todavía no se ha esclarecido. Sabiendo que el TNF puede inducir estrés oxidativo hipotetizamos que podría haber daño al ADN, sugerida hasta este momento por el incremento en la incorporación de timidina-[^3H] en células tratadas. De ser así, debería de haber un incremento en los niveles de expresión del ARN mensajero y de la proteína de p53 en células tratadas con TNF- α . Cuando evaluamos los niveles de ARNm de p53 a través de "northern blot" en células L929 tratadas con TNF- α observamos un incremento de casi 3 veces a las 4 h (2.9 veces) con respecto al basal encontrado en las células sin tratamiento, este incremento permaneció al mismo nivel hasta las 8 h (2.5 veces), incluso a las 12 h se mantiene casi al doble (1.9 veces)(figura 13A). El incremento observado en los niveles de ARNm correlaciona con el incremento en los niveles de expresión de la proteína p53 evaluada por "Western blot" a los mismo tiempos de tratamiento, encontrando que a las 4 h se detecta un ligero incremento (1.5 veces), y a las 8 h los niveles de proteína se eleva por arriba de 3 veces (3.2 veces)(figura 13B). En células MCF-7 los niveles de expresión de ARNm de p53 también se incrementan en células tratadas con TNF- α , y el mayor incremento en los niveles de ARNm de p53 se observó a las 12 h (4.5 veces), este incremento permaneció hasta 12 h después, 2.3 veces para 18 h y 1.9 para 24 h (figura 14A). El incremento de los niveles de mensajero para p53 en células MCF-7 correlaciona con un incremento en los niveles de la proteína, sobre todo a las 12 h de tratamiento (2.7 veces)(figura 14B).

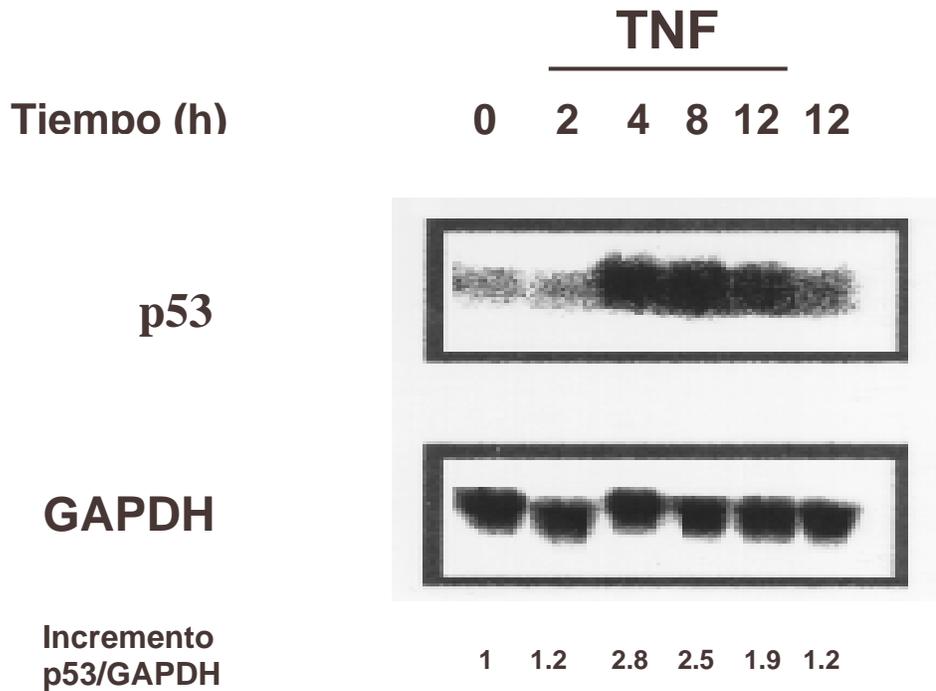


Figura 13A: Impresión de p53 revelada por pantalla de flúor en un equipo STORM. El ARN total se aisló a los tiempos indicados (h) después de tratar a las células L929 con 5 ng/ml de TNF. La misma membrana fue hibridada primero con una sonda de p53 radiactiva, y después de lavar la membrana se rehibridó con una sonda de GAPDH radiactiva, como se indica en materiales y métodos. Los números reflejan la normalización de la señal de p53 con respecto a la señal de GAPDH.

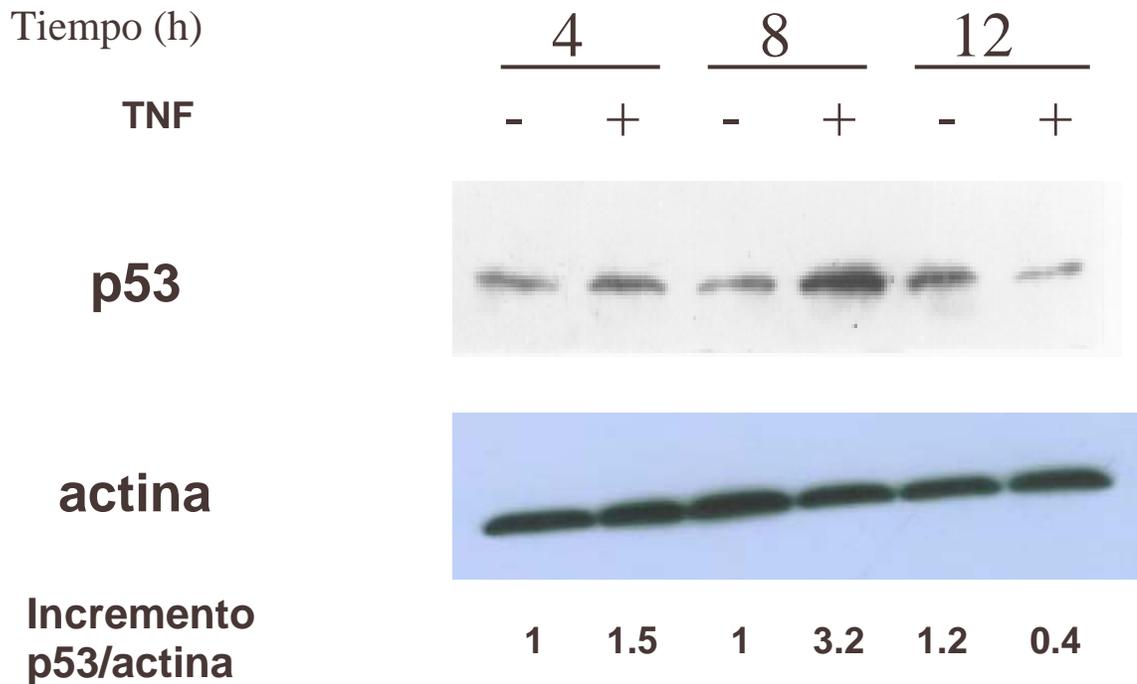


Figura 13B: Autoradiograma revelado por quimioluminiscencia de un inmuno ensayo tipo "Western Blot" de p53. En cada pozo se cargaron 100 µg proteína total obtenido después de 4, 8 y 12 h de tratamiento de células L929 con TNF. Como control de cargado se presenta una exposición de actina total en un gel cargado con la misma cantidad de proteína. Los números representan la normalización por densitometría de p53 entre actina.

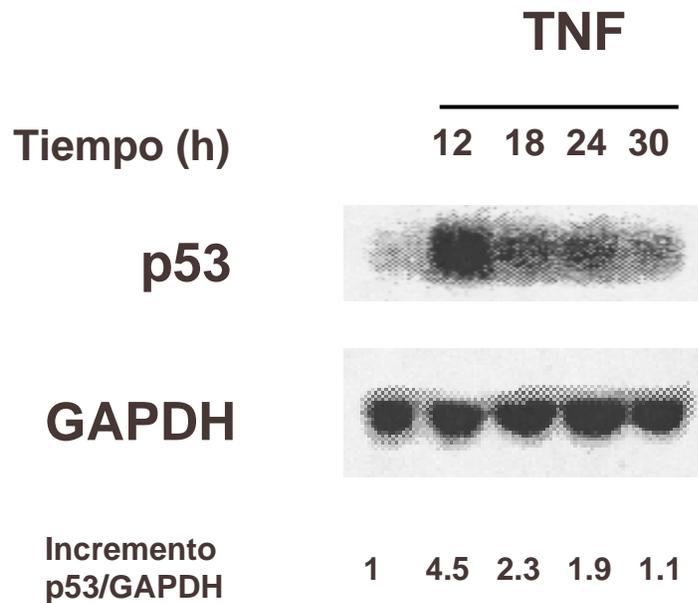


Figura 14A: Impresión de p53 revelada por pantalla de flúor en un equipo STORM. El ARN total se aisló a los tiempos indicados (h) después de tratar a las células MCF-7 con 10ng/ml de TNF. La misma membrana fue hibridada primero con una sonda de p53 radiactiva, y después de lavar la membrana se rehibridó con una sonda de GAPDH radiactiva, como se indica en materiales y métodos. Los números reflejan la normalización de la señal de p53 con respecto a la señal de GAPDH.

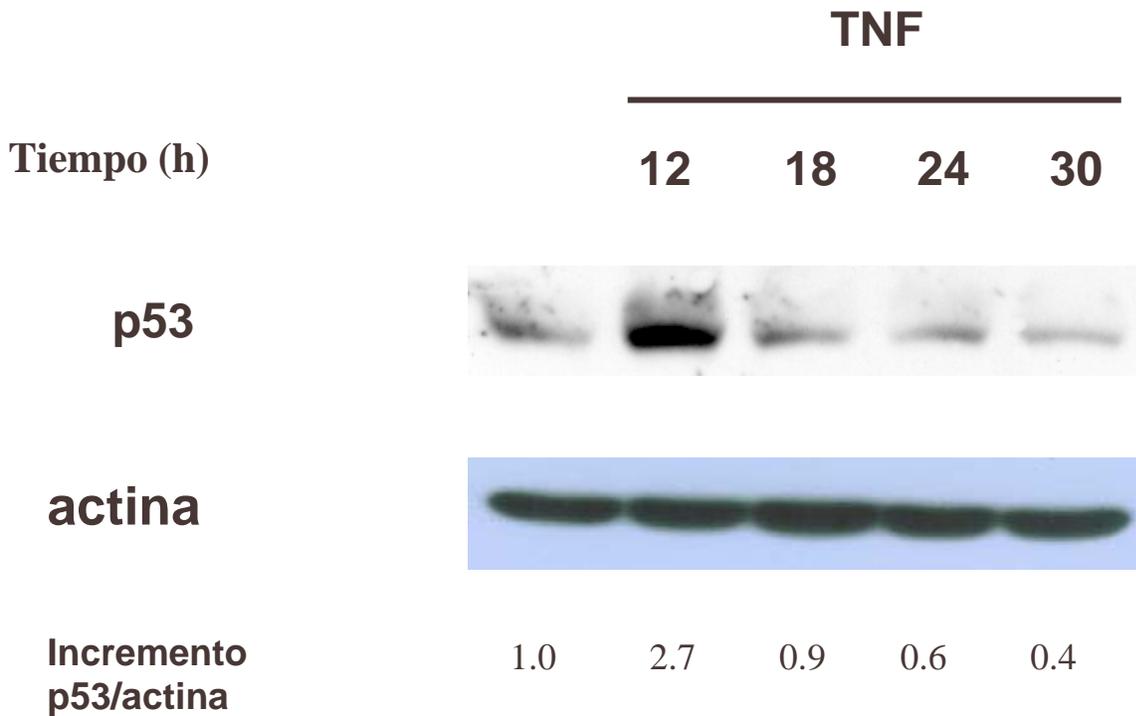


Figura 14B: Autoradiograma revelado por quimioluminiscencia de un inmuno ensayo tipo "Western Blot". En cada pozo se cargaron 100 μ g proteína total obtenido después de 12, 18, 24 y 30 h de tratamiento de células MCF-7 con TNF. Como control de cargado se presenta una exposición de actina total en un gel cargado con la misma cantidad de proteína. Los números representan la normalización por densitometría de p53 entre actina.

d) Análisis de la expresión de la proteína p21

El mecanismo por el cual p53 bloquea el ciclo celular es a través de promover la expresión uno de sus genes blanco, p21. Por lo tanto, debido a los resultados obtenidos por la viabilidad celular por exclusión de azul de tripano en células tratadas con TNF- α , y al incremento de los niveles de p53 en ARNm y proteína, se esperaba que las células tratadas con TNF- α presentaran un incremento de los niveles de proteína de p21. Cuando evaluamos los niveles de proteína por inmunoensayos tipo "Western Blot" se encontró que en células L929 tratadas con TNF- α los niveles se incrementan poco a las 4 h (1.9 veces). A las 8 y 12 h los niveles decrecen considerablemente con respecto a los niveles basales (figura 15A). Por otro lado, cuando evaluamos los niveles de proteína de p21 en células MCF-7, observamos que se incrementan de forma importante después de 12 h de tratamiento con TNF- α (3 veces), y que este incremento prevalece por 12 horas más (tiempos 18 y 24 h). Sin embargo, después de 30 h de tratamiento la proteína p21 disminuye por debajo de su nivel basal (figura 15B).

e) Análisis del ciclo celular

Es evidente que las células tratadas con TNF- α no están incrementando su número, a pesar de una mayor incorporación de timidina-[3 H] por una parte, la cual se puede explicar por reparación. Por otra parte, el incremento en los niveles de p21 en las células L929 a las 4 y 8 no guarda relación con el incremento en expresión de p53 que ocurre 8 h después de tratamiento. Esto indica que otra u otras proteínas con capacidad inhibitoria estarían actuando en el arresto del ciclo celular. Cuando evaluamos la distribución de las células tratadas con TNF- α en las diferentes fases del ciclo celular observamos que la

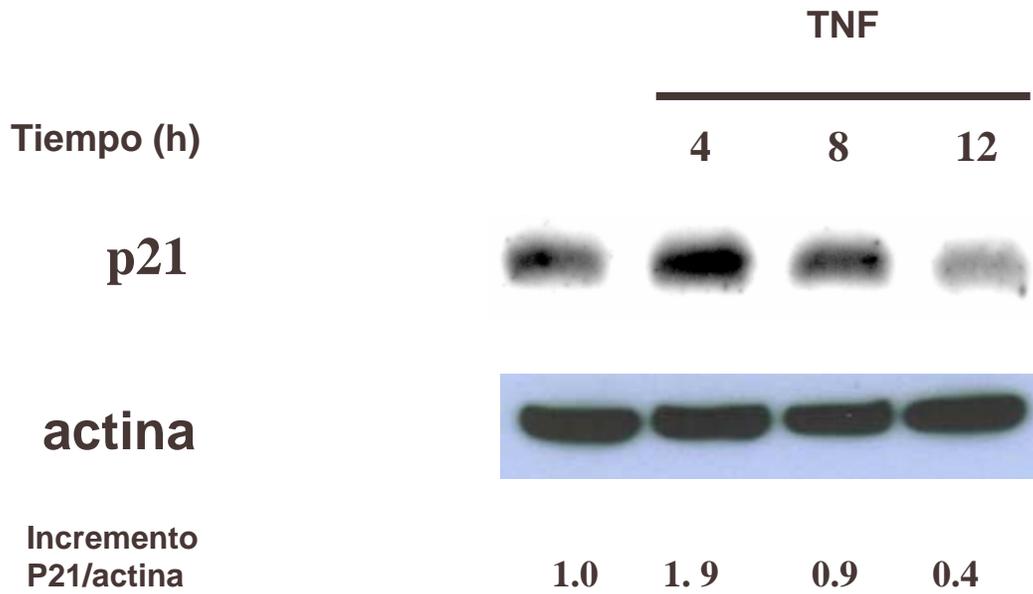


Figura 15A: Autooradiograma revelado por quimioluminiscencia de un inmuno ensayo tipo “Western Blot” de p21 en células L929. En cada pozo se cargaron 100 µg proteína total obtenida después de 4, 8, 12 h de tratamiento de células L929 con TNF. Como control de cargado se presenta una exposición de actina total en un gel cargado con la misma cantidad de proteína. Los números representan la normalización por densitometría de p21 entre actina.

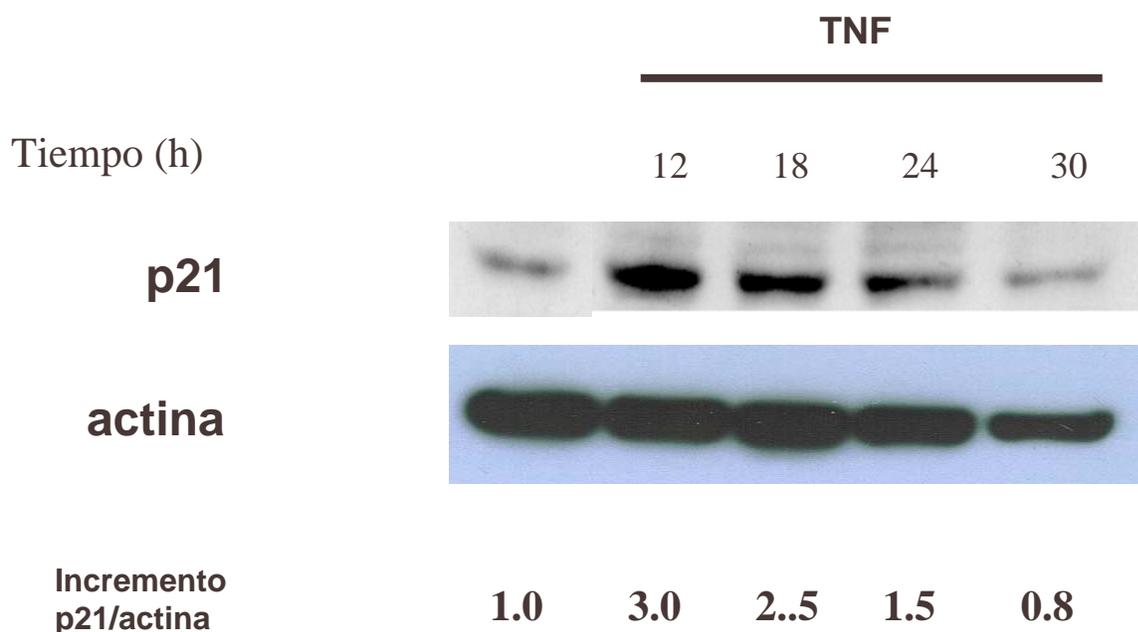


Figura 15B: Autoradiograma revelado por quimioluminiscencia de un inmuno ensayo tipo "Western Blot" de p21 en células MCF-7. En cada pozo se cargaron 100 µg proteína total obtenida después de 12, 18, 24 y 30 h de tratamiento de células MCF-7 con TNF. Como control de cargado se presenta una exposición de actina total en un gel cargado con la misma cantidad de proteína. Los números representan la normalización por densitometría de p21 entre actina.

cantidad de células L929 en la región G2-M se incrementa (figura 16 y tabla 4). El incremento en esta región se va haciendo más notable conforme avanza el curso temporal, y es a las 8 h de tratamiento cuando las células presentan un incremento máximo pasando de 13 a 41% en células control o tratadas con TNF- α respectivamente. Paralelamente, ocurre una disminución notable de población de células de la región que corresponde a G1 que pasa de 75 a 45% en células control o tratadas con TNF- α , ésto se ve bastante evidente en los histogramas de intensidad de fluorescencia (figura 16). Las células MCF-7 por su parte no presentaron una acumulación en ninguna de las regiones, por lo que pensamos que no hay un punto específico en el cual se interrumpa el ciclo y que por tanto, las células están detenidas en cualquier punto a todo lo largo del ciclo celular (figura 17 y tabla 5).

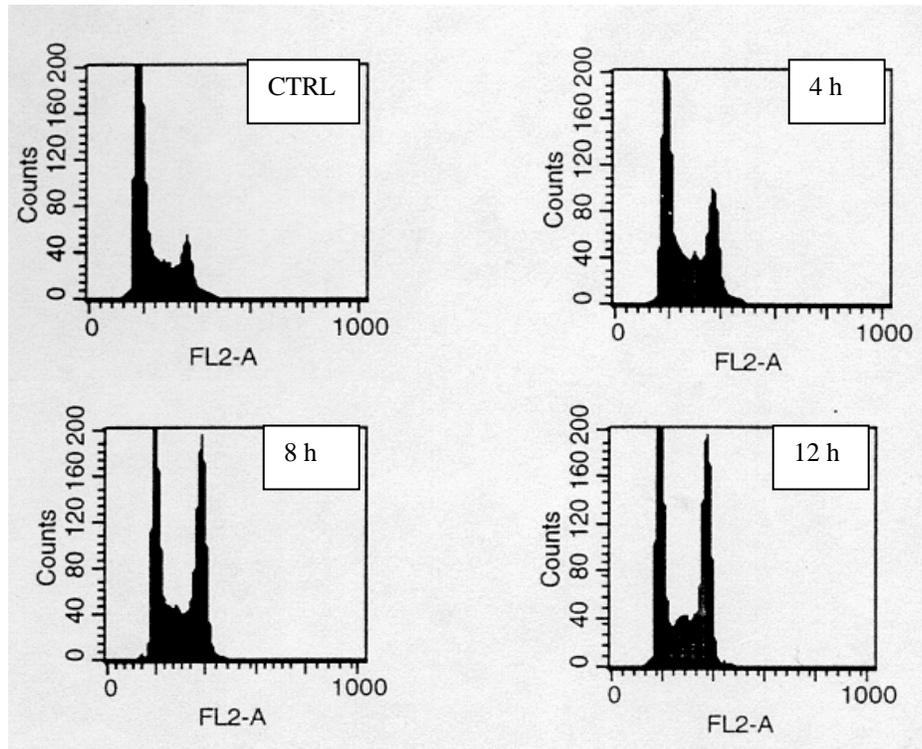


Figura 16: Distribución del contenido de ADN en células L929. Los núcleos de L929 fueron preparados y visualizados en el canal FL2-A (580 nm) por citofluorometría. Células control (CTRL) o tratadas con TNF por los tiempos indicados (4, 8, 12 h).

	G1	S	G2-M
CTRL	75	12	13
4H	64	12	24
8H	45	14	41
12H	49	13	38

Tabla 4: Distribución de las células L929 en las diferentes fases del ciclo celular después de diferentes tiempos de tratamiento con TNF.

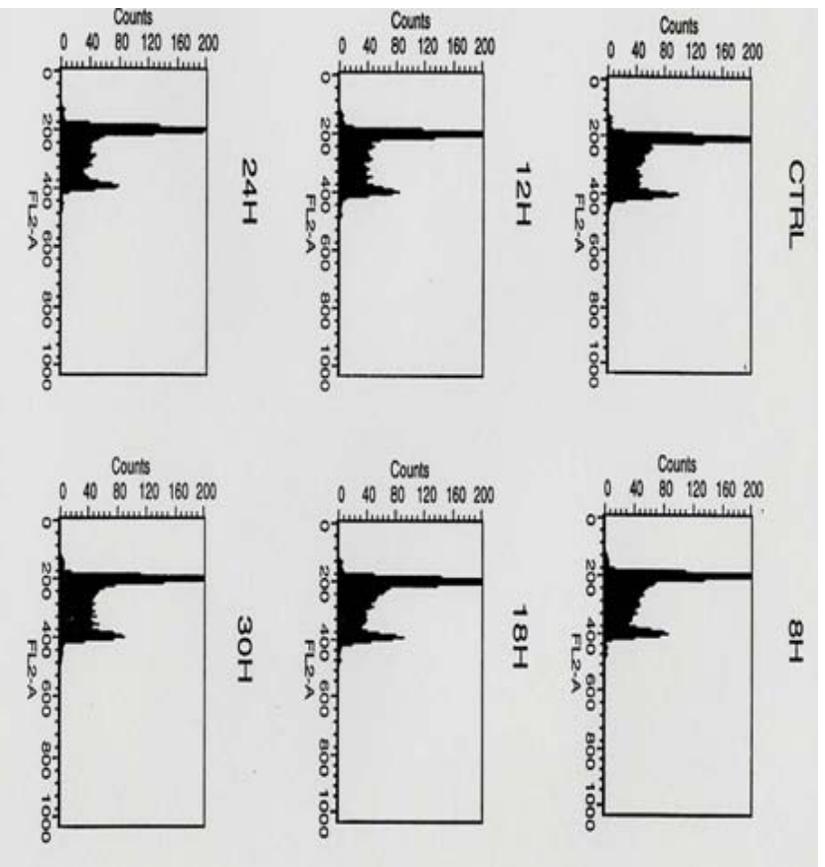


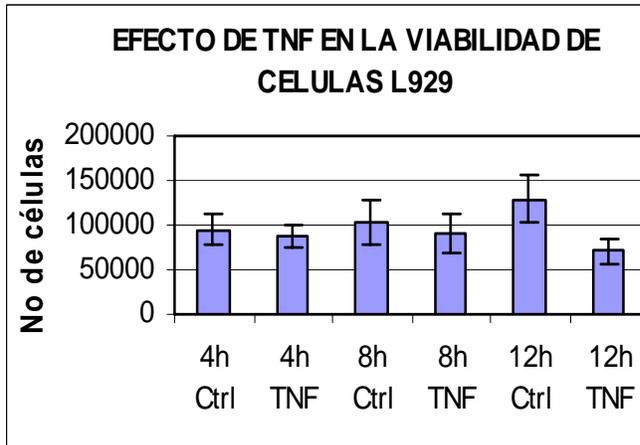
Figura 17: Distribución del contenido de ADN en células MCF-7. Los núcleos de MCF-7 fueron preparados y visualizados en el canal FL2-A (580 nm) por citofluorometría. Células control (CTRL) o tratadas con TNF por los tiempos indicados (8, 12, 18, 24 y 30 h).

	G1	S	G2-M
CTRL	67	16	17
8 h	67	16	17
12 h	72	13	15
18 h	68	16	16
24 h	73	14	13
30 h	67	16	17

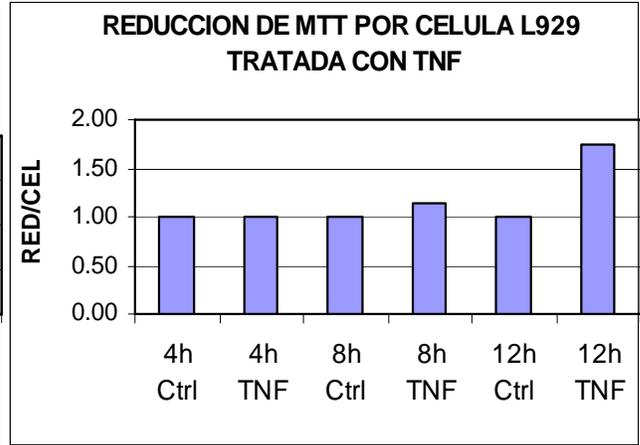
Tabla 5: Distribución de las células MCF-7 en las diferentes fases del ciclo celular después de diferentes tiempos de tratamiento con TNF.

f) Análisis del estrés oxidativo

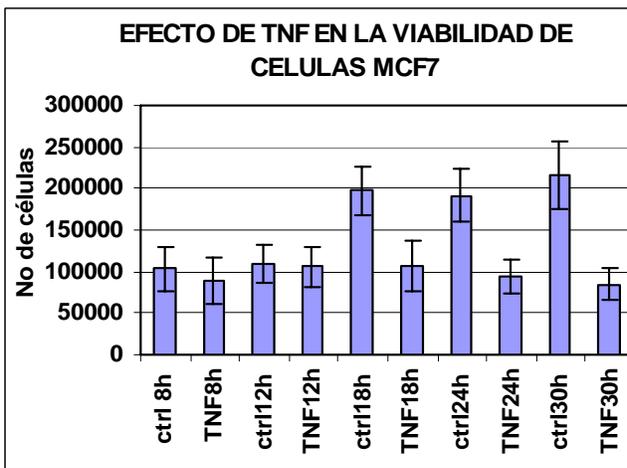
Los resultados de incorporación de timidina-[³H], sumado al incremento de proteína p53, son congruentes con daño al ADN, pero por otra parte, deja la gran interrogante que se presentó desde un principio en cuanto al origen y la naturaleza del daño al ADN. Si bien se ha demostrado que la adición de antioxidantes salva de la muerte a las células, no se ha vinculado directamente a las ERO como un agente generador de daño al ADN cuando se tratan a las células con TNF- α . Como una medida del estrés oxidativo, realizamos evaluaciones de reducción de MTT, el cual como ya habíamos mencionado puede utilizarse como un índice de estrés oxidativo, a tiempos donde no se observa ni muerte ni daño celular. En células L929, se observa solo un incremento hasta las 12 h de tratamiento (1.7 veces) (figura 18B). En Células MCF-7, es a partir de las 18 h cuando la reducción de MTT por célula se incrementa (2 veces), este incremento permanece por las siguientes 12 h (figura 18D). Otra sonda fluorescente que ampliamente se ha utilizado para evaluar el estrés oxidativo, es la oxidación del DCFH₂. En células L929 la oxidación de DCF fue incrementándose con un curso temporal. El tiempo más temprano de exposición a TNF- α , se encontró un ligero incremento en la oxidación de DCF con respecto al control sin tratamiento, y a las 8 h de tratamiento la oxidación de DCF se incrementó 3 veces y la máxima oxidación se presentó a 18 h (4.5 veces)(figura 19). Para las células MCF-7 se observa un ligero incremento a las 8 h, el cual se eleva paulatinamente hasta alcanzar un máximo a las 30 h de tratamiento, lo que correspondió a un 50% por arriba del nivel basal de las células sin tratamiento (figura 20).



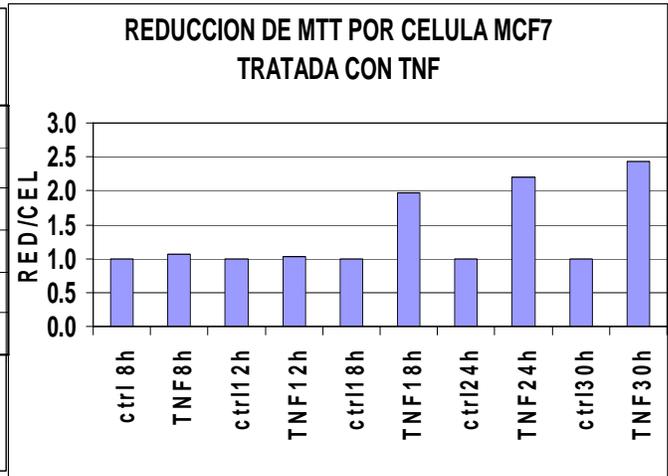
A



B



C



D

Figura 18: Estrés oxidativo medido por MTT en células L929 (A y B) y MCF-7 (C y D) tratadas con TNF por los periodos indicados. En las gráficas A y C se presenta la desviación estándar de un experimento representativo realizado por triplicado, y en las gráficas B y D se presenta un índice de normalización entre la reducción de MTT por célula viable (RED/CEL). Ctrl: control.

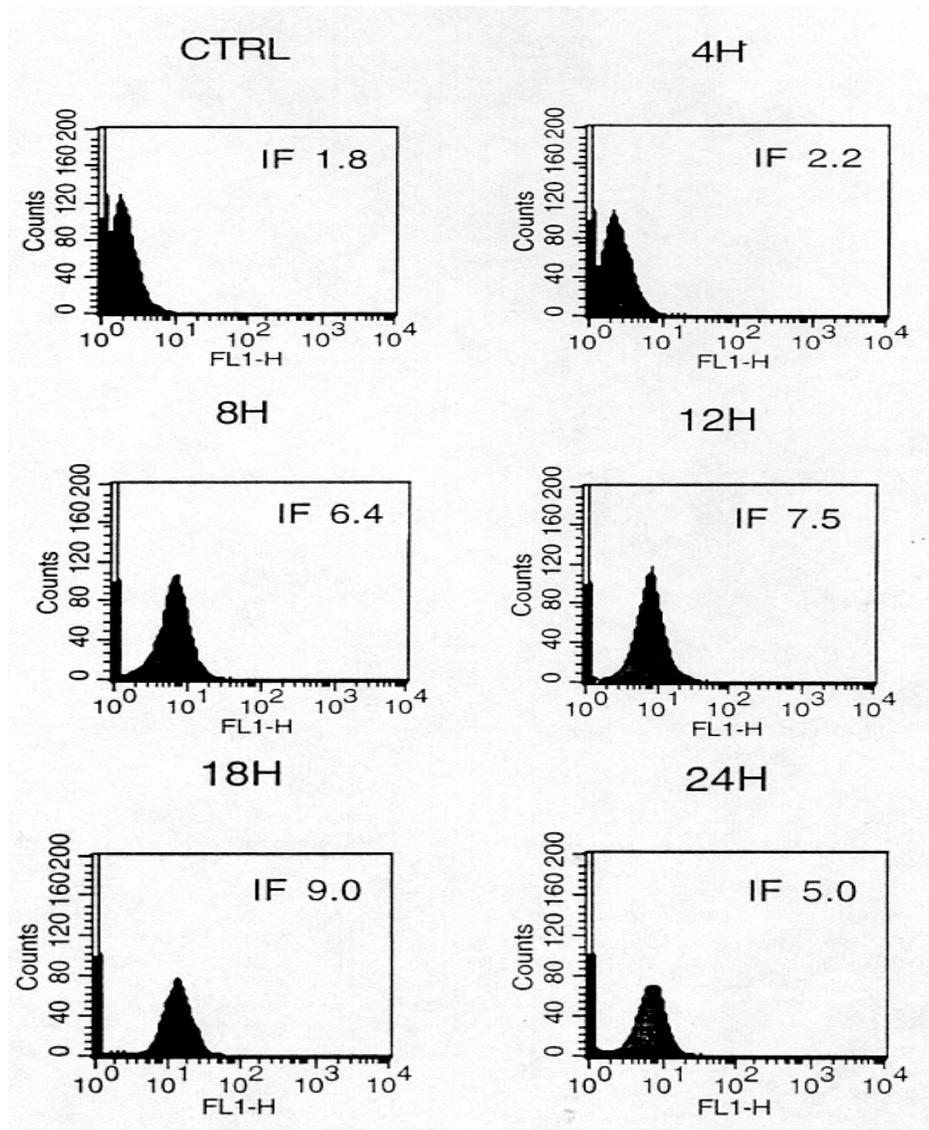


Figura 19: Estrés oxidativo en células L929 tratadas con TNF medido por DCF. Las células L929 control (CTRL) o tratadas con TNF por los tiempos indicados (4, 8, 12, 18 y 24 h) fueron cargadas con DCF por 15 min, después de lo cual se evaluó el incremento en la intensidad de fluorescencia en el canal FL1-H (520 nm) por citofluorometría. Se muestran los histogramas y las intensidades de fluorescencia promedio (IF) dentro de los recuadros.

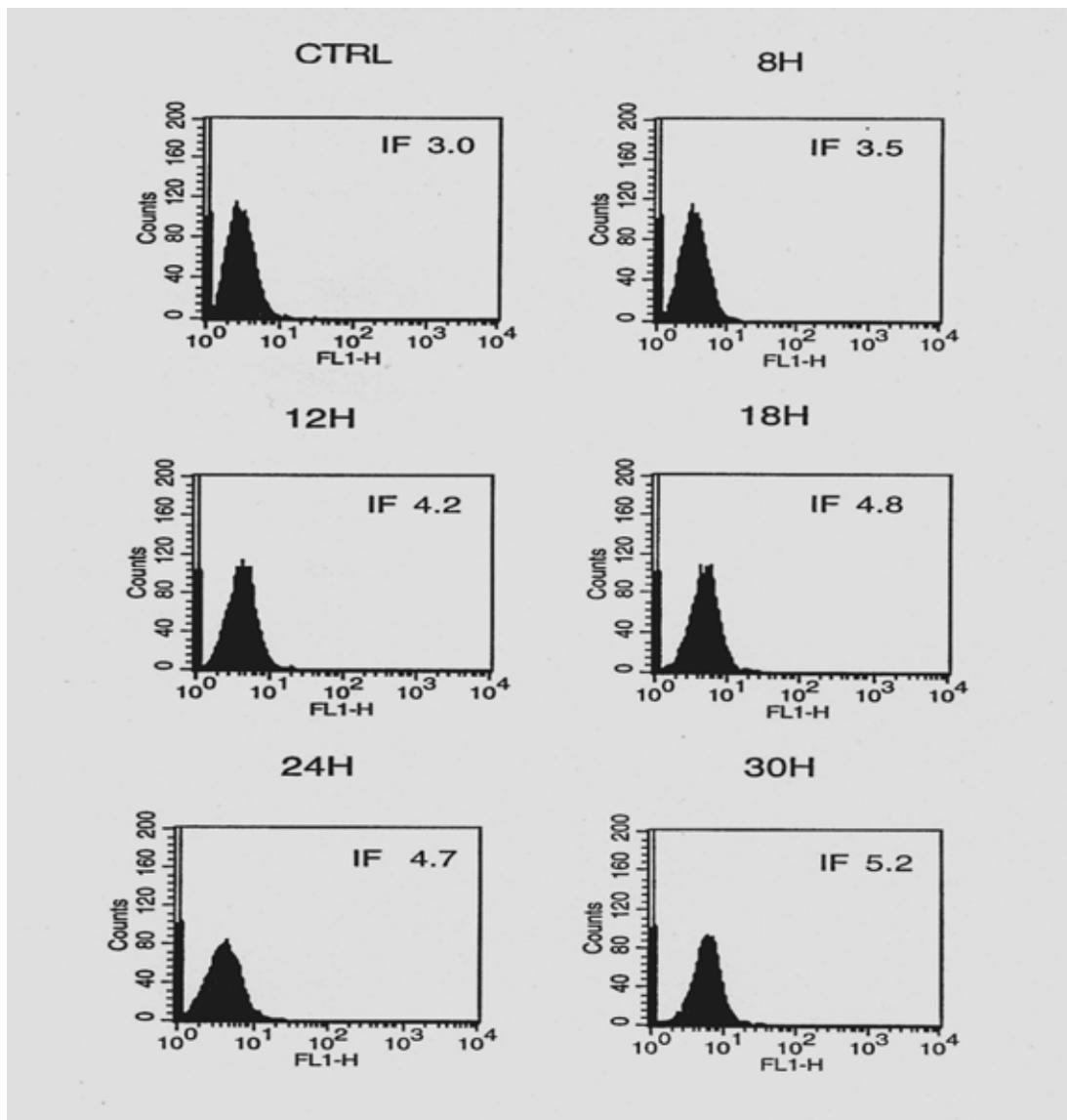


Figura 20: Estrés oxidativo en células MCF-7 tratadas con TNF medido por DCF. Las células MCF-7 control (CTRL) o tratadas con TNF por los tiempos indicados (8, 12, 18, 24 y 30 h) fueron cargadas con DCF por 15 min., después de lo cual se evaluó el incremento en la intensidad de fluorescencia en el canal FL1-H (520 nm) por citofluorometría. Se muestran los histogramas y las intensidades de fluorescencia promedio (IF) dentro de los recuadros.

DISCUSIÓN

En nuestro laboratorio previamente se determinó que existe una ventana de tiempo, en la cual las células L929 y MCF-7 presentan características de muerte cuando se tratan con TNF- α , es decir con características de daño, como la retracción de las prolongaciones celulares, la aparición de un cuerpo celular más redondeado, así como células despegadas y detritus celular (Gómez, 2004; y el presente trabajo). Posterior a esta ventana de tiempo, las células inician una mayor destrucción de forma generalizada, la cual hemos medido por diferentes técnicas (exclusión de azul de tripano, MTT, cristal violeta, liberación de LDH, contenido de ADN por citofluorometría etc.), y se han obtenido los resultados más espectaculares cuando se compara con las células sin tratamiento. Previo a este tiempo, cuando el daño celular aún no se presenta, los ensayos biológicos más comunes que hemos realizado, no han podido determinar una diferencia que represente algún grado de daño e inicio de la muerte celular. Por lo tanto, en el presente trabajo, evaluamos la expresión de la proteína p53, implicada en daño al ADN, paro del ciclo celular y apoptosis (EL-Deiry, 1993; Miyashita, 1994; Shieh, 1997). Los resultados obtenidos sugieren que la célula pasa de un paro del ciclo celular a la muerte, ésto determinado por el número de células evaluadas a tiempos tempranos tanto de L929 y de MCF-7 tratadas con TNF- α (figura 9A y 10A). Las células L929 durante las primeras 8 h de tratamiento con TNF ya no proliferaron, y es a partir de las 12 h cuando se observa una disminución en la viabilidad (figura 9A). Por lo tanto, esto indica que posiblemente se hayan detenido en alguna fase del ciclo celular. A pesar de que en células L929 existe una amplia literatura sobre el efecto de TNF- α , no se ha determinado que en estas células se induzca un paro del ciclo celular en alguna fase en particular, ya que existe actualmente una discrepancia, mientras algunos describen apoptosis (Kyprianou, 1991; Fady, 1995) otros determinaron que estas células se mueren con un fenotipo necrótico (Schulze, 1992; Grooten, 1993) e incluso algunos sugieren una muerte apoptótica atípica

(Humphreys, 1998). En células MCF-7, durante las primeras 12 h de tratamiento no se observó un incremento en el número de células, pero sí ligeramente a las 18 h de tratamiento, lo que indica que alguna parte de la población completa el ciclo y posteriormente se arresta. En un trabajo detallado se ha demostrado que las células MCF-7 se arrestan en la fase G1 del ciclo celular cuando son tratadas con TNF- α (Jeoung, 1995).

La inhibición de la proliferación coincide con un incremento en la incorporación de timidina-[^3H] (figura 9B y 10B). Inicialmente se esperaba que las células tratadas con TNF incorporaran menor timidina-[^3H] que las células control, ya que no se estaban dividiendo, incluso cuando se trataron las células L929 por 24 h con TNF- α (figuras 7A y B) se observó que la incorporación de timidina-[^3H] no correspondía a la cantidad de células viables. A pesar de tener solo un 15% de células viables, la incorporación de timidina-[^3H] solo cayó a la mitad. En células MCF-7 tratadas con TNF- α por 72 h la cantidad de células viables presentes en el cultivo cayó a un 25% (figura 8A), pero sorprendentemente la incorporación de timidina-[^3H] presentó los mismos valores que en cultivos sin tratamiento (figura 8B). Por lo tanto, cuando realizamos nuestros experimentos a tiempos más largos (después de 24 h para L929 o después de 72 h para MCF-7) o a tiempos cortos (antes de 24 h para L929 o antes de 72 h para MCF-7) con TNF- α , se normalizó la incorporación de timidina-[^3H] por célula viable (figuras 7C, 8C, 9C y 10C). Los resultados preliminares a tiempos más largos indicaron que las células tratadas con TNF- α estaban incorporando 3 veces más timidina-[^3H] que los cultivos sin tratamiento, para ambas líneas celulares. Cuando se evaluó la incorporación de timidina-[^3H] a tiempos más tempranos de tratamiento con TNF- α se encontró que a partir de las 8 h de tratamiento las células L929 tenían un índice casi de 2 y para las 12 h éste se incrementaba hasta 3 (Figura 9C). Algo semejante pasó en las células MCF-7, a las 24 h de tratamiento con TNF- α , ya que el índice de incorporación por célula viable se incrementó a 2, y a 30 h de tratamiento éste ya se había duplicado (figura 10C). Por lo tanto, consideramos

que este gran incremento en la incorporación de timidina-[³H] sólo puede explicarse por un proceso de reparación de ADN, posiblemente en respuesta a un daño al ADN.

La incorporación de timidina-[³H] mostró un daño al ADN, por lo que se sugiere que exista alguna respuesta celular frente al daño inducido por el TNF- α . Se sabe que cuando existe daño al ADN una de las primeras proteínas que responde es el supresor tumoral p53. De hecho, trabajos recientes han involucrado a p53 en la respuesta temprana cuando las células son tratadas con TNF- α ; uno de los primeros trabajos describe que la antimitogenicidad asociada al incremento en la expresión de p53 en la línea MCF-7 (Jeoung, 1995; Drané, 2002), y la resistencia a la muerte inducida por TNF- α por pérdida de función de p53 están asociadas (Cai, 1997). El papel de p53 en la muerte celular inducida por TNF- α se refuerza con los resultados obtenidos con la línea celular ME-180 que muere en respuesta a TNF- α . Mientras que el TNF- α induce un aumento en la expresión de p53, en clones resistentes al TNF- α no se presenta el aumento en expresión de p53 (Donato, 1998). Actualmente, es evidente que la acumulación o sobreexpresión de p53 está asociada a la muerte celular inducida por el TNF- α . Por lo tanto, cuando se evaluó el ARNm de p53 en ambas líneas celulares observamos que desde las primeras horas de tratamiento éste se incrementó (figuras 13A y 14A), y el resultado fue corroborado en la expresión de la proteína, la cual también se incrementó de forma considerable (figuras 13B y 14B). En la línea celular MCF-7, existen varios reportes donde se ha mostrado que TNF- α es capaz de inducir la sobreexpresión de p53, pero para las células L929 fue hasta el 2002 cuando apareció el primer trabajo donde se demuestra que el TNF- α es capaz de inducir la acumulación de p53 (Kim, 2002), y el presente trabajo el cual fue iniciado en 1999.

Entonces, podemos asociar el incremento de incorporación de timidina-[³H] con la expresión de p53, y ambas evidencias nos conducen a pensar en un posible daño al ADN cuando las células fueron tratadas con TNF- α . Por lo tanto, si existe

daño al ADN y acumulación de p53, entonces una de las posibles consecuencias es que exista paro del ciclo celular, en donde p53 como factor de transcripción pudiera funcionar en algunos de sus genes blanco que detienen el ciclo celular como la proteína inhibidora de CDK's, p21.

En células MCF-7 ya se había demostrado que el TNF- α induce la sobreexpresión de p21 (Jeoung, 1995). En L929 recientemente se ha descrito que no existe un incremento en los niveles de proteína de p21, pero si de p53 (Kim, 2002). Nuestros resultados indican que sí existe un incremento considerable a tiempos tempranos de p21, pero los niveles decrecen rápidamente para L929 (figura 15A), y para MCF-7 el incremento se mantiene por arriba del basal por lo menos entre 12 y 24 h de tratamiento (figura 15B), lo cual corresponde con lo ya descrito.

Entonces, si las células tratadas con TNF- α no están proliferando, y están acumulando p53 y p21 a tiempos tempranos, se cree en un posible paro del ciclo celular previo a la muerte. Los resultados mostraron que las células L929 se acumularon en la fase G2-M desde las 4 h de tratamiento y previo a la muerte (12 h) la acumulación fue máxima (figura 16 y tabla 4), cabe mencionar que no existe algún trabajo previo que indique que las células L929 se detengan en la fase G2 cuando se tratan con TNF- α . En células MCF-7, como ya lo mencionamos antes, ya se tenía el antecedente de paro en la fase G1, pero en nuestras células MCF-7 no fue posible observarlo (Figura 17 y tabla 5), por lo que pensamos que las células podrían detenerse en cualquier punto del ciclo celular, principalmente G1 o G2. A pesar de que las células MCF-7 acumulan p53 y p21, al parecer no fue suficiente para montar una respuesta de paro del ciclo celular, y que el mecanismo implicado en el paro puede ser más complejo; esto último, debido a la alteración genética que las células de cáncer presentan con los años de cultivo.

Uno de los principales objetivos en el presente trabajo fue determinar cual sería la causa de daño al ADN. Algunos estudios que se han realizado para

caracterizar la muerte celular inducida por el TNF- α han coincidido en señalar al estrés oxidativo como un fenómeno que acompaña la destrucción de las células (Schulz-Osthoff, 1992; Goosens, 1995). En el laboratorio, se utilizó una sal de tetrazolio llamada comúnmente MTT; esta sal, al ser reducida dentro de la célula produce formazan que se utiliza comúnmente como una medida de actividad respiratoria. El MTT es una molécula que puede aceptar electrones de alto potencial redox, como los provenientes de las deshidrogenasas mitocondriales (Slater, 1963), o el radical superóxido (Burdon, 1990). Se utilizó al MTT como una medida de estrés oxidativo (Gómez, 1996), ya que en la muerte de células L929 con TNF- α , la reducción de MTT se incrementaba tanto como en las células sin tratamiento, entonces se definió un umbral de reducción donde la célula manifestaba características de daño o muerte. En el presente trabajo se utilizó esta misma sal de tetrazolio para evaluar la presencia de estrés oxidativo en ambos tipos celulares, mientras que a tiempos más tardíos la reducción de MTT puede ser evaluada con mucha facilidad, 24 h para L929 y 72 h para MCF-7 (figura 7D y 8D), a tiempos tempranos para L929 (12 h) ésta ligeramente se incrementa (figura 18B), para MCF-7 se observó una reducción considerable solo cuando las células manifestaron características de daño (18 h)(figura 18D), la cual se ve incrementada con mayor tiempo de exposición a TNF- α .

En las primeras horas de tratamiento con TNF- α se hizo evidente que la reducción de MTT por célula no presentaba ningún incremento, por lo que buscamos otro agente que nos pudiera dar una señal de estrés oxidativo. El DCF-DA es otra sonda fluorescente, que al ser oxidado dentro de la célula (DCF) emite fluorescencia la cual puede ser medida fluorométricamente. Se ha reportado que esta sonda puede reaccionar con H₂O₂ y otros radicales libres (Halliwell, 1999). Los resultados indican que la oxidación del DCF se incrementó considerablemente a partir de las 8 h de tratamiento de células L929 con TNF- α (figura 19). Para las células MCF-7 la oxidación de DCF sólo se incrementó

ligeramente hasta las 12 h de tratamiento con TNF- α (figura 20). Esta evidencia sugiere que el estrés oxidativo podría ser una de las causas de daño al ADN. Recientemente en células L929 tratadas con TNF- α se publicó la presencia de bases oxidadas como la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, cuya presencia fue detectada de forma considerable a las 5 h (Park, 1998).

El mecanismo general de muerte en ambos tipos celulares podría ser el daño al ADN por ERO, expresión de p53, activación de p53, inducción de genes blanco de p53 que regulen el ciclo celular como p21, 14-3-3 σ u otro mecanismo inducido por p53 hasta ahora desconocido, y finalmente al no llevarse a cabo la reparación de ADN junto con la activación de moléculas pro-apoptóticas (Bax, caspasas, etc.), la célula muere.

CONCLUSIONES

- 1) Las células L929 y MCF-7 presentan un umbral entre la inhibición de la proliferación y muerte celular.
- 2) El incremento en la incorporación de timidina en células tratadas posiblemente refleje reparación debido a daño al ADN.
- 3) El incremento en la expresión de p53 tanto de ARNm y proteína posiblemente está relacionado a daño al ADN y a la inhibición de la proliferación.
- 4) El incremento de la incorporación de timidina y la expresión de p53 son fenómenos que anteceden a la muerte celular.
- 5) La expresión de p21 no está implicada en el paro del ciclo celular en las células L929, o al menos que p21 colabore en el inicio del paro de la fase G2.
- 6) Las células MCF-7 presentan una mayor complejidad en el paro del ciclo celular, y posiblemente tanto p21 como otras u otras proteínas inhibidoras de ciclo podrían estar actuando.
- 7) El paro del ciclo celular se lleva a cabo después de la fase S y antes de la fase M, posiblemente en un punto de revisión durante la fase G2 para células L929.
- 8) El paro del ciclo celular en MCF-7 es complejo; no hay incremento en ninguna de las 2 fases donde funciona normalmente un inhibidor (G1 o G2).
- 9) Existe un estrés oxidativo desde tiempos tempranos, y posiblemente está relacionado con daño al ADN.

BIBLIOGRAFÍA

- Aderka D, Holtmann H, Toker L, Hahn T, y Wallach D, 1986, Tumor necrosis factor induction by Sendai virus, *J. Immunol.* 136: 2938-2942.
- Aggarwal BB, Khor W, Hass P, Moffat B, Spencer S, Henzel W, Brigman T, Nedwin G, Goeddel D y Harkins R., 1985, Human tumor necrosis factor: production, purification and characterization, *J. Biol. Chem.* 260:2345:2354.
- Aggarwal BB y Vilcek J, 1992, *Tumor Necrosis Factors : structure, function, and mechanism of action*, Marcel Dekker Inc. New York, USA, pp 600.
- Ames B, 1989, Endogenous oxidative DNA damage in aging and cancer, *Free Radic. Res. Commun.* 7:121-128.
- Anderson H y Roberge M, 1992, The DNA topoisomerase II: a review of its involvement in chromosome structure, DNA replication, transcription and mitosis, *Cell. Biol. Int. Rep.* 16:8717-8724.
- Arakaki N, Kahijara T, Arakaki R, Ohnishi T, Kazi J, Nakashima H y Daikuhara, 1999, Involvement of oxidative stress in tumor cytotoxic activity of hepatocyte growth factor/scatter factor, *J. Biol. Chem.* 274:13541-13546.
- Aspinwall R, Rothwell D, Roldan-Arjona T, Anselmino C, Ward C, Cheadle J, Sampson J, Lindahl T, Harris P y Hickson I, 1997, Cloning and characterization of a functional human homolog of *Escherichia coli* endonuclease III, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:109-114.
- Ausubel , 1994. *Current Protocol in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York, USA.
- Avantaggiati M, Ogryzko V, Gardner K, Giordano A, Levine A y Kelly K, 1997, Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways, *Cell* 89:1175-1184.
- Bache M, Dunst J, Wurl P, Frode D, Meye A, Schmidt H, Rath F y Taubert H, 1999, G2/M checkpoints is p53-dependent and independent after irradiation in five human sarcoma cell lines, *Anticancer Res.* 19:1827-1832.
- Bargonetti J, Manfredi J, Chen X, Marshak D y Prives C, 1993, A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild-type but not from oncogenetic mutant p53 protein, *Genes Dev.* 7:2565-2574.
- Baud, y Karin M, 2001 , *Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives*, *TRENDS in Cell Biol.* 11: 372-377.
- Beisel W, 1975, Metabolic response to infection, *Annu. Rev. Med.* 26: 9-20.
- Bennett M, McDonald K, Chan S, Luzio J, Simari R y Weisber P, 1998, Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53, *Science* 282:290-293.
- Beutler B y Cerami A, 1988, Tumor necrosis, cachexia, shock and inflammation: a common mediator. *Annu. Rev. Biochem.* 57: 505-518.
- Beutler B, Mahoney J, Le Trang N, Pekala P y Cerami A., 1985, Purification of cachectin, a lipoprotein

lipase/suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *J. Exp. Med.*, 161:984-995.

●Bjorneboe A, Bjorneboe G y Devon C, 1990, Absorption, transport and distribution of vitamin E, *J. of Nutrition* 120:233-242.

●Blangy A, Lane H, D'Herin P, Harper M, Kress M y Nigg E, 1995, Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation *in vivo*, *Cell* 83:1159-1169.

●Bohr V y Anson R, 1995, DNA damage, mutation and fine structure DNA repair in aging, *Mutat. Res.* 338:25-34.

●Boyd S, Tsai K y Jacks T, 2000, An intact HDM2 ring –finger domain is required for nuclear exclusion of p53, *Nat. Cell. Biol.* 2:563-568.

●Brash D, 1997, Sunlight and the onset of skin cancer, *Trends Genet.* 13:410-414.

●Braun K, Holz G, Pusch O y Hengstschlager M, 1998, Deregulated expression of Cdk2 or Cdk3 associated kinase activities enhances c-Myc-induced apoptosis, *Cell. Biol.* 7:789-798.

●Brook M, Sully G, Clark A y Saklatvala J., 2000, Regulation of tumor necrosis factor alpha mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signalling cascade. *FEBS Lett.* 483:57-61.

●Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Walkman T, Zhou S, Brown J, Sedivy J, Kinzler K y Vogelstein B, 1998, Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage, *Science* 282:1497-1501.

●Burdon R, Gill V y Rice-Evans C, 1990, Oxidative stress and tumor cell proliferation, *Free Radic. Res. Commun.* 11:65-76.

●Cai Z, Capoulade C, Moyret-Lalle C, Amor-Gueret M, Feunteun J, Larsen AK, Paillerets BB, y Chouaib S., 1997, Resistance of MCF7 human breast carcinoma cells to TNF-induced cell death is associated with loss of p53 function, *Oncogene* 15:2817-26.

●Canman C, 1998, Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53, *Science* 281: 1677-1679.

●Carnero A, 2000, Cell cycle and cancer, *Rev. Oncología* 2:12-22.

●Carnero A y Hannon G, 1998, The INK-4 family of CDK inhibitors, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 227:43-55.

●Carswell E, Old L, Kassel R, Green S, Fiore N y Williamson B, 1975, An endotoxin induced serum factor which causes necrosis of tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3666-3670.

●Céspedes-Miranda E, Hernández-Lantigua I y Llopiz-Janer N, 1996, Enzimas que participan como barrera fisiológicas para eliminar los radicales libres: II, *Catalana. Rev. Cubana de Investigación Biomédica*, 15:2-16.

●Chao C, Saito S, Kang J, Anderson C, Appella E, y Xu Y, 2000, p53 transcriptional activity is essential of p53 –dependent apoptosis following DNA damage, *EMBO J.* 19:4967-4975.

●Chehab N, Malikzay A, Appel M y Halazonetis T, 2000, Chk2/hCds1 functions as a DNA damage

checkpoint in G1 by stabilizing p53, *Genes Dev.* 14:278-288.

- Chen H y Carbone D, 1997, p53 as a target for anti-cancer immunotherapy, *MOL. MED. TODAY*, Abril, 160-167.
- Chernov M, Ramana C, Adler B y Stark G, 1998, Stabilization and activation of p53 are regulated independently by different phosphorylation events, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:2284-2289.
- Cho Y, Gorina S, Jeffrey P y Pavletich N, 1994, Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations, *Science* 265:346-355.
- Chomczynski, P. y Sacchi N., 1987, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction, *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Clarke P, 1995, Cyclin-dependent kinase Cdk2-dependent kinase activation, *Curr. Biol.* 5:40-42.
- Clore G, Omichinski J, Sakaguchi K, Zambrano N, Sakamoto H, Appella E y Gronenborn A, 1994, High-resolution structure of the oligomerization domain of p53 by multidimensional NMR, *Science* 265:386-391.
- Coleman T, Tang Z y Dunphy W, 1993, Negative regulation of the wee1 protein kinase by direct action of the nim/cdr1 mitotic inducer, *Cell* 72: 919-929.
- Dang C y Lee W, 1989, Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-erb-A, c-myc, N-myc, p53, HSP70 and HIV proteins, *J. Biol. Chem.* 264:18019-18023.
- Dempsey P, Doyle S, He J y Cheng G., 2003, The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14:193-209.
- Cisneros P, 1995, La glutatión reductasa y su importancia biomedical, *Rev. Cubana Investigación Biomédica* 14:1-5.
- Cheng K, Cahill D, Kasai H, Nishimura S y Loeb L, 1992, 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G-T and A-C substitutions, *J. Biol. Chem.* 267:166-172.
- Dempsey B y Harrison L, 1994, Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology, *Annu. Rev. Biochem.* 63:915-948.
- Desai D, Wessling H, Fisher R y Morgan D, 1995, Effects of phosphorylation by CAK on cyclin binding by Cdc2 and Cdk2, *Mol. Cell. Biol.* 15:345-350.
- Dianov G y Lindhal T, 1994, Reconstitution of the DNA base excision-repair pathway. *Curr. Biol.* 4:1069-1076.
- Dizdaroglu M, 1993, Chemistry of the free radical damage to DNA and nucleoproteins, Ed. Ellis Horwood, London UK, p. 18-39.
- Donato NJ y Perez M, 1998, Tumor necrosis Factor-induced apoptosis stimulates p53 accumulation and p21 WAF1 proteolysis in ME-180 cells, *J. Biol. Chem.*, 273:5067-72.
- Drané P, Leblanc V, Miro-Mur F, Saffroy R, Debuire B y May E., 2002, Accumulation of an inactive form of p53 protein in cells treated with TNF α , *Cell Death and Differentiation* 9:527-537.
- Ducommun B, Brambilla P, Felix M, Franza B, Karsenti E y Draetta G, 1991, Cdc2 phosphorylation is

required for its interaction with cyclin, EMBO J. 10: 3311-3319.

- Dutta A, Rupert J, Aster J y Winchester E, 1993, inhibition of DNA replication factor RPA by p53, Nature 365:79-82.
- Ehrlich M, 2000, DNA alterations in cancer genetic and epigenetic changes, Eaton Publishing, USA, 508pp.
- El-Deiry W, Kern S, Pietenpol J, Kinzler K y Vogelstein B, 1992, Definition of a consensus binding site for p53, Nat. Genet. 1:45-49.
- El-Deiry W, Tokino T, Velculescu V, Levy D, Parson R, Trent J, Lin D, Mercer W, Kinzler K y Vogelstein B., 1993, WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell 75:817-825.
- El-Deiry W., 1998, *Regulation of p53 downstream genes*, Sem. CANCER BIOL., 8: 345-357.
- Fady C, Gardner A, Jacoby F, Briskin K, Tu YP, Schmid I, y Lichtenstein A, 1995, Atypical apoptotic cell death induced in L929 target by exposure to tumor necrosis factor. J. Interferon Cytokine Res., 15:71-80.
- Fhan S y Cohen G, 1992, The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it, Ann. Neurol. 32:804-812.
- Friedberg E, 1996, cockayne syndrome- a primary defect in DNA repair, transcription, both or neither?, Bioessays 18:731-738.
- Frosina G, Fortini P, Rossi O, Carrozzino F, Raspaglio G, Cox L, Lane D, Abbondandolo A y Dogliotti E, 1996, Two pathways for base excision repair in mammalian cells, J. Biol. Chem. 271:9573-9578.
- Galaktionov K y Beach D, 1991, Specific activation of cdc25 tyrosine phosphatase by type cyclins: evidence for multiple roles of mitotic cyclins, Cell 67:1181-1194.
- Geyer R, Yu Z y Maki C, 2000, The MDM2 ring-finger domain is required to promote p53 nuclear export, Nat. Cell. Biol. 2:569-573.
- Giannakakou P, Sackett D, Ward Y, Webster K, Blagosklonny M y Fojo T, 2000, p53 is associated with cellular microtubules and uses dynein-dependent transport for nuclear accumulation, Nat. Cell. Biol., 2:709-717.
- Gomez E, 2004, Correlación entre el estrés oxidativo inducido por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y sus efectos citostático y citotóxico en células L929, Tesis doctoral, UNAM, 128pp.
- Gómez E, Mendoza-Milla C, Ibarra-Sánchez M, Ventura-Gallegos J y Zentella-Dehesa A, 1996, Ceramide reproduces late appearance of oxidative stress during TNF-mediated cell death in L929 cells, Biochem. Biophys. Res. Commun. 228:505-509.
- Goossens V, Grooten J, De Vos K y Fiers W., 1995; Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:8115-8119.
- Gorina S y Pavletich N, 1996, Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2, Science 274:1001-1005.

- Grana X y Reddy E, 1995, Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDK's), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKI's), *Oncogene* 11:211-219.
- Grooten J, Goossens V, Vanhaesebroeck B y Fiers W, 1993, Cell membrane permeabilization and cellular collapse, followed by loss of dehydrogenase activity: early events in tumor necrosis factor – induced cytotoxicity. *Cytokine* 5:546-555.
- Grune T y Davis J, 2001, Oxidative processes in aging. En: *Handbook of the biology of Aging*, 5a ed. Academic Press. USA. P25-42.
- Gurer H y Hercul N, 2000, Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning?, *Free Radical Biology and Medicine* 29:927-945.
- Gu W y Roeder R, 1997, Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain, *Cell* 90:595-606.
- Hainaut P y Milner J, 1993, Structural role for metal ions in the “wild-type” conformation of the tumor suppressor protein p53, *Cancer Res.* 53:1739-1742.
- Halliwell B y Gutteridge M, 1991, Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metal and disease, *Biochem. J.* 219:1-14.
- Halliwell B, 1994, Free radical and oxidants: a personal view, *Nutrition* 52:253-265.
- Halliwell B y Gutteridge J, 1999, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, third edition, New York, USA, pp 899.
- Hartwell L y Weinert T, 1989, Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events, *Science* 246:629-634.
- He Z, Brinton B, Greenblat J, Hassell J y Ingles C, 1993, The transactivator proteins VP16 and GAL4 bind replication factor A, *Cell* 73:1223-1232.
- Hengest L y Reed S, 1998, Inhibitors of the Cip/Kip family, *Curr. Top. Microbio. Immunol.* 227:225-241.
- Hernández J, Domínguez M, Palmer E y Saborío L, 1989, Interaction of cadmium with actin microfilaments *in vitro*, *Toxicol. in vitro* 3:277-284.
- Hofmann F y Livingston D, 1996, Differential effects of cdk2 and cdk3 on the control of pRB and E2F function during G1 exit, *Genes Dev.* 10:851-861.
- Horikoshi N, Usheva A, Chen J, Levine A, Weinmann R y Shenk T, 1995, Two domains of p53 interact with the TATA-binding protein, and the adenovirus 13S E1A protein disrupts the association, relieving p53-mediated transcriptional repression, *Mol. Cell. Biol.* 15:227-234.
- Humphreys D y Wilson M, 1998, Modes of L929 cell death induced by TNF- α and other cytotoxic agents, *Cytokine* 11:773-782.
- Jenkins J, Chumakov P, Addison C, Sturzbecher H y Wade-Evans A, 1988, Two distinct regions of the murine p53 primary amino acid sequence are implicated in stable complex formation with simian

virus 40 T antigen, J. Virol. 62:3903-3906.

- Jeoung D, Tang B y Sonenberg M., 1995, Effects of tumor necrosis factor- α on antimitogenicity and cell cycle-related protein in MCF-7 cells, J. Biol. Chem., 270:18367-18373.
- Jimenez G, Nister M, Stommel J, Beeche M, Barcase E, Zhang X, O'Gorman S y Wahl G, 2000, A transactivation-deficient mouse model provides insights into Trp53 regulation and function, Nat. Genet. 26:37-43.
- Jin S, Antinore M, Lkung F, Dong X, Zhao H, Fan F, Colchagie A, Blanck P, Roller P, Fornance A y Zhan Q, 2000, The GADD45 inhibition of CDC2 kinase correlates with GADD45-mediated growth suppression, J. Bio. Chem. 275:16602-16608.
- Kamb A, 1995, Cell-cycle regulators and cancer, TRENDS Genet. 11:136-140.
- Kaufmann W y Paules R, 1996, DNA damage and cell cycle checkpoints , FASEB J. 10:238-247.
- Ko L y Prives C, 1996, p53: puzzle and paradigm, Genes Dev. 10:1054-1072.
- Kubbutat M., and Vousden K.H., 1998, *Keeping an old friend under control: regulation of p53 stability*, MOL. MED. TODAY, June , 250-256.
- Kim B y Jung Y, 2002, Calpeptin suppresses tumor necrosis factor- α -induced death and accumulation of p53 in L929 mouse sarcoma cells, Apoptosis 7:115-121.
- Kraiss S, Quaisier A, Oren M y Montenarh M, 1988, Oligomerización of oncoprotein p53. J. Virol. 62:4737-4744.
- Kubota Y, Nash R, Klungland A, Sdchar P, Barnes D y Lindhal T, 1996, Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins interaction between polimerase beta and the XRCC1 protein, EMBO J. 15:6662-6670.
- Kyprianou N, Alexander RB e Issacs JT, 1991, Activation of programmed cell death by recombinant human tumor necrosis factor plus topoisomerase II-targeted drugs in L929 tumor cells. J. Natl Cancer Inst. 83:346-350.
- Laemmli U, 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 227:680-685.
- Lee S, Elenbaas B, Levine A y Griffith J, 1995, p53 and its 14 kDa C-terminal domine recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches, Cell 81:1013-1020.
- Lees E y Harlow E, 1993, Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase, Mol. Cell. Biol. 13:1194-1201.
- Lenaz G, 1998, Role of mitochondria in oxidative stress and aging, Biochem. Biophys. Acta, 1366:53-67.
- Libler D, 1993, The role of metabolism in the antioxidant function of Vitamine E, Critical Review in toxicol. 23:147-169.
- Lindahl T, 1993, Instability and decay of the primary structure of DNA, Nature 362:709-715.

- Lin J, Chen J, Helenbaas B y Levine A, 1994, Several hydrophobic aminoacids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm-2 and the adenovirus 5 E1B 55-kD protein, *Genes. Dev.* 8:1235-1246.
- Lindahl T, Karran P y Wood R, 1997, DNA excision repair pathways. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7:158-169.
- Liochev S y Fridovich I, 2000, Copper- and Zinc-containing superoxide dismutase can act as a superoxide reductase and a superoxide oxidase, *J. Biol. Chem.* 275:38482-38485.
- Li X y Coffino P, 1996, High-risk human papilloma virus E6 protein has two distinct binding sites within p53, which only one determines degradation, *J. Virol.* 70:4509-4516.
- Liu L, Scolnick D, Trievel R, Zhang H, Marmorstein R, Halazonetis T y Berger S, 1999, P53 sites acetylated *in vitro* by PCAF and p300 are acetylated *in vivo* response to DNA damage, *Mol. Cell. Biol.* 19:1202-1209.
- Locksley R, Killen N, y Lenardo M, 2001, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*, *Cell* 104: 487-501.
- Lohrum M y Scheidtmann K, 1996, Differential effects of phosphorylation of rat p53 on transactivation of promoters derived from different p53 responsive genes, *Oncogene* 13:2527-2539.
- Lowndes N y Murgia J, 2000, Sensing and responding to DNA damage, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10:117-125.
- Marchenko N, Zaika A y Moll U, 2000, Death signal-induced localization of p53 protein to the mitochondria, *J. Biol. Chem.* 275:16202-16212.
- Martínez F, Chávez A, Gonzalez D, Gutiérrez A, Chapter: Regulation of cell division in higher Eukaryotes, In. *Cell physiology Sourcebook: A molecular approach*, Third Edition, Ed. Academic Press. 2001.
- Matés J, 2000, Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology, *Toxicology* 153:83-104.
- Matsumoto Y y Kim K, 1995, Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair, *Science* 269:699-702.
- Matsuoka M, Matsura Y, Samba K y Nishimoto I, 2000, Molecular cloning of a cyclin-like protein associated with cyclin-dependent kinase 3 (cdk3) *in vivo*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273:2442-2447.
- May P y May E, 1998, Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein, *Oncogene* 18:7621-7636.
- Mayr G, Reed M, Wang P, Wang Y, Schwedes J y Tegtmeyer P, 1995, Serine phosphorylation in the NH2 terminus of p53 facilitates transactivation, *Cancer Res.* 55:2410-2417.
- McCord J, 1993, Oxygen-derived free radicals, *New Horizons* 1:70-76.
- Meraldi P, Lukas J, Fry A, Bartek J y Nigg E, 1999, Centrosome duplication in mammalian somatic cells

requires E2F and Cdk2-cyclin A, *Nat. Cell. Biol.* 1:288-293.

- Miller S, Zambetti G y Ewen M, 2000, p53 binds selectively to the 5' untranslated region of cdk4, an RNA element necessary and sufficient for transforming growth factor β and p53-mediated translation inhibition of cdk4, *Nat. Cell. Biol.* 20:8420-8431.
- Miyashita T, Krajewski S, Krajewski M, Wang HG, Lin HK, Hoffman B, Lieberman D y Ree JC., 1994, Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax in gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene* 9:1799-1805.
- Mohan M, Seaton T, Mitchell J, Howe A, Blackburn K, Burkhart W., Moyer M, Patel I, Waitt G, Becherer J, Moss M y Milla M., 2002, The tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE): a unique metalloproteinase with highly defined substrate selectivity, *Biochemistry* 41:9462-9469.
- Monti P, Campomenosi P, Ciribilli Y, Lannone R, Inga A, Abbondandolo A, Resnick M y Fronza G, 2002, Tumour p53 mutations exhibit promoter selective dominance over wild type p53, *Oncogene* 11:1641-1648.
- Mosmann T, 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.* 65:55-63.
- Muller U, Kjongeneel C, Nedoospasov S, Lindahl K y Steinmetz M, 1987, Tumor necrosis factor and lymphotoxin genes map close to H-2D in the mouse major histocompatibility complex, *Nature* 325: 265-267.
- Murphy M, Ahn J, Walker K, Hoffman W, Evans R, Levine A y George D, 1999, Transcriptional repression by wild type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a, *Genes Dev.* 13:2490-2501.
- Nedwin G, Naylor S, Sakaguchi A, Smith D, Jarret N, Pennica D, Goeddel D y Gray P, 1985, Human Lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res.* 13: 6361-63731.
- Nigg E, 1995, Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle, *Bioessays* 17:471-480.
- Nuber U, Schwarz S y Scheffner M, 1998, The ubiquitin-protein ligase E6-associated protein (E6-AP) serves as its own substrate, *Eur. J. Biochem.* 254:646-649.
- Oliner J, Pietenpol J, Thiagalingam S, Gyuris J, Kinzler K y Vogelstein B, 1993, Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53, *Nature* 362:857-860.
- Oliner J, 1994, *The role of p53 in cancer development*, *Scientific American SCIENCE & MEDICINE*, september/october, 16-25.
- Oren M, 1999, *regulation of the p53 tumor suppressor protein*, *J. Biol. Chem.* 274: 36031-36034.
- Pardee A, 1989, G1 events and regulation of cell proliferation, *Science* 246:603-608.
- Patrick L, 2004, Selenium biochemistry and cancer: a review of the literature. *Alternative Medicine*

Review, 9:239-258.

- Pavletich N, Chambers K y Pabo C, 1993, The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved region and the major mutation hot spots, *Genes Dev.* 7:2556-2564.
 - Peng C, Graves P, Thomas R, Wu Z, Shaw S y Piwnika-Worns H, 1997, Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of CDC25C on serine-216, *Science* 227:1501-1505.
 - Pietempol J, Tokino T, Thiagalingam S, El-Deiry W, Kinzler K y Vogelstein B, 1994, Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:1988-2002.
 - Pines J y Hunter T, 1991, Human cyclins A and B are differentially located in the cell and undergo cell cycle dependent nuclear transport, *J. Cell. Biol.* 115:1-17.
 - Poon R, Yamashita K, Adameczewski J, Hunt T y Shuttleworth J, 1993, The cdc2-related protein p40MO15 is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33cdk2 and p34cdc2, *EMBO J.* 12:3123-3132.
 - Radicella J, Dherin J, Desmaze C, Fox M, Boiteux S, 1997, Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:8010-8015.
- Raycroft L, Schmidt J, Yoas K, Hao M y Lozano G, 1991, Analysis of p53 mutants for transcriptional activity, *Mol. Cell. Biol.* 11:6067-6074.
- Raycroft L, Wu H y Lozano G, 1990, Transcriptional activation by wild type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene, *Science*, 249:1049-1051.
 - Reed M, Woelker B, Wang P, Wang Y, Anderson M y Tegtmeyer P, 1995, The c-terminal domain of p53 recognizes DNA damaged by ionizing radiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9455-9459.
 - Rikans L y Hornbrook K, 1997, Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging, *Biochem. Biophys. Acta* 1362:116-127.
 - Roldán-Arjona T, Wei W, Carter K, Kungland A, Anselmino C, Wang R, Augustus M y Lindhal T, 1997, Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding the antomutator enzyme 8-hydroxyguanine-DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:8016-8020.
 - Rosenquist T, Zharkov D y Grollman A, 1997, Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:7429-7434.
 - Roulblevskaia I, Polevoda B, Lublow J y Haake A, 2000, Induced G2/M arrest and apoptosis in human epidermoid carcinoma cell lines by semisynthetic drug Ukrain, *Anticancer Res.* 20:3163-3167.
 - Ruberfroid M y Buc-Caldern P, 1994, Free radicals and oxidation phenomena in biological system, Marcel Dekker Inc. New York, USA. 265pp.
- Ruppert J y Stillman B, 1993, Analysis of a protein-binding domain of p53, *Mol. Cell. Biol.* 13:3811-3829.

- Sakaguchi K, Herrera J, Saito S, Miki T, Bustin M, Vassilev A, Anderson C y Paella E, 1998, DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade, *Genes Dev.* 12:2831-2841.
- Sakamuro D, Sabbatini P, White E y Prendergast G, 1997, The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest, *Oncogene* 15:887-898.
- Scolnick D, Chehab N, Stavridi E, Lien M, Caruso L, Moran E, Berge E y Halazonetis T, 1997, CREB-binding protein and p300/CBP-associated factor are transcriptional coactivators of the p53 tumor suppressor protein, *Cancer Res.* 57:3693-3696.
- Shakov A, Collart M, Vassalli P, Nedospasov S y Jongeneel C, 1990, Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. *J. Exp. Med.*, 171:35-47.
- Shaulsky G, Goldfinger N, Ben-Ze'ev A y Rotter V, 1990, Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis, *Mol. Cell. Biol.* 10:6565-6577.
- Shieh S, Ahn J, Tamai K, Taya Y y Prives C, 2000, The homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites, *Genes Dev.* 14:389-400.
- Shieh S, Ikeda M; Taya Y y Prives C, 1997, DNA damage induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91:325-334.
- Schulze-Osthoff K, Bakker AC, Vanhaesebroeck B, Beyaert R, Jacob WA y Fiers W., 1992, Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions., Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation, *J. Biol. Chem.* 267:5317-5323.
- Slater T, Sawyer B y Straeuli U, 1963, Studies on succinate-tetrazolium reductase systems III. Points of coupling of four different tetrazolium salts, *Biochem. Biophys. Acta* 77:383-393.
- Singhal R, Prasad R y Wilson S, 1995, DNA polymerase beta conducts the gap-filling step in uracil-initiated base excision repair in a bovine testis nuclear extract, *J. Biol. Chem.* 270:949-957.
- Srivastava S, 1990, Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome, *Nature* 348, 747-749.
- Smith R y Baglioni C, 1987, The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J. Biol. Chem.* 262:6951-6954.
- Spies T, Blanck G, Bresnahan M, Sands J y Strominger J, 1989, A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex, *Science*, 243: 214-217.
- Sobol R, Horton J, Kuhn R, Gu H, Singhal R, Prasad R, Rajewsky K y Wilson S, 1996, Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair, *Nature* 379:183-186.
- Soussi T., 1996, The tumor suppressor gene: a model for molecular epidemiology of human cancer, *MOL. MED. TODAY*, January, 32-37.
- Stephen N y Lane D, 1992, Mutant conformation of p53: precise epitope mapping using a filamentous

phage epitope library, *J. Mol. Biol.*, 225:557-583.

- Stommel J, Martchenko N, Jimenez G, Moll U, Hope T y Wahl G, 1999, A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain : regulation subcellular localization and p53 activity by NES masking, *EMBO J.* 18:1660-1672.
- Tang P, Hung M y Klostergaard J., 1996, Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* 35:8216-8225.
- Tang G, Minemoto Y, Dibling B, 2001, Inhibition of JNK activation through NF- κ B target genes, *Nature* 414: 313-317.
- Thornberry NA y Lazebnik Y, 1998, *Caspases enemies within*, *Science* 281: 1312-1316.
- Towbin H, Staehelin T and Gordon J, 1979, Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 (9): 4350-
- Turrens J, Alexandre A y Lehninger A, 1985, Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 237:408-414.
- Unger T, Nau M, Segal S y Minna J, 1992, p53: a transdominant regulator of transcription whose function is ablated by mutations occurring in human cancer, *EMBO J.* 11:1383-1390.
- Valen G, Erl W, Eriksson P, Wuttge D, Paulsson G y Hansson G, 1999, Hydrogen peroxide induces mRNA for tumor necrosis factor alpha in human endothelial cells, *Free Radic. Res.* 31:503-512.
- Venot C, Maratrat M, Dureuil C, Conseiller E, Bracco L y Debussche L, 1998, The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression, *EMBO J.* 17:4668-4679.
- Vousden K y Woude G, 2000, The ins and out of p53, *Nat. Cell. Biol.* 2:E178-E180.
- Walker K y Levine A, 1996, Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:15335-15340.
- Wang Y y Prives C, 1995, Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases, *Nature* 376:88-91.
- Wang X, Vermeulen W, Coursen J, Gibson M, Lupold S, Forrester K, Elmore L, Yeh H, Hoeijmerkers J y Harris C, 1996, The XPB and XPD DNA helicases are components of the p53- mediated apoptosis pathway, *Genes Dev.* 10:1219-1232.
- Winters Z, Ongkeko W, Harris A y Norbury C, 1998, p53 regulates Cdc2 independently of inhibitory phosphorylation to reinforce radiation-induced G2 arrest in human cells, *Oncogenes* 17:673-684.
- Woods D y Vousden K, 2001, Regulation of p53 function, *Exp. Cell. Res.* 264:56-66.
- Yew P y Berk A, 1992, inhibition of p53 transactivation require for transformation by adenovirus early 1B protein, *Nature* 357:82-85.
- Zhang P, 1999, The cellular and development: redundant of cell cycle regulators, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11:655-662.

APÉNDICES

Apéndice A: Cristal Violeta

Se prepara una solución de ácido fórmico 200 mM pH: 6 (ajustar con hidróxido de sodio), y en esta solución se disuelve el cristal violeta al 0.1%, agitándolo hasta disolver por completo, al término de la operación se filtra la solución en papel Watman 3M y se almacena a temperatura ambiente.

Apéndice B: Verseno

La solución de verseno se prepara disolviendo las siguientes sales en 1 litro de agua desionizada:

NaCl	8.0 g
KCl	0.4 g
EDTA	0.2 g
Tris-base	3.04 g

Ajustar pH a 7.7 con HCl, esterilizar por autoclave y almacenar a 4 °C.

Apéndice C: Solución de azul de tripano

Se disuelven las siguientes sales en 100 ml de agua desionizada:

NaCl	810 mg
K ₂ HPO ₄	60 mg
Azul de tripano	400 mg

Después de disolver las sales y el azul de tripano la solución se filtra con una unidad de filtración con poro de membrana de 0.22 μ m y se almacena a temperatura ambiente.

Apéndice D: Extracción de núcleos de células L929 y MCF7 (1 o 2×10^6 cel).
Estuche Cycletest (Roche).

- 1) Despegar células de la superficie de cultivo con tripsina al 0.1% en verseno, neutralizar la tripsina con medio de cultivo con 10% de suero, y centrifugar por 5 min a 1000 rpm.
- 2) Resuspender las células en PBS y centrifugar .
- 3) Resuspender las células en solución amortiguadora de citratos (estuche Cycle test, Roche), y centrifugar.
- 4) Resuspender suavemente las células en el reactivo A, el cual contiene tripsina con una actividad específica alta para romper membrana citoplasmática, incubar por 10 min.
- 5) Agregar el reactivo B y mezclar suavemente con micropipeta, el reactivo contiene un inhibidor de tripsina y RNAsa, incubar por 10 min.
- 6) Agregar el reactivo C y mezclar suavemente con micropipeta, el reactivo contiene yoduro de propidio para teñir el ADN contenido en los núcleos, incubar por 10 min en refrigeración y oscuridad.
- 7) Los núcleos son pasados con una jeringa de 1 ml a través de una malla fina para eliminar agregados.
- 8) Los núcleos son evaluados en un citómetro de flujo en el canal FL2-W y FL2-A a través del programa "cellQuest".

ApéndiceE: Extracción de ARN total de células L929 y MCF7

El ARN se extrajo mediante el método propuesto por Chomczynski y Sachi, utilizando una solución comercial de isotiocianato de guanidinio -fenol (Roche, Ger).

1) Las células se sembraron un día antes a una densidad de 40×10^3 cel/cm² en una caja petri de 100 mm. Posteriormente, las células fueron tratadas por diferentes periodos de tiempo con TNF- α , al término del cual fueron lavadas 2 veces con PBS y se lisaron con 500 μ l de solución de isotiocianato de guanidinio -fenol.

2) La lisis celular fue raspada con un gendarme y se colectó en un tubo para microcentrífuga .

3) Al lisado celular se le agregó 100 μ l de cloroformo para realizar una extracción orgánica, y separar el ADN y las proteínas. El tubo de microcentrífuga es agitado por vortex y centrifugado a 14000 rpm durante 15 min.

4) La fase acuosa (superior e incolora) fue retirada cuidadosamente del tubo y colocada en un tubo nuevo. La fase acuosa fue mezclada con 250 μ l de isopropanol para precipitar el ARN, se incubó por 15 min y fue centrifugada a 14000 rpm .

5) Se retiró el sobrenadante y el precipitado fue lavado con 500 μ l de etanol al 75%. Se realizó una breve agitación por vortex y se centrifugó por 15 min a 14000 rpm.

6) Se retiró el sobrenadante casi en su totalidad y se evaporó el resto de etanol en una campana de flujo laminar por 30 min.

7) El precipitado fue resuspendido en 30 μ l de agua esteril tratada con DEPC (dietil piro carbonato al 0.2%).

8) El ARN total fue cuantificado por espectrofotometría y por geles desnaturalizantes de agarosa al 1.2 % (formaldehído-agarosa).

Apéndice F: Solución amortiguadora de MOPS

Se preparó una solución concentrada de MOPS 10X, la cual contiene lo siguiente:

MOPS	41.8g
Acetato de sodio 3M	16.6 ml
EDTA 0.5M pH 8	20 ml

Disolver las sales en 800 ml de agua desionizada tratada con DEPC (0.2%), ajustar pH a 7.0, y llevar a 1litro, esterilizar por autoclave, y almacenar los frascos a temperatura ambiente aislado de la luz o tapado con papel aluminio.

Apéndice G: Solución de hibridación

Se realizó la siguiente mezcla a partir de soluciones concentradas :

Denhardt (100X)	200µl
SSC (20X)	2.5ml
Formamida desionizada	5.0ml
SDS (10%)	100µl
ADN de salmón	120µl
H2O –DEPC (0.2%)	2.08ml

La mezcla se hirvió durante 5min en baño de agua, se enfrió en hielo y se agregó a las membranas.

Soluciones concentradas:

Denhardt 100X (2 g de albumina, 2 g de ficoll 400 y 2 g de polivinilpirrolidona en 100ml de agua desionizada).

SSC 20X (citrato de sodio 0.3 M, cloruro de sodio 3M, pH: 7.0)

ADN de esperma de salmón (10 mg/ml)

Apéndice H: Solución amortiguadora de lisis para proteínas

La solución de lisis puede ser preparada a partir de soluciones más concentradas para facilitar su preparación, las concentraciones finales de sus componentes fueron las siguientes:

Tris-HCl pH: 8.0	50 mM
NaCl	120 mM
NaF	100 mM
NaVO ₅	200 μ M
NP40	0.5%

La solución una vez preparada se almacenó a 4 °C, y los inhibidores se agregaron al momento de la lisis celular, y fueron los siguientes:

Aprotinina	10 μ g/ml
PMSF	1 mM (stock 100 mM)
Leupeptina	10 μ g/ml