

70
490

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA MEDICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE MEDICINA- UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**ASPECTOS MOLECULARES DE LA ACCIÓN DEL
ÓXIDO NÍTRICO COMO MEDIADOR DE LA
APOPTOSIS INDUCIDA POR CITOCINAS EN
CÉLULAS SECRETORAS DE INSULINA**

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
BIBLIOTECA GENERAL
13
179
28 ABR. 1999

Julio Cesar Bernabe Ortiz

Tesis presentada por :
JULIO CESAR BERNABE ORTIZ
Para optar el grado de
Doctor en Biología

Sevilla - España

1999

R. 18.543



ASPECTOS MOLECULARES DE LA ACCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO
COMO MEDIADOR DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR CITOCINAS
EN CÉLULAS SECRETORAS DE INSULINA

Autor: Julio César Bernabé Ortiz

Director: Francisco J. Bedoya Bergua

Sevilla, Abril de 1999



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR

AVDA. SANCHEZ PIZJUAN, 4
41009 SEVILLA

**D. FRANCISCO JAVIER BEDOYA BERGUA, PROFESOR TITULAR
DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA,**

CERTIFICA: Que **D. JULIO CÉSAR BERNABÉ ORTIZ** ha
realizado bajo mi dirección la tesis doctoral titulada
“ASPECTOS MOLECULARES DE LA ACCIÓN
DEL ÓXIDO NÍTRICO COMO MEDIADOR DE
LA APOPTOSIS INDUCIDA POR CITOCINAS
EN CÉLULAS SECRETORAS DE INSULINA”

Y para que conste y surta los efectos oportunos,
expido el presente en Sevilla, a 14 de abril de 1999.

EL DIRECTOR DE TESIS

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'F. Bedoya'.

**A MI MADRE Y
A LA MEMORIA DE MI PADRE**

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1.	Apoptosis	3
2.	Apoptosis en <i>C.elegans</i> y su homología en mamíferos	4
3.	La maquinaria apoptótica	5
3.1.	Señalización	5
3.1.1.	Señalización por el receptor CD95	5
3.1.2.	Señalización por el receptor TNFR1	6
3.1.3.	Señalización por el receptor DR3	8
3.1.4.	Señalización por los receptores DR4 o DR5	8
3.2.	Control y ejecución	10
3.3.	Alteraciones estructurales o fase terminal	11
3.3.1.	Daño al ADN	11
3.3.2.	Desmonte de la lámina nuclear	11
3.3.3.	Formación de vesículas citoplasmáticas y cuerpos apoptóticos	12
3.3.4.	Otros cambios	12
4.	Fagocitosis de las células apoptóticas	13
5.	Proteínas más importantes que participan en la apoptosis	14
5.1.	Proteínas de la familia de la Bcl-2	14
5.2.	Proteínas de la familia de las caspasas	18
5.2.1.	Clasificación de las caspasas	19
5.2.2.	Proteínas blanco de las caspasas	19
6.	Óxido nítrico	22
6.1.	Síntesis de óxido nítrico en las células	22
6.2.	El óxido nítrico como regulador de la apoptosis	23
6.3.	Mecanismo molecular de la acción del óxido nítrico	24
7.	Papel de las enzimas de las vías MAPK en la transducción de señales en la apoptosis	26
8.	Papel de la apoptosis de la célula β en la etiopatogenia de la diabetes dependiente de insulina	27

OBJETIVOS	29
MATERIAL Y MÉTODOS	
1. Material	35
2. Métodos	36
2.1. Cultivo de las células RINm5F	36
2.2. Exposición de las células a inductores	37
2.3. Estudios con inhibidores	37
2.4. Determinación de los nitritos	38
2.5. Determinación de la viabilidad celular	39
2.6. Observación de la morfología nuclear por microscopía de fluorescencia	40
2.7. Cuantificación de la fragmentación nucleosomal del ADN por el método de ELISA	41
2.8. Cuantificación de las células apoptóticas por el método de TUNEL	42
2.9. Determinación de las proteínas	43
2.10. Extracción y aislamiento del ADN	44
2.11. Visualización de la fragmentación del ADN nucleosomal en gel de agarosa	46
2.12. Lisis de las células para el análisis de las proteínas iNOS, PARP y Bcl-2	46
2.13. Electroforesis de las proteínas en gel de poliacrilamida	48
2.14. Transferencia de las proteínas a membranas de PVDF	49
2.15. Incubación con los anticuerpos “immunoblotting”	50
2.16. Revelado de las bandas proteicas	50
2.17. Transfección de las células RINm5F	51
2.18. Expresión y purificación de la proteína de fusión GST-ATF2	52
2.19. Medida de la actividad cinasa de la ERK y la JNK	55
2.20. Inmunoprecipitación de la Bcl-2	57
2.21. Medida de la actividad de la caspasa-3	58

RESULTADOS

1.	Efecto de las citocinas sobre la producción de óxido nítrico en células RINm5F	61
2.	Efecto de las citocinas sobre la viabilidad celular	64
3.	Estudio de la fragmentación del ADN y de la morfología nuclear en células expuestas a las citocinas	64
4.	Cuantificación de la acción apoptótica de las citocinas por citometría de flujo	71
5.	Efecto de la inhibición de la caspasa-3 sobre la fragmentación del ADN inducida por las citocinas	71
6.	Papel del óxido nítrico en la degradación del ADN inducida por las citocinas	74
7.	Efecto de las citocinas y del óxido nítrico sobre la degradación de la PARP	76
	7.1. Degradación de la PARP inducida por las citocinas	76
	7.2. Degradación de la PARP inducida por el SNP	77
8.	Efecto de las citocinas y del óxido nítrico sobre la presencia de la proteína Bcl-2 en las células	80
	8.1. Efecto de las citocinas y el SNP	80
	8.2. Efecto del óxido nítrico sobre la fosforilación de la Bcl-2	83
9.	Participación de la isoenzima PI3K γ en la acción del NO	86
10.	Efecto del NO sobre la activación de las enzimas MAPK	90
	10.1. Actividad de la ERK y la JNK en células RINm5F expuestas al SNP	90
	10.2. Relación entre la activación de la caspasa-3 y la activación de las enzimas MAPK	98
	10.3. Relación entre la liberación de citocromo c y la activación de las enzimas MAPK	100

DISCUSIÓN	103
CONCLUSIONES	115
RESUMEN	119
BIBLIOGRAFÍA	121

INTRODUCCIÓN

1. APOPTOSIS

El término apoptosis fue acuñado por Kerr (1) y hace alusión a la analogía encontrada con la caída de las hojas de los árboles en otoño (del griego **apo**: lejos de y **ptosis**: caer). Este fenómeno es una forma de muerte celular regulada “muerte celular programada” que utiliza el organismo para eliminar células innecesarias o superfluas (2, 3). La apoptosis se caracteriza por ciertos cambios en la morfología celular como son la constricción citoplasmática, la condensación de la cromatina, la vesiculación de la membrana y la generación de cuerpos apoptóticos que rápidamente son fagocitados y digeridos por células adyacentes (1, 4-7). Por otra parte, durante el proceso apoptótico el ADN nuclear se escinde en fragmentos de 200 pb o múltiplos de éstos, que pueden ser visualizados por electroforesis como una degradación del ADN “en escalera”.

Este proceso apoptótico juega un papel importante en la homeostasis celular durante el desarrollo en los organismos animales (1) y su alteración puede producir un desarrollo anormal del organismo o manifestarse en forma de una enfermedad (8, 9).

La muerte por apoptosis se distingue de la muerte por necrosis en que la **necrosis** ocurre en una situación patológica y tiene como consecuencia una reacción inflamatoria en el tejido afectado. Normalmente la necrosis ocurre en muchas células que se encuentran próximas entre sí, tiene lugar a lo largo de días y el volumen celular aumenta antes de su ruptura. En cambio, la **apoptosis** puede ocurrir tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (desarrollo embriológico, recambio celular, desarrollo de tumores, etc.) y no tiene como consecuencia la reacción inflamatoria del tejido adyacente. La apoptosis puede ocurrir en una única célula aislada y además suele tener lugar en períodos de horas y contrariamente a la necrosis, una célula apoptótica disminuye su tamaño hasta un tercio de su volumen inicial (10).

2. APOPTOSIS EN *C. elegans* Y SU HOMOLOGÍA EN MAMÍFEROS

El proceso de muerte por apoptosis es el resultado de una interacción compleja entre los factores desencadenantes que pueden ser fisiológicos o generados en respuesta a daños en varias partes de la célula y los sistemas moleculares encargados de llevar a cabo la destrucción celular.

El diseño básico del funcionamiento de la maquinaria apoptótica fue elaborado en base a los estudios realizados en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (11-13). La muerte celular ocurrida durante el desarrollo de este verme involucra a las moléculas CED-3 (*Caenorhabditis elegans* death-3) y CED-4 (*Caenorhabditis elegans* death-4). Así mismo, se observó que la proteína CED-9 (*Caenorhabditis elegans* death-9) actúa como un inhibidor de este proceso y por lo tanto protege a las células de la muerte. Evidencias genéticas muestran que la CED-9 actúa como un inhibidor de la proteína CED-4 para prevenir la actividad inductora de muerte de la CED-3 (14, 15), puesto que la CED-4, cuando se encuentra libre (sin interactuar con otras proteínas), promueve el autoprosesamiento de la CED-3. Cada una de estas moléculas tiene su equivalente funcional en mamíferos; por ejemplo, la CED-3 que es una proteasa con cisteína en su sitio activo, tiene como homóloga a toda una familia de más de 12 miembros presentes en mamíferos que reciben el nombre genérico de caspasas (cysteine-containing **asp-ases**)(16). Por otro lado, la CED-9 se corresponde en mamíferos con una familia de muchos miembros que tiene como prototipo a la proteína Bcl-2 (**B-cell leukemia/lymphoma-2**)(17) y tienen función de regular la muerte celular apoptótica (15, 18). El equivalente a la proteína CED-4 en mamíferos es la proteína Apaf-1 (apoptosis-activating factor 1) (19, 20).

3. LA MAQUINARIA APOPTÓTICA

El modelo que describe la apoptosis en las células agrupa las transformaciones que tienen lugar en tres etapas o fases: A) Señalización, B) Control y ejecución y C) Fase terminal (12).

3.1. SEÑALIZACIÓN

El primer receptor de señalización de apoptosis que ha sido identificado en la superficie de linfocitos activados se denominó CD95, conocido también como Apo-1 o Fas, y actualmente está muy bien caracterizado (21).

3.1.1. Señalización por el receptor CD95

CD95 forma parte de la familia de receptores que reconocen al factor de necrosis tumoral (TNF) y a moléculas afines. La unión de los ligandos desencadena la trimerización del receptor, permitiendo de esta forma el reclutamiento inmediato de proteínas junto al receptor para formar un complejo denominado DISC (death initiating signalling complex). El extremo C-terminal del CD95 contiene una secuencia de aminoácidos denominada DD (death domain), que se une a una secuencia similar del extremo C-terminal de otra proteína llamada FADD (Fas-associated death domain). Ésta, a su vez contiene en su extremo N-terminal una secuencia llamada DED (death effector domain), que se une a una región homóloga N-terminal de una tercera proteína FLICE (Fas-activated protein like ICE)/caspasa 8 que tiene su extremo C-terminal homólogo al resto de las caspasas y puede autoactivarse (22, 23). De esta manera, un receptor de superficie conecta la señal con el sistema de control y ejecución de la apoptosis por medio de una vía independiente de la transcripción (Fig.1).

3.1.2. Señalización por el receptor TNFR1

El TNF, producido por macrófagos activados y células T en respuesta a una infección, es reconocido por el receptor 1 para el TNF (TNFR1), que inicia la señal apoptótica. El TNFR1 posee un dominio de muerte que se une a unas proteínas llamadas TRADD (TNFR-associated death domain), las cuales se encargan de unir, vía FADD, a FLICE y caspasa-2. TNFR1 también contiene un segundo dominio que en asociación con adaptadores como TRAF2 (TNFR-associated factor 2) y RIP (receptor interacting protein), estimula las vías que conducen a la activación de NF- κ B (factor nuclear κ B) y la JNK(c-Jun N-terminal kinase)/AP-1 activándose finalmente genes proinflamatorios e inmunomoduladores. Generalmente, el TNF no produce la apoptosis a no ser que la síntesis de proteínas esté bloqueada. Esto implica la existencia de genes supresores de la apoptosis cuya expresión probablemente esté regulada por el NF- κ B y la JNK. La estimulación de la JNK depende de la activación en cascada de las cinasas MAPK (mitogen-activated protein kinase), MEKK1 (MAPK/ERK kinase kinase 1), JNKK (JNK kinase) y JNK, pero su mecanismo y conexiones exactas no están del todo claras (24). La estimulación del NF- κ B está mediada por NIK (NF κ B-inducing kinase), IKK (inhibitor of κ B kinase), I- κ B (inhibitor of κ B) y finalmente la translocación del NF- κ B al núcleo para la activación de la transcripción e inhibición de la apoptosis (Fig. 1).

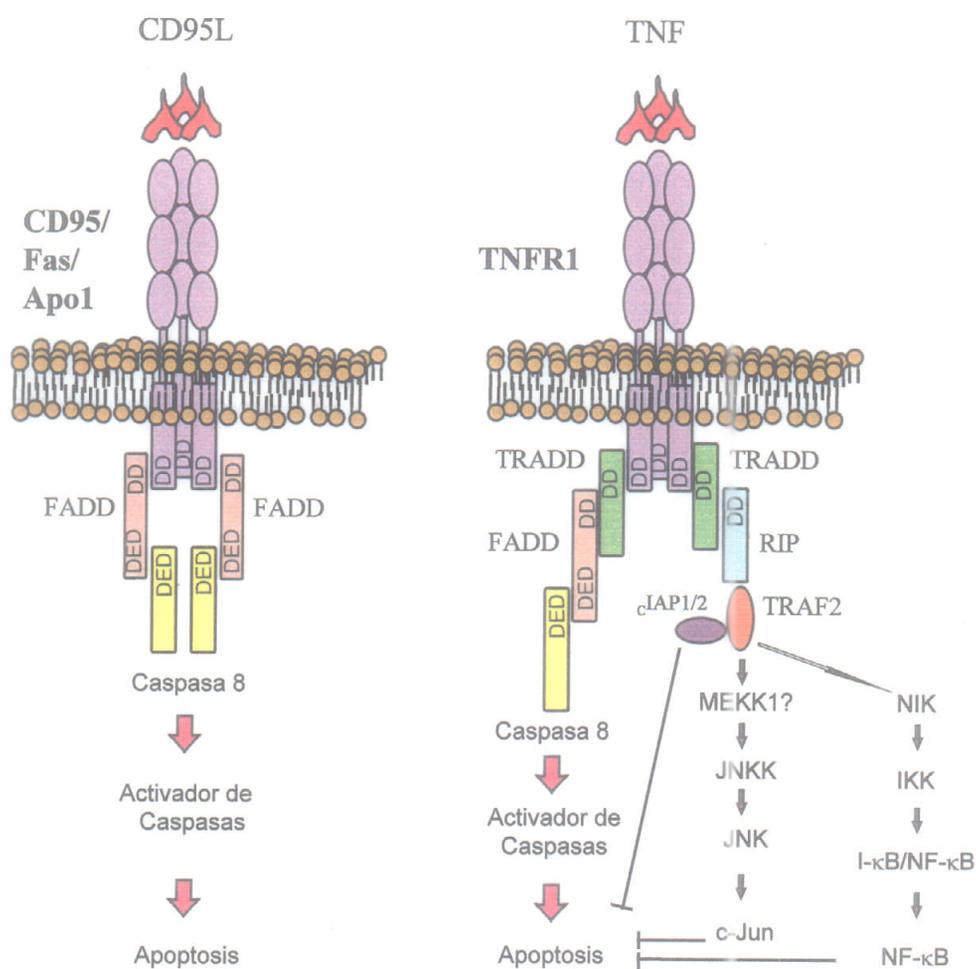


Fig. 1 Señalización de la apoptosis modulada por los receptores CD95 y TNFR1

3.1.3. Señalización por el receptor DR3

Este receptor tiene una estructura similar al TNFR1 y tiene como ligando a la proteína Apo3L (Apo3 ligand). La activación del DR3 (death receptor 3/Apo 3) produce la activación del factor de transcripción NF- κ B a través de TRADD, TRAF2, RIP y NIK. Por otro lado, activa la apoptosis a través de TRADD, FADD y de la caspasa-8.

El mecanismo de señalización por el DR3 es muy similar al de TNFR1 para la activación del NF- κ B y la apoptosis; sin embargo, existe una notable diferencia en cuanto a la expresión de sus ligandos y receptores. La expresión de TNF ocurre fundamentalmente en macrófagos activados y linfocitos; sin embargo, el ARNm de Apo3L se expresa constitutivamente en la mayoría de tejidos. Mientras que el del TNFR1 se expresa ubicuamente (25); el DR3 está presente en bazo, timo y sangre periférica y se induce por la activación de las células T.

3.1.4. Señalización por los receptores DR4 o DR5

El ligando del DR4 (death receptor 4) y DR5 (death receptor 5) es la proteína Apo2L, denominado también TRAIL. Su capacidad de activar la caspasa es al parecer independiente de FADD, como lo demuestran los experimentos realizados en ratones deficientes en FADD, en los que se encontró una resistencia a la apoptosis inducida por activación del CD95, del TNFR1 y del DR3, pero no a la apoptosis inducida por activación del DR4 (26, 27). Todavía no se han identificado las moléculas que desencadenan el proceso apoptótico tras la activación de los receptores DR4 y DR5 (Fig. 2).

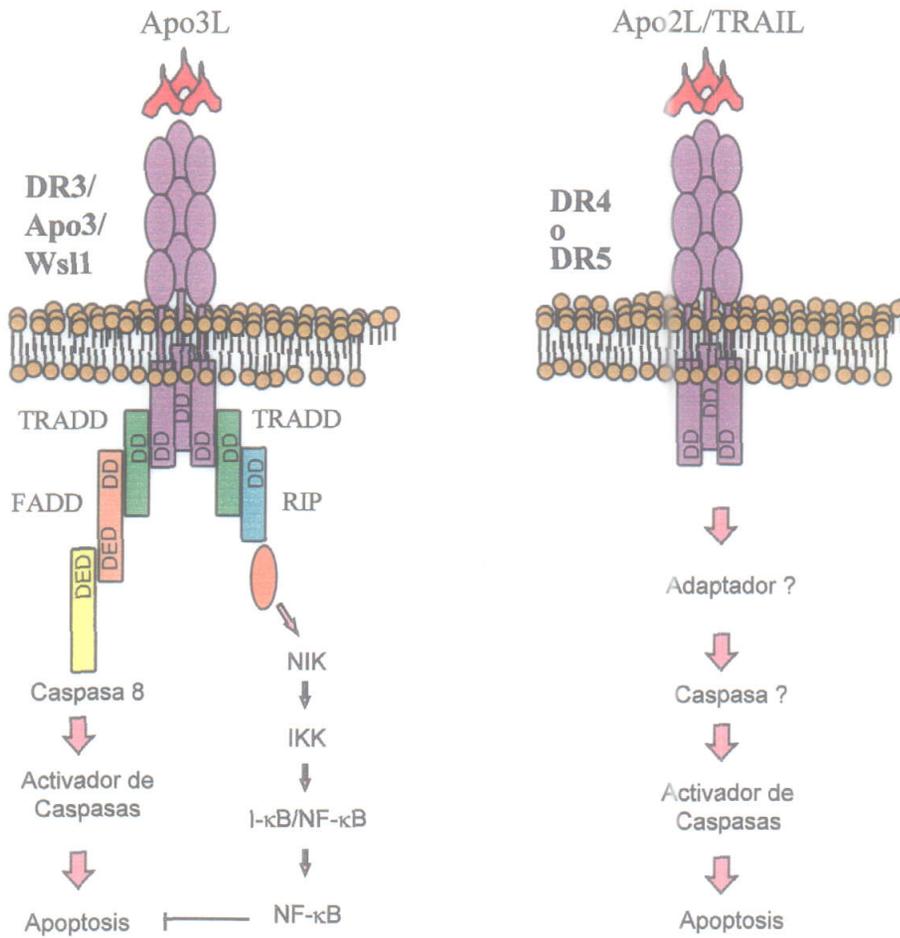


Fig. 2 Señalización de la apoptosis modulada por los receptores DR3, DR4 y DR5



3.2. CONTROL Y EJECUCIÓN

En esta etapa participan los siguientes componentes: CED-3/Caspasa, CED-9/Bcl-2, CED-4/Apaf-1 y la mitocondria.

Las caspasas se producen por degradación de zimógenos (procaspasas) en un sistema de activación en cascada. Esto sucede por ejemplo con las caspasas 3, 6 y 7 (28).

Otra forma de activación de las caspasas es a través de un aumento de la concentración de procaspasas junto a un receptor de membrana activado. En esta agregación, la baja actividad proteásica inherente a la procaspasa es suficiente para facilitar la activación proteolítica y convertir la procaspasa en caspasa activa. Este fenómeno ha sido descrito en la activación de la caspasa-8 (29). Esta activación está regulada por moléculas como la CED-4/Apaf-1, que se encargan de la regulación de la concentración local de las procaspasas, a través de su interacción con éstas. La CED-4 debe oligomerizarse y unirse además a la proCED-3 para su activación; pero cuando la CED-4 se encuentra unida a la CED-9, pierde esta capacidad evitando así la activación de la CED-3 (30).

Similarmente, el Apaf-1 promueve la activación de la procaspasa-9 en el apoptosoma (que está compuesto por citocromo c citosólico, el Apaf-1 y la procaspasa-9), pero esta activación puede ser bloqueada si el Apaf-1 interacciona con la Bcl-2. El citocromo c liberado de la mitocondria juega un papel fundamental en la regulación de la etapa de ejecución de la apoptosis de células de mamíferos. El grupo de investigación en el que he llevado a cabo este trabajo está estudiando el mecanismo por el que la Bcl-2 regula la salida del citocromo c de la mitocondria.

3.3. ALTERACIONES ESTRUCTURALES O FASE TERMINAL

3.3.1. **Daño al ADN**

La fragmentación de los nucleosomas es el resultado de la activación de endonucleasas mediante la inactivación de sus inhibidores. Por ejemplo, la degradación de la proteína I^{CAD} (inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease)/DFF45 hace que la nucleasa CAD se active produciendo una fragmentación del ADN característica (31, 32). Algunos autores describen la aparición de fragmentos de ADN de gran tamaño 50000-300000 pb, sugiriendo que serían los precursores de fragmentos más pequeños (33) y por lo tanto se encontrarían en la fase iniciadora de la apoptosis. Otros investigadores han encontrado un único fragmento de ADN que sería la primera señal de la inducción del proceso apoptótico (34, 35). En cualquier caso, el tamaño de los fragmentos estaría relacionado con el avance del proceso y los dominios de cromatina unidos a la matriz nuclear.

3.3.2. **Desmante de la lámina nuclear**

La lámina nuclear es una estructura rígida que mantiene la forma y la consistencia de la membrana nuclear y además está involucrada en la organización de la cromatina. Dos de sus proteínas estructurales, las lamininas A y B son degradadas por las caspasas, causando así el colapso de la organización de la membrana nuclear y contribuyendo a la condensación de la cromatina (36).

3.3.3. Formación de vesículas citoplasmáticas y cuerpos apoptóticos

Este proceso ha sido estudiado mediante microscopía electrónica en diferentes tipos de células (37, 38). La formación de cuerpos apoptóticos involucra una marcada condensación tanto del núcleo como del citoplasma, una fragmentación de la membrana nuclear y la separación de protuberancias formadas en la superficie celular, a manera de vesículas, que se fragmentan finalmente en cuerpos apoptóticos que contienen citosol y restos de orgánulos con o sin restos de cromatina en su interior (1). Luego la célula se desprende de sus células vecinas para fragmentarse posteriormente.

3.3.4. Otros cambios

En la apoptosis tiene lugar además otros procesos como son: la degradación de la proteína antiapoptótica Bcl-2, la degradación de proteínas del citoesqueleto y la disociación de proteínas que participan en la reparación y replicación del ADN y en el procesamiento del ARNm (28, 39).

4. FAGOCITOSIS DE LAS CÉLULAS APOPTÓTICAS

En todos los tipos de células estudiadas, la mayoría de los cuerpos apoptóticos han sido encontrados en el citoplasma de células intactas que son fagocitadas rápidamente. Por lo tanto, las células apoptóticas tienen que sufrir cambios a nivel de la membrana plasmática para que puedan ser reconocidas por las células fagocíticas (histiocitos, macrófagos o células epiteliales adyacentes) (1).

Este reconocimiento por los fagocitos es la etapa final y común del proceso apoptótico en muchas células. El mecanismo mediante el cual los fagocitos reconocen, ingieren y degradan las células muertas por apoptosis es aparentemente complejo y muy poco conocido. Un cambio descrito a nivel de la membrana plasmática es la presencia de fosfatidilserina (PS) sobre su superficie externa (40, 41). La PS, que normalmente se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática, aparece en la cara externa como resultado de la disminución de la actividad de una aminofosfolípido translocasa y de la activación de una enzima que promueve el desplazamiento de la PS hacia la cara externa. Los receptores que reconocen la PS en células apoptóticas no han sido completamente caracterizados hasta el momento presente. Sin embargo, muchos candidatos han sido propuestos; entre éstos se incluyen: los receptores "scavenger" clase B (en especial el CD36), un receptor para la LDL oxidada (CD68), CD14, anexina, β 2-glicoproteína I y gas6.

Queda por establecer si la PS, el único ligando reconocido por los fagocitos, está asociado con otras moléculas para formar un ligando mas complejo (40, 42).

5. PROTEÍNAS MAS IMPORTANTES QUE PARTICIPAN EN LA APOPTOSIS

5.1. PROTEÍNAS DE LA FAMILIA Bcl-2

Utilizando técnicas de inmunoprecipitación y de rastreo de doble híbrido en levadura se han identificado hasta ahora 15 proteínas relacionadas con la Bcl-2. Todas ellas poseen por lo menos uno de los cuatro motivos conservados en Bcl-2 que se denominan dominios BH (Bcl-2 Homology). El prototipo de la familia es la proteína Bcl-2 que presenta los cuatro dominios: BH1, BH2, BH3 y BH4.

Mediante estudios mutacionales se ha establecido que los dominios BH son las regiones responsables de la formación de dímeros. Adams and Cory (43) agrupa a los miembros de esta familia en 3 subfamilias (Tabla 1):

- Subfamilia Bcl-2
- Subfamilia Bax y
- Subfamilia BH3

Tabla 1. Clasificación de los miembros de la familia Bcl-2

Nombre	Dominios	Anclaje a membrana	Función
Subfamilia Bcl-2			
Bcl-2	BH4, BH3, BH1 y BH2	sí	antiapoptótica
Bcl-x _L	BH4, BH3, BH1 y BH2	sí	antiapoptótica
Bcl-w	BH4, BH3, BH1 y BH2	sí	antiapoptótica
Mcl-1	BH3, BH1 y BH2	sí	antiapoptótica
A1	BH1 y BH2	no	antiapoptótica
Subfamilia Bax			
Bax	BH3, BH1 y BH2	sí	proapoptótica
Bak	BH3, BH1 y BH2	sí	proapoptótica
Bok	BH3, BH1 y BH2	sí	proapoptótica
Subfamilia BH3			
Bik	BH3	sí	proapoptótica
Blk	BH3	sí	proapoptótica
Hrk	BH3	sí	proapoptótica
BNIP3	BH3	sí	proapoptótica
Bim _L	BH3	sí	proapoptótica
Bad	BH3	no	proapoptótica
Bid	BH3	no	proapoptótica

Tomado y modificado de Adams y Cory, 1998 (43).

La subfamilia Bcl-2, relacionada con la supervivencia de las células, contiene al menos dos dominios BH de los cuatro que contiene Bcl-2.

- a) **Bcl-2.-** Fue identificada por primera vez en ciertos linfomas de células B que expresan cantidades elevadas de esta proteína. Esta alteración produce una inhibición de la apoptosis, demostrando así que la vía de la generación de tumores depende no sólo de la capacidad de escapar del control de crecimiento, sino que también depende de la capacidad de bloquear la apoptosis (44).

El gen *bcl-2* codifica una proteína integral de membranas intracelulares con un peso molecular de 26 kD. La proteína Bcl-2 se localiza predominantemente en la cara externa de la mitocondria, en la membrana nuclear y en el retículo endoplasmático (45). El extremo C-terminal de la proteína contiene los 21 aminoácidos hidrofóbicos necesarios para la inserción en las membranas y para la regulación de la apoptosis.

Los análisis mutacionales en los dominios BH1 o BH2 de la Bcl-2 han demostrado que éstos son importantes para que esta proteína pueda formar homo- o heterodímeros, necesarios para su función protectora. La Bcl-2 puede heterodimerizarse con proteínas relacionadas o no con la familia Bcl-2, como Bax (46), Bak y Bik, anulando de este modo su efecto proapoptótico.

Se ha observado que la proteína 53BP2 (p53-binding protein), que se caracteriza por unirse a la p53, se une a la Bcl-2. Por lo tanto, la 53BP2 podría participar en la acción bloqueadora de la Bcl-2 sobre la p53 (47).

La composición de los dímeros (hetero- u homodímeros) de proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas parece que determina la represión ó inducción de la apoptosis. Por otro lado, no está claro si todas las interacciones posibles tienen lugar en todas las células. La formación de dímeros se regula por mecanismos

postraduccionales como la fosforilación /desfosforilación (48, 49) que son dependientes de las vías MAPK y JNK (50). Por ejemplo, la fosforilación de la Bcl-2 evita su dimerización con la proteína Bax, inclinando el equilibrio hacia la apoptosis (51).

Guan et al. (1996) demostraron recientemente que la Bcl-2 se fosforila en siete residuos de serina. Esta evidencia es el inicio de muchos estudios para buscar la participación de cinasas/fosfatasa en la modulación de la función de “aduanas mitóticas” de la Bcl-2 (52).

- b) **Bcl-x_L**.- Ésta es otra proteína antiapoptótica muy semejante a la Bcl-2 y contiene los cuatro dominios BH presentes en la Bcl-2. Es capaz de formar poros en orgánulos como la mitocondria y necesita el dominio BH4 para su actividad. Se ha descrito que la Bcl-x_L puede unirse al Apaf-1 en una región necesaria para unirse a la procaspasa-9, inhibiendo de esta forma la asociación entre el Apaf-1 y la procaspasa-9.
- c) **Bax**.- Fue una de las primeras proteínas homólogas de la Bcl-2 descritas y fue aislada como una proteína unida a la Bcl-2 cuando ésta se inmunoprecipitaba. Contiene 3 dominios, BH1, BH2 y BH3, además del extremo C-terminal que es un dominio transmembrana. Experimentos de sobreexpresión de la Bax demostraron que esta proteína induce la apoptosis y puede antagonizar el efecto protector de la Bcl-2 (46). Análisis mutacionales de la Bax y de la Bcl-2 han establecido que los dominios BH conservados son los responsables de que estas proteínas puedan homo- o heterodimerizarse y que la Bcl-2 deba su efecto antiapoptótico a su unión a la Bax; de igual forma, las mutaciones en los dominios BH de la Bcl-2 afectan su interacción con otras proteínas diferentes a los miembros de la familia (46, 53).
- d) **Bak**.- La apoptosis en las células no es controlada sólo por la interacción de la Bcl-2 con la Bax. Recientemente otros miembros de la familia han sido clonados y son

muy parecidos a bax, puesto que inducen apoptosis en las células. El gen llamado bak, expresa una proteína proapoptótica, pero pierde este efecto al unirse a otra proteína antiapoptótica (54).

- e) **Bok.-** Se ha encontrado que esta proteína interactúa con Mcl-1 y la proteína viral BARTF1, pero no interactúa con Bcl-2, Bcl-x_L o Bcl-w.

- f) **BH3.-** Las siete proteínas agrupadas en esta subfamilia se caracterizan por poseer tan sólo el dominio BH3. Este dominio presente en los miembros de esta familia, es el antagonista fisiológico de las proteínas antiapoptóticas. En este grupo, por ejemplo, la Bid es promiscua y puede unirse a la Bax y la Bak así como a proteínas antiapoptóticas, pero las otras seis se unen solamente a ciertos inhibidores de la apoptosis; demostrándose que la heterodimerización de las proteínas de este grupo, a través de su dominio BH3, es esencial para poder cumplir su función (43, 55, 56). La Bik también es una proteína proapoptótica (57) y su función parece ser dependiente de la unión a la Bcl-2 o a la Bcl-x_L. La proteína Bik podría actuar anulando la función de la proteína Bcl-2 de una manera competitiva.

5.2. PROTEÍNAS DE LA FAMILIA DE LAS CASPASAS

Las caspasas son las proteínas ejecutoras de la apoptosis y se caracterizan por su absoluta especificidad para cortar péptidos por el lado C-terminal de un residuo de Asp dentro de una secuencia específica de 4 aminoácidos.

El descubrimiento de que CED-3, el producto de un gen necesario para la muerte celular por apoptosis en *C. elegans*, está relacionado con una cisteína proteasa en mamíferos, denominada ICE (interleukin-1 β converting-enzyme)/Caspasa-1, ha desencadenado una serie de estudios sobre el papel de las proteasas en la apoptosis. Hasta la fecha se han identificado diez caspasas en humanos. Estas enzimas son sintetizadas en forma de

proenzimas y requieren un procesamiento proteolítico para su activación y participación, tanto en la etapa de señalización como en la de ejecución de la apoptosis. El hecho de que la función de las caspasas pueda ser bloqueada por inhibidores selectivos permitirá en un futuro su aplicación en el tratamiento de enfermedades que resultan de una muerte celular por apoptosis (28, 58).

5.2.1. Clasificación de las caspasas

Las caspasas pueden ser tentativamente agrupadas en dos subfamilias, la ICE y la CED-3 (Tabla 2). Todos los miembros de la familia son sintetizados como proenzimas y son proteolíticamente procesados en sitios Asp-X para generar un heterodímero que es la forma activa de las caspasas. Todas las caspasas presentan en el sitio activo la secuencia de aminoácidos QACXG, donde X puede ser: R, Q o G.

5.2.2. Proteínas blanco de caspasas

En la Tabla 3, se muestra las proteínas conocidas como sustratos de caspasas, entre las que se incluyen la PARP, la laminina B y la histona H1 (59). El número de proteínas identificadas como blanco de caspasas es cada vez mayor y en todos los casos la hidrólisis se produce después del aminoácido aspártico.

Tabla 2. Clasificación de las caspasas

Subfamilia	Nombre	Otros nombres	Sitio activo
ICE			
	Caspasa-1	ICE	QACRG
	Caspasa-4	ICE II, TX, ICH-2	QACRG
	Caspasa-5	ICE III, TY	QACRG
	Caspasa-2*	Nedd2, ICH-1	QACRG
	Caspasa-3	CPP32, Yama, Apopain	QACRG
CED-3			
	Caspasa-6	Mch2	QACRG
	Caspasa-7	Mch3, ICE-LAP3, CMH-1	QACRG
	Caspasa-8	MACH, FLICE, Mch5	QACQG
	Caspasa-9	ICE-LAP6, Mch6	QACGG
	Caspasa-10	Mch4	QACQG

(*) Cohen agrupa a esta caspasa como miembro de una tercera subfamilia, ICH-1 (60).



Tabla 3. Proteínas celulares degradadas por las caspasas en la apoptosis

Proteína blanco	Sitio de hidrólisis	Caspasa	Función de la proteína blanco
PARP ¹	DEYD-G	3 y 7	Reparación del ADN
U1-70KDa ²	DGPD-G	3	Procesamiento del ARN
DNA-PK _{cs} ³	DEVN-N	3	Reparación de brechas en ADN de doble cadena
SREBP	DEPD-S	3 y 7	Proteína que se une a elemento regulado por esterol
D4-GD1	DELD-S	3	Regulador de Rho (GTPasa)
PKC- δ	DMQD-N	3	Degradado a su forma activa en apoptosis
Pro-IL1 β	YVHD-A	1	Degradada a citocina activa
C1 y C2 ⁴	?	3 y 7	Procesamiento de pre-ARNm
Laminina A y B	VEID-N	6	Mantenimiento de forma de membrana nuclear
Gas2	SRVD-G	?	Componente del sistema microfilamento
Fodrina	DETD-S	?	Estructura del citoesqueleto asociado a membrana
G-actina	LVVD-N	?	Estructura del citoesqueleto
NuMa	?	?	Mantiene la estructura nuclear

(1) Poli(ADP-ribosa)polimerasa

(3) Proteína cinasa ADN dependiente

(2) 70kda U1 pequeña ribonucleoproteína

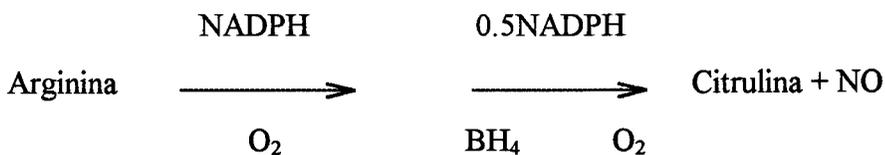
(4) Proteína heterorribonuclear

6. ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico (NO) es un radical libre de nitrógeno, relativamente inestable en condiciones aeróbicas, que ha sido identificado en estos últimos años como un potente mediador citotóxico y como mensajero químico en diferentes tejidos (61). Así, actúa como neurotransmisor en el SNC (sistema nervioso central), como vasodilatador y como efector citotóxico en la defensa inmunitaria (62). La función citotóxica del NO en la autoinmunidad fue propuesta en 1991 y posteriormente se ha identificado como un mediador de la destrucción de células productoras de insulina por macrófagos activados (63).

6.1. SÍNTESIS DE ÓXIDO NÍTRICO EN LAS CÉLULAS

Está establecido que el óxido nítrico se genera por oxidación de uno de los nitrógenos del grupo guanidinio de la L-arginina con formación de 1 mol de L-citrulina, utilizándose el oxígeno molecular como fuente de los átomos de oxígeno de las moléculas de L-citrulina y NO formadas (64). La reacción está catalizada por una enzima denominada sintasa del óxido nítrico (NOS) que utiliza el NADPH y la tetrahidrobiopterina (BH₄) como cofactores de óxido reducción.



Esquema de la reacción catalizada por la sintasa del óxido nítrico

La NOS tiene hasta tres isoenzimas: la constitutiva endotelial (eNOS), la constitutiva neuronal (cNOS) y la forma inducible (iNOS). Ésta última presenta su máxima actividad

cuando el macrófago está inmunológicamente activado (65), o por inducción por la citocina IL-1 β o por acción sinérgica entre el IFN γ (interferon γ) y el LPS (lipopolysaccharide) (65, 66), su inducción requiere horas y tiene una vida media de días.

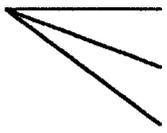
Las isoformas eNOS y cNOS se expresan constitutivamente en los tejidos, fundamentalmente en células del endotelio y cerebro; esta enzima produce una pequeña cantidad de NO y durante un corto período de tiempo, en respuesta a una variedad de estímulos que van acompañados con la elevación de Ca⁺⁺ intracelular. Es dependiente de calcio-calmodulina.

6.2. EL ÓXIDO NÍTRICO COMO REGULADOR DE LA APOPTOSIS

La inducción de apoptosis por el NO parece ser importante en la regulación de la maduración de las células T en el timo y en su crecimiento en la periferia. Por otro lado, el NO puede inhibir la apoptosis en ciertas condiciones experimentales (67). Así, se ha encontrado que a bajas concentraciones, el NO protege a la célula, a través de una inactivación de una proteasa relacionada con CPP32 (cysteine protease protein of 32 kD) e incrementando la expresión de la Bcl-2 (68, 69). Sin embargo, elevados niveles de NO están asociados con apoptosis en timocitos y en otras células (70).

El efecto anti o proapoptótico del NO probablemente involucre una serie de interacciones con radicales de oxígeno formados simultáneamente y una dependencia del estado redox de la célula. La Tabla 4 muestra los compuestos intermedios formados a partir del NO y otros radicales libres en la célula.

Tabla 4. Compuestos formados por NO y radicales libres en la célula

Reacción	Productos	Nombre del producto	Referencia
NO· + O ₂	 ONOO· NO ₂ · N ₂ O ₃	Radical peroxinitrito Dióxido de nitrógeno Trióxido de nitrógeno	71
NO· + O ₂ ^{-·}	ONOO ⁻	Anión peroxinitrito	72
NO· + H ₂ O ₂	¹ O ₂	Oxígeno singlete	73

6.3. MECANISMO MOLECULAR DE LA ACCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO

Actualmente, se sabe poco sobre el mecanismo molecular por el que el NO induce la apoptosis. Algunos de los candidatos para participar en este proceso son, el daño en el ADN nuclear y mitocondrial, así como el bloqueo en la cadena de transporte de electrones y la alteración en la permeabilidad de la membrana mitocondrial.

El NO interfiere con el grupo hemo del complejo IV de la cadena respiratoria y, a través de una inhibición reversible, causa una inhibición transitoria del flujo de electrones, incrementándose la síntesis del O₂^{-·} por el complejo I y II. El O₂^{-·} y el NO pueden luego reaccionar y producir ONOO⁻ (anión peroxinitrito), un fuerte oxidante que a su vez inhibiría irreversiblemente los complejos I, II y III (74).

En conclusión, la inhibición reversible de la cadena respiratoria por el NO produce una elevación intracelular del $O_2^{\cdot-}$ y una subsiguiente producción de $ONOO^{\cdot}$, conduciendo a una peroxidación de lípidos, destrucción de enlaces Fe-S de las enzimas y a la inhibición de la superóxido dismutasa dependiente de manganeso de la mitocondria. Todo ello conduciría a un cambio en la permeabilidad de la membrana mitocondrial y finalmente se bloquearía la producción de energía en la célula (67).

Por otro lado, se ha encontrado que el óxido nítrico altera la configuración de estructuras “dedos de zinc” en proteínas reguladoras mediante la liberación de los átomos de zinc desde sus grupos tioles. Esta acción conduce a una inactivación reversible de proteínas que necesitan estas estructuras para su unión a secuencias de ADN o ARN y que participan en la regulación de la transcripción y replicación o recombinación de genes (75). Por ejemplo, el NO inhibe el factor de transcripción NF- κ B a través de la inducción y estabilización de I κ B α (76), y además inhibe la unión del NF- κ B al ADN (77). La unión de la AP-1 al ADN es también inhibida por el NO (78).

El NO también puede actuar directamente sobre el ADN, causando desaminación de los desoxirribonucleótidos y su posterior hidrólisis (79). Esto produce la ruptura de la cadena de ADN (80), inhibiéndose la progresión del ciclo celular a nivel de la aduana mitótica para poder reparar el daño del ADN por las proteínas de reparación (81); pero si el daño es continuo e intenso, la célula termina ingresando en el proceso apoptótico (82).

Aparte de sus efectos sobre el núcleo y la mitocondria, existen otros blancos que pueden ser regulados por el NO. En muchos casos, éstos son proteínas que tienen en su sitio funcional grupos Zn-S, Fe-S o -SH que reaccionan reversiblemente con el NO (61, 83).

7. PAPEL DE LAS ENZIMAS DE LAS VÍAS MAPKs EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN LA APOPTOSIS

En las células de mamíferos han sido caracterizadas tres vías paralelas de MAPK (mitogen-activated protein kinase) (84), que son:

La clásica cascada de la MAPK, compuesta por Raf, MEK (MAPK/ERK kinase) y ERK (extracellular signal-regulated kinase), que está regulada por una GTPasa monomérica denominada Ras en respuesta a agonistas de receptores tirosina cinasa y por receptores acoplados a proteína G (85-88). Las proteínas ERK catalizan la fosforilación de factores de transcripción y controlan de esta manera la expresión de determinados genes.

Una segunda cascada de la MAPK es estimulada por el estrés osmótico y regula la actividad de la p38 (protein 38 MAPK). La función, así como la secuencia de transducción de señales de esta vía hasta la p38, no se conoce en su totalidad.

Con elementos similares a la cascada de la p38, la cascada de JNK (c-Jun N-terminal kinase) es la tercera vía de la MAPK. Esta vía está involucrada en la respuesta al estrés celular en mamíferos. La JNK puede ser estimulada por factores de estrés como son la IL-1 β , el TNF y el NO (89, 90), así como por agonistas de receptores acoplados a la proteína G (91, 92).

Las cascadas de señalización de la JNK, la p38 y la ERK, podrían participar en la vía de señalización que conduce a la apoptosis en diferentes tipos celulares y por diferentes estímulos incluyendo el NO (86, 93-99).

8. PAPEL DE LA APOPTOSIS DE LA CÉLULA β EN LA ETIOPATOGENIA DE LA DIABETES DEPENDIENTE DE INSULINA

La diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM) es una enfermedad autoinmune que se desarrolla a lo largo de un período prolongado de tiempo antes de mostrarse clínicamente (100). A pesar de las investigaciones realizadas para conocer el origen de esta enfermedad, aún no se conoce con detalle las células y los mediadores moleculares que participan en la alteración funcional y en la destrucción de las células β del páncreas.

En 1984, Schwizer mostró que los macrófagos afectaban la función de las células β y provocaban su lisis "in vitro" (101). Posteriormente se mostró que el sobrenadante de un cultivo de monocitos causaba cambios estructurales en las células β (102) y uno de los candidatos responsables presentes en el sobrenadante sería la IL-1, más específicamente la isoforma PI7 (IL-1 β). En base a estos hallazgos se propuso que la infiltración de macrófagos en los islotes del páncreas sería responsable de la destrucción de las células β , mediante la liberación local de citocinas inflamatorias, en particular la IL-1 β (102, 103).

En la actualidad se está estudiando los mecanismos mediante los cuales la IL-1 β produce su efecto sobre las células β . La IL-1 β induce la expresión de la iNOS en células productoras de insulina (63, 104); la iNOS promueve la formación del NO, que como se describió anteriormente es muy inestable, y que va acompañada de muchos compuestos intermediarios (radicales de nitrógeno). El NO sería una de las moléculas efectoras que media la destrucción de las células β inducida por la IL-1 β y el desencadenamiento del proceso apoptótico podría jugar un papel fundamental en dicha destrucción (63, 82). El NO produce una acción similar en células de tejidos afectados en determinadas enfermedades autoinmunes (96, 97). Sin embargo, poco se sabe sobre el mecanismo molecular de la acción del NO en la apoptosis.

OBJETIVOS

A pesar del elevado número de publicaciones sobre el papel del óxido nítrico en la apoptosis, en general, y su efecto sobre las células β , en particular, su mecanismo de acción no está completamente aclarado. De un tiempo a esta parte, nuestro laboratorio está estudiando la acción de la IL-1 β en células productoras de insulina, utilizando como sistema biológico la línea tumoral "RINm5F". Se ha encontrado que las células al ser estimuladas con citocinas inflamatorias, producen NO a través de la inducción de la iNOS. Con el afán de contribuir al conocimiento del mecanismo por el que el óxido nítrico estimula la apoptosis y su posible implicación en la patología molecular de la IDDM, abordamos los siguientes objetivos:

GENERALES:

1. Estudiar los mecanismos moleculares implicados en la acción estimuladora del óxido nítrico sobre la apoptosis.
2. Contribuir al conocimiento de la patología molecular de la IDDM.

ESPECÍFICOS:

1. Evaluar el efecto de la IL-1 β y su acción sinérgica con el IFN- γ y el TNF- α sobre la inducción de la iNOS y la producción de óxido nítrico.
2. Estudiar los aspectos moleculares y celulares de la apoptosis inducida por citocinas en células secretoras de insulina.
3. Estudiar el posible papel del óxido nítrico como activador de la apoptosis y como mediador de la acción de las citocinas en células secretoras de insulina.
4. Estudiar la acción del óxido nítrico sobre el sistema de caspasas.
5. Estudiar el papel de la fosforilación de proteínas intracelulares en la señalización de la apoptosis inducida por el óxido nítrico.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

- Los reactivos químicos y bioquímicos fueron de grado analítico y se obtuvieron de Panreac Química S.A., Sigma Chemical Co., Fluka BioChemica, Merck, Boehringer Mannheim y Santa Cruz.
- El medio de cultivo, RPMI 1640, se obtuvo de Bio-Whittaker.
- Las citocinas (TNF α , IFN γ) se obtuvieron de Boehringer Mannheim y la IL-1 β de Genzyme.
- ATP radiactivo (^{32}P - γ) se obtuvo de Amersham, UK.
- Anticuerpos:
 - iNOS (macrófago inducible). N32030. Transduction Laboratories.
 - Bcl-2(DC21) sc-783 IgG policlonal . Santa Cruz Biotechnology
 - Fosfo-p44/42 MAPK IgG monoclonal, Ab 9106. Biolabs. New England.
 - Fosfo-JNK IgG monoclonal. Santa Cruz Biotechnology.
 - PARP (Ab-2), IgG monoclonal, AM30-100UG. Calbiochem.
 - Citocromo c, IgG monoclonal. 65981A PharMigen.
 - Anti-conejo IgG conjugado con peroxidasa, A6154. Sigma Chemical Co.
 - Anti-ratón IgG conjugado con peroxidasa, A9044. Sigma Chemical Co.
- El equipo de electroforesis y transferencia fueron obtenidos de Bio-Rad.
- Cubeta de electroporación de Bio-Rad.

2. MÉTODOS

2.1. CULTIVO DE CÉLULAS RINm5F

a) Reactivos:

- RPMI 1640
- Suero fetal bovino inactivado 10 % (v/v)
- Glutamina 2 mM
- Penicilina 100 U/ml
- Estreptomicina 100 µg/ml
- Anfotericina B 2.5 µg/ml

b) Procedimiento:

Para preparar el medio RPMI-completo se mezclan todos los componentes en las proporciones indicadas. Las células RINm5F, derivadas de un insulinoma de rata, fueron cedidas por el Dr. Décio L. Eizirik. Estas células se siembran en placas Petri de 15x60 mm, conteniendo 5 ml de medio RPMI-completo. Las células se mantienen al menos 24 horas, a una temperatura constante de 37 °C y en una atmósfera de 5 % de CO₂ y 95 % de aire, antes de iniciarse los experimentos.

Para la exposición de las células a agentes inductores de apoptosis, previamente se renueva el medio de cultivo manteniéndose las condiciones antes indicadas.

2.2. EXPOSICIÓN DE LAS CÉLULAS A INDUCTORES (MEZCLA DE CITOCINAS O SNP)

a) Reactivos:

- IL-1 β 25U/ml
- TNF- α 1000U/ml
- IFN- γ 1000U/ml
- RPMI-completo
- Nitroprusiato de sodio (SNP) 1 mM

b) Procedimiento:

24 horas después de sembrar las células y cuando se haya alcanzado una densidad aproximada de 2×10^6 células (60% de confluencia), se renueva el medio (5 ml), se añade la mezcla de citocinas (IL-1 β 25 U/ml, TNF- α 1000 U/ml e IFN- γ 1000 U/ml) y se incuban las células durante los tiempos programados. Para el tratamiento con el SNP (sodium nitroprusside), se añade el SNP a una concentración final de 1 mM.

2.3. ESTUDIOS CON INHIBIDORES

a) Reactivos:

- Z-YVAD.fmk (benzyloxycarbonyl-Tir-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone) 100 μ M
- Z-VAD.fmk (benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone) 100 μ M, inhibidor de la caspasa-3
- PD098059 50 μ M, inhibidor de la vía de la MAPK
- SB203580 10 μ M, inhibidor de la p38
- Wortmanina 0.1 μ M, inhibidor de la PI3K

b) Procedimiento:

Se añaden los inhibidores 1 hora antes de los activadores.

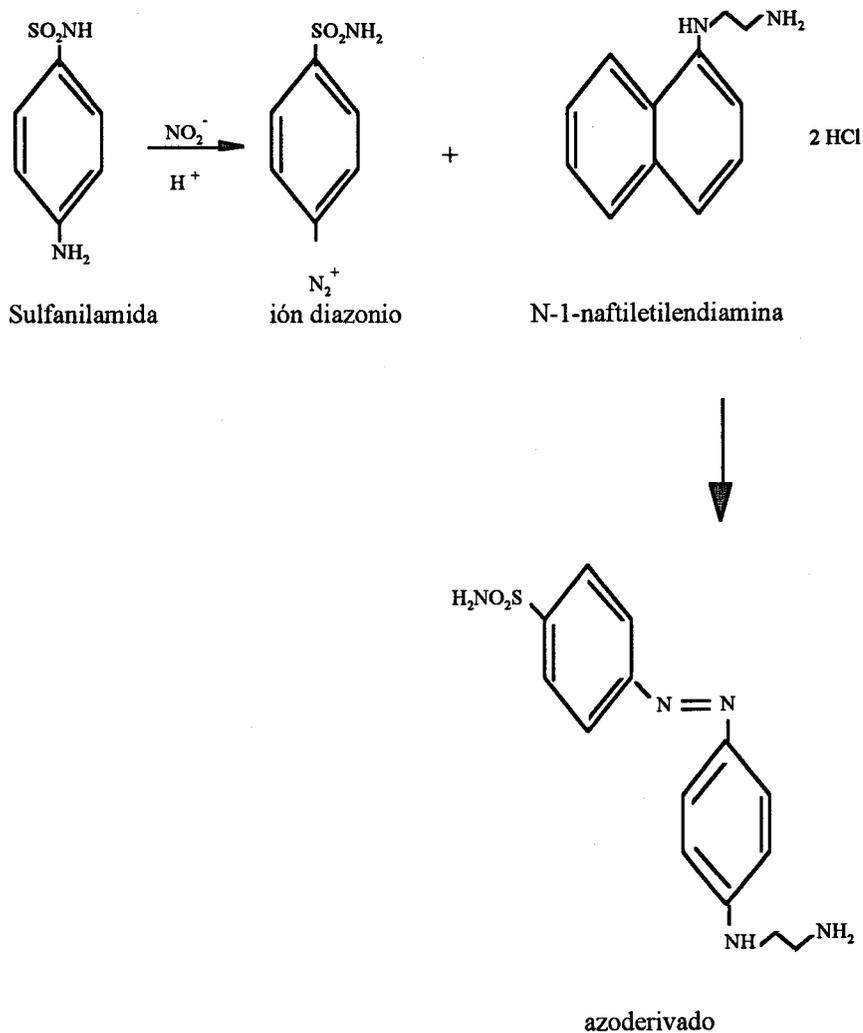
2.4. DETERMINACIÓN DE LOS NITRITOS

a) Reactivos:

- Sulfanilamida 1 % (p/v)
- N-1-naftiletilendiamina 0,02 % (p/v)
- HCl 3 M
- NO_2Na 1 -20 μM

b) Procedimiento:

El nitrito a pH ácido reacciona con la sulfanilamida para producir el ión diazonio.



Este ión se acopla entonces a la N-1-naftiletildiamina para formar un azo derivado de color púrpura que absorbe luz a 540 nm (105).

El procedimiento consiste en colocar 200 µl del sobrenadante de cultivo de células en un pocillo de la placa "microtiter" (96 pocillos) y se mezclan con 20 µl de reactivo de Griess. Este reactivo está formado por la mezcla, realizada en el momento de su uso, a partes iguales de una solución de sulfanilamida al 1 % (p/v) en HCl 3 M con una solución de N-1-naftiletildiamina al 0,02 % (p/v). Ambas soluciones por separado son estables a 4 °C durante al menos dos meses. Una vez agitada la mezcla, se deja a temperatura ambiente durante 15 minutos y se lee el color desarrollado en un lector de placa "MIOS", Merck Modelo MR700, a 540 nm. El color se mantiene estable al menos durante una hora.

Para preparar el blanco, se añade RPMI-completo en lugar de sobrenadante del cultivo celular.

El cálculo de la concentración de nitritos se realiza utilizando una curva estándar elaborada con 1, 2, 5, 10, 15 y 20 µM de NO₂Na.

2.5. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

a) Reactivos:

- NADH 4 mM
- Ac. pirúvico 32 mM

b) Procedimiento:

Medida de la actividad de LDH en el sobrenadante libre de células. Las células no viables incrementan la permeabilidad de su membrana plasmática a enzimas intracelulares que son liberadas al medio extracelular. El cociente

de la actividad de la LDH (lactato deshidrogenasa) en el medio extracelular y la actividad total de la misma, es un índice fiable de la viabilidad celular.

La suspensión de células se centrifuga a 3000 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante obtenido se utiliza para el análisis de actividad de la LDH liberada al medio y el precipitado celular se rompe con tampón de lisis y posteriormente se mide la actividad de la LDH.

La actividad de la LDH se mide espectrofotométricamente siguiendo la disminución de la absorbancia de NADH a 340 nm. El porcentaje de la LDH liberada por las células al medio de cultivo se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ LDH liberada} = \frac{\text{LDH en el medio de cultivo}}{\text{LDH en el medio} + \text{LDH del homogeneizado}} \times 100$$

2.6. OBSERVACIÓN DE LA MORFOLOGÍA NUCLEAR POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

a) Reactivos:

- Solución concentrada de yoduro de propidio 1 mg/ml
- Solución concentrada de Hoechst 33342 2 mg/ml

b) Procedimiento:

1×10^4 células son sembradas en pocillos de una microplaca e incubadas durante 24 horas. Se inicia el tratamiento en 100 μ l de medio de cultivo y transcurrido dicho tiempo se añade 1 μ l de la solución concentrada de yoduro de propidio y 1 μ l de la solución concentrada de Hoechst y se observa la morfología nuclear en un microscopio de fluorescencia.

El yoduro de propidio penetra en la célula sólo cuando la membrana celular está destruida y tiñe el ADN del núcleo de color naranja. De esta manera, la morfología nuclear permite distinguir a las células muertas por necrosis de las muertas por apoptosis.

El colorante Hoechst 33342 atraviesa la membrana celular y tiñe el ADN con un color azul o blanco. Las células sanas presentan una coloración difuminada mientras que las apoptóticas muestran una coloración granular, según la etapa apoptótica, pudiéndose distinguir claramente la condensación del núcleo o los cuerpos apoptóticos formados.

2.7. CUANTIFICACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN NUCLEOSOMAL DEL ADN POR EL MÉTODO DE “ELISA”

a) Reactivos:

- “Kit CELL DEATH DETECTION ELISA^{PLUS}” (Boehringer M.)
- Mezcla de reactivos para 10 determinaciones (10 pocillos)
 - 40 µl del bote 1 (Anti-Histona)
 - 40 µl del bote 2 (Anti-ADN-POD)
 - 720 µl de tampón de incubación
- Solución de sustrato:
 - una tableta del bote 7 en 15 ml de tampón de sustrato.

b) Procedimiento:

Se utilizan aproximadamente 1×10^5 células. Se resuspenden en 200 µl de tampón de lisis y se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Se centrifuga el homogeneizado celular a 4000 rpm durante 5 minutos para separar los núcleos y se ponen 20 µl de sobrenadante, de cada una de las muestras, en los

pocillos de la placa con streptavidina. Se hace además un control positivo y de señal de base, según las instrucciones del reactivo.

Se añaden 80 µl de la mezcla de reacción a cada una de los pocillos.

Se cubre la superficie de la microplaca con un plástico adhesivo.

Se incuba durante 2 horas con agitación a 500 rpm y luego se remueve la solución cuidadosamente.

Se enjuaga la placa tres veces con 250 µl de tampón de incubación.

Se añaden 100 µl de solución de sustrato y se incuba con agitación a 250 rpm hasta que desarrolle color para el análisis (10 a 20 minutos).

Se mide la absorbancia a 405 nm en un lector de placa.

Se prepara un muestra "blanco" conteniendo sólo solución de sustrato y se lee a 492 nm.

Cálculos:

Factor de enriquecimiento (F.E.):

$$F.E. = \frac{DO.10^{-3} \text{ muestra}}{DO.10^{-3} \text{ control}}$$

D.O. de cada muestra = Lectura muestra a 405 nm - Lectura blanco a 492 nm

Se representa gráficamente la D.O. ($A_{405} - A_{492}$) frente a la concentración de la sustancia apoptótica o F.E. frente a la concentración.

2.8. CUANTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS APOPTÓTICAS POR EL MÉTODO DE TUNEL

a) Reactivos:

- PBS (phosphate-buffered saline) con 1% de BSA (bovine serum albumin)(v/v)

- Paraformaldehído 4 % en PBS pH 7,4
- Tritón X-100 0,1 %
- “Batería de reactivos” para la detección de muerte celular “in situ” por fluorescencia (Boehringer M.)

b) Procedimiento:

La degradación del ADN genómico durante la apoptosis produce fragmentos de cadena de bajo peso molecular (mono-oligonucleosomas), así como brechas en una de las cadenas (“nicks”) del ADN de alto peso molecular. Estas mellas pueden ser identificadas mediante el marcaje de su extremo 3`OH con nucleótidos modificados y a través de una reacción enzimática. Para ello, se emplea la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), que cataliza la polimerización de nucleótidos marcados con fluoresceína en el extremo 3`OH libre, sin necesidad de un ADN molde. La incorporación de polímeros de nucleótidos marcados se detecta y cuantifica por citometría de flujo.

Células RINm5F con una densidad de 2×10^6 se incuban en presencia de la mezcla de citocinas durante 0, 12 y 24 horas. A continuación se lavan 2 veces, se fijan, se permeabilizan y se marcan de acuerdo a las instrucciones de la “Batería de reactivos” para luego ser cuantificadas por citometría de flujo.

2.9. DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

a) Reactivos:

- Reactivo de Bradford “Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate”
- Estándar de albúmina sérica de bovino de 1mg/ml
- Tampón de lisis

Tris-HCl 20 mM

ClNa 137 mM

Cl ₂ Mg	5 mM
Glicerol	10%
NP-40	1 %

b) Procedimiento:

Se preparan estándares de albúmina a concentraciones de 0.5, 1, 2, 5, 10, 15 y 20 µg/ml.

Se añaden 5 µl del estándar diluido (1 µl de estándar + 4 µl de ClNa 150 mM) más 945 µl de agua desionizada, y 50 µl del reactivo de Bradford concentrado. Transcurridos 5 minutos se mide la absorbancia en un espectrofotómetro a 595 nm. Se elabora una curva de calibración (absorbancia frente a la concentración de proteína).

Para las muestras, se usa 1 µl de sobrenadante del homogeneizado celular más 4 µl de ClNa 150mM y se diluye con agua desionizada hasta 950 µl. Se sigue el mismo procedimiento que los estándares. El blanco se prepara reemplazando el homogeneizado con tampón de lisis.

La cantidad de proteínas utilizada en los diferentes experimentos está indicada en los apartados correspondientes.

2.10. EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DEL ADN

a) Reactivos:

- Proteinasa K 20 mg/ml
- RNasa A 10 mg/ml
- Tampón de lisis
 - NaCl..... 400 mM
 - EDTA..... 2 mM
 - Tris-HCl ... 10 mM
 - pH..... 8,2

- SDS 10 %
- Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1)
- Tampón TE
 - EDTA 1 mM
 - Tris-HCl .. 10 mM
 - pH 7,6
- Etanol absoluto

b) Procedimiento:

Después de la incubación con los reactivos apropiados, las células son despegadas de la placa con la ayuda de una paleta de plástico y luego la suspensión celular se centrifuga a 3000 rpm durante 3 minutos. El precipitado celular se resuspende en 700 µl de tampón de lisis, conteniendo además 50 µl de SDS al 10 % y proteinasa K a una concentración final de 200 µg/ml. El homogeneizado celular se incuba durante una noche a 37 °C. La extracción de ácidos nucleicos se hace añadiendo un volumen igual de la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. El ADN se precipita con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío durante 2 horas a -20 °C y después se centrifuga a 6000 rpm durante 10 min. El ADN precipitado se seca y luego se resuspende con 100 µl de tampón TE conteniendo 0,5 mg/ml de RNasa A y se incuba durante 2 horas a 37 °C.

Finalmente el ADN se reprecipita con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío durante 2 horas a -20 °C y se centrifuga a 6000 rpm durante 10 minutos. El ADN precipitado se seca y resuspende en 50 µl de tampón TE .

La pureza del ADN se determina por espectrofotometría midiendo la absorbancia de las muestras a 260 y 280 nm. El cociente A_{260} / A_{280} debe ser superior a 1,7 en un ADN hidratado bien purificado. Una solución patrón de ADN de concentración, 50 µg/ml tiene una $A_{260} = 1$, lo que permite calcular la concentración de ADN a partir de su A_{260} . Los cocientes obtenidos en las diferentes preparaciones de ADN, oscilan entre 1,7 - 1,8.

Cl₂Mg 5 mM

Glicerol 10%

NP-40 1 %

- Mezcla de inhibidores de proteasas para 1 ml

Pefabloc 100 mg

Leupeptina 1 mg

Pepstatina 2 mg

- Tampón de carga "Laemmli"

Tris- HCl 125 mM

SDS 2 %

Glicerol 5 %

Azul de bromofenol 0,003 %

2-Mercaptoetanol 1 %

b) Procedimiento:

Transcurrido el tiempo de incubación con las sustancias apropiadas, las células RINm5F a una densidad aproximada de 2×10^6 , se despegan de la placa con una paleta de plástico y luego se centrifugan a 3000 rpm durante 3 minutos. A continuación, el precipitado celular se resuspende y se lava dos veces con PBS frío.

El precipitado celular se rompe con 100 μ l de tampón de lisis y con 5 μ l de la mezcla de inhibidores de proteasas en un baño de hielo. El homogeneizado celular es tratado con ultrasonidos durante 10 segundos en hielo y luego se centrifuga a 13000 rpm durante 20 minutos y la cantidad de proteínas contenidas en el sobrenadante se determina por la técnica de Bradford. Alícuotas del sobrenadante conteniendo una determinada cantidad de proteínas se diluyen con tampón de carga 2X y se incuban en baño hirviente durante 7 minutos. Luego se procede a la electroforesis de proteínas.

Para el caso de proteínas citosólicas como la JNK, la ERK y el citocromo c, las células se rompen con tampón de lisis cinasa (apartado 2.19. de Material y Métodos) y se usa el sobrenadante como fuente proteica.

2.13. ELECTROFORESIS DE LAS PROTEÍNAS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

a) Reactivos:

- Acrilamida- bis acrilamida 30 %
 - Tris-HCl 1,5 M pH 8,8
 - SDS 10 %
 - Persulfato de amonio 10 %
 - Temed
 - Tris- HCl 0,5 M pH 6,8
 - Tampón de corrida pH 8,3
- | | |
|----------|--------|
| Tris HCl | 25 mM |
| SDS | 0,1 % |
| Glicina | 250 mM |

b) Procedimiento:

La electroforesis se realiza utilizando un gel de apilamiento de un 4 % de poliacrilamida y un gel de separación al 12,5 % para la Bcl-2, 10 % para la ERK y la JNK o 7,5 % para la PARP y la iNOS. Ambos geles se dejan polimerizar durante 45 minutos a temperatura ambiente. El sistema de geles se prepara utilizando el sistema mini-PROTEAN II; para ello, primero se prepara la solución separadora, dejándola polimerizar en el sistema. Para evitar el efecto inhibitorio del oxígeno atmosférico sobre la polimerización, se añaden con cuidado 500 µl de agua desionizada sobre la solución. Una vez polimerizado, se elimina el agua y se añade la solución de apilamiento, en la cual se construyen los pocillos para las muestras. Una vez cargados los pocillos con las muestras, 20 µg de proteínas totales (PT) para la Bcl-2,

la MAPK, la JNK o el citocromo c y 30 µg de PT para la PARP y la iNOS, y con el estándar de pesos moleculares, se introduce el sistema en el tanque de electroforesis, el cual se rellena con tampón de corrida. Por último, el sistema se conecta a una fuente de alimentación manteniéndose a 150 V durante 1 hora.

2.14. TRANSFERENCIA DE LAS PROTEÍNAS A MEMBRANAS DE PVDF

a) Reactivos:

- Tampón de transferencia

Tris	48 mM
Glicina	39 mM
SDS	0,0375 %
Metanol	20 %
pH	9,2

b) Procedimiento:

La transferencia se efectúa utilizando el sistema húmedo de Bio-Rad y membrana PVDF (polyvinylidene difluoride), siguiendo el protocolo recomendado por esta casa comercial. Una vez terminada la electroforesis, el gel se introduce en tampón de transferencia para un enjuague y a continuación, se coloca en forma de emparedado (soporte-esponja-papel-membrana PVDF-gel-papel filtro-esponja-soporte) en el aparato de transferencia, en baño de hielo. Se conecta el sistema a una fuente de alimentación efectuándose la transferencia y manteniéndose la intensidad en 350 mA durante 3 horas.

2.15. INCUBACIÓN CON LOS ANTICUERPOS “IMMUNOBLOTTING”

a) Reactivos:

- Tampón de lavado (TBS)

Tris 20 mM

ClNa 137 mM pH 7,6

- Tampón de saturación de la membrana

Leche en polvo 5 % en TBS más Tween 20 0,5 %

- Anti-iNOS, dilución 1:2000

- Anti-Bcl-2, dilución 1:2500

- Anti-PARP, dilución 1:2500

- Anti-citocromo c, dilución 1:2500

- Anti-fosfo-MAPK, dilución 1:2500

- Anti-fosfo-JNK, dilución 1:2500

Las diluciones se hacen en TBST (TBS y Tween 20 0,5 %)

b) Procedimiento:

En primer lugar, la membrana de PVDF se incuba toda la noche en tampón de saturación de membrana para bloquear los espacios libres con caseína de la leche en polvo. Tras tres lavados con TBS, se incuba la membrana durante 12 horas, con el respectivo anticuerpo. Luego se lava la membrana 3 veces con TBS y se incuba con un segundo anticuerpo anti IgG (de conejo o ratón) marcado con peroxidasa y diluido 1/5000 en TBST. Por último, se lava la membrana 3 veces con TBS.

2.16. REVELADO DE LAS BANDAS PROTEICAS

a) Reactivos:

- Tampón ECL

Tris 10 mM

pH 8,5

- Luminol

4 mg de luminol se disuelven en 25 μ l de NaOH 1 N y se completa hasta 5 ml con tampón ECL.

- Yodofenol

1 mg de 4-yodofenol se disuelve en 5 ml de buffer ECL

b) Procedimiento:

Tras la mezcla de los reactivos luminol y yodofenol a volúmenes iguales, se añaden 5 μ l de H₂O₂ concentrado y se incuba la membrana durante 1 minuto (106). A continuación la membrana se coloca en un casete, en contacto con una película radiográfica (Hyperfilm MP de Amersham) durante 2 ó 3 minutos. La sensibilidad de la película aumenta usando dos pantallas intensificadoras de calcio-tungsteno-fósforo (Dupont Lightning-Plus). Por último, la película se revela de una forma manual. Todos los pasos del revelado de las bandas se llevan a cabo en un cuarto oscuro.

2.17. TRANSFECCIÓN DE LAS CÉLULAS RINm5F

a) Reactivos y plásmidos

RPMI- completo

RPMI-sin suero

pcDNA-PI3K γ ¹ (expression plasmid for PI3K γ)

pcDNA-PI3K γ KR¹ (expression plasmid for dominant negative mutant of PI3K γ)

(1) Ambos plásmidos han sido clonados en los sitios BamHI-NotI en el vector pEF-GST-Bos (87).

b) Procedimiento:

Las células se hacen crecer en medio RPMI-completo y en condiciones estándar.

En el momento de la transfección, se despegan las células con tripsina al 0,5 %, luego las células se centrifugan a 2000 rpm durante 2 minutos. El precipitado celular se lava con RPMI sin suero y se resuspende en este mismo medio a una concentración final de 4×10^6 células/800 μ l.

En una cubeta de electroporación, se depositan 5 μ g de plásmido que contiene el inserto de la PI3K γ o su dominante negativo, PI3K γ KR, junto con 5 μ g de plásmido de la proteína verde fluorescente (GFP).

Se añaden 800 μ l de la suspensión celular y se mezclan completamente con el plásmido. Es importante evitar que se forme espuma durante la mezcla, ya que puede provocar cambios en la resistencia y afectar la descarga eléctrica sobre las células.

Posteriormente se procede a la electroporación. Para ello, se descarga un único pulso de 300 V y 1200 μ F de capacitancia.

Inmediatamente después del pulso, se coloca la cubeta en un baño de hielo durante 5 minutos.

Después, se transfieren las células a placas que contienen RPMI-completo y se incuban durante 48-72 horas con cambios de medio cada 24-48 horas.

Para evaluar el porcentaje de células transfectadas, se hace el recuento de las células que incorporaron el plásmido GFP(células con fluorescencia verde).

2.18. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN GST-ATF2

a) Reactivos:

-Medio LB (pH 7)

Bacto triptona 1 %.

Extracto de levadura 0,5 %.

NaCl 10 g

- Medio SOB

Triptona 2 %

Extracto de levadura 0,5 %

ClNa 10 mM

ClK 2,5 mM

Cl₂Mg 10 mM

SO₄Mg 10 mM

- Ampicilina 100 mg/ml

- PBS

- IPTG (Isopropil-β-D-Tiogalactósido) 100 mM

- Tritón X-100 20 % en PBS

- Glutación-Agarosa

- Tampón de elución

Glutación reducido 10 mM en Tris-HCl 50 mM (pH 8)

b) Procedimiento:

La proteína ATF2 es un factor de transcripción y un sustrato de la JNK y de la p38. El gen GST-ATF2 se inserta en el vector pGEX-4T3, que es inducible por IPTG y que presenta sitios de corte para Bam HI y EcoRI; el fragmento insertado mide 300 pb.

Transformación

Células competentes de E.coli DH1 alfa se incuban con 100 ng del plásmido en medio SOB durante 1 hora en hielo.

Se hace un choque térmico llevando el tubo a 42 °C durante 90 segundos e inmediatamente se vuelve a poner en hielo y se deja en reposo durante 30 minutos.

Se añade 1 ml de medio LB al tubo y se incuba a 37 °C durante 1 hora con moderada agitación.

Las bacterias transformadas se siembran en medio LB-agar conteniendo ampicilina 100 µg/ml.

Crecimiento e inducción

Se coge una sola colonia de E.coli conteniendo el plásmido recombinante para GST-ATF2, se siembra en 5 ml de medio LB suplementado con ampicilina 100 µg/ml y se incuba toda la noche a 37 °C con movimiento vigoroso.

Se diluye el cultivo hasta 400 ml con medio LB suplementado con ampicilina, se incuba a 37 °C con movimiento vigoroso hasta alcanzar una A_{600} de 1 (aprox. 6 horas).

Se añade IPTG a una concentración final de 0,1 mM y se continúa la incubación durante 4 horas.

Purificación de la proteína de fusión GST-ATF2

Se transfiere el cultivo celular a tubos apropiados y se centrifuga a 8000 rpm durante 10 minutos a 4 °C para sedimentar las células.

Se descartan los sobrenadantes y se escurren los sedimentos y se dejan los tubos en hielo.

Se resuspenden los precipitados celulares en 1 ml de PBS frío, luego se juntan las suspensiones en un tubo y se completa con PBS hasta un volumen final de 20 ml (50 µl PBS/ml de cultivo).

La suspensión celular se rompe mediante sonicación en hielo. Se añade tritón X-100 al 20 % para conseguir una concentración final de 1 % y se mezcla suavemente durante 30 minutos, para facilitar la solubilización de la proteína de fusión.

A continuación se centrifuga a 10000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo.

Se añaden 200 µl de la suspensión de glutatión-agarosa al 50 % en PBS (2 ml de suspensión/100 ml de sonificado) y se incuba con agitación suave a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Se centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos para sedimentar la matriz (glutatión-agarosa) y se descarta el sobrenadante.

Se lava la matriz sedimentada con 1 ml de PBS, luego se centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos y se descarta el sobrenadante del lavado.

Se repite el lavado 2 veces más.

Se eluye con 200 µl de tampón de elución.

Se mezcla suavemente para resuspender la matriz y se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos para despegar la proteína de fusión de la matriz.

A continuación, se centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos para sedimentar la matriz y recuperar el sobrenadante.

Finalmente se mide la concentración de proteínas y se analiza la presencia de GST-ATF2 en PAGE-SDS al 12,5 %.

Las muestras se almacenan a -20 °C y se utilizan 10 µg de proteínas como sustrato para el análisis de la actividad de la JNK y la p38.

2.19. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD CINASA DE LA ERK Y LA JNK

a) Reactivos:

- Tampón de lisis cinasa

Hepes 20 mM pH 7,5

EGTA 10 mM

β-glicerofosfato 40 mM

NP-40 1 %

Cl₂Mg 2,5 mM

VO₄Na₃ 2 mM

DTT 1 mM

- Mezcla de inhibidores de proteasas
- Tampón de reacción para cinasa
 - MOPS 12,5 mM pH 7,5
 - β -Glicerofosfato 12,5 mM
 - Cl_2Mg 7,5 mM
 - EGTA 0,5 mM
 - FNa 0,5 mM
 - VO_4Na_3 0,5 mM
- ATP 1 mM
- γ - ^{32}P -ATP
- Proteína básica de mielina (MBP) 10 mg/ml
- GST-ATF2 10 mg/ml
- DTT 1M

b) Procedimiento:

Se cultivan preparaciones celulares hasta que alcancen una confluencia del 60 % en medio RPMI completo. Para iniciar el experimento, las células se preincuban en RPMI sin suero durante 4 horas. A continuación, se estimulan las células durante un tiempo apropiado (0-12 horas) a 37 °C, se lavan rápidamente con PBS frío y se rompen a 4 °C con 100 μl de tampón de lisis cinasa.

La preparación de células rotas se centrifuga a continuación a 13000 rpm durante 25 minutos a 4 °C y se recupera el sobrenadante.

Se mide la concentración de proteínas y se congelan las muestras para evaluar la actividad cinasa.

La actividad cinasa se desarrolla en presencia de los siguientes reactivos:

- 1 μCi γ - ^{32}P -ATP
- 20 μM de ATP no marcado

1,5 mg/ml de proteína sustrato, proteína básica de mielina para la ERK y GST-ATF2 para el caso de la JNK

3,3 μ M de DTT

Finalmente se completa con tampón de reacción hasta un volumen final de 30 μ l.

Después de 20 minutos de incubación a 30 °C, se para la reacción por adición de 10 μ l de tampón Laemmli 5X.

Se calientan las muestras a 95 °C durante 5 minutos y se analizan por electroforesis en gel de poliacrilamida- SDS al 12,5 % y autorradiografía.

Para medir la fosforilación de Bcl-2 se usan 10 μ l de inmunoprecipitado de la Bcl-2 como sustrato.

2.20. INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA Bcl-2

Para ello, un número aproximado de 1×10^7 células son tratadas con un tampón de lisis y posteriormente sometidas a tratamientos con ultrasonidos. Después de una centrifugación a 13000 rpm durante 25 minutos, el sobrenadante (1mg) es inmunoprecipitado con 20 μ l de anticuerpo para la Bcl-2 a 4 °C durante 4 horas. El inmunocomplejo se precipita con 50 μ l de proteína G-sefarosa. El precipitado se lava tres veces con tampón fosfato (PBS) suplementado con Nonidet P-40 al 1 % y un cuarto lavado con el tampón de reacción para cinasa. Finalmente el precipitado se disuelve en 100 μ l de tampón de reacción para cinasa. 10 μ l de esta preparación se usa como sustrato de fosforilación.

2.21. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE CASPASA-3

a) Reactivos:

- Tampón de reacción de caspasa

Hepes 25 mM

Chaps 0,1 %

DTT 100 mM

-Mezcla de inhibidores de proteasas para 1 ml

Pefabloc 100 mg

Leupeptina 1 mg

Pepstatina 2 mg

- Sustrato fluorogénico para caspasa-3

DEVD-AFC 50 μ M

b) Procedimiento:

Las células se rompen con tampón de lisis cinasa (ver apartado 2.19.b). Al sobrenadante del homogeneizado celular (50 μ g) se le añaden 4 μ l de la mezcla de inhibidores de proteasas y tampón de reacción de caspasa hasta un volumen final de 275 μ l. Esta mezcla se incuba durante 2 horas a 37 °C, en presencia del sustrato fluorogénico (50 μ M). La reacción se para con 1,225 ml de tampón de caspasa frío.

La caspasa-3 activa, degrada al sustrato fluorogénico DEVD-AFC (N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoremethyl coumarin) después del segundo residuo de Asp y libera un fragmento fluorescente (7-amino-4-trifluorometil coumarin o AFC). La acumulación del colorante fluorescente se cuantifica en un fluorímetro a 400 nm de excitación y 505 nm de emisión; las medidas se relacionan con la actividad enzimática .

RESULTADOS

1. EFECTO DE LAS CITOCINAS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN CÉLULAS RINm5F

Las células RINm5F fueron cultivadas en placas Petri con RPMI-completo. Después de alcanzar una confluencia del 60 %, se reemplazó el medio con 5 ml de medio atemperado y suplementado con una mezcla de citocinas (IL-1 β 25 U/ml, IFN- γ 1000 U/ml y TNF- α 1000 U/ml). Diferentes placas fueron incubadas durante períodos de 0, 6, 12, 18 y 24 horas; el sobrenadante del cultivo fue utilizado para medir la producción de nitrito.

La Fig. 3A muestra la producción de NO, expresada en μ M de nitrito por millón de células, a diferentes tiempos de exposición de las células a citocinas; el estudio muestra que la producción de NO se inicia a las 6 horas (1,91 μ M) y se incrementa notablemente hasta las 24 horas (14,58 μ M). Las células no tratadas apenas alcanzan un promedio de 0,12 y 0,23 μ M a las 6 y 24 horas respectivamente.

Cuando las células son expuestas a la mezcla de citocinas en presencia de NMMA (N^G-Methyl-L-Arginine) 400 μ M, un inhibidor específico de la sintasa del óxido nítrico, se previene considerablemente la producción de NO inducida por citocinas (Fig. 3B).

Por otra parte, la exposición de las células a la mezcla de citocinas produce un notable incremento en la síntesis de la proteína iNOS (Fig. 4).

Este hallazgo y el hecho de que exista un desfase de 6 horas entre el comienzo de la exposición a las citocinas y el comienzo de la producción de NO, permite llegar a la conclusión de que la producción de NO es dependiente del efecto de las citocinas sobre la expresión del gen de la iNOS.

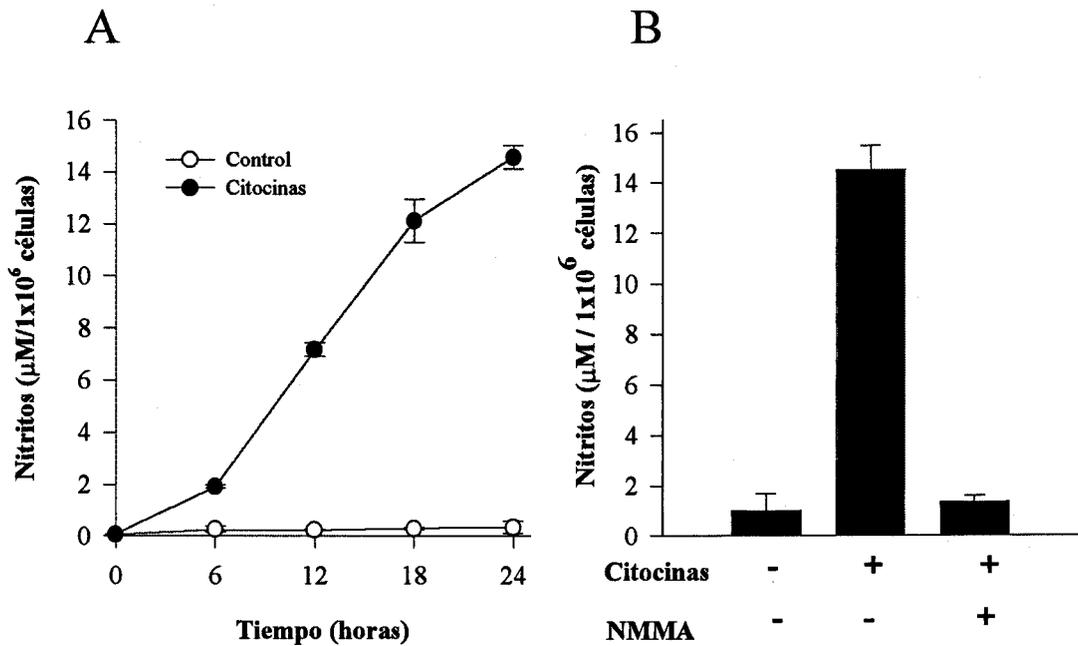


Fig. 3 Producción de óxido nítrico en células RINm5F expuestas a la combinación de citocinas (IL-1 β 25 U/ml, IFN- γ 1000 U/ml y TNF- α 1000 U/ml). A) Dependencia de tiempo. Las células fueron expuestas a la mezcla de citocinas durante los tiempos indicados; el medio de cultivo libre de células fue utilizado para el análisis de la producción de nitritos. B) Efecto de la NMMA. Las células fueron expuestas a las citocinas en ausencia o presencia de la NMMA 400 μM durante 24 horas; el medio de cultivo libre de células fue utilizado para el análisis de la producción de nitrito. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

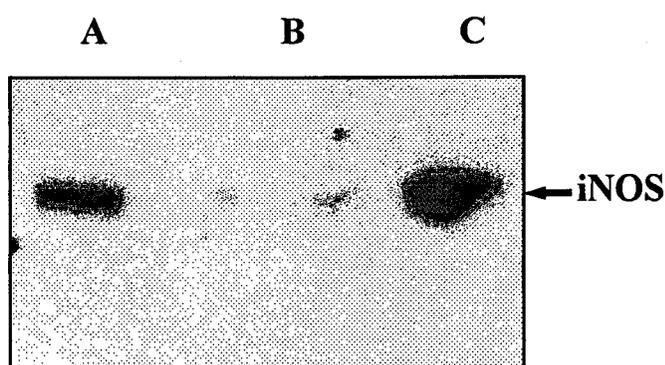


Fig. 4 Detección de la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS). Células RINm5F fueron expuestas a la combinación de citocinas durante 24 horas y el sobrenadante de la preparación de las células rotas fue separado por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 7.5%. La proteína iNOS fue detectada mediante "western blot". Carril (A), control positivo, homogeneizado de macrófagos de rata activados con LPS; carril (B), células RINm5F controles; carril (C), células RINm5F tratadas con la combinación de citocinas.

2. EFECTO DE LAS CITOCINAS SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR

La producción de NO ha sido relacionada con la muerte de las células de los islotes del páncreas. En esta serie de experimentos, la mezcla de citocinas produce un incremento en la liberación de LDH, encontrándose también una pérdida de viabilidad a partir de las 6 horas (5,45 %); la curva sigue un patrón temporal similar a la producción de NO, alcanzando una pérdida del 18,93 % a las 24 horas de exposición a la mezcla de citocinas. La presencia de NMMA 400 μ M previene parcialmente la muerte celular inducida por las citocinas (Fig. 5).

3. ESTUDIO DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN Y DE LA MORFOLOGÍA NUCLEAR EN CÉLULAS EXPUESTAS A LAS CITOCINAS

Se investigó también el modo en el que las citocinas provocan la muerte de las células RINm5F.

La observación microscópica de las células teñidas con yoduro de propidio y Hoechst revela que el tratamiento con citocinas produce la condensación y fragmentación del núcleo en un número reducido de células. Estas alteraciones son características de la alteración nuclear apoptótica (Fig. 6). Por el contrario, el patrón de coloración de los núcleos de las células que no han sido expuestas a las citocinas revela una morfología normal (Fig. 7).

También se evaluó mediante ELISA la fragmentación del ADN en nucleosomas. Las células expuestas a citocinas muestran una fragmentación de ADN dependiente del tiempo, manifestándose a las 6 horas (236,7 % del control) y con un aumento progresivo hasta las

24 horas (1893 %, cerca de 19 veces el control) (Fig. 8). Se observó también que el NMMA (400 μ M) bloquea este efecto.

Para visualizar el daño del ADN inducido por las citocinas, se hizo una electroforesis del ADN en gel de agarosa. Se extrajo el ADN de las células que fueron expuestas durante 24 horas a las citocinas exclusivamente o a la combinación de las citocinas y la NMMA. La electroforesis en agarosa (Fig. 9) revela un patrón de degradación del ADN en escalera en las células que fueron tratadas con las citocinas. El efecto de las citocinas sobre la fragmentación del ADN es abolido completamente por el NMMA, mostrándose de esta manera que la producción de NO es responsable de la activación de la apoptosis en las células RINm5F.

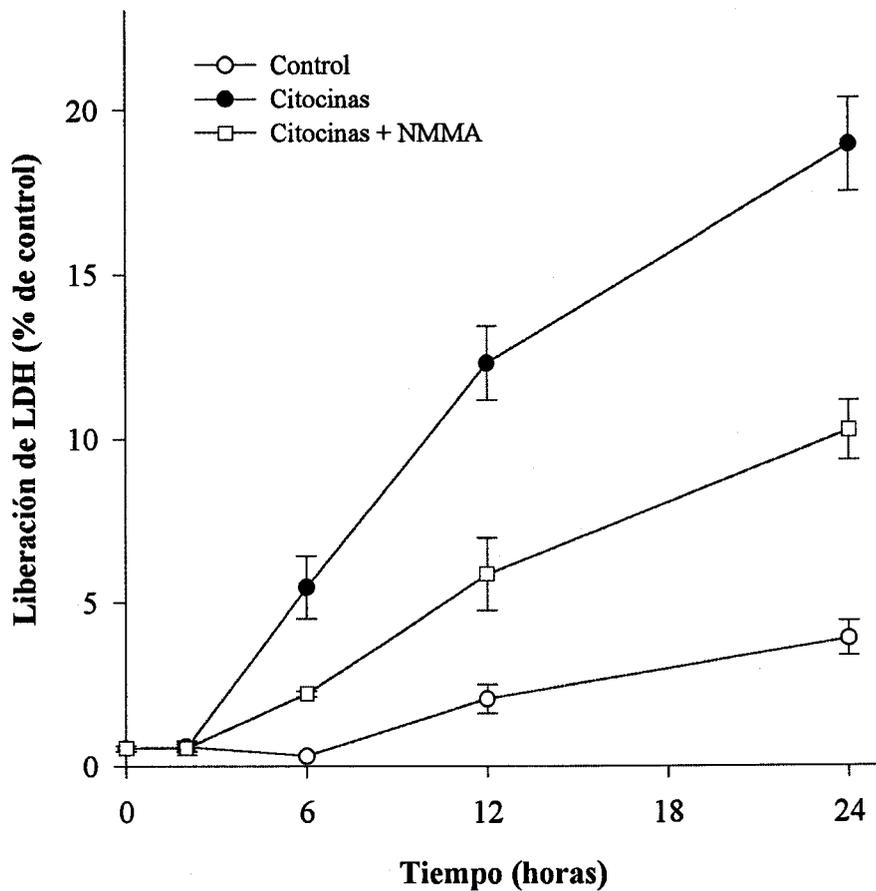


Fig. 5 Efecto de las citocinas y la NMMA sobre la viabilidad celular. Células RINm5F fueron incubadas durante 0, 2, 6, 12 y 24 horas en presencia de citocinas (IL-1 β 25 U/ml, INF- γ 1000 U/ml y TNF- α 1000 U/ml), o la combinación de citocinas y NMMA 400 μ M. Los homogeneizados celulares y el medio de cultivo se usaron para la medida de LDH. Los valores representados son las medias \pm desviación estándar de tres experimentos.

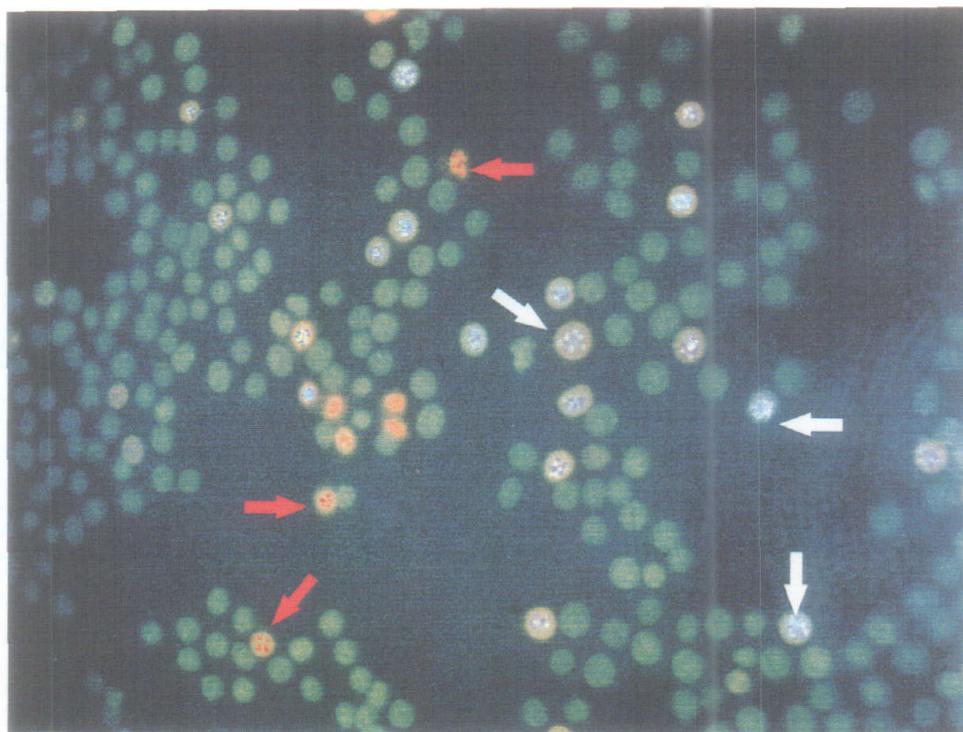


Fig. 6 Microfotografía de células RINm5F apoptóticas. Las células fueron incubadas con RPMI-completo conteniendo la combinación de citocinas durante 24 horas. Posteriormente fueron expuestas a los colorantes Hoechst 33342 y yoduro de propidio. Las flechas blancas señalan a las células apoptóticas vivas que han sido teñidas con Hoechst y muestran un ADN condensado y/o fragmentado (gránulos de color blanco-azul). Las flechas rojas señalan a las células apoptóticas con una necrosis secundaria en las que su ADN tiene un color naranja porque se ha teñido con ambos colorantes.

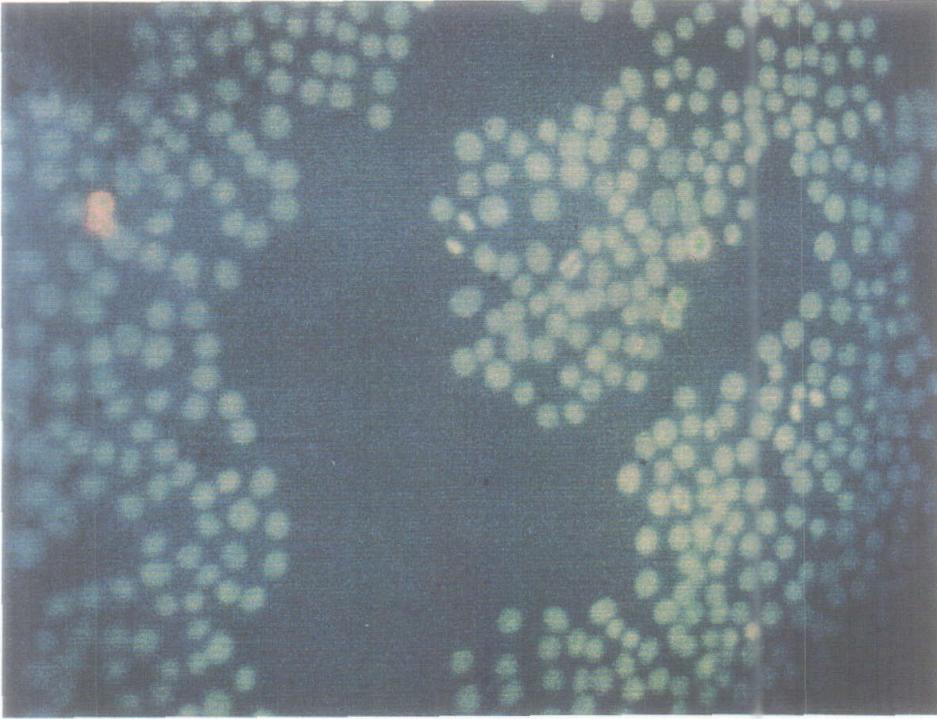


Fig. 7 Microfotografía de células RINm5F controles. Las células fueron incubadas con RPMI-completo durante 24 horas. Posteriormente fueron expuestas a los colorantes Hoechst 33342 y yoduro de propidio. El color azul-blanco difuminado de los núcleos muestra un ADN normal sin alteraciones apoptóticas.

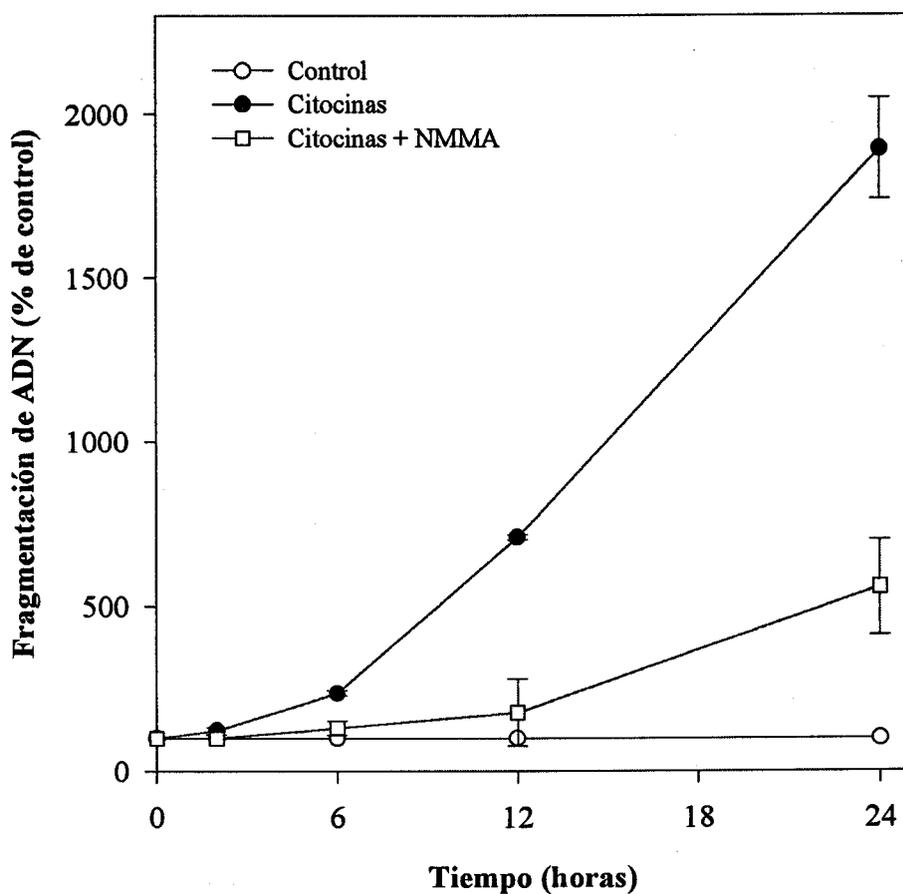


Fig. 8 Dependencia de tiempo de la fragmentación del ADN inducida por las citocinas. Células RINm5F fueron incubadas durante 0, 2, 6, 12 y 24 horas en presencia de citocinas (IL-1 β 25 U/ml, INF- γ 1000 U/ml y TNF- α 1000 U/ml), o la combinación de citocinas y NMMA 400 μ M. La fragmentación del ADN fue medida mediante ELISA. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.



Fig. 9 Efecto de las citocinas sobre la fragmentación del ADN. Células RINm5F fueron cultivadas durante 24 horas en presencia de citocinas (IL-1 β 25 U/ml, INF- γ 1000 U/ml y TNF- α 1000 U/ml), o la combinación de citocinas y NMMA 400 μ M. El ADN total fue separado por electroforesis en gel de agarosa y visualizado por fluorescencia con luz ultravioleta. Los resultados son típicos de tres experimentos.

4. CUANTIFICACIÓN DE LA ACCIÓN APOPTÓTICA DE LAS CITOCINAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Las células se marcaron con desoxirribonucleótidos unidos a fluoresceína mediante el método TUNEL (descrito en Material y Métodos). La incorporación de fluorescencia fue medida por citometría de flujo tomando una población de 20.000 células por tratamiento.

El análisis por citometría de flujo de células RINm5F no tratadas indica que sólo un 0,5 % son apoptóticas (Fig.10A), en tanto que las células tratadas con la mezcla de citocinas durante 12 y 24 horas muestran 18,5 y 25,9 % de células apoptóticas, respectivamente (Fig. 10B y 10C).

5. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA CASPASA-3 SOBRE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN INDUCIDA POR LAS CITOCINAS

En vista del papel de las caspasas en la inducción de apoptosis en diferentes tipos celulares (9, 36), se examinó la posible participación de la caspasa-3 en la fragmentación del ADN de células RINm5F inducida por las citocinas. Cuando las células RINm5F fueron incubadas con la mezcla de citocinas (IL-1 β 25 U/ml, IFN- γ 1000 U/ml y TNF- α 1000 U/ml), el ADN se fragmentó con un patrón de degradación en escalera, típico de apoptosis; pero la presencia de Z-VAD.fmk, un inhibidor de la caspasa-3, a una concentración final de 100 μ M, bloqueó la fragmentación del ADN inducida por las citocinas (Fig. 11).

Estos resultados sugieren que la caspasa-3 está involucrada en la apoptosis de las células RINm5F inducida por las citocinas.

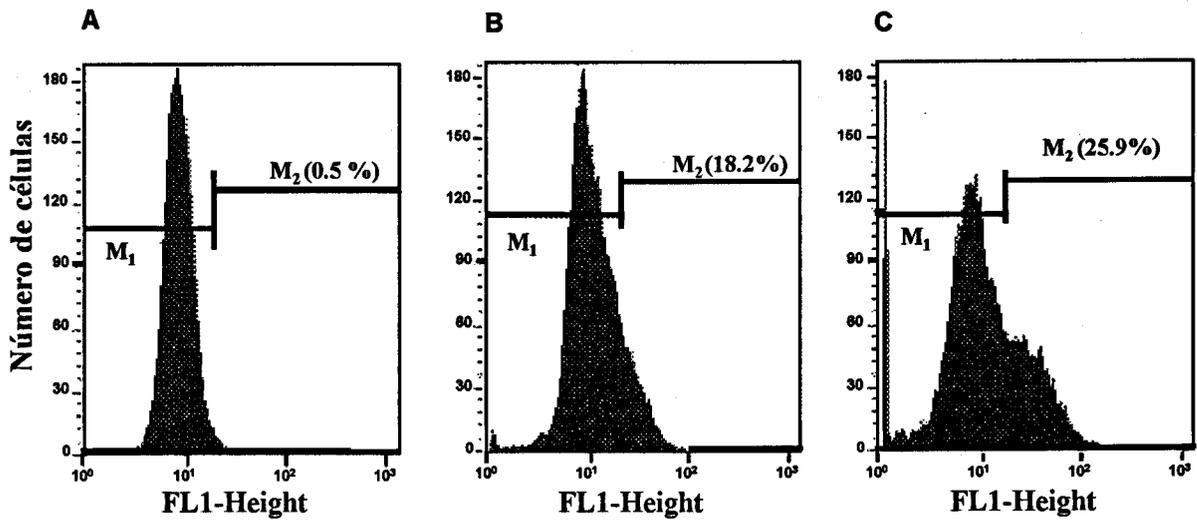


Fig. 10 Cuantificación por citometría de flujo de la apoptosis inducida por las citocinas. Células RINm5F fueron incubadas durante 0, 12 y 24 horas (A, B y C respectivamente) en presencia de citocinas (IL-1 β 25 U/ml, INF- γ 1000 U/ml y TNF- α 1000 U/ml). Las células fueron marcadas por la técnica TUNEL y analizadas mediante citometría de flujo. M₁: Células normales, M₂: Células apoptóticas. Los resultados son representativos de tres experimentos.

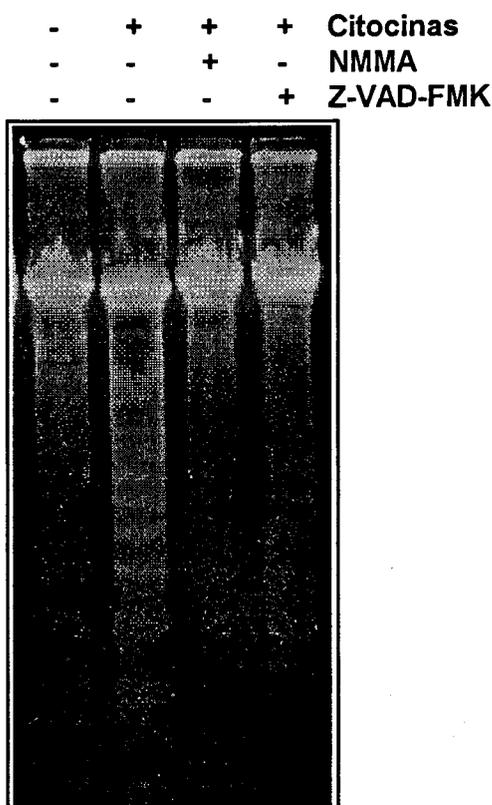


Fig. 11 Protección con Z-VAD.fmk de la fragmentación del ADN inducida por las citocinas. Células RINm5F fueron incubadas durante 24 horas en presencia de citocinas (IL-1 β 25U/ml, INF- γ 1000U/ml y TNF- α 1000 U/ml), de la combinación de citocinas y NMMA 400 μ M, y de la combinación de citocinas y el inhibidor de la caspasa-3, Z-VAD.fmk 100 μ M. El ADN total fue separado por electroforesis en gel de agarosa y visualizado por fluorescencia con luz ultravioleta. Los resultados fueron reproducibles en tres experimentos independientes.

6. PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA DEGRADACIÓN DEL ADN INDUCIDA POR LAS CITOCINAS

Con objeto de averiguar si el NO es responsable de la acción de las citocinas se llevó a cabo una serie de experimentos con SNP, que libera óxido nítrico cuando está en disolución acuosa.

La Fig. 12 A muestra la cuantificación de la degradación del ADN por el método de ELISA. Se observa que la fragmentación del ADN en las células tratadas con SNP 1mM es más rápida que en las células expuestas a las citocinas. Este hecho es debido a la cinética de liberación del óxido nítrico a partir del SNP. La adición de inhibidores de las caspasas, Z-YVAD.fmk 100 μ M o Z-VAD.fmk 50 μ M, al medio inhibe la fragmentación inducida por el SNP.

Por otro lado, se estudió la fragmentación del ADN en células expuestas a SNP 0,5 y 1 mM durante 7 horas. La aplicación extracelular de NO produce una marcada fragmentación del ADN en escalera cuando el SNP se encuentra en una concentración de 1 mM (Fig. 12B). En esta condición, la fragmentación del ADN requiere menos tiempo que la inducida por la mezcla de citocinas.

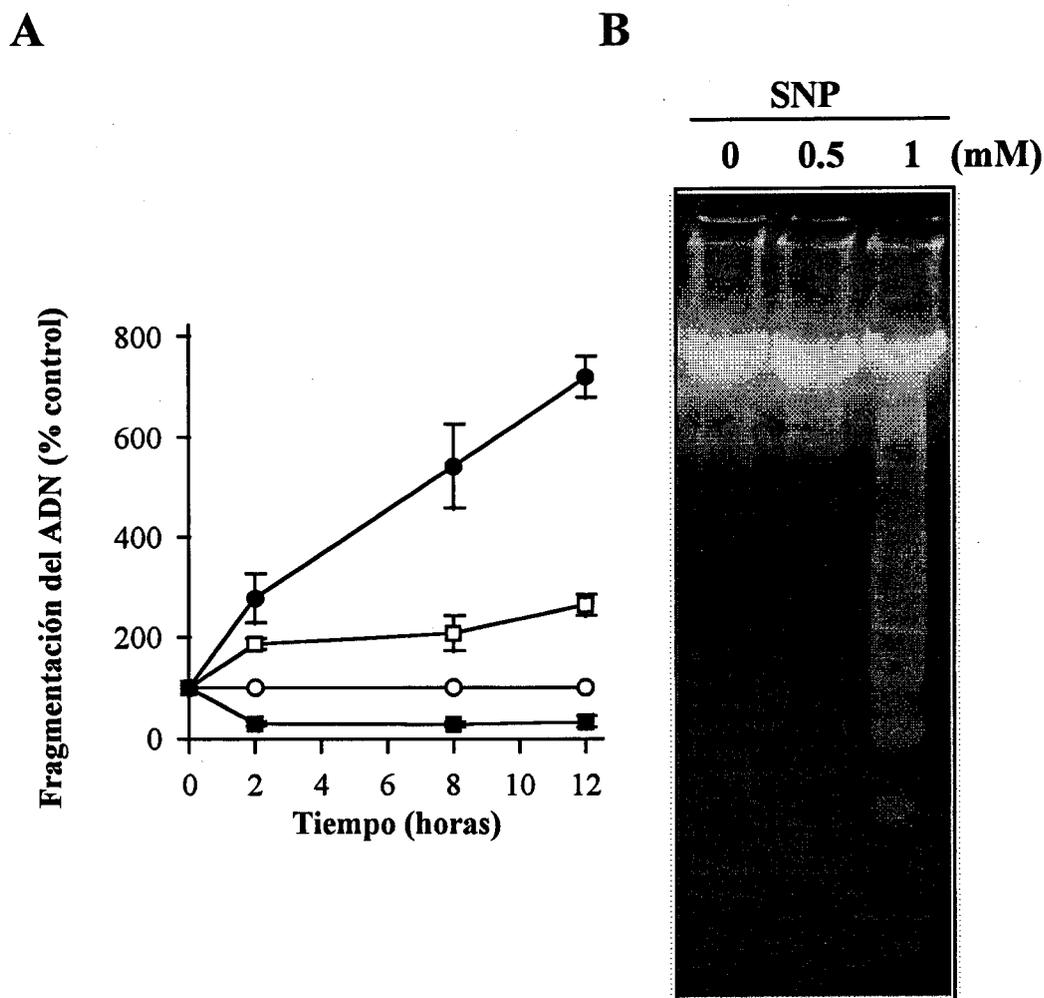


Fig. 12 Efecto del SNP sobre la fragmentación del ADN en células RINm5F.
 A) Dependencia de tiempo: (○) control, (●) SNP 1 mM, (□) SNP 1mM + Z-YVAD 100μM, (■)SNP 1 mM + Z-VAD 50 μM.
 B) Fragmentación del ADN en células tratadas con diferentes concentraciones de SNP durante 7 horas. El ADN fragmentado fue visualizado por fluorescencia con luz ultravioleta, después de la electroforesis del ADN total en gel de agarosa. El gel es típico de tres experimentos independientes.

7. EFECTO DE LAS CITOCINAS Y DEL ÓXIDO NÍTRICO SOBRE LA DEGRADACIÓN DE LA PARP

La PARP, poli(ADP-ribosa)polimerasa, es una enzima nuclear que cumple una función de reparación del ADN. Esta proteína es uno de los sustratos de la caspasa-3 durante la apoptosis. La caspasa-3 separa el extremo N-terminal, sensor de las brechas en el ADN, del extremo C-terminal, que es el dominio catalítico.

7.1. DEGRADACIÓN DE LA PARP INDUCIDA POR LAS CITOCINAS

Placas de células RINm5F, con un 60 % de confluencia, fueron incubadas con la mezcla de citocinas durante tiempos que van desde 0 hasta las 48 horas. Como muestra la Fig. 13, la PARP (116 kD) se degrada generando un fragmento menor de 85 kD cuando las células son tratadas con la mezcla de citocinas (IL-1 β 25 U/ml, IFN- γ 1000 U/ml y TNF- α 1000 U/ml). El análisis de los “western blot” usando un anticuerpo monoclonal anti-PARP, establece que la degradación de la PARP en respuesta a la acción de las citocinas, es dependiente del tiempo (Fig. 13A). La PARP empieza a degradarse a las 24 horas de tratamiento, periodo en el que hay una considerable producción de NO y una degradación del ADN en fragmentos nucleosomales. La degradación es mayor a las 36 y 48 horas de exposición.

El pequeño fragmento de 31 kD, complementario al de 85 kD en la fragmentación de la PARP, no es observado en la membrana puesto que no muestra inmunorreactividad.

Cuando se incuban las células con las citocinas en presencia del inhibidor NMMA 400 μ M durante 24 horas, se bloquea completamente la degradación de la PARP. Una respuesta similar se observa cuando está presente el inhibidor de caspasa Z-VAD.fmk 100 μ M (Fig. 13B).

El efecto inhibitorio de la NMMA sobre la degradación de la PARP establece claramente el papel del NO generado por la iNOS como una respuesta a la inducción por las citocinas. Por otro lado, esta degradación es dependiente de la caspasa-3, como lo demuestra la inhibición completa de la degradación de la PARP por el Z-VAD.fmk.

7.2. DEGRADACIÓN DE LA PARP INDUCIDA POR EL SNP

El SNP provoca también la degradación de la PARP de una manera dependiente del tiempo. La degradación de la PARP inducida por el SNP se inicia a las 6 horas de exposición, tiempo en que empieza a disminuir la señal de la PARP (116 kD), haciéndose evidente el fragmento de 85 kD a las 12 horas (Fig. 14A).

La degradación de la PARP inducida por el SNP 1 mM es bloqueada por la presencia de Z-VAD.fmk 100 μ M (Fig. 14B).

El estudio del efecto de las citocinas sobre la degradación de la PARP nos permite establecer que el NO actúa como mediador y que en este proceso está involucrado la caspasa-3.

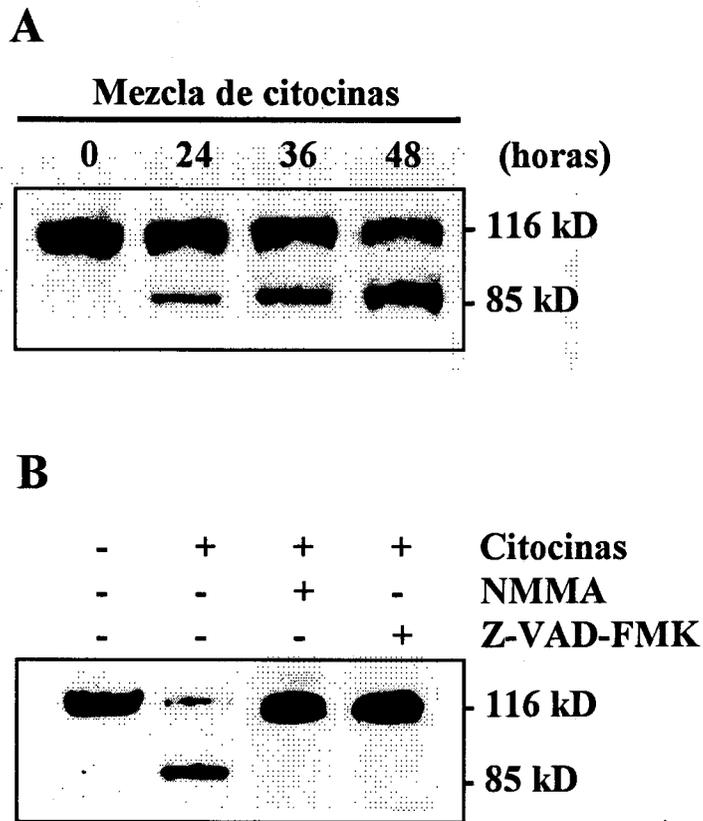


Fig.13 Degradación de la PARP en células RINm5F tratadas con citocinas. A) Las células fueron incubadas con citocinas (IL-1 β 25 U/ml, INF- γ 1000U/ml y TNF- α 1000U/ml) durante los tiempos indicados. B) Efecto de la NMMA 400 μ M y el Z-VAD.fmk 100 μ M sobre la degradación de la PARP inducida por las citocinas después de 24 horas de tratamiento. Los “western blot” fueron realizados como se indica en la sección de Métodos. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

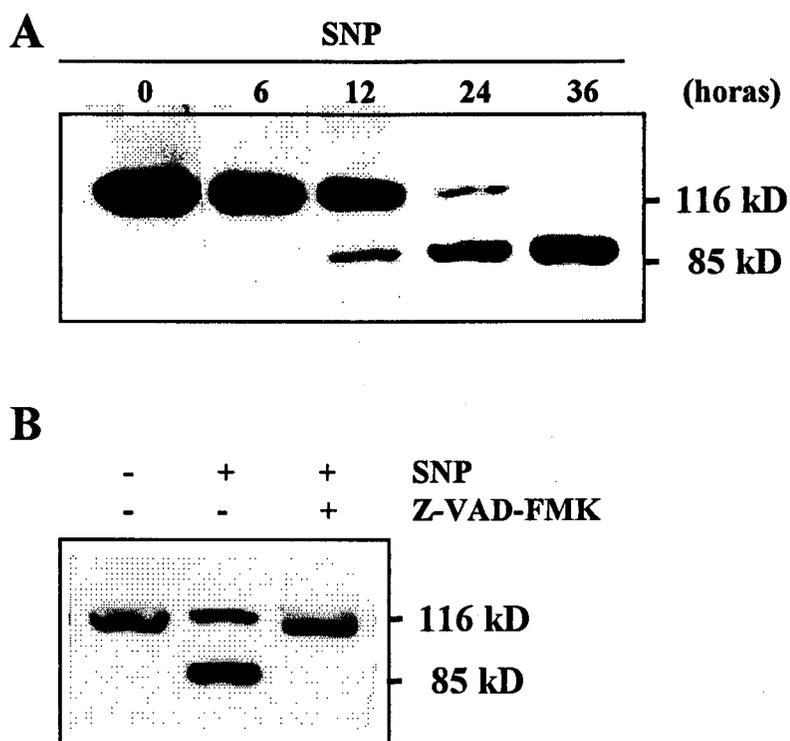


Fig.14 Degradación de la PARP en células RINm5F tratadas con SNP.
A) Las células fueron incubadas con el SNP 1 mM durante los tiempos indicados. B) Efecto del Z-VAD.fmk 100 μ M sobre la degradación de la PARP inducida por el SNP durante 12 horas de tratamiento. Los "western blot" fueron realizados como se indica en la sección de Métodos. Los datos son representativos de 3 experimentos .

8. EFECTO DE LAS CITOCINAS Y DEL ÓXIDO NÍTRICO SOBRE LA PRESENCIA DE LA PROTEÍNA Bcl-2 EN LAS CÉLULAS

La proteína Bcl-2 se encuentra en las membranas intracelulares y protege a las células de la apoptosis (107). Los estudios genéticos y bioquímicos indican que la Bcl-2 puede regular la apoptosis inducida por la activación de las caspasas, pero su participación “upstream” o “downstream” en la cascada de las caspasas no está del todo clara (108); sí está establecido en cambio, que la Bcl-2 puede ser un blanco preferido de las caspasas activadas (109, 110). En esta sección, se investiga la presencia de la proteína Bcl-2 en las células RINm5F, así como el efecto de las citocinas y de los inhibidores de la iNOS y de la caspasa-3.

8.1. EFECTO DE LAS CITOCINAS Y EL SNP

Las células RINm5F fueron incubadas con la mezcla de citocinas (IL-1 β 25U/ml, IFN- γ 1000U/ml y TNF- α 1000U/ml), o con SNP 1mM durante diferentes tiempos.

El análisis de los “western blot” (Fig. 15), revela que la exposición de las células RINm5F a la mezcla de citocinas durante 24 horas produce una marcada disminución de la proteína Bcl-2. La adición de la NMMA 400 μ M o el Z-VAD.fmk 100 μ M al cultivo celular bloquea la disminución de los niveles de Bcl-2 producida por las citocinas.

La incubación con SNP 1 mM provoca también una disminución de la proteína Bcl-2, que es dependiente del tiempo (Fig. 16A); dicha disminución se inicia a las 6 horas de exposición. De igual manera, la incorporación del Z-VAD.fmk bloquea el efecto del SNP (Fig. 16B).

Estos resultados sugieren que la disminución de la proteína Bcl-2 depende de la producción de NO endógena o exógenamente y es secundaria a la actividad de la caspasa-3.

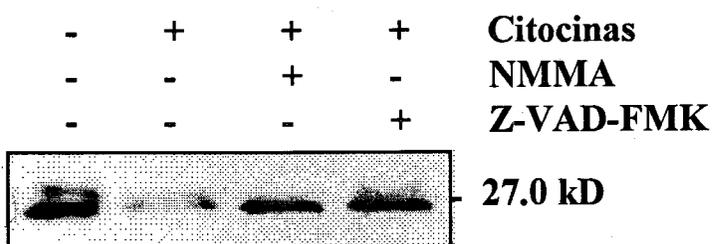


Fig.15 Efecto del tratamiento con las citocinas sobre la proteína Bcl-2 en células RINm5F. Las células fueron incubadas con las citocinas (IL-1 β 25 U/ml, INF- γ 1000U/ml y TNF- α 1000 U/ml) durante 24 horas, en ausencia o presencia de la NMMA 400 μ M o el Z-VAD.fmk 100 μ M. Los resultados son típicos de tres experimentos.

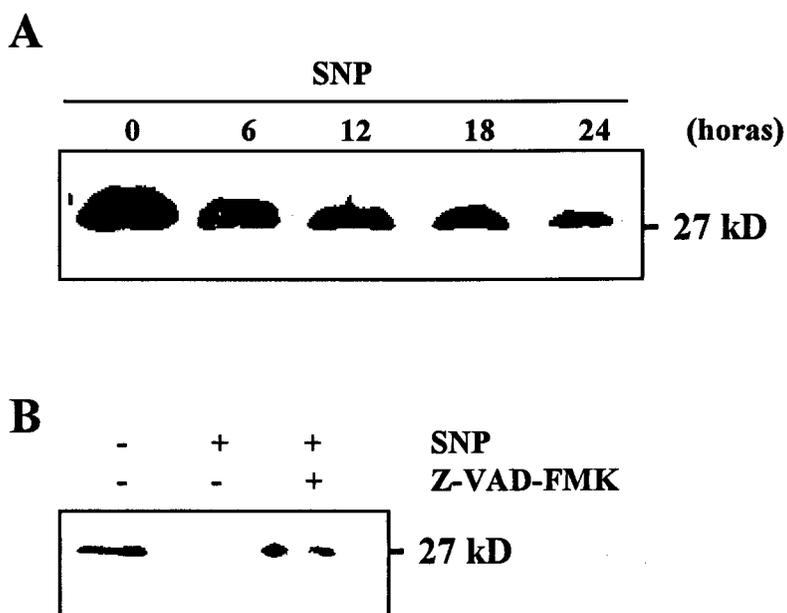


Fig.16 Efecto del tratamiento con el SNP sobre la proteína Bcl-2 en células RINm5F. A) Las células fueron incubadas con el SNP 1mM durante los tiempos indicados. B) Efecto del Z-VAD.fmk 100 μ M sobre los niveles de la Bcl-2 en células incubadas con el SNP durante 12 horas. Los “western blot” fueron realizados como se indica en la sección de Métodos. Los datos son representativos de 3 experimentos.

8.2. EFFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE LA Bcl-2

Se ha descrito que la Bcl-2 puede asociarse a intermediarios de las vías de las MAPKs (49) durante la apoptosis. Por otra parte, la Bcl-2 puede sufrir cambios postraduccionales, como es su fosforilación, para regular la apoptosis ya sea potenciando o reprimiendo este proceso. Actualmente existe mucha controversia sobre la función de la Bcl-2 fosforilada. En la siguiente serie de experimentos se estudia la fosforilación de la Bcl-2 en un sistema de reacción que contiene la proteína Bcl-2 obtenida por inmunoprecipitación de homogeneizados celulares, (γ - 32 P)ATP y como fuente enzimática, el homogeneizado de las células RINm5F expuestas a diferentes tratamientos.

La Fig. 17A representa un “western blot” de 10 μ l de sistema de fosforilación para la Bcl-2, y fue revelado usando un antisuero para la Bcl-2; el análisis de los resultados muestra que cuando la Bcl-2 es incubada con la fracción citosólica de células expuestas a SNP 1mM durante 6 horas, presenta un ligero retardo de su movilidad en el gel de poliacrilamida-SDS al 12,5 %. Este retardo en la migración es típico de una fosforilación y es confirmado a través de una autorradiografía (Fig. 17B). La fosforilación de la Bcl-2 “in vitro” por el homogeneizado celular es dependiente del tiempo de exposición a SNP (Fig. 18) y se inicia a la primera hora. Estos resultados sugieren que las cinasas responsables de la fosforilación de Bcl-2 se activan en este tiempo o menos. Por tanto, este cambio postraduccionales de la Bcl-2 sería un proceso anterior a su degradación y a la activación de la caspasa-3.

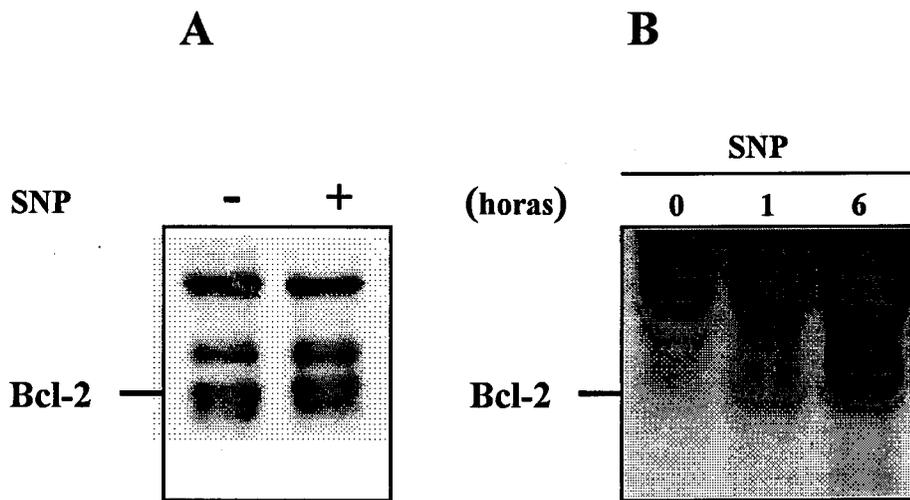


Fig.17 Fosforilación de la Bcl-2 inducida por el SNP. El sobrenadante del homogeneizado de células RINm5F expuestas al SNP 1 mM fue incubado con la Bcl-2 en un sistema de reacción que contenía (γ - ^{32}P)ATP. A) Análisis del retardo en la migración de la Bcl-2 fosforilada; el "western blot" fue desarrollado con antisuero para la Bcl-2. B) autorradiografía del sistema separado por electroforesis en PAGE-SDS al 12,5 %. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

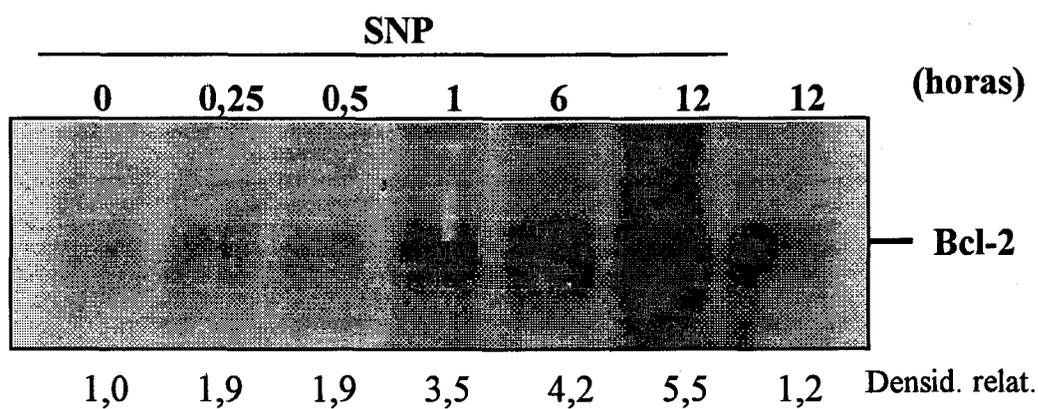


Fig.18 Dependencia de tiempo de la fosforilación de la Bcl-2 inducida por el SNP. El sobrenadante del homogeneizado de células RINm5F expuestas al SNP 1 mM durante diferentes tiempos, fue incubado con la Bcl-2 en un sistema de reacción que contenía (γ - ^{32}P)ATP. Los valores densitométricos de las señales autorradiográficas indican la incorporación de $^{32}\text{PO}_4$ a la Bcl-2 y son ajustados en base al tiempo cero, al que se le da un valor de 1. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

9. PARTICIPACIÓN DE LA ISOENZIMA PI3K γ EN LA ACCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO

La PI3K γ (phosphatidylinositol 3- kinase γ) es una enzima cuya actividad está regulada por ciertos factores de crecimiento y por determinados oncogenes e interactúa con muchas vías con funciones aún no muy precisadas.

Se han clonado y caracterizado muchas especies de PI3K. Las proteínas heterodiméricas PI3K α y PI3K β , están formadas por una subunidad catalítica (p110) y por diferentes moléculas adaptadoras (p85) y son reguladas por receptores con actividad tirosina cinasa, intrínseca o asociada. La isoforma denominada PI3K γ puede ser activada “in vitro” por las subunidades α y/o $\beta\gamma$ de la proteína G, pero no interactúa con el adaptador p85 (87).

Se expresó la proteína PI3K γ en células RINm5F y se evaluó su participación en la fosforilación de la Bcl-2 y en la activación de la ERK, en cultivos carentes de suero. Se encontró que las células que expresan la PI3K γ producen una mayor fosforilación de la Bcl-2 que aquellas que expresan el dominante negativo de la PI3K γ (PI3K γ KR), cuando las células son incubadas en un medio carente de suero durante 12 horas (Fig. 19A).

De manera similar, las células que expresan la PI3K γ producen una mayor fosforilación de la ERK que aquellas que expresan el dominante negativo de la PI3K γ (PI3K γ KR), cuando las células son incubadas en un medio carente de suero durante 12 horas (Fig. 19B).

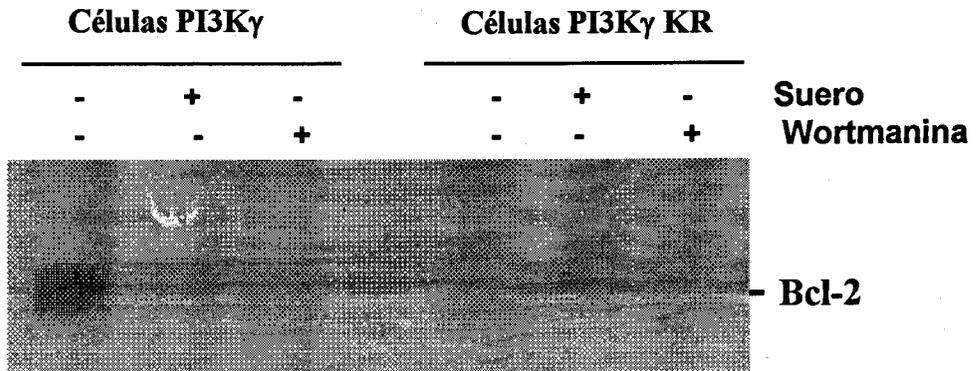
El efecto de la carencia de suero sobre la fosforilación de la Bcl-2 y de la ERK es inhibido por la wortmanina, un inhibidor de la PI3K.

Con la idea de conocer si la PI3K γ participa también en la señalización de la apoptosis provocada por el NO, se evaluó la actividad de la ERK en células que expresan la PI3K γ o el dominante negativo la PI3K γ KR, tras su incubación con el SNP 1 mM. Se observó que

las células que expresan la PI3K γ potencian la activación de la ERK inducida por el SNP (Fig. 20), lo que hace sospechar una posible participación de la PI3K γ en la vía de señalización de la apoptosis inducida por el NO.

Se requieren estudios más detallados para determinar la verdadera función de la PI3K en la activación de la vía de la MAPK inducida por el NO, puesto que además de una función de supervivencia puede participar en vías de estrés celular (92).

A



B

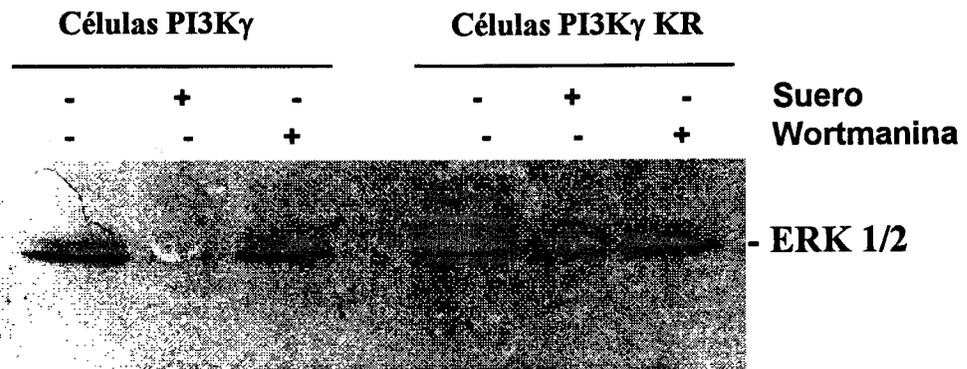


Fig. 19 Efecto de la PI3Ky sobre la fosforilación de la Bcl-2 y sobre la activación de la ERK en ausencia o presencia de suero. Células RINm5F que expresan la PI3Ky fueron incubadas en ausencia o presencia de suero durante 12 horas. El sobrenadante del homogeneizado celular fue usado para evaluar la fosforilación de la Bcl-2 y la ERK. A) Autorradiografía de la fosforilación de la Bcl-2. B) Análisis por "western blot" de la fosfo-ERK.

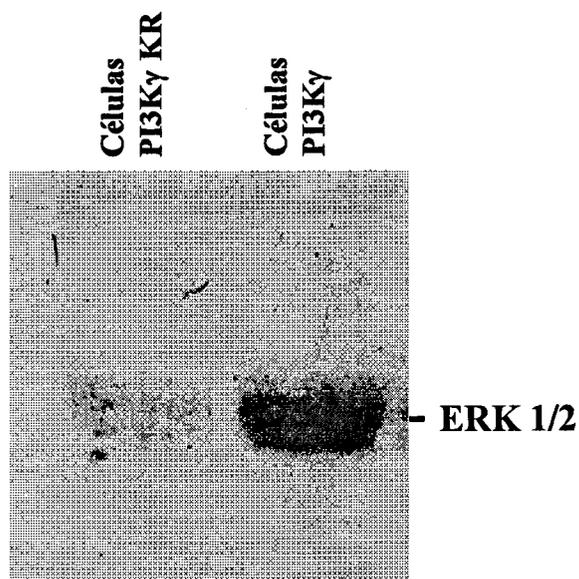


Fig. 20 Efecto de la PI3Ky sobre la activación de la ERK inducida por el SNP. Células RINm5F que expresan la PI3Ky fueron incubadas en presencia de SNP 1 mM durante 12 horas. El sobrenadante del homogeneizado celular fue usado para evaluar la proteína ERK. “western blot” para la fosfo-ERK.

10. EFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LAS ENZIMAS MAPK

Para investigar si la apoptosis producida por el NO va acompañada de una estimulación de la ERK y/o de la JNK, se estudió la actividad de la MAPK y de la JNK en las células RINm5F incubadas en RPMI sin suero y expuestas a SNP 1 mM.

10.1. ACTIVIDAD DE LA ERK Y DE LA JNK EN CÉLULAS RINm5F EXPUESTAS AL SNP

La actividad de la ERK se determinó usando la proteína básica de mielina (MBP) como sustrato y se evaluó mediante autorradiografía la incorporación de $^{32}\text{PO}_4$ a la proteína. La Fig. 21A muestra una autorradiografía de la actividad de la ERK en las células RINm5F expuestas a SNP 1 mM durante 0,25, 0,5, 1, 6 y 12 horas. Los valores densitométricos de las señales autorradiográficas indican la incorporación de $^{32}\text{PO}_4$ a la MBP. Estos valores fueron ajustados a una densidad relativa tomando como referencia el tiempo 0, al que se le asigna el valor de uno.

Los valores de densidad relativa fueron representados frente al tiempo de inducción con el SNP (Fig. 21B). La gráfica indica que la ERK se activa después del tratamiento con el SNP; el incremento de la actividad de la ERK se inicia a los 15 minutos y presenta su máximo nivel a los 60 minutos manteniéndose casi constante hasta las 6 horas para luego sufrir un nuevo incremento a las 12 horas. La actividad basal encontrada en las células controles podría deberse al estrés mecánico a que son sometidas durante su manipulación en la homogeneización. El tiempo de incubación no afecta a la actividad de la ERK en el grupo control. El análisis de "Western blot" usando antisuero para fosfo-p44/p42MAPK revela un comportamiento de la ERK activada similar al descrito para el análisis autorradiográfico (Fig. 22).

Para el estudio de la actividad de la JNK, usamos como sustrato una proteína de fusión que contiene el factor de transcripción ATF2. La proteína GST-ATF2 fue expresada en bacterias y aislada mediante agarosa-glutación (como se describe en la sección de Métodos).

La autorradiografía (Fig. 23B) muestra que la JNK se activa cuando las células RINm5F son expuestas al SNP.

En la Fig. 23A, podemos ver que la activación de la JNK (JNK fosforilada), la isoforma JNK46, aparece a las 6 horas de exposición con el SNP y su actividad se incrementa a las 12 horas. La presencia de PD098059, un inhibidor de la MEK que es utilizado para inhibir la activación de la ERK, bloquea completamente la activación de la JNK; en cambio, la presencia de SB203580, un inhibidor de la p38, no afecta la activación de la JNK inducida por el SNP (Fig. 24). La activación de la JNK se inicia a las 6 horas de tratamiento con el SNP, es decir, después de la activación de la ERK (Fig. 25). Estos resultados muestran que la inducción de la JNK es posterior y dependiente de la activación de la ERK e independiente de la actividad de la p38.

Cuando estudiamos la participación de estas vías en la fosforilación de la Bcl-2 (Fig. 26), encontramos que la fosforilación de la Bcl-2 inducida por el SNP no es afectada cuando se inhiben las vías de la ERK y la p38, por lo que podemos concluir que existe otra vía, diferente a las MAPKs, que sería la responsable de la fosforilación de la Bcl-2.

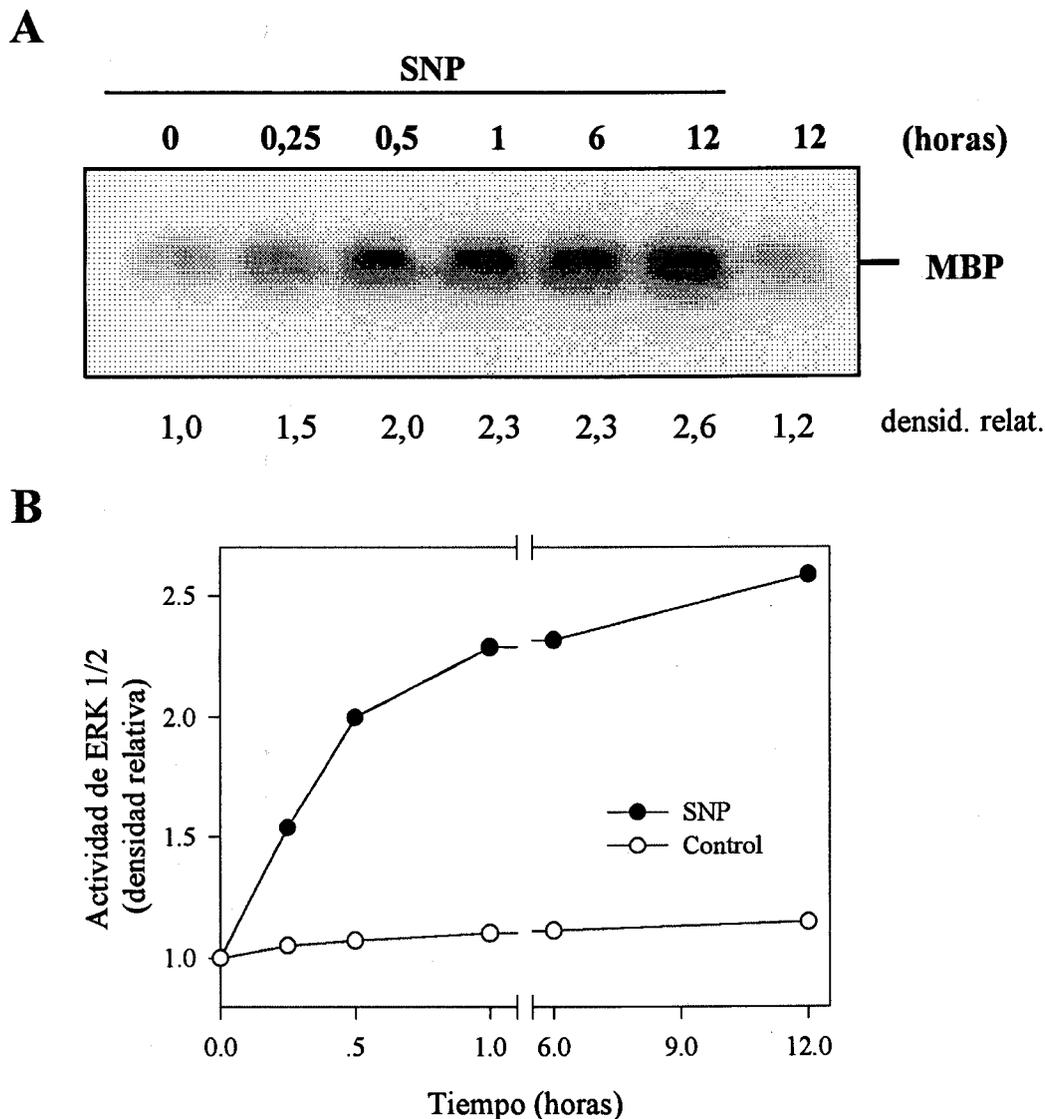


Fig. 21 Dependencia de tiempo de la activación de la ERK inducida por el SNP. Homogeneizados de células RINm5F expuestas al SNP 1 mM durante diferentes tiempos fueron utilizados para el ensayo de la actividad ERK, como se describe en la sección de Métodos. A) Autorradiografía de la dependencia de tiempo. B) Actividad de la MAPK (densidad relativa) frente al tiempo de inducción con el SNP 1 mM. Los valores densitométricos de las señales autorradiográficas indican la incorporación de $^{32}\text{PO}_4$ a la MBP y son ajustados en base al tiempo cero, al que se le da el valor de 1. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

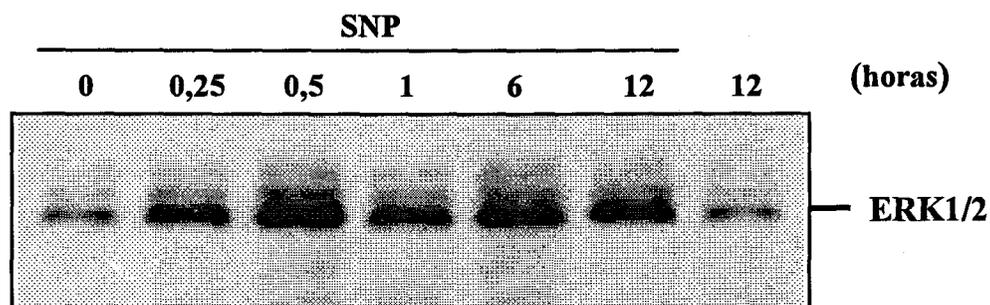


Fig. 22 Dependencia de tiempo de la fosforilación de la ERK inducida por el SNP. Células RINm5F fueron expuestas al SNP 1mM durante diferentes tiempos y el homogeneizado celular fue separado por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12.5%. El “western blot” fue revelado con antisuero para la fosfo-p44/42 MAPK. Los resultados son típicos de 3 experimentos independientes.

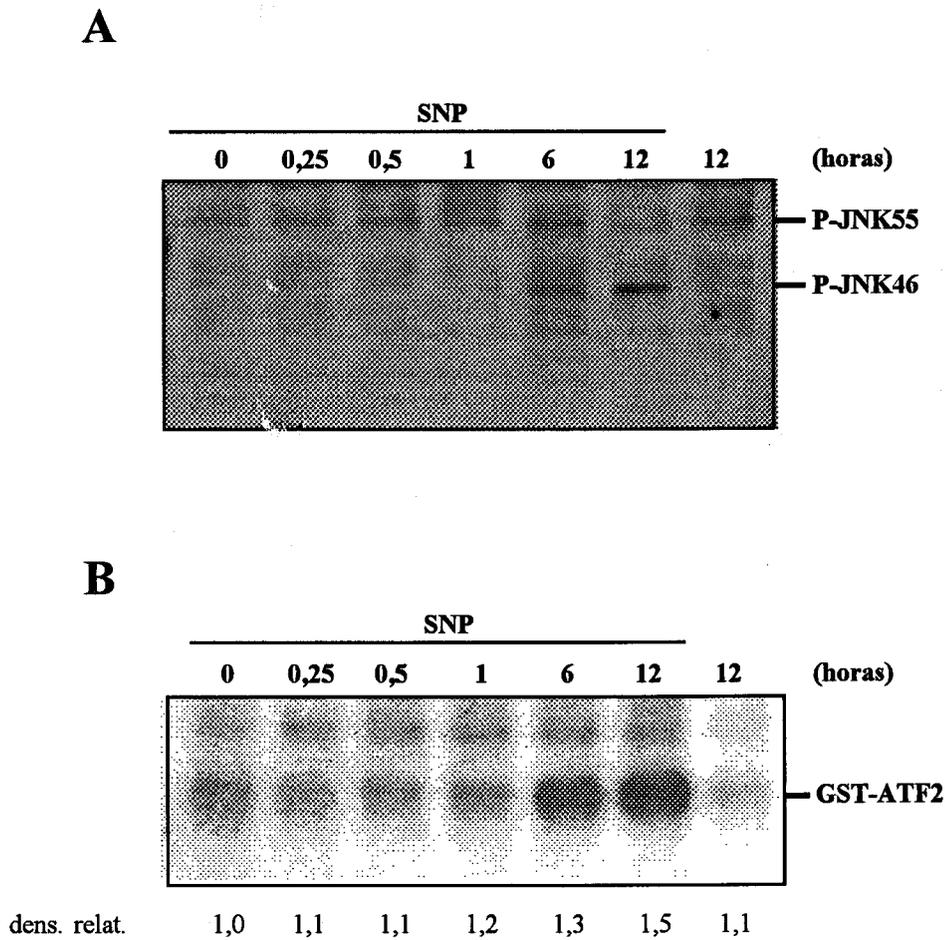


Fig. 23 Dependencia de tiempo de la fosforilación y de la activación de la JNK inducidas por el SNP. Células RINm5F fueron expuestas al SNP 1mM durante diferentes tiempos y el homogeneizado celular fue utilizado para el análisis de la JNK. A) “Western blot” de los homogeneizados celulares separados por electroforesis en PAGE-SDS y revelado con antisuero para la fosfo-JNK. B) Autorradiografía de la fosforilación de la GST-ATF2 por la JNK. Los resultados son típicos de 3 experimentos independientes.

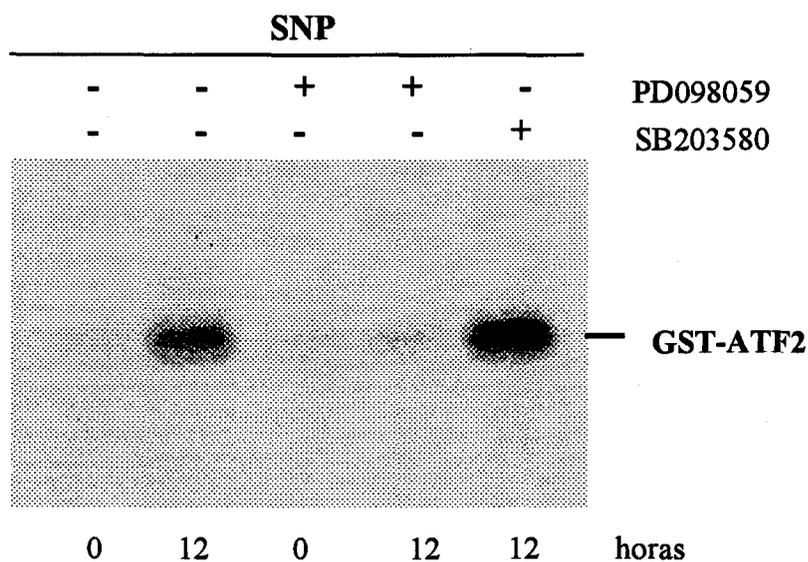


Fig. 24 Efecto de los inhibidores de la ERK y de la p38 sobre la activación de la JNK inducida por el SNP. Células RINm5F fueron preincubadas con PD098059 50 μ M o SB203580 20 μ M durante 1 hora y luego expuestas al SNP 1mM durante diferentes tiempos. El homogeneizado celular fue utilizado para el ensayo de la actividad de la JNK, como se describe en la sección de Métodos. Las señales de la autorradiografía indican la incorporación de $^{32}\text{PO}_4$ sobre la proteína de fusión GST-ATF2. Los resultados son típicos de tres experimentos independientes.

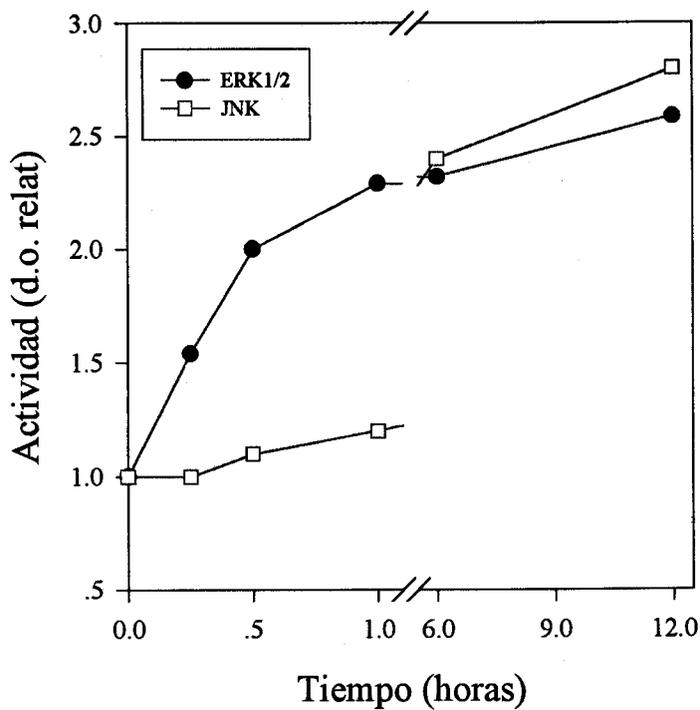


Fig. 25 Cinética de activación de la ERK y de la JNK inducida por el SNP. Células RINm5F fueron expuestas al SNP 1 mM durante diferentes tiempos. El homogeneizado celular fue utilizado para el ensayo de la actividad de la ERK 1/2 y de la JNK como se describe en la sección de Métodos. En el gráfico se muestran la densidad relativa de las señales autorradiográficas.

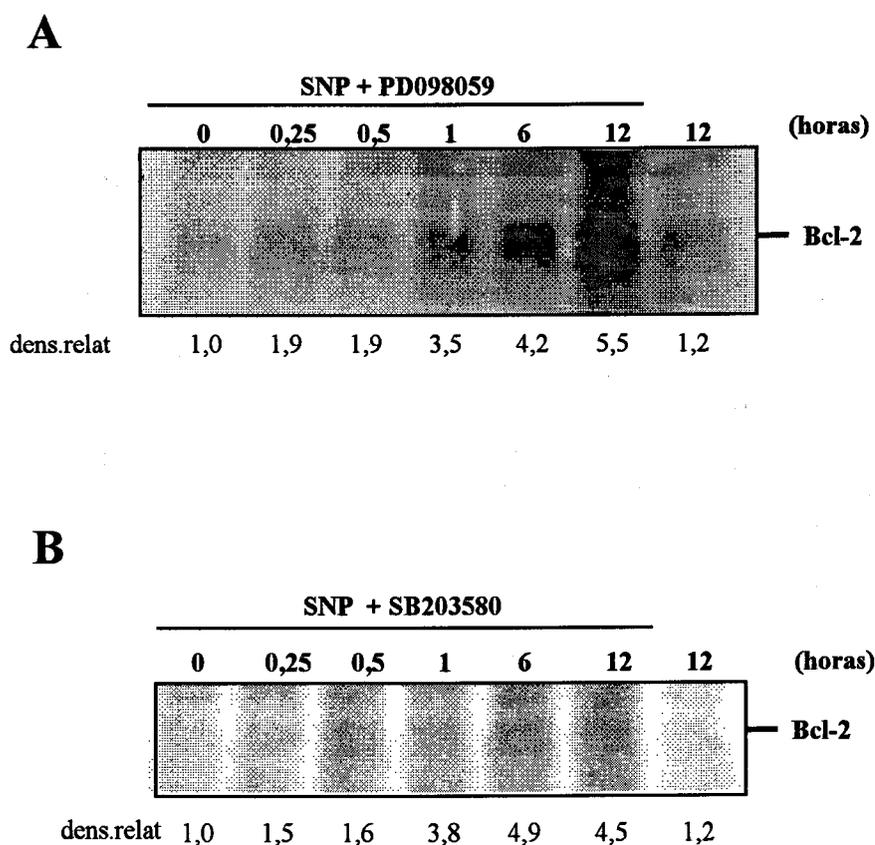


Fig. 26 Efecto de la inhibición de la ERK y de la p38 sobre la fosforilación de la Bcl-2 inducida por el SNP. Células RINm5F fueron preincubadas con PD098059 50 μ M o SB203580 20 μ M durante 1 hora y luego expuestas al SNP 1mM durante diferentes tiempos. El homogeneizado celular fue utilizado para el ensayo de actividad cinasa como se describe en la sección de Métodos. Las señales de la autorradiografía indican la incorporación de $^{32}\text{PO}_4$ a la Bcl-2. A) Efecto de PD098059. B) Efecto de SB203580. Los resultados son típicos de 3 experimentos independientes.

10.2. RELACIÓN ENTRE LA ACTIVACIÓN DE LA CASPASA-3 Y LA ACTIVACIÓN DE LAS ENZIMAS MAPK

En este estudio se investigó la activación de la caspasa-3 inducida por el SNP y su correlación con la ERK y la p38, ya que esta caspasa está involucrada en la etapa de ejecución de la apoptosis. La actividad proteasa de la caspasa-3 fue medida en la fracción citosólica de las células RINm5F tratadas con el SNP, mediante la degradación de DEVD-AFC, sustrato de la caspasa-3.

En la Fig. 27 se muestra que el SNP 1 mM activa a la caspasa-3 en las células RINm5F de una manera dependiente del tiempo. La activación se inicia a los 15 minutos (143 pmol de AFC/min/mg de proteína), incrementándose considerablemente hasta las 12 horas. Las células controles apenas sufren incremento en la actividad de la caspasa-3 (de 165 a 171 pmol/ min/mg de proteína en el inicio y el final del experimento respectivamente).

La presencia de PD098059, un inhibidor de la MEK, bloquea considerablemente la activación de la caspasa-3 inducida por el SNP; de igual forma, cuando se usa SB203580, un inhibidor de la p38, se observa que la actividad de la caspasa-3 es anulada. Para descartar que estos inhibidores no afectan directamente a la caspasa-3, se realizó una prueba control incubando un homogeneizado de células, activadas con el SNP, con el sustrato fluorogénico de la caspasa-3 en presencia de estos inhibidores, y se encontró que la propiedad proteolítica de la caspasa-3 no se afectaba.

Podemos concluir que la activación de la caspasa-3 es rápida y su incremento es dependiente del tiempo. Esta actividad es bloqueada cuando las vías de la ERK y de la p38 dejan de funcionar.

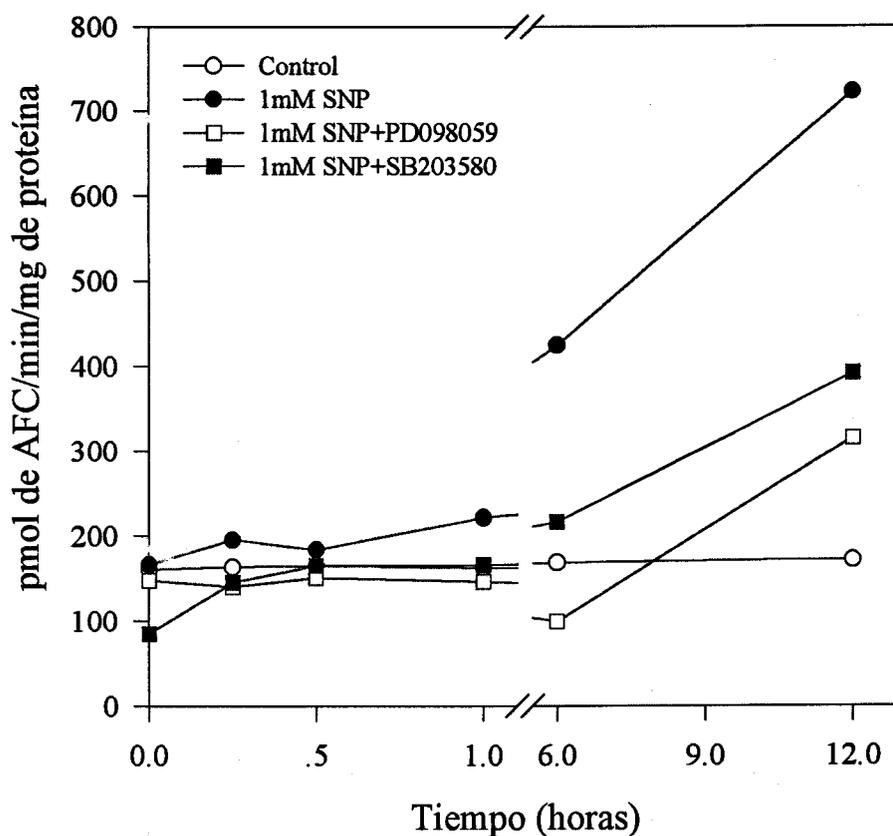


Fig. 27 Dependencia de tiempo de la activación de la caspasa-3 inducida por el SNP. Células RINm5F fueron expuestas al SNP 1 mM durante diferentes tiempos en presencia o ausencia de PD098059 50 μ M o SB203580 20 μ M. La fracción citosólica (50 μ g) fue incubada durante 2 horas a 37° C en un sistema de reacción para caspasa que contenía DEVD-AFC, un sustrato de la caspasa-3. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

10.3. RELACIÓN ENTRE LA LIBERACIÓN DEL CITOCROMO C Y LA ACTIVACIÓN DE LAS ENZIMAS MAPK

Teniendo en cuenta que la mitocondria juega un papel muy importante, a través de la liberación de citocromo c, en la fase ejecutora de la apoptosis, se estudió la salida de citocromo c desde la mitocondria al citosol, en células expuestas al SNP durante 12 horas. El “western blot” (Fig. 28) muestra que el SNP 1mM induce la liberación del citocromo c y que esta liberación se bloquea en presencia de los inhibidores de la MEK o de la p38.

Estos resultados nos permiten sugerir que la vía de señalización de la ERK y de la p38 están comprometidas en el mecanismo de la regulación de la liberación del citocromo c inducida por el óxido nítrico.

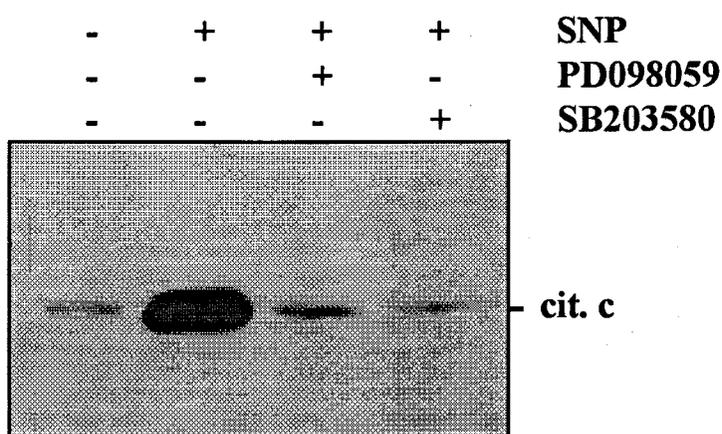


Fig. 28 Liberación del citocromo c inducida por el SNP. Células RINm5F fueron incubadas con el SNP 1 mM durante 12 horas en presencia o ausencia de PD098059 50 μ M o SB203580 20 μ M. El sobrenadante del homogeneizado celular fue separado mediante electroforesis en PAGE-SDS y el "western blot" fue revelado con antisuero para el citocromo c. Los resultados son típicos de tres experimentos independientes.

DISCUSIÓN

Con objeto de estudiar los aspectos moleculares de la acción del NO, como mediador en la apoptosis inducida por las citocinas en las células RINm5F, se aplicaron diferentes técnicas, ya que la apoptosis se caracteriza por un conjunto de alteraciones morfológicas y bioquímicas.

En este trabajo de tesis doctoral se ha empleado una mezcla de IL-1 β , IFN- γ y TNF- α , puesto que las evidencias indican que la acción sinérgica de estas citocinas causan la síntesis del NO y de las otras especies reactivas de oxígeno descritas anteriormente (111). Por otro lado, para estudiar el papel del NO, se usó el nitroprusiato de sodio (SNP), un efectivo dador de NO (112).

Nuestros resultados muestran que la combinación de citocinas induce la producción de NO en las células RINm5F de una manera dependiente del tiempo (Fig. 3A) y se inicia a las 6 horas del tratamiento. El tiempo necesario para la producción de NO es similar al encontrado por Andrade (104), pero cuando las células se incuban solamente con IL-1 β 10U/ml, el tiempo es de 12 horas (63). Nuestros hallazgos muestran la efectividad de la acción sinérgica de la mezcla de citocinas.

Respecto a la mortalidad celular y a la fragmentación del ADN, nuestros resultados muestran claramente que siguen un patrón similar a la producción de NO (Figs. 5 y 8). Esto nos permite sugerir que el NO induce la muerte celular y la fragmentación del ADN en las células RINm5F.

El hecho de que la NMMA, un inhibidor competitivo de la iNOS, bloquee la producción de NO inducida por las citocinas, indica que el NO es el resultado de la inducción de la iNOS por acción de las citocinas (IL-1 β 25U/ml, IFN- γ 1000 U/ml y TNF- α 1000U/ml) (Fig. 3B), similar a lo observado por Kaneto (82).

La fragmentación del ADN (Fig. 9) en un típico patrón de escalera, así como el estudio de la morfología nuclear (Fig. 6) en células RINm5F tratadas con citocinas, establecen una típica muerte por apoptosis y confirman los hallazgos descritos anteriormente para este sistema (111). Estos resultados son también similares a los encontrados en células de islotes de rata y líneas celulares de insulinoma de hámster (113).

Se cuantificó además la población apoptótica mediante citometría de flujo, marcando las células con la técnica de TUNEL, método muy fiable para la cuantificación de células apoptóticas (114). Los resultados de la citometría de flujo muestran que a las 12 horas de tratamiento con las citocinas (Fig. 10), existe una elevada población de células apoptóticas (18 %), que no es visualizada cuando se hace un gel de agarosa para el ADN.

La exposición de las células a SNP 1 mM produce unos efectos sobre la fragmentación del ADN y la muerte celular similares a los producidos por las citocinas (Fig. 12). Ello nos permite establecer que el NO sería el responsable del daño celular, sin excluir la presencia de otros radicales liberados por este dador de óxido nítrico. El efecto apoptótico que encontramos para el SNP es más rápido que el producido por la mezcla de citocinas y es consecuencia de la cinética de liberación del NO a partir del SNP.

Se han propuesto varios mecanismos por los que el NO puede producir la fragmentación del ADN. Uno de ellos es el daño oxidativo directo al ADN a través de la desaminación de ciertas bases. La guanina puede ser desaminada a xantina y la adenina a hipoxantina, creando de esta forma sitios abásicos (álcalis lábiles potencialmente mutagénicos)(67, 79, 115); o mediante reacción con aminas secundarias y terciarias de compuestos N-nitrosos, los cuales durante su metabolismo pueden provocar la alquilación de bases nitrogenadas del ADN (116). Estas etapas iniciales de cambios en la estructura del ADN servirían de blanco y señales para activar moléculas sensoras e iniciar el proceso apoptótico.

PARP y Bcl-2

Nuestros resultados establecen claramente que la apoptosis inducida por el NO endógeno o exógeno en las células RINm5F va acompañada de la degradación de la PARP y de la disminución de la proteína Bcl-2.

Se encontró que la degradación de la PARP por el NO se inicia a las 24 horas, cuando el NO es generado por la combinación de citocinas (Fig. 13A), mientras que si el NO es de origen exógeno, generado por el SNP, esta degradación se inicia a las 12 horas (Fig. 14); en ambos casos, la degradación de la PARP sigue un patrón temporal. Si se comparan estos resultados con los tiempos de degradación del ADN (Figs. 8 y 12A), se observa que la degradación de la PARP es un proceso posterior al inicio de la degradación del ADN. Este hallazgo apoya la idea de que al inicio la PARP estaría cumpliendo funciones de reparación del daño del ADN provocado por el NO, ya que se ha descrito un incremento de su actividad en respuesta al daño del ADN (117, 118). Por otra parte, este incremento en la actividad de la PARP conlleva a un consumo masivo de ATP y NAD^+ (119, 120).

Por otro lado, nuestros resultados son consistentes con los hallazgos que describen que la PARP es un sustrato de ciertas caspasas, especialmente la caspasa-3, durante la fase ejecutora del proceso apoptótico (121, 122).

Kaufmann (121) demostró que la degradación de la PARP (116 kD) provocaba la eliminación de un fragmento N-terminal, resultando una PARP (85 kD) sin el sitio de unión al ADN pero que retenía una actividad enzimática basal menos estimulable por señales de reparación. Además, la PARP normalmente ADP-ribosila la endonucleasa activa $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ -dependiente (123) y la convierte en inactiva.

En conclusión, el daño al ADN mediado por el NO en las primeras horas de inducción, causaría la activación de la PARP y ésta produciría una disminución de los niveles de ATP y NAD^+ que contribuirían al inicio del programa apoptótico. La degradación de la PARP

dependiente de la caspasa-3 provocaría la activación de endonucleasas que fragmentarían el ADN, resultando en una típica fragmentación del ADN en escalera.

Respecto a la proteína Bcl-2, se encontró que el NO tanto endógeno como exógeno producen su disminución en las células RINm5F (Fig. 15 y 16A).

Normalmente la apoptosis va acompañada de la degradación de la Bcl-2 y del incremento de la expresión de otras proteínas relacionadas con la Bcl-2, pero que tienen función proapoptótica, como Bax, Bid, etc. (110, 124, 125). Contradictoriamente en células B esplénicas, se ha encontrado que el NO induce la expresión de la Bcl-2 y previene la apoptosis (68). Este tipo de células podría diferir en la regulación de la expresión de la Bcl-2.

Los resultados experimentales que muestran que la degradación de la Bcl-2 es inhibida por el Z-VAD.fmk (Fig. 15 y 16B) nos permiten sugerir que ésta es dependiente de la caspasa-3 y que la función reguladora de apoptosis por la Bcl-2 sería anterior en la secuencia de la activación de la caspasa-3 (126).

Es cierto que la activación de las caspasas juega un papel importante en la señalización apoptótica y que la Bcl-2, con su función antiapoptótica, puede inhibir este proceso (18, 127, 128). Por lo tanto, ¿cómo es que la Bcl-2 pierde el control de las caspasas convirtiéndose luego en blanco de éstas en la apoptosis inducida por el óxido nítrico?... la respuesta debe tener un fundamento en la existencia de un ciclo de retroalimentación entre la Bcl-2 y las caspasas.

El mecanismo por el cual la Bcl-2 regula la función de las caspasas es aún desconocido. El hecho de que la Bcl-2 no pueda inhibir la apoptosis en algunas situaciones, implica que caspasas específicas podrían evitar la vía regulada por la Bcl-2. En este caso, la activación de un subgrupo de caspasas que son insensibles a la Bcl-2 podría promover también la degradación de la Bcl-2, convirtiéndose incluso en proapoptótica (109). Por otro lado, se

ha demostrado que su función protectora se debe a que la Bcl-2 forma dímeros, a través de su dominio BH3, con otras proteínas de función proapoptótica, como Bax y con las procaspasas (129), al igual que lo hace Bcl-x_L interactuando con la ICE y la FLICE (14), secuestrando de esta forma proteínas proapoptóticas. La modulación de esta interacción puede ser regulada por el citocromo c y/o el AIF (apoptosis inducing factor) liberados de la mitocondria o por cambios postraduccionales de la Bcl-2, como su fosforilación. Por ejemplo, la fosforilación de la Bcl-2 previene su dimerización con la Bax, inclinando de esta manera el equilibrio hacia la apoptosis (48-51).

Nuestros resultados sobre la fosforilación de la Bcl-2 inducida por el NO (Fig. 17) apoyan fuertemente esta última idea, estableciendo de esta forma, que la fosforilación de la Bcl-2 en células RINm5F compromete la participación de proteínas cinasas/fosfatasas que actuarían inmediatamente “upstream” del control apoptótico regulado por la Bcl-2. Para establecer la interacción molecular a este nivel, estudios posteriores son requeridos, puesto que aún se sabe poco sobre la fosforilación de la Bcl-2 .

Finalmente podemos concluir que la degradación de la Bcl-2 en las células RINm5F inducida por el NO es secundaria a la iniciación de la apoptosis y va acompañada por un mecanismo de fosforilación.

MAPKs

Se ha descrito que las cascadas de señalización de las MAPKs, como son: la JNK, la p38 o la ERK, o las tres juntas participan en la vía de señalización que conduce a la apoptosis (49, 130). Se investigó si estas vías de señalización pueden ser activadas por el NO y se encontró que tanto la cascada de la ERK como la JNK, y de una forma indirecta, también la p38, son activadas en las células RINm5F cuando éstas fueron expuestas al SNP, un dador de óxido nítrico (Figs. 20 - 23).

La ERK es una MAPK que se activa por una reacción de fosforilación mediada por la MEK. La forma activa de la ERK fue evaluada a través de su capacidad de fosforilar la MBP y analizada por autorradiografía (Fig. 21). También se hizo un “western blot”, usando un antisuero que reconoce su forma fosforilada, la fosfo-p44/42ERK (Fig. 22). Nuestros resultados muestran que la activación de la ERK se inicia a los 15 minutos de exposición al SNP (Fig. 21), tiempo similar al encontrado para las células RES y RAW (99), condrocitos (89) y células endoteliales (86). Su actividad sufre un incremento importante hasta la primera hora de tratamiento con el SNP y que se mantiene con un leve incremento hasta las 6 horas, produciéndose luego un nuevo incremento a las 12 horas que es una etapa final de la apoptosis inducida por el SNP.

Para el caso de la JNK, su actividad también fue evaluada por la capacidad de fosforilar la ATF2, que fue expresada y purificada como una proteína de fusión (GST-ATF2), y analizada por autorradiografía (Fig. 23B). La forma fosforilada de la JNK fue visualizada por “western blot”, usando un antisuero que reconoce la fosfo-1/2JNK (Fig. 23A). La activación de la JNK inducida por el SNP es posterior a la de la ERK, ya que su activación se produce a las 6 horas de exposición al SNP (Fig. 25).

En el intento de relacionar la vía de la ERK con la de la JNK, se preincubaron las células RINm5F con PD098059 (inhibidor específico de la MEK) o con SB203580 (inhibidor de la p38)y, a continuación, se realizó una incubación con el SNP 1 mM (Fig.24). Al bloquear la vía de señalización de la ERK, interesantemente, se encontró que la JNK también es

inhibida, convirtiendo así la JNK en una vía dependiente de la ERK. Nuestros hallazgos permiten establecer que el NO activa la ERK en un corto periodo de tiempo, posiblemente para cumplir una función protectora frente al estrés y presumiblemente lo haría a través de la p21^{ras}, puesto que se ha mostrado que esta pequeña proteína puede actuar como sensor celular del estado redox (86). La activación de la ERK conllevaría a la estimulación de factores de transcripción, los cuales a su vez inducirían la expresión de genes que terminarían activando la JNK. Por otro lado, al inhibir la p38, la activación de la JNK inducida por el SNP no es afectada, lo que nos hace pensar que la vía de la JNK actuaría de una forma independiente de la p38.

Por lo descrito, la ERK y la JNK necesariamente participan en la transducción de señales del NO. Además, las vías de la JNK y de la p38, actúan de forma separada en la señalización del NO y, al parecer, no intervienen en la regulación de la fosforilación de la Bcl-2 (Fig. 26); puntualizando así, un papel más para las vías MAPKs en la señalización del proceso apoptótico inducido por el NO.

Nuestros estudios también dirigen la atención a la posición de la activación de las vías MAPKs y de la caspasa-3. Curiosamente Park (93), utilizando inhibidores de las caspasas en sus experimentos de activación de la JNK en células PC12, demostró que la activación de la JNK es independiente de la activación de las caspasas, especialmente las de la familia ICE. Nosotros enfocamos el tema desde otro punto de vista; se intentó averiguar qué sucede con la actividad de la caspasa-3 cuando la vía ERK o la vía p38 es bloqueada. Para ello, se preincubaron células RINm5F con PD098059 (un inhibidor específico de la MEK) o con SB203580 (un inhibidor específico de la p38) y, a continuación, se expusieron al SNP 1 mM.

Nuestros resultados demuestran claramente que la actividad de la caspasa-3 es dependiente de la actividad de la ERK y de la p38 (Fig. 27). El incremento de la actividad de la caspasa-3 se inicia a la hora de exposición al SNP, es decir, posteriormente a la activación de la ERK; en este tiempo posiblemente se active la p38 (la actividad de p38 no fue evaluada).

Estos resultados, nos permiten sugerir que la activación de la caspasa-3 es posterior a la activación de la ERK y que depende además de la activación de la p38.

La regulación de las caspasas, vía cascada de las MAPKs, está empezando a ser definida como lo demuestran artículos recientemente publicados (99, 130).

En nuestro laboratorio, de un tiempo a esta parte, se está caracterizando el papel de la mitocondria en la apoptosis inducida por la IL-1 β y por moléculas donantes de óxido nítrico. Para estudiar la participación de las vías MAPKs en la liberación del citocromo c, desde la mitocondria al citosol, se preincubaron las células RINm5F con PD098059 (un inhibidor específico de la MEK) o con SB203580 (un inhibidor específico de la p38) y seguidamente se expusieron al SNP 1 mM. El "western blot" del sobrenadante de los homogeneizados celulares (Fig. 28) muestra que la incubación con el SNP, produce la liberación del citocromo c y que este efecto es bloqueado por la presencia de inhibidores de la MEK y de la p38. Estos resultados confirman la participación de la mitocondria en la apoptosis inducida por el NO, a través de la liberación del citocromo c y que esta liberación es mediada por las MAPKs. El hecho que el bloqueo de la salida de citocromo c esté relacionado con la supervivencia (18, 127), hace que esta relación citocromo c-MAPKs se convierta en un atractivo tema de estudio.

Nosotros proponemos un modelo hipotético de las vías de señalización para el proceso apoptótico inducido por el óxido nítrico (Fig. 29) en el que éste actúa antes o por encima de las vías de las MAPKs, y fundamentalmente éstas vías serían una de las rutas que sigue la señal del óxido nítrico para la activación de la caspasa-3 y la regulación de la salida del citocromo c. Por otro lado, la fragmentación del ADN que es una respuesta casi inmediata de las células cuando éstas son expuestas al óxido nítrico, coincide temporalmente con la activación de la ERK, lo que hace sospechar que ésta vía es dependiente de la activación de la ERK. Por otra parte, la vía de la PI3K activa a la ERK en el sistema celular que hemos estudiado. Ello nos permite proponer que la ERK controla la producción de señales que

participan tanto en los procesos de supervivencia como de muerte celular. Las flechas discontinuas indican procesos que están todavía por determinar.

En resumen, se propone que las señales de muerte o de supervivencia serían el resultado de la integración de múltiples vías. En este sentido, el óxido nítrico intervendría tanto en los procesos de supervivencia como de muerte en las células RINm5F. La muerte celular sería entonces el resultado de una producción elevada de óxido nítrico que provocaría un daño irreparable en el ADN y causaría un desequilibrio energético en la mitocondria manifestándose en una exacerbación del proceso apoptótico.

Finalmente, se sugiere que el conocimiento molecular de la expresión y regulación de las vías de las MAPKs y su relación con el proceso apoptótico en células secretoras de insulina podría conducir a la elaboración de estrategias para la prevención o el tratamiento de la IDDM, mal que aqueja a un buen porcentaje de la población mundial.

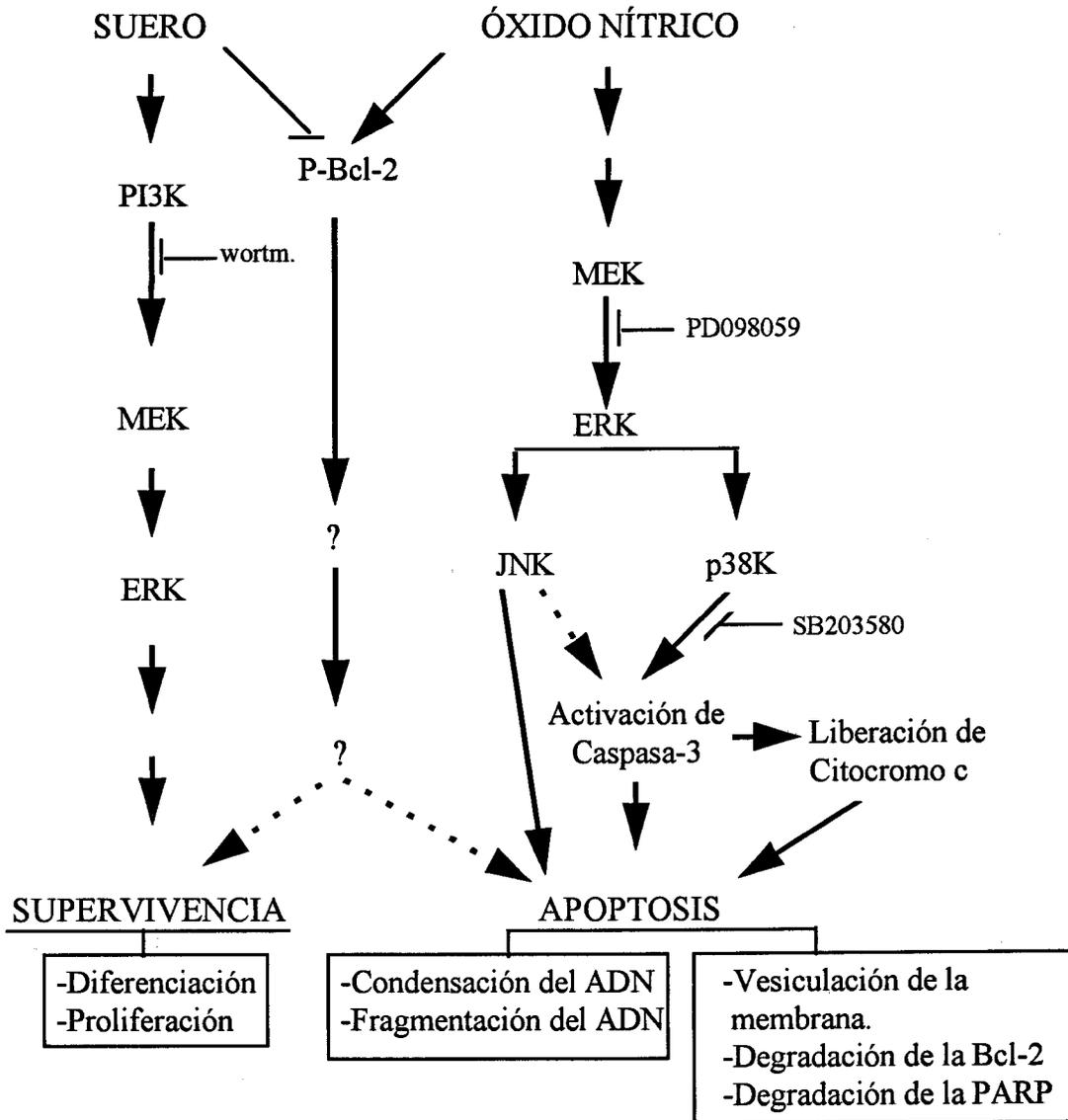


Fig. 29 Modelo propuesto para la vía de señalización en la apoptosis inducida por el óxido nítrico.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. La combinación de citocinas IL-1 β , IFN- γ y TNF- α , induce la apoptosis en las células RINm5F. Este proceso va acompañado de una fragmentación en escalera del ADN, una degradación de la PARP y una disminución de la proteína Bcl-2. Estas acciones son secundarias a la activación de la caspasa-3.
2. El óxido nítrico es el mensajero intracelular que transmite la señal apoptótica en las células RINm5F.
3. El óxido nítrico produce una fosforilación de la Bcl-2. Esta acción no es dependiente de la ERK ni de la p38.
4. La apoptosis inducida por el óxido nítrico, en las células RINm5F, va acompañada de la activación secuencial de la ERK y de la JNK.
5. La sobreexpresión de la PI3K γ por transfección de las células RINm5F potencia el efecto del óxido nítrico sobre la ERK, pudiendo participar esta isoforma en la regulación de la apoptosis.
6. La activación de la caspasa-3 inducida por el óxido nítrico es secundaria a la activación de las vías ERK y p38K.
7. El óxido nítrico provoca la liberación del citocromo c al citosol. Este proceso es dependiente de las vías ERK y p38K.

RESUMEN

La diabetes tipo I se caracteriza por una destrucción de las células β del páncreas endocrino en un proceso autoinmune en el que células inmunitarias activadas infiltran el islote pancreático y producen citocinas inflamatorias como la IL-1 β que actúan selectivamente sobre la célula β provocando su destrucción. Se ha descrito recientemente que el óxido nítrico participa en las acciones de las citocinas inflamatorias.

En este trabajo de tesis doctoral se han estudiado los mecanismos implicados en la acción del óxido nítrico como mediador de la destrucción de la célula β producida por citocinas inflamatorias.

Los resultados obtenidos muestran que la combinación de citocinas (IL-1 β , IFN- γ y TNF- α) induce la muerte por apoptosis; ésta se caracteriza por una fragmentación del ADN que va seguida de una disminución de la proteína Bcl-2 en las células y de la degradación de la poli(ADP-ribosa)polimerasa. El nitroprusiato de sodio, un compuesto que libera óxido nítrico, reproduce los efectos de las citocinas, pero con una acción mas inmediata.

Por otro lado, al estudiar la participación de las vías de las MAPK se ha encontrado que la ERK en una forma temprana y la JNK posteriormente se activan en el proceso de la apoptosis inducido por el óxido nítrico. La activación de la caspasa-3 y la liberación del citocromo c inducida por el óxido nítrico requieren de la activación de la ERK y de la p38 en nuestro sistema; por el contrario la fosforilación de la Bcl-2 es independiente de las vías MAPK.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kerr, J. F. R., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging implications in Tissue Kinetics. **Br. J. Cancer** **26**, 239-257.
2. Ellis, R.V.; Yuan, J.Y. and Horvitz, H.R. (1991) Mechanism and function of cell death. **Annu. Rev. Cell. Biol.** **7**, 663-698.
3. Miller, L.J. and Mark, J. (1998). Apoptosis. **Science**. **281**, 1301
4. Steller, H. (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. **Science**. **267**, 1445-1449.
5. Nagata, S. (1996). Apoptosis: telling cells their time is up. **Current Biology**. **6**, 1241-1243.
6. Bossy-Wetzell, E.; Bakiri, L. and Yaniv M. (1997). Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun. **The EMBO Journal**. **16**(7), 1695-1709.
7. Wyllie, A.H. (1988). Apoptosis. *ISI Atlas of Science: Immunology*. **1**, 192-196.
8. Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**. **267**, 1456-1462.
9. Barinaga, M. (1998). Death by dozens of cuts. **Science** **280**, 32-34.
10. Corcoran, G.B.; Fix, L.; Jones, D.P.; Moslen, M.T.; Nicotera, P.; Oberhammer, F.A. and Buttyan, R. (1994). Apoptosis: molecular control point in toxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** **128**, 169-181.
11. Hengartner, M.O. and Horvitz, H.R. (1994). The ins and outs of programmed cell death during *C. elegans* development. **Phil. Trans. R. Soc. Lond B**. **345**, 243-248.
12. Golstein, P. (1997). Controlling Cell Death. **Science** **275**, 1081-1082.
13. Golstein, P. (1998). Cell Death in us and others. **Science** **281**, 1283.
14. Chinnaiyan A.M.; O'Rourke K.; Lane, B.R. and Dixit, V.M. (1997). Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: A Molecular Framework for Cell Death. **Science**. **275**, 1122-1126.
15. Wu, D.; Wallen, H.D. and Nuñez, G. (1997). Interaction and regulation of Subcellular Localization of CED-4 by CED-9. **Science**. **275**, 1126-1129.
16. Whyte, M. (1996). ICE/CED-3 proteases in apoptosis. **Trends. Cell. Biol.** **6**, 245-248.
17. White, E.L. (1996). Death and the pursuit of apoptosis. **Genes Dev.** **10**, 1-15.

18. Yang, J.; Liu, X.; Bhalla, K.; Kim, C.N.; Ibrado A.M.; Cai, J.; Peng, T-I.; Jones, D.P. and Wang, X. (1997). Prevention of Apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrome c from Mitochondria Blocked. *Science*. **275**, 1129-1132.
19. Zou, H.; Henzel, W.J.; Liu, X.; Lutschg, A. and Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C.elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. **90(3)**, 405-413.
20. Srinivasula, S.M.; Ahmad, M.; Fernandes-Alnemri, T. and Alnemri, E.S. (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol. Cell*. **1(7)**, 949-957.
21. Wallach, D. (1997). Placing death under control. *Nature*. **338**, 123-126.
22. Chinnaiyan, A.M.; O'Rourke, K.; Tewari, M. and Dixit, V.M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*. **81(4)**, 505-512.
23. Boldin, M.P.; Goncharov, T.M.; Goltsev, Y.V. and Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD- interacting protease, in Fas/APO-1 and TNF receptor-induced cell death. *Cell* **85(6)**, 803-815.
24. Liu, Z.G.; Hsu, H.; Goeddel, D.V. and Karin, M. (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell*. **87(3)**, 565-576.
25. Tartaglia, L.A. and Goeddel, D.V. (1992). Two TNF receptors. *Immunol. Today* **13(5)**, 151-3.
26. Marsters, S.M.; Pitti, R.M.; Donahue, C.J.; Ruppert, S.; Bauer, K.D. and Ashkenazi, A. (1996). Activation of apoptosis by Apo-2 ligand is independent of FADD but blocked by CrmA. *Curr. Biol*. **6(6)**, 750-752.
27. Yeh, W.C.; Pompa, J.L.; McCurrach, M.E.; Shu, H.B.; Elia, A.J.; Shahinian, A.; Ng, M.; Wakeham, A.; Khoo, W.; Mitchell, K.; El-Deiry, W.S.; Lowe, S.W.; Goeddel, D.V. and Mak, T.W. (1998). FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science*. **279**, 1954-1958.
28. Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science*. **281**, 1312-1316.
29. Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*. **281**, 1305-1308.

30. Yang, X.; Chang, H.Y. and Baltimore, D. (1998). Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. **Science** **261**, 1355-58.
31. Wyllie, A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. **Nature**. **284**, 555-556.
32. Enari, M.; Sakahira, H.; Yokoyama, H.; Okawa, K.; Iwamatsu, A. and Nagata, S. (1998). A caspase-activated Dnase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. **Nature**. **391**(6662), 43-50.
33. Walker, P.R.; Smith, C.; Youdale, T.; Leblanc, J.; Withfield, J.F., and Sikorska, M. (1991). Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. **Cancer Res**. **51**, 1078-1085.
34. Peitsch, M.C.; Muller, C. and Tschopp, J. (1993). DNA fragmentation during apoptosis is caused by fragment single strand cuts. **Nucleic Acid Res**. **18**, 4206-4209.
35. Bortner, C.D.; Oldenburg, N.B.E. and Cidlowski, J.A. (1995). The role of DNA fragmentation in apoptosis. **Trends Cell Biol**. **5**, 21-26.
36. Takahashi, A.; Alnemri, E.S.; Lazebnik, Y.A.; Fernandes-Alnemri, T.; Litwack, G.; Moir, R.D.; Moldam, R.D.; Poirier, G.C.; Kaufmann, S.H. and Earnshaw, W.C. (1996). Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. **93**(16), 8395-400.
37. Wyllie, A.H.; Kerr, J.F. and Currie, A.R. (1972). Cell death in the normal neonatal rat adrenal cortex. **J. Pathol**. **111**(4), 255-261.
38. Crawford, A.M.; Kerr, J.F. and Currie, A.R. (1972). The relationship of acute mesodermal cell death to the teratogenic effects of 7-OHM-12-MBA in the foetal rat. **Br. J. Cancer**. **26**(6), 498-503.
39. Wright, S.C.; Wei, Q.S.; Zhong, J.; Zheng, H.; Kinder, D.H. and Larrick, J.W. (1994). Purification of a 24-Kda protease from apoptosis tumor-cells that activates DNA fragmentation. **J. Exp. Med**. **180**, 2113-2123.
40. Fadok, V.A.; Bratton, D.L.; Frasch, S.C.; Warner M.L. and Henson, P.M. (1998). The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. **Cell Death and Differentiation**. **5**, 551-562.
41. Diaz, C.; Lee, A.T.; McConkey, D.J. and Schroit, A.J. (1999). Phosphatidylserine externalization during differentiation-triggered apoptosis of erythroleukemic cells. **Cell Death and Differentiation**. **6**(3), 218-226.

42. Ren, Y. and Savill, J. (1998). Apoptosis: The importance of being eaten. **Cell Death and Differentiation**. **5**, 563-568.
43. Adams, J.M. and Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. **Science**. **281**, 1322- 1326.
44. Tsujimoto, Y.; Crossman, J.; Jaffe, E. and Croce, C. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. **Science**. **228**, 1440-1443.
45. Monaghan, P.; Robertson, D. and Amos, A.S. (1992). Ultrastructural localization of Bcl-2 protein. **J. Histochem. Cytochem.** **40**, 1819-1825.
46. Yin, C.; Knudson, C.M.; Korsmeyer, S.J. and Van Dyke, T. (1997). Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. **Nature**. **385**, 637-640.
47. Naumovski, L. and Cleary, M.L. (1996). The p53-binding protein 53BP2 also interacts with bcl-2 and impedes cell cycle progression at G2/M. **Mol. Cell Biol.** **16**, 3884-92.
48. May, W.S.; Tyler, P.G.; Ito, T.; Armstrong, D.K.; Qatsha, K.A. and Davidson N.E. (1994). Interleukin-3 and briostatine-1 mediate hyperphosphorylation of Bcl2 α in association with suppression of apoptosis. **J. Biol. Chem.** **269(43):26865-70**.
49. Chen, C-Y and Faller, D.V. (1996). "Phosphorylation of Bcl-2 Protein and Association with p21^{Ras} in Ras-induced Apoptosis. **J. Biol. Chem.** **271(5): 2376-2379**.
50. Haldar, M.; Jena, N. and Croce, C.M. (1995). Inactivation of bcl-2 by phosphorylation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **92**, 4507-4511.
51. Guan, R.J.; Moss, S.F. and Arber, N. (1996). 30 Kda phosphorylated for Bcl-2 protein in human colon. **Oncogen.** **12**, 2605-2609.
52. Ling, Y-H.; Tornos, C. and Perez-Soler, R. (1998). Phosphorylation of Bcl-2 is a marker of M phase events and not a determinant of apoptosis. **J. Biol. Chem.** **273(30)**, 18984-18991.
53. Yin, X-M.; Oltvai, Z.N. and Korsmeyer, S.J. (1994). BH1 and BH2 domains of bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerisation with BAX. **Nature.** **369**, 321-323.
54. Farrow, S.F.; White, J.H.M. and Martinou, Y. (1995). Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. **Nature.** **371**, 731-733.

55. Chittenden, T.; Flemington, C.; Houghton, A.B.; Ebb, R.G.; Gallo, G.J.; Elangovan, B.; Chinnadurai, G. and Lutz, R.J. (1995). A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. **EMBO J.** **14(22)**, 5589-5596.
56. Conradt, B. and Horvitz, H.R. (1998). The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. **Cell.** **93(4)**, 519-529.
57. Boyd, J.M.; Gallo, G.J.; Elangovan, B. (1995). Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. **Oncogene.** **11**, 1921-1928.
58. Barinaga, M. (1998). Stroke-damaged neurons may commit cellular suicide. **Science.** **281**, 1302-1304.
59. Kaufmann, S.H. (1989). Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. **Cancer Res.** **49(21)**, 5870-5878.
60. Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochem. J.** **326**, 1-16.
61. Kolb, H. and Kolb-Bachofen, V. (1998). Nitric oxide in autoimmune disease: Cytotoxic or regulatory mediator?. **Immunol. Today.** **19(12)**, 556-561.
62. Liew, F.Y. and Cox, F.E. (1991). Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. **Immunol. Today.** **12(3)**, A17-21.
63. Ankaracrona, M.; Dypbukt, J.M.; Brüne, B. and Nicotera P. (1994). Interleukin-1 β -induced nitric oxide production activates apoptosis in pancreatic RINm5F cell. **Experimental Cell Research** **213**, 172-177.
64. Nathan, C.F. and Hibbs, J.B. Jr. (1991). Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. **Curr. Opin. Immunol.** **3(1)**, 65-70.
65. Andrade, J.; Conde, M.; Sobrino, F. and Bedoya, F. (1993) Activation of peritoneal macrophages during the prediabetic phase in low-dose streptozotocin-treated mice. **FEBS Lett.** **327**, 32-34.
66. Stuehr, D.J. and Marletta, M.A. (1987). Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines. **Cancer Res.** **47(21)**, 5590-5594.
67. Kröncke, Klaus-D.; Fehsel, K. and Kolb-Bachofen, V. (1997). Nitric Oxide: Cytotoxicity versus Cytoproteccion- How, Why, When and Where?. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry.** **1(2)**, 107-120.

68. Genaro, A.M.; Hortelano, S.; Alvarez, A.; Martínez, C. and Boscá, L. (1995). Splenic Bcl-2 lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanisms involving sustained Bcl-2 levels. **J. Clin. Invest.** **95(4)**, 1884-1890.
69. Dimmeler, S.; Haendeler, J.; Nehis, M. and Zeiher, A.M. (1997). Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 β -converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. **J. Exp. Med.** **185(4)**, 601-607.
70. Okuda, Y.; Sakoda, S.; Shimaoka, M. and Yanagihara, T. (1996). Nitric oxide induces apoptosis in mouse splenic T lymphocytes. **Immunol. Lett.** **52(2-3)**, 135-138.
71. Goldstein, S. and Czapski, G. (1995) The reaction of NO with O₂ and HO₂: a pulse radiolysis study. **Free Radic Biol Med** **4**, 505-510.
72. Kooy, N.W. and Royall, J.A. (1994). Agonist-induced peroxynitrite production from endothelial cells. **Arch. Biochem Biophys.** **310(2)**, 352-359.
73. Ioannidis, Y. and de Groot, H. (1993). Cytotoxicity of nitric oxide in Fu5 rat hepatoma cells: evidence for co-operative action with hydrogen peroxide. **Biochem J.** **296**, 341-345.
74. Lizasoain, Y.; Moro, M.A.; Knowles, R.G.; Darley-Usmar, V. and Moncada, S. (1996). Nitric oxide and peroxynitrite exert distinct effects on mitochondrial respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose. **Biochem. J.** **314(Pt3)**, 877-880.
75. Berendji, D.; Kolb-Bachofen, V.; Meyer, K.L.; Grapenthin, O.; Weber, H.; Wahn, H. and Kröncke, K.D. (1997). Nitric oxide mediates intracytoplasmic and intranuclear zinc release. **FEBS Lett.** **405(1)**, 37-41.
76. Peng, H.B.; Rajavashisth, T.B.; Libby, P. and Liao, J.K. (1995). Nitric oxide inhibits macrophage-colony stimulating factor gene transcription in vascular endothelial cells. **J. Biol. Chem.** **270(28)**, 17050-17055.
77. Matthews, J.R.; Botting, C.H.; Panico, M.; Morris, H.R. and Hay, R.T. (1996). Inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide. **Nucleic. Acids. Res.** **24(12)**, 2236-2242.
78. Tabuchi, A.; Sano, K.; Oh, E.; Tsuchiya, T. and Tsuda, M. (1994). Modulation of AP-1 activity by nitric oxide (NO) in vitro: NO-mediated modulation of AP-1. **FEBS Lett.** **351(1)**, 123-127.



79. Nguyen, T.; Brunson, D.; Crespi, C.L.; Penman, B.W.; Wishnok, J.S. and Tannenbaum, S.R. (1992). DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **89(7)**, 3030-3034.
80. Wilson, G.L.; Patton, N.J. and LeDoux, S.P. (1997). Mitochondrial DNA in b-cells is a sensitive target for damage by nitric oxide. **Diabetes.** **46**, 1291-1295.
81. MeBmer, U.K.; Ankarcona, M; Nicotera, P. and Brüne B. (1994). p53 expression in nitric oxide-induced apoptosis. **FEBS Lett.** **355**, 23-26.
82. Kaneto, H.; Fujii, J.; Seo, H.G.; Suzuki, K.; Matsuoka, T-A.; Nakamura, M.; Tatsumi, H.; Yamasaki, Y.; Kamada, T. and Taniguchi N. (1995). Apoptotic cell death triggered by nitric oxide in pancreatic β -cells. **Diabetes.** **44**, 733-738.
83. Green, I.C. and Chabrier, P-E. (1999). Nitric oxide: from basic research to clinical applications. **DDT.** **4(2)**, 47-49.
84. Cano, E. and Mahadevan, L.C. (1995). Parallel signal processing among mammalian MAPKs. **Trends Biochem. Sci.** **20**, 117-121.
85. Rake, J.B., Quiñones, M.A. and Faller, D.V. (1991). Inhibition of Platelet-derived Growth Factor-mediated Signal Transduction by Transforming *ras*. **J. Biol. Chem.** **266(8)**:5348-5352.
86. Lander, H.M.; Jacovina, A.T.; Davis, R.J. and Tauras, J.M. (1996). Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species. **J. Biol. Chem.** **271(33)**:19705-9.
87. Lopez-Illasaca, M.; Crespo, P.; Pellici, G.; Gutkind, J.S. and Wetzker, R. (1997). Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase γ . **Science.** **275**, 394-397.
88. Lefkowitz, R.J. (1998). G protein-coupled receptors. **J. Biol. Chem.** **273(30)**, 18677-18680.
89. Lo, Y.Y.K.; Wong, J.M.S. and Cruz, T.F. (1996). Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH₂-terminal kinases. **J. Biol. Chem.** **271(26)**, 15703-15707.
90. Kim, H.; Shim, J.; Han, P.L. and Choi, E.J. (1997). Nitric oxide modulates the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activity through activating c-Jun N-terminal kinase kinase. **Biochemistry.** **36(44)**, 13677-81.

91. Kyriakis, J.; Banerjee, P.; Nikolakak, E.; Dait, R.; Ahmad, M.; Avruch, J. and Woodgett, J. (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. **Nature**. **369**, 156-160.
92. Lopez-Illasaca, M.; Gutkind, J.S. and Wetzker, R. (1998). Phosphoinositide 3-kinase γ is a mediator of G $\beta\gamma$ -dependent Jun kinase activation. **J. Biol. Chem.** **271(5)**, 2505-2508.
93. Park, D.S.; Stefanis L.; Yan, C.Y.I.; Farinelli, S.E. and Greene, L.A. (1996). Ordering the cell death pathway. Differential effects of Bcl-2, an interleukin-1-converting enzyme family protease inhibitor, and other survival agents on JNK activation in serum/nerve growth factor-deprived PC12 cells. **J. Biol Chem.** **271(36)**:21898-905.
94. Hui, A.; Kulkarni, G.V.; Hunter, W.L.; McCulloch, C.A. and Cruz, T.F. (1997). Paclitaxel selectively induces mitotic arrest and apoptosis in proliferating bovine synoviocytes. **Arthritis Rheum.** **40(6)**, 1073-1084.
95. Ichijo, H.; Nishida, E.; Irie, K.; ten Dike, P.; Saitoh, M.; Moriguchi, T.; Takagi, M.; Matsumoto, K.; Miyazono, K. and Gotoh, Y. (1997). Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. **Science**. **275**, 90-94.
96. Hui, A.; Min, W.X.; Tang, J. and Cruz, T.F. (1998). Inhibition of activator protein 1 activity by paclitaxel suppresses interleukin-1--induced collagenase and stromelysin expression by bovine chondrocytes. **Arthritis Rheum.** **41(15)**, 869-76.
97. Lo, Y.Y.; Conquer, J.A.; Grinstein, S. and Cruz, T.F. (1998). Interleukin-1 beta induction of c-fos and collagenase expression in articular chondrocytes: involvement of reactive oxygen in articular chondrocytes: involvement of reactive oxygen species. **J. Cell Biochem.** **69(1)**, 19-29.
98. Macho, A.; Blázquez, M.-V.; Navas, P. and Muñoz, E. (1998). Induction of apoptosis by vanilloid Compounds does not require de novo gene transcription and activator protein 1 activity. **Cell Growth & Differentiation.** **9**, 277-286.
99. Mohr, S.; McCormick, T.S. and Lapetina, E.G. (1998). Macrophages resistant to endogenously generated nitric oxide-mediated apoptosis are hypersensitive to exogenously added nitric oxide donors: Dichotomous apoptotic response independent of caspase 3 and reversal by the mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) inhibitor PD 098059. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **95(9)**:5045-50.
100. Eisenbarth G.S. (1986). Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. **N. Engl. J. Med.** **314**, 1360-1368.

101. Schwizer, R.W.; Leiter, E.H. and Evans, R. (1984). Macrophage-mediated cytotoxicity against cultured pancreatic islet cells. **Transplantation**. **37**, 539-544.
102. Mandrup-Poulsen, T. (1986). The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. **Diabetologia**. **39**, 1005-1029.
103. Sandler, S.; Eizirik, D.L.; Svensson, C.; Trandell, E.; Welsh, Michael and Welsh N. (1991). Biochemical and Molecular action of Interleukin-1 on pancreatic β -cells. **Autoimmunity**. **10**, 241-253.
104. Andrade, J.; Conde, M.; Ramirez, R.; Monteseirín, J.; Conde, J.; Sobrino, F. and Bedoya, F.J. (1996). Protection from nicotinamide Inhibition of Interleukin-1 β -induced RIN cell nitric oxide formation is associated with induction of MnSOD enzyme activity. **Endocrinology** **137**: 4806-4810.
105. Green, L.C.; Wagner, D.A.; Glogowski, J.; Skipper, P.L.; Wishnok, J.S. and Tannenbaum, S.R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.** **126(1)**, 131-138.
106. Carballo, M.; Vilaplana, R.; Márquez, G.; Conde, M.; Bedoya, F.J.; Gonzales-V., F. and Sobrino, F. (1997). **Biochem. J.** **328**, 559-564.
107. Kroemer, G. (1997). The proto-oncogene bcl-2 and its role in regulating apoptosis. **Nat. Med.** **3**, 614-619.
108. Yasuhara, N.; Sahara, S.; Kamada, S.; Eguchi, Y. and Tsujimoto, Y. (1997). Evidence against a functional site for Bcl-2 downstream of caspase cascade in preventing apoptosis. **Oncogene**. **15**, 1921-1928.
109. Cheng, E.H-Y.; Kirsch, D.G.; Clem, R.J.; Ravi, R.; Kastan, M. B.; Bedi, A.; Ueno, K. and Hardwick, J.M. (1997). Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. **Science**. **278**, 1966-1968.
110. Tamatani, M.; Ogawa, S.; Nuñez G. and Tohyama, M. (1998). Growth factors prevent changes in Bcl-2 and Bax expression and neuronal apoptosis induced by nitric oxide. **Cell Death and Differentiation**. **5(19)**:911-919.
111. Rabinovitch, A. (1993). Roles of cytokines in IDDM pathogenesis and islet β -cell destruction. **Diabetes. Rev.** **1**, 215-240.
112. Stamler, J.S.; Singel, D.J. and Loscalzo, J. (1992). Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. **Science** **258**, 1898-1902.

113. Delaney, C.A.; Green, M.H.; Lowe, J.E. and Green I.C. (1993). Endogenous nitric oxide induced by interleukin-1 β in rat islets of Langerhans and HIT-T15 cells causes significant DNA damage as measured by the "comet" assay. **FEBBS Lett.** **333**, 291-295.
114. Didenko, V.V. and Honsby, P.I. (1996). Presence of Double-strand breaks with single-base 3' Overhangs in cell undergoing apoptosis but not necrosis. **The Journal of Cell Biology.** **135(5)**, 1369-1376.
115. Wink, D.A.; Kasprzak, K.S.; Maragos, C.M.; Elespuru, R.K.; Misra, M.; Dunams, T.M.; Cebula, T.A.; Koch, W.H.; Andrews, Allen, J.S. and Keefer, L.K. (1991). DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. **Science.** **254**, 1001-1003.
116. Grisham, M.B. (1992). Potential role of nitrogen oxides in pathophysiology. In reactive metabolites of oxygen and nitrogen in Biology and Medicine. **Austin, T.X., R.G. Landes pag 72.**
117. Kerridge, D.F. (1979). Estimation of the ratio (γ) of poly(ADP-ribose)synthetase activity in non-lower-crypt cells to that in lower-crypt cells in vivo from an analysis of enzyme activities and thymidine incorporation in populations of sequentially isolated cell. **Biochem. J.** **180**, 462-463.
118. Porteus, J.W.; Furneaux, H.M.; Pearson, C.K.; Lake, C.M. and Morrison, A. (1979). poly(ADP-ribose)synthetase activity in nuclei of dividing and of non-dividing but differentiating intestinal epithelial cells. **Biochem. J.** **180**:455-463.
119. Heller, B.; Burkle, A.; Radons, J.; Fengler, E.; Muller, M.; Burkart, V. and Kolb, H. (1997). DNA-damage and NAD⁺-depletion are initial events in oxygen radical induced islet cell death. **Adv. Exp. Med. Biol.** **426**, 329-34.
120. Burkart, B.; Wang, Z.Q.; Radons, J.; Heller, B.; Herceg, Z.; Stingl, L.; Wagner, E. and Kolb, H. (1999) Mice lacking the poly(ADP-ribose)polymerase gene are resistant to pancreatic beta-cell destruction and diabetes development induced by streptozocin. **Nat. Med.** **3**, 314-319.
121. Kaufmann, S.H.; Desnoyers, S.; Ottaviano, Y.; Davidson, N.E. and Poirier, G.G. (1993) Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase: An early marker of chemotherapy-induced apoptosis. **Cancer Res.** **53**, 3976-3985.
122. Payne, C.M.; Crowley, C.; Washo-Stuitz, D.; Briehl, M.; Bernstein, C.; Bearol, S.; Holubec, H. and Warneke, J. (1998). The stress-response protein poly(ADP-ribose)polymerase and NF κ B protect against bile salt-induced apoptosis. **Cell Death Differ.** **5(7)**, 623-636.

123. Yoshihara, K.; Tanigawa, Y.; Burzio, L. and Koide, S.S. (1975) Evidence for adenosine diphosphate ribosylation of Ca^{++} , Mg^{++} -dependent endonuclease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **72**, 289-293.
124. Kitanaka, C.; Namiki, T.; Noguchi, K.; Mochisuki, T.; Kagaya, S.; Chi, S.; Hayashi, A.; Asai, A.; Tsujimoto, Y. and Kuchino Y. (1997). Caspase-dependent apoptosis of COS-7 cells induced by Bax overexpression: differential effects of Bcl-2 and Bcl-x_L on Bax-induced caspase activation and apoptosis. **Oncogene** **15**, 1763-1772.
125. Cerezo, A.; Martinez-A, C.; González, A.; Gómez, J. and Rebollo, A. (1999). IL-2d deprivation triggers apoptosis which is mediated by c-Jun N-terminal kinase 1 activation and prevented by Bcl-2. **Cell Death and Differentiation**. **6**, 87-94.
126. Chinnaiyan, A.M.; Orth, K.; O'Rourke, K.; Duan, H.J.; Poirier, G.G. and Dixit, V.M. (1996). Molecular ordering of cell death pathway: bcl-2 and bclxL function upstream of the ced-3-like apoptotic proteases. **J. Biol. Chem.** **271**, 4573-4576.
127. Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green D.R. and Newmeyer, D.D. (1997). The Release of Cytochrome c from Mitochondria: A Primary Site For Bcl-2 Regulation of Apoptosis. **Science**. **275**, 1132-1135.
128. Nicholson, W. (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. **Nature**. **376**, 37-43.
129. Spector, M.S.; Desnoyers, S.; Hoepfner, D.J. and Hengartner, M.O. (1997). Interaction between the *C. elegans* cell death regulators CED-9 and CED-4. **Nature**. **385**, 653-656.
130. Toyoshima, F.; Moriguchi, T. and Nishida, E. (1997). Fas induces cytoplasmic apoptotic responses and activation of the MKK7-JNK/SAPK and MKK6-p38 pathways independent of CPP32-like proteases. **The Journal of Cell Biology**. **139**(4), 1005-1015.



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672261

JULIO CÉSAR BERNABÉ CRTÍZ
ASPECTOS MOLECULARES DE LA ACCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO
COMO MEDIADOR DE LA APTOSIS INDUCIDA POR LAS CITOCINAS
EN CÉLULAS SECRETORAS DE INSULINA

16 JULIO

99

[Signature]

Elisa B

~~[Signature]~~

Fra. Pdm

Enrique Rojas

[Signature]