

R. 98 846

S TD I/34

1159330

T.D.  
0/34

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA  
Y BIOLOGÍA MOLECULAR.

FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE SEVILLA.



MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS EN EL  
NEUTRÓFILO POR CALCIO, QUINASAS DE PROTEÍNAS Y  
METABOLITOS REACTIVOS DEL OXÍGENO.

62

87

25 JUN 1997

*Pilar Díaz Mancha*

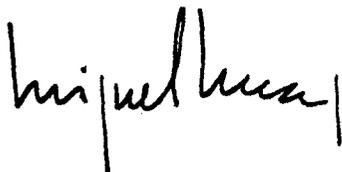
Tesis presentada por:  
**Pilar Díaz Mancha**  
Para optar al título de  
Doctora en Farmacia.

Sevilla 1997.

MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS EN EL  
NEUTRÓFILO POR CALCIO, QUINASAS DE PROTEÍNAS Y  
METABOLITOS REACTIVOS DEL OXÍGENO.

Director del trabajo:

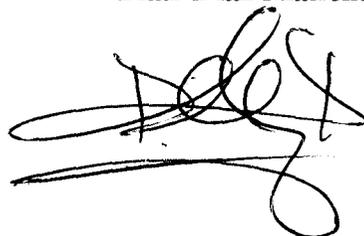
**Dr. Miguel Lucas Lucas.**



Profesor Titular del Departamento  
de Bioquímica Médica y Biología Molecular  
de la Facultad de Medicina  
de la Universidad de Sevilla.

Autor del trabajo:

**Pilar Díaz Mancha.**



Tesis presentada por  
Pilar Díaz Mancha  
para optar al Título de  
Doctora en Farmacia



BIBLIOTECA

El Dr. Miguel Lucas Lucas, Profesor Titular del departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla

Certifica:

Que Pilar Díaz Mancha, licenciada en Farmacia, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado "Mecanismos de Regulación de la Apoptosis en el Neutrófilo por Calcio, Quinasas de Proteínas y Metabolitos Reactivos del Oxígeno", y que este trabajo reúne las características para que , una vez defendido ante el tribunal correspondiente, se presente para optar al grado de Doctor en Farmacia por la Universidad de Sevilla.

Sevilla 1997.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Miguel Lucas Lucas".

Miguel Lucas Lucas.

**INDICE.**

	pág
<b>1.- INTRODUCCIÓN.</b>	1
<b>1.1.- Los neutrófilos.</b>	1
1.1.1.- Composición y tamaño.	1
1.1.2.- Funciones.	1
1.1.3.- Granulocitopoyesis.	2
<b>1.2.- La apoptosis.</b>	3
1.2.1.- Diferencias con la necrosis.	3
1.2.2.- Sentido fisiológico de la apoptosis en neutrófilos.	5
1.2.2.1.- Intervención de los macrófagos.	6
1.2.2.2.- Relación de la apoptosis con otros factores que contribuyen a limitar o prolongar la respuesta inflamatoria.	7
<b>1.3.- Endonucleasas.</b>	8
1.3.1.- Diferentes patrones de fragmentación del ADN.	9
1.3.2.- Tipos de endonucleasas.	10
1.3.3.- Principales endonucleasas descritas en los neutrófilos.	13
<b>1.4.- Relación entre la fragmentación del ADN y la poli ADP ribosa polimerasa.</b>	14
<b>1.5.- Relación entre la apoptosis y la síntesis de nuevas proteínas.</b>	15
<b>1.6.- Principales genes implicados en el proceso de la apoptosis.</b>	16
1.6.1.- bcl-2	17
1.6.2.- APO-1/Fas	19
1.6.3.- c-myc	21
1.6.4.- Genes relacionados con la apoptosis descritos en los neutrófilos.	22

---

<b>1.7.- Implicaciones del calcio en la apoptosis.</b>	22
1.7.1.- Modelo explicativo de las oscilaciones del calcio.	23
1.7.2.- Tapsigargina.	24
1.7.3.- Relación entre el calcio citoplasmático y el calcio nuclear.	25
1.7.4.- Participación del $\text{Ca}^{2+}$ en el desencadenamiento de la apoptosis.	27
1.7.5.- Implicaciones del calcio en la muerte celular programada de los neutrófilos.	29
<b>1.8.- PKC.</b>	29
1.8.1.- Diferentes isoenzimas de la protein kinasa C.	29
1.8.2.- Isoenzimas presentes en los neutrófilos.	31
1.8.3.- Participación de la PKC en la apoptosis.	32
1.8.4.- Implicación de la PKC en la regulación de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .	34
<b>1.9.- NADPH OXIDASA.</b>	35
1.9.1.- Componentes de la NADPHoxidasa.	37
1.9.2.- Fosfolipasas implicadas en el estallido respiratorio.	40
1.9.3.- Intervención del $\text{Ca}^{2+}$ en la activación de la NADPHoxidasa.	43
1.9.4.- Interacciones entre la PKC y la NADPH oxidasa.	43
1.9.5.- Relación entre la producción de radicales libres y la activación de la apoptosis.	44
<b>1.10.- Otros factores implicados en la apoptosis.</b>	46
1.10.1.- ATP.	46
1.10.2.- AMPc.	46
1.10.3.- Glucocorticoides.	47
1.10.4.- Segundos mensajeros de carácter lipídico.	48
<b>2.- OBJETIVOS.</b>	51

---

<b>3.- MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>53</b>
<b>3.1.- Aislamiento de polimorfonucleares.</b>	<b>53</b>
3.1.1.- Reactivos.	53
3.1.2.- Método.	53
<b>3.2.- Estudio de la viabilidad celular.</b>	<b>54</b>
3.2.1.- Reactivos.	54
3.2.2.- Método.	54
<b>3.3.- Estudio de la fragmentación de ADN.</b>	<b>55</b>
3.3.1.- Tratamiento de las células.	55
3.3.1.1.- Reactivos.	55
3.3.1.2.- Método.	55
3.3.2.- Extracción del ADN.	56
3.3.2.1.- Reactivos.	56
3.3.2.2.- Método.	57
3.3.3.- Cuantificación del ADN.	57
3.3.4.- Marcaje de ADN con <sup>32</sup> P.	58
3.3.5.- Electroforesis y visualización del ADN.	58
3.3.5.1.- Reactivos.	58
3.3.5.2.- Método.	59
<b>3.4.- Estudio de la apoptosis por microscopía electrónica.</b>	<b>59</b>
3.4.1.- Reactivos.	59
3.4.2.- Método.	59
<b>3.5.- Quimioluminiscencia.</b>	<b>60</b>
3.5.1.- Fundamento.	60
3.5.2.- Reactivos.	63

---

3.5.3.- Método.	63
<b>3.6.- Medida de calcio intracelular.</b>	64
3.6.1.- Reactivos.	64
3.6.2.- Método.	64
<b>3.7.- Estudio de fosforilación de proteínas de membranas.</b>	66
3.7.1.- Tratamiento de las células.	66
3.7.2.- Obtención de las membranas celulares.	66
3.7.2.1.- Reactivos.	66
3.7.2.2.- Método.	67
3.7.3.- Cuantificación de proteínas.	67
3.7.4.- Reacción de fosforilación.	68
3.7.4.1.- Reactivos.	68
3.7.4.2.- Método.	68
3.7.5.- Electroforesis en gel de poliacrilamida.	68
3.7.5.1.- Reactivos.	68
<b>4.- RESULTADOS.</b>	69
<b>4.1.- Estudio de la viabilidad de los neutrófilos.</b>	70
<b>4.2.- Estudio de la concentración de calcio libre iónico en el citoplasma del neutrófilo.</b>	71
4.2.1.- Registro continuo.	71
4.2.2.- Registro discontinuo.	74
<b>4.3.- Estudio de la fragmentación del ADN.</b>	76
4.3.1.- En células no sometidas a ningún estímulo externo (Apoptosis espontánea).	76
4.3.2.- En células sometidas a diferentes estímulos.	77
4.3.3.- Efecto activador de la estaurosporina en la fragmentación	79

del ADN.	
4.3.4.- Estudio de la apoptosis por microscopía electrónica.	85
<b>4.4.- Estudio de la relación entre la producción de metabolitos reactivos del oxígeno y la apoptosis en neutrófilos .</b>	<b>90</b>
4.4.1.- Activación de la NADPHoxidasa.	90
4.4.1.1.- Medida continua de quimioluminiscencia.	90
4.4.1.2.- Medida discontinua de la quimioluminiscencia.	95
4.4.2.- Estudio de la similitud de efecto sobre la NADPHoxidasa entre la tapsigargina y el ionóforo de calcio.	97
4.4.3.- Potenciación del efecto del PMA cuando las células se preincuban con tapsigargina.	99
4.4.4.- Implicación del calcio en la activación de la NADPHoxidasa.	101
4.4.5.- Efecto de la inhibición de la PKC en la activación de la NADPH oxidasa.	104
<b>4.5.- Intervención de la PKC en la fosforilación de proteínas de membrana.</b>	<b>108</b>
<b>5.- DISCUSIÓN.</b>	<b>111</b>
<b>5.1.- El método.</b>	<b>111</b>
5.1.1.- Medida de quimioluminiscencia.	111
5.1.2.- Determinación de la apoptosis celular.	112
<b>5.2.- Los resultados.</b>	<b>113</b>
5.2.1.- Acción del Ca <sup>2+</sup> como mediador de la apoptosis en el neutrófilo.	113
5.2.2.- Participación de la PKC en la apoptosis del neutrófilo.	115
5.2.3.- Intervención de los radicales libres en la muerte celular programada del neutrófilos.	118
<b>6.- CONCLUSIONES.</b>	<b>122</b>
<b>7.- BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>124</b>

---

<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>AMPc</b>	Adenosina monofosfato cíclico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>ATPasa</b>	Adenosina trifosfatasa
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>Buffer HS</b>	Buffer hepes suplementado
<b>cit</b>	Citocromo
<b>CGD</b>	Enfermedad granulomatosa crónica
<b>c.p.m.</b>	Cuentas por minutos
<b>c.p.s.</b>	Cuentas por segundos
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNAsa</b>	Desoxirribonucleasa
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGTA</b>	Ácido etilenglicol ( $\beta$ aminoetil eter) tetraacético.
<b>E.S.M.</b>	Error estándar de la media
<b>FAD</b>	Flavina adenina dinucleótido (forma oxidada)
<b>f-MLP</b>	Péptido formil-metionil-leucil-fenilalanina
<b>GDP</b>	Guanosina difosfato
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
<b>ICE</b>	Enzima convertidora de interleukina 1 $\beta$
<b>IL</b>	Interleukina
<b>Ins (1,4,5)P<sub>3</sub></b>	Inositol 1,4,5 trifosfato.
<b>Kd</b>	Constante de disociación
<b>kDa</b>	Kilodalton

<b>kpb</b>	Kilopares de bases
<b>M</b>	Molar
<b>min</b>	Minuto
<b>MRO</b>	Metabolitos reactivos del oxígeno
<b>NAD</b>	Nicotinamida adenina dinucleotido (forma oxidada)
<b>NADP</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento neuronal
<b>NGF-R</b>	Receptor del factor de crecimiento neuronal
<b>PARP</b>	PoliADP ribosa polimerasa
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PLD</b>	Fosfolipasa D
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
<b>PKC</b>	Protein kinasa C
<b>PMA</b>	Forbol miristato acetato
<b>PP2A</b>	Fosfatasa tipo 2A
<b>PTK</b>	Fosfotirosin kinasa
<b>r.p.m.</b>	Revoluciones por minutos
<b>SERCA</b>	Calcio ATPasas del reticulo endoplásmico y sarcoplásmico
<b>SBF</b>	Suero bovino fetal
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>TEMED</b>	Tetrametiletilendiamina
<b>TRIS</b>	Trihidroximetilaminometano
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>TNF-R</b>	Receptor del factor de necrosis tumoral
<b>UFC- GM</b>	Célula progenitora común de los granulocitos y los monocitos
<b>UFC-G</b>	Célula progenitora de granulocitos
<b>UFC-M</b>	Célula progenitora de monocitos



Editorial C. A.

## **1.- INTRODUCCIÓN**

## 1.1.- LOS NEUTRÓFILOS.

### 1.1.1.- COMPOSICIÓN Y TAMAÑO.

Los neutrófilos son los leucocitos granulares más abundantes. En números absolutos, hay entre  $(3-6) \cdot 10^3 / \text{mm}^3$ , lo que representa unos  $(2-3) \cdot 10^{10}$ . *In vivo* tienen un diámetro de 7  $\mu\text{m}$ , aunque en los frotis de sangre tienen de 10-12  $\mu\text{m}$ . Son fácilmente reconocibles entre los leucocitos por su núcleo característico, formado por dos o tres lobulillos unidos entre sí por puentes estrechos. La cromatina del núcleo se observa en forma de grumos intensamente teñidos en la periferia, y normalmente no se aprecia el nucleolo. En el frotis de sangre teñido, el citoplasma de los neutrófilos, que en sí mismo es incoloro, aparecen gránulos específicos, muy finos, que muestran muy poca afinidad por los colorantes y que son un poco mayores que los gránulos azurófilos de tinción más intensa. Las dos terceras partes del total de gránulos son específicos y una tercera parte son azurófilos. En las micrografías electrónicas, los gránulos de los neutrófilos aparecen ampliamente distribuidos en el citoplasma, aunque suelen estar excluidos de la estrecha zona de ectoplasma, rica en actina, que participa en los movimientos ameboides de estas células. Los gránulos azurófilos presentan positividad con las técnicas para la demostración de peroxidasa, fosfatasa ácida y  $\beta$  glucuronidasa, y se considera que representan orgánulos similares a los lisosomas de otras células. Los gránulos específicos carecen de estas hidrolasas lisosomales, aunque muestran positividad en las técnicas citoquímicas para la demostración de fosfatasa alcalina, colagenasa, lisozima, lactoferrina y otras proteínas básicas aún mal caracterizadas.

### 1.1.2.- FUNCIONES.

Los neutrófilos están en la primera línea de defensa del organismo frente a la invasión por bacterias. En la zona de infección, se libera un mediador químico que es transportado hasta la médula ósea, donde da lugar al aumento en la producción y

liberación de neutrófilos a la sangre. Los neutrófilos se adhieren a la pared de las vénulas de la zona de la infección, y emigran entre las células endoteliales hasta alcanzar el tejido conectivo adyacente. En el medio extravascular quedan expuestos a productos bacterianos, de forma que reorganizan su citoesqueleto y se polarizan, para desplazarse a favor del gradiente de concentración de estos factores quimiotácticos. Este proceso se denomina quimiotaxis. Cuando los neutrófilos alcanzan la zona en la que la concentración del factor quimiotáctico es máxima, dejan de desplazarse, y se convierten en células con actividad fagocítica. Para ello, extienden pseudópodos alrededor de una bacteria y por fagocitosis la introducen en el citoplasma, concretamente en el interior de una gran vacuola y descargan sus enzimas hidrolíticas en la misma, destruyendo la bacteria.

### 1.1.3.- GRANULOCITOPOYESIS.

En la médula ósea existe una célula madre pluripotencial, que da lugar a dos progenitores mayores: la célula madre linfoide y la célula madre hematopoyética. Ésta última, actúa como precursor común de granulocitos, monocitos, eritrocitos y megacariocitos. Las células madres pluripotenciales se encuentran en un número muy reducido en la sangre y en la médula. La célula progenitora común de los neutrófilos y los monocitos (UFC-GM), se divide y da lugar a las células progenitoras de los granulocitos (UFC-G) y monocitos (UFC-M), y éstas a su vez dan lugar a los mieloblastos y monoblastos respectivamente, por la activación de factores estimuladores de colonias de granulocitos-monocitos. El *mieloblasto*, es una célula con un diámetro de 15  $\mu\text{m}$ , con un núcleo grande de forma ovalada; la cromatina está uniformemente distribuida y el citoplasma es pálido y no presenta gránulos. La fase de *promielocito*, comprende el proceso de formación de gránulos azurófilos. Esta célula es algo mayor que la anterior y en ella se observa la cromatina empezando a condensarse. La siguiente fase de *mielocito neutrófilo* se inicia con la aparición de gránulos específicos, que se van extendiendo por todo el citoplasma y la cromatina se encuentra cada vez más condensada. Esta fase es la última con capacidad de división celular. A partir de aquí quedan todavía la fase de *metamielocito neutrófilo*, *neutrófilos en banda* y *neutrófilo segmentado*. En estas fases las diferencias en el

citoplasma son mínimas y el núcleo va sufriendo una constricción que los divide en lobulillos.

Los neutrófilos maduros permanecen en la sangre durante sólo 8 horas; pasado este tiempo salen de los vasos y se introducen en los tejidos en los que llevan a cabo su función fagocíticas. Si no son necesarios, en pocos días mueren espontáneamente y son eliminados por los macrófagos.

## **1.2.- LA APOPTOSIS.**

### **1.2.1.- DIFERENCIAS CON LA NECROSIS.**

Es conocido que existe un tipo de muerte celular programada, que ocurre en diferentes circunstancias del desarrollo de la células y que se caracteriza por la participación activa de la célula que la padece (Kerr et al., 1972; Duvall and Wyllie, 1986., Wyllie, 1988). Este tipo de muerte se diferencia fácilmente de la muerte por necrosis que ocurre en las células, normalmente como resultado de la exposición de la célula a un tóxico o a un agente lesivo. Las principales diferencias que existen entre estos dos tipos de muerte son las siguientes:

- La necrosis ocurre como respuesta a una situación patológica, no ocurre nunca de manera fisiológica. Suele tener como reacción principal la inflamación del tejido dañado. Normalmente ocurre en muchas células que se encuentran próximas entre sí. Tiene lugar a lo largo de días. En estos casos el ADN no sufre ninguna variación significativa, de manera que si se extrae de las células dañadas y se visualiza tras una electroforesis se observa una banda de alto peso molecular de ADN.

- La apoptosis se caracteriza porque ocurre bajo condiciones que pueden ser tanto fisiológicas como patológicas: desarrollo embriológico, del sistema inmune, de homeostasis de tejido, recambio celular, así como proliferación celular y procesos de tumoración (McConkey et al., 1990; Fesus et al., 1991; Golstein et al., 1991). No tiene como consecuencia la reacción inflamatoria del tejido adyacente. Es un fenómeno que puede ocurrir en una única célula de forma aislada. Tiene lugar en un

período de horas y suele presentar un patrón característico de fragmentación de ADN, en fragmentos de 180-200 pares de bases, que si bien no es imprescindible para la clasificación de este tipo de muerte, si resulta muy significativo. Otra diferencia importante es que mientras en la necrosis se produce un hinchamiento de la célula antes de la ruptura, en el caso de la apoptosis, se encuentra una disminución del volumen de la célula a un tercio del volumen inicial (Corcoran et al., 1994).

El nombre de apoptosis fue dado por Kerr a este tipo de muerte celular en 1972 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).

La muerte programada puede resultar como consecuencia de la activación de un programa endógeno (Ellis et al., 1991); o bien puede ser el resultado de la actuación de un agente extraño sobre la célula (Steller, 1995). La mayoría de las células animales tienen la capacidad de autodestrucción mediante la activación de un programa intrínseco de “suicidio”, que se activa cuando por algunas circunstancias son innecesarias o han sido excesivamente dañadas (Steller, 1995).

En una célula, durante el proceso de apoptosis, se pueden apreciar alteraciones en tres niveles:

-Alteraciones morfológicas (Wyllie, 1988), entre las que cabe destacar las siguientes:

*Constricción celular*: la célula tiene un tamaño menor; el citoplasma es más denso y los orgánulos aunque relativamente normales están más agrupados (las variaciones en el volumen celular se achacan a la inducción de la actividad transglutaminasa, que causa un enlace cruzado extenso entre las proteínas citoplasmáticas).

*Condensación de la cromatina*: es el elemento más característico de la apoptosis. La cromatina se agrega en la periferia, por debajo de la membrana nuclear, en masas densas bien delimitadas de diversas formas y tamaños.

*Formación de vesículas citoplásmicas y cuerpos apoptóticos*: las células apoptóticas muestran al principio una extensa vesiculación de la superficie, después sufren fragmentación en numerosos cuerpos apoptóticos, unidos a la membrana y compuestos de citoplasma y restos de orgánulos, con o sin restos de cromatina.

*Fagocitosis de las células o cuerpos apoptóticos:* por las células sanas adyacentes, ya sean células parenquimatosas o macrófagos. Los cuerpos apoptóticos se degradan con rapidez dentro de los lisosomas, y las células adyacentes migran o proliferan para reemplazar el espacio ocupado por la célula apoptótica suprimida. La fagocitosis de los cuerpos apoptóticos, está mediada por receptores situados en estas células.

-Alteraciones a nivel molecular, como la fragmentación del ADN en fragmentos múltiples de nucleosomas de 180-200 pares de bases.

-Alteraciones metabólicas, como la síntesis de macromoléculas (Golstein et al., 1991).

Los mecanismos que involucran, desencadenan y regulan la apoptosis están siendo muy estudiados en estos últimos años, encontrándose diferencias significativas dependiendo del tipo de célula estudiada y condiciones en que se llevan a cabo los experimentos. En cualquier caso hay unos factores que son los más barajados en el proceso de apoptosis, aunque el sentido de su intervención sea muchas veces contradictorio. Se encuentran relacionados de alguna manera con la muerte celular programada los siguientes factores: 1) la interacción de un estímulo externo con el receptor celular; 2) la alteración en los niveles de calcio intracelular; 3) la activación de la PKC; 4) el estrés oxidativo; 5) la expresión de determinados genes: bcl-2, p53, c-myc...; 6) la participación de las endonucleasas; 7) la síntesis de nuevas proteínas; 8) la hidrólisis de lípidos de membrana.

#### **1.2.2.- SENTIDO FISIOLÓGICO DE LA APOPTOSIS EN LOS NEUTRÓFILOS.**

La apoptosis es una manera de muerte celular que se activa bajo algunas situaciones fisiológicas. En neutrófilos esta muerte en condiciones fisiológicas podría desempeñar dos funciones principales. Por un lado, la apoptosis podría considerarse un proceso que tiene como objetivo el mantener los niveles de una determinada población celular dentro de unos rangos establecidos. La apoptosis espontánea que sufren los neutrófilos maduros, no sería más que una manera de controlar el crecimiento de una determinada población celular (Haslett, 1992).

Por otro lado, la apoptosis contribuiría a la correcta resolución de la respuesta inflamatoria. Los neutrófilos maduros en sangre periférica, tienen una vida media muy corta y tras su muerte son eliminados eficazmente por los macrófagos. Este hecho tiene su importancia fisiológica, ya que los neutrófilos juegan un papel muy importante en el comienzo de las reacciones inflamatorias, y al mismo tiempo, es necesaria su desaparición del sitio afectado, con el fin de limitar el daño tisular en la zona adyacente a la inflamación. Cuando la muerte de los neutrófilos se produce por necrosis, se vierte al exterior el contenido de los gránulos citoplasmáticos, con la consiguiente estimulación de los macrófagos y la prolongación de la reacción inflamatoria. Cuando la muerte del neutrófilo se produce de manera programada los macrófagos reconocen a los neutrófilos, los fagocitan y se disminuye el tiempo de dicha reacción (Savill et al., 1990).

#### **1.2.2.1.- Intervención de los macrófagos.**

Se observa una relación clara entre la acción fagocítica de los macrófagos sobre los neutrófilos y el proceso de apoptosis sufrido por éstos, lo que indica que la apoptosis es una señal necesaria para la actuación de los macrófagos. De hecho, se encuentra que en neutrófilos obtenidos de sangre periférica, y en los que se consigue separar una población que ya ha iniciado el proceso de apoptosis, de otra que todavía no lo ha empezado, tan sólo la población con las características típicas de la apoptosis, es fagocitada por los macrófagos (Savill et al., 1989). Una de las características que permite a los macrófagos identificar a las células apoptóticas, es la alteración en la estructura de la membrana celular, que sufre cambios importantes en su composición. Se ha visto que la fosfatidilserina, que normalmente se encuentra en la cara interna de la membrana citoplasmática, aparece en la parte externa en cuanto el proceso de apoptosis comienza a desarrollarse (Martin et al., 1995). Otras moléculas que parecen relacionadas con el reconocimiento por parte de los macrófagos de las células apoptóticas, pueden ser residuos de carbohidratos, que aparecen en la población apoptótica y que no son los mismos que se encuentran en la superficie de las células intactas. Los macrófagos tienen en su superficie receptores

que reconocen moléculas de azúcares presentes en la superficie de otra célula (Duvall et al., 1985; Wyllie, 1988).

En contradicción a lo expuesto anteriormente, otros estudios han puesto de manifiesto que no es tan estrecha la relación entre la apoptosis y la fagocitosis de los neutrófilos por los macrófagos. Debido a que uno de los genes involucrados en la apoptosis es el *bcl-2*, y para estudiar si era realmente el desencadenamiento de la apoptosis la señal necesaria para la actuación de los macrófagos, se han creado ratones transgénicos que expresan *bcl-2* en neutrófilos maduros, y se encuentra que, a pesar de que en estos ratones no tiene lugar la muerte celular programada, si ocurre su fagocitosis por parte de los macrófagos en las mismas circunstancias que si no expresaran dicho gen (Lagasse and Weissman, 1994).

#### **1.2.2.2.- Relación de la apoptosis con otros factores que contribuyen a limitar o prolongar la respuesta inflamatoria.**

Otros agentes relacionados con el proceso inflamatorio son las *plaquetas*. Hay estudios que tratan de ver si existe alguna relación entre éstas y la apoptosis de los neutrófilos. Cuando se incuban neutrófilos con citoquinas tales como el GM-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos), se observa un retraso en la aparición del fenómeno de apoptosis. Este mismo efecto aparece cuando se incuban las células con ATP, o con los polifosfatos de adenosina  $Ap_4A$  y  $Ap_3A$ . En estas condiciones, los neutrófilos conservan las características morfológicas: no se produce la fragmentación del ADN y se mantiene la actividad de la NADPH oxidasa, así como la expresión de CD16 (Fc $\gamma$  RIII, que se encuentra significativamente disminuida en neutrófilos apoptóticos). El hecho de que las plaquetas sean células involucradas en los fenómenos de inflamación, y que cuando se activan, liberan al medio ATP y nucleósidos  $Ap_4A$  y  $Ap_3A$ , hace pensar que este tipo de células, junto con los productos derivados de células del sistema inmune como el GM-CSF, regulen de alguna manera la apoptosis del neutrófilo. En este caso, contribuyendo a incrementar el período de actividad de los neutrófilos en la zona afectada por un proceso de inflamación (Gasmi et al., 1996).

Relacionados con la resolución del proceso inflamatorio están otros agentes como son las *enzimas proteolíticas* (tripsina, quimiotripsina, pronasa), que producen una inducción de la apoptosis en neutrófilos, mientras que no ejercen ningún efecto en monocitos, macrófagos o linfocitos. Estas enzimas, aparecen en el lugar de la inflamación procedentes no sólo de neutrófilos y macrófagos, sino también de la activación de los sistemas de coagulación y complemento (Henson and Johnson, 1987; Weiss, 1989). Este mismo efecto, se observa cuando las células se tratan con elastasa, una serina proteasa que se considera uno de los mayores agentes inductores de daño tisular. Este dato es de mayor interés debido a que esta proteasa interviene directamente en el proceso de inflamación al ser secretadas por el propio neutrófilo. El tratamiento previo de las células con aprotinina (un inhibidor de serinoproteasas), bloquea la apoptosis en neutrófilos tratados con las enzimas proteolítica. La inducción de la apoptosis por las proteasas puede considerarse una manera de limitar el proceso inflamatorio (Trevani et al., 1996).

Otro dato sobre la resolución de los procesos inflamatorios es que en los neutrófilos, cuando se induce la apoptosis, algunos de los *receptores de membrana* empiezan a disminuir, como ocurre con proteínas reguladoras del complemento (CD59 y CD55) (Jones and Morgan, 1995). Otros receptores de superficie, cuya expresión se encuentra disminuida cuando se inicia el proceso de apoptosis y cuya disminución limita en cierta forma el daño excesivo sobre otros tejidos, son el CD62L (L-selectina); CD16 (Fc $\gamma$ III) y CD43. Estos receptores contribuyen a la adhesión de los neutrófilos a los vasos sanguíneos y a células endoteliales y su disminución limita la permanencia de los neutrófilos en la zona afectada (Dransfield et al., 1995).

### 1.3.- ENDONUCLEASAS.

Entre las características de la muerte celular programada están: a) un retraimiento celular; b) la condensación de la cromatina; c) aparición de los llamados cuerpos apoptóticos y d) la degradación enzimática de la cromatina (Wyllie, 1980; Wyllie, 1988).

En el proceso de la apoptosis, la fragmentación del ADN se considera como uno de los sucesos irreversibles que lleva a la célula a una muerte segura (Williams et al., 1974; Wyllie, 1980). La actuación de las endonucleasas favorece la formación de los cuerpos apoptóticos, lo que facilita la fagocitosis de las células apoptóticas por parte de las células responsables de su eliminación (Arends et al., 1990).

### 1.3.1.- DIFERENTES PATRONES DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN.

Se han encontrados tres patrones diferentes de fragmentación de ADN cuando este se visualiza tras una electroforesis en agarosa, apareciendo uno u otro dependiendo del tipo de célula estudiada, y en ocasiones dependiendo del momento en que se estudie. Los diferentes patrones observados son:

- Oligonucleosomas, fragmentos de ADN múltiplos de 180-200 pb.
- Fragmentos de 50-300 kpb.
- Un único fragmento de ADN.

#### *Escisión del ADN internucleosomal.*

La aparición de los fragmentos de nucleosomas se ha utilizado en la mayoría de los estudios de apoptosis como marcador bioquímico de la muerte celular. Estos fragmentos, son el resultado de la activación de endonucleasas, que rompen el ADN entre las regiones de unión de los nucleosomas de la cromatina, con la aparición de un patrón típico de fragmentos de ADN, múltiplos de 180-200 pares de bases cuando se hace una electroforesis en un gel de agarosa (Wyllie, 1980; Arends et al., 1990).

#### *Escisión del ADN en fragmentos de alto peso molecular.*

Algunos autores han descrito la aparición de fragmentos de ADN de alto peso molecular : 50-300 kpb durante el proceso de apoptosis. Se ha sugerido que estos fragmentos pueden servir de precursores a los de menor tamaño (Walker et al., 1991). En esta misma línea, hay otros estudios realizados en timocitos. Se encuentra que en una primera fase, aparecen unos fragmentos de ADN de 700, 200-250 kpb. La

formación de estos fragmentos es dependiente de la concentración de  $Mg^{2+}$ , pero no de  $Ca^{2+}$ . En una segunda fase aparecen fragmentos de 30-50 kbp; la formación de éstos es dependiente de  $Mg^{2+}$ , pero se ve facilitada en presencia de  $Ca^{2+}$ . La tercera fase de aparición de los fragmentos de oligonucleosomas, es dependiente de  $Mg^{2+}$  y de  $Ca^{2+}$  (Sun and Cohen, 1994).

Algunos autores que postulan que estos fragmentos mayores son precursores de los más pequeños, lo hacen en base a que la condensación de la cromatina que se aprecia en la célula durante la apoptosis, es consecuencia de la ruptura de los sitios de unión de la cromatina a la matriz nuclear, y que en estas condiciones es más accesible a las endonucleasas (Adachi et al., 1989; Pfaffle et al., 1990).

En contraposición, otros autores han encontrado que la aparición de ambos tipos de fragmentos de ADN se produce de manera simultánea, y que por tanto no son los fragmentos de mayor tamaño precursores de los de menor tamaño (Bortner et al., 1995). En cualquier caso, el tamaño de estos fragmentos se corresponde con el de los dominios de la cromatina unidos a la matriz nuclear, lo que pone de manifiesto que la ruptura del ADN se produce a un alto nivel de organización.

#### *Escisión en un único fragmento de ADN.*

Otros investigadores, han encontrado un único fragmento de ADN durante el proceso de apoptosis (Oberhammer et al., 1992; Peitsch et al., 1993a). Esta fragmentación del ADN podría ser exclusivamente, una primera señal para la inducción del proceso (Bortner et al., 1995).

#### **1.3.2.- TIPOS DE ENDONUCLEASAS.**

En cuanto a la participación de las endonucleasas en todo este proceso, Wyllie fue el primero en destacar el papel de la activación de las endonucleasas en la apoptosis de timocitos, inducida por el tratamiento con glucocorticoides (Wyllie, 1980). Si bien, el patrón típico de fragmentos de ADN, había sido descrito previamente por Hewish y Burgoyne, cuando estudiaron la autodigestión del ADN, en

el núcleo de células de hígado comprobando que esta digestión era dependiente de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Hewish and Burgoyne, 1973).

Entre las endonucleasas mejor caracterizadas se encuentran las siguientes:

**DNAsa I:** aislada por primera vez en páncreas bovino, se ha encontrado en numerosos tejidos, requiere para su actuación  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , y es inhibida por  $\text{Zn}^{2+}$  y actina. Su pH óptimo es de 7.5 (Peitsch et al., 1993b).

Su participación en el proceso de apoptosis se demostró al incubar timocitos en presencia de dicha enzima y observarse el patrón característico de degradación del ADN. Además, cuando se sometían las células a un tratamiento con anticuerpos antiADNsa se observaba una reducción significativa de la degradación del ADN (Peitsch et al., 1993b).

Se han realizado varios estudios sobre la localización intracelular de esta enzima. Aunque hay autores que afirman que está localizada en el núcleo, esto es incompatible con el hecho de que en el estudio de su ADNc se haya observado la secuencia de un péptido señal, que favorecería la teoría de que es una proteína de secreción (Polzar and Mannherz, 1990) y de hecho, dicha enzima se ha detectado circulante en el suero. Esta DNAsa se encuentra localizada en el lumen del retículo endoplásmico rugoso antes de su secreción. Una posible explicación a como entra en contacto con el ADN podría ser el hecho de que el aumento en los niveles de calcio (indispensable para la actuación de la enzima y puesto de manifiesto en la apoptosis de determinados tipos celulares (McConkey et al., 1989a; Bellomo et al., 1992)), altere la estructura del retículo endoplásmico, ésto permitiría el contacto entre esta enzima y el interior nuclear.

**DNAsa II:** estudiada fundamentalmente en células CHO (Chinese Hámster Ovary); requiere para su actuación un pH óptimo de 5.5 y es independiente de la concentración de iones (Liao, 1985). Su localización es fundamentalmente intralisosomal, aunque cierta actividad ha sido detectada en el núcleo. Para que esta enzima fuera la responsable de la degradación del ADN, el pH del núcleo debería disminuir sensiblemente. Se postula que los factores desencadenantes de la apoptosis, tienden a acidificar el contenido nuclear, como ocurre con los ionóforos del calcio; no

obstante, no parece que esta acidificación sea suficiente para conseguir el pH óptimo para la activación de esta enzima (Peitsch et al., 1994).

**NUC18:** purificada del núcleo de timocitos de rata tratados con glucocorticoides (Gaido and Cidlowski, 1991); requiere para su acción  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y es inhibida por  $\text{Zn}^{2+}$  y ácido aurintricarboxílico. Esta enzima es dependiente del receptor de glucocorticoides y es inhibida por antagonistas de los mismos. Tiene una estructura muy parecida a la ciclofilina A. Su localización es intranuclear, lo cual es compatible con la participación en un proceso de apoptosis. Se sugiere que para la actuación de esta enzima es necesaria la presencia de un factor proteico, ya que al incubar las células en presencia de cicloheximida, se encuentra una disminución en la actividad de esta enzima, si bien las concentraciones de enzima permanecen constantes (Caron-Leslie et al., 1991).

En cualquier caso, no está del todo claro si la fragmentación del ADN es una causa de la muerte celular, o por el contrario, si este suceso ocurre como un hecho más a lo largo del proceso de la apoptosis. Más seguro es que llegado a este punto el proceso de apoptosis es irreversible (Arends et al., 1990). De todas formas, no es tampoco un hecho imprescindible para que el proceso de la muerte celular programada tenga lugar (Oberhammer et al., 1991).

Desde un punto de vista de su sentido fisiológico, la apoptosis se puede considerar como un mecanismo destinado a evitar la lesión inflamatoria. Las cantidades observadas de DNAsa en suero pueden estar destinadas a la limitación del daño que puede ocasionar ADN libre en el torrente circulatorio. Igualmente puede considerarse un sistema de protección frente a determinados procesos autoinmunes, ya que en algunos de ellos, se encuentra anticuerpos frente a cromatina. También se ha sugerido, que sea una forma de facilitar la fagocitosis de las células apoptóticas, ya que las células encargadas de esta misión, encuentran que la cromatina presente en los cuerpos apoptóticos está ya muy fragmentada, lo que favorece sensiblemente su fagocitosis (Peitsch et al., 1994).

### **1.3.3.- PRINCIPALES ENDONUCLEASAS DESCRITAS EN LOS NEUTRÓFILOS.**

A lo largo de la maduración del granulocito desde la célula madre hematopoyética se observa una variación significativa en cuanto a la composición de esta enzima. En células CD34<sup>+</sup> (marcador de precursores de células hematopoyéticas), la primera endonucleasa que se detecta es dependiente de iones Mg<sup>2+</sup>. A lo largo de la diferenciación de la célula mielóide, aparece una endonucleasa cuya actividad es dependiente de un pH ligeramente alcalino (7.6) y de una concentración óptima de iones Ca<sup>2+</sup> (10 mM) y Mg<sup>2+</sup> (5 mM), junto con otra endonucleasa activa a un pH ligeramente ácido (6.0). Simultáneamente a la aparición de estas dos últimas actividades, se observa una disminución paulatina, hasta total desaparición, de la actividad dependiente de iones Mg<sup>2+</sup>. Este hecho se trata de justificar, argumentando que, o bien se pierde realmente la capacidad de expresión de esta enzima, o bien aparecen en el núcleo celular determinados compuestos no identificados, que actúan inhibiendo la acción de esta endonucleasa.

La apoptosis está mediada por diferentes enzimas en función de la etapa de maduración de la célula mielóide. El Ca<sup>2+</sup> inhibe la apoptosis en células progenitoras, mientras que la endonucleasa dependiente de Mg<sup>2+</sup> se pone en funcionamiento en estas células ante la ausencia de factores de crecimiento (Anzai et al., 1995).

En contraposición con estos estudios que destacan la existencia de varias endonucleasas en el neutrófilo, algunos autores han puesto de manifiesto la existencia de una única endonucleasa en el neutrófilo maduro, que sería un enzima independiente de cationes; inhibida por ácido aurintricarboxílico y activa exclusivamente a pH inferiores a 6.6. Esta enzima estaría incluida dentro del grupo de DNAsas II (Gottlieb et al., 1995). La actuación de este enzima a pH por debajo del fisiológico, sería posible dado que durante el proceso de apoptosis la célula sufre una acidificación; por ejemplo, el calcio; que es activador de apoptosis en determinadas células induce una ligera acidificación del medio intracelular, (0.3 unidades de pH) (Peitsch et al., 1994) aunque se discute si esta bajada de pH sería suficiente para activar la endonucleasa.

#### **1.4.- RELACIÓN ENTRE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN Y LA POLI ADP RIBOSA POLIMERASA.**

La poliADPribosa polimerasa, (EC 2.4.2.30), es una enzima nuclear que transfiere el grupo ADPribosa del  $\text{NAD}^+$ , a proteínas nucleares como las histonas; además de poder ser ella misma su propio sustrato (Kreimeyer et al., 1984). Otros sustratos *in vitro* de esta enzima son la topoisomerasa I, ARN polimerasa II, ADN polimerasa  $\alpha$  y  $\beta$ . La poliADP ribosilación se ha relacionado con la replicación y la reparación del ADN, la diferenciación celular y la promoción de tumores.

La relación existente entre la apoptosis y la actividad de la poli ADPribosa polimerasa (PARP) no está perfectamente aclarada. Algunos autores han encontrado una disminución en la actividad de la PARP, en células en proceso de apoptosis, observando que compuestos que inhiben la actividad de esta enzima, provocan la apoptosis de células de mamíferos en cultivo (Rice et al., 1992). En este mismo sentido se ha encontrado que durante el desarrollo del proceso de la apoptosis se produce una rotura proteolítica de la PARP, que es simultánea en el tiempo a la degradación del ADN. La PARP es un polipéptido, y tras su ruptura proteolítica da lugar a dos fragmentos; uno más pequeño que contiene la región amino terminal, que se une al ADN, y otro de mayor tamaño que contiene el dominio catalítico, inactivos ambos por separado. Cuando se tratan las células con algún compuesto que impide esta ruptura en dos péptidos, se observa una inhibición en la fragmentación del ADN; estos datos apuntan a una relación directa entre la inactividad de la PARP y la fragmentación del ADN (Kauffman et al., 1993).

Por otro lado, hay estudios que apoyan el hecho de que una activación de la PARP contribuye a la inducción de la apoptosis. Así, en la línea celular promielocítica HL-60, se relaciona la ADP ribosilación de la histona H1 con la fragmentación del ADN durante el proceso de la apoptosis, postulándose que la ADP ribosilación hace más susceptible la cromatina nuclear a la endonucleasa (Yoon et al., 1996). En estas células se encuentra que el máximo nivel de actividad del enzima precede al inicio de la fragmentación del ADN, además de observarse que en presencia de inhibidores de la PARP, el proceso de fragmentación del ADN, así

como los cambios morfológicos que ocurren durante el proceso de la apoptosis, no tienen lugar. Otros estudios en este sentido se han realizado en la línea U937 de leucemia mieloide. En este caso, se vio que el aumento de la temperatura y el estrés oxidativo que aceleraban la apoptosis, provocaban una disminución de NAD. Ésto se evitaba si se añadía al medio un inhibidor de la PARP, lo que hace pensar en que una activación de la enzima intervendría en el desencadenamiento de la apoptosis (Nosseri et al., 1994).

### **1.5.- RELACIÓN ENTRE LA APOPTOSIS Y LA SÍNTESIS DE NUEVAS PROTEÍNAS.**

La síntesis de nuevas proteínas se ha considerado en algunos casos como el primer paso irreversible que tiene lugar en el proceso del suicidio celular. En timocitos la inhibición de la síntesis de proteínas, evita la muerte celular, así como la fragmentación del ADN; poniendo de manifiesto una relación entre ambos sucesos (Cohen and Duke, 1984). Datos similares se encuentran en células Jurkat (Chen et Faller, 1995).

Ayudando estas ideas, en otros estudios realizados en timocitos, se ha aislado ARNm asociado al desencadenamiento de la muerte celular, que aparece al poco tiempo de estimular a la célula con el agente causante de la apoptosis (Owens et al., 1991).

En contraposición, y aunque la apoptosis es un proceso donde la célula participa activamente, diversos estudios en líneas celulares han puesto de manifiesto que no existe una activación en la síntesis de proteínas, ni de la expresión génica durante el proceso de la muerte celular. En la línea celular humana promielocítica HL-60, en presencia de cicloheximida, un potente inhibidor de la síntesis de proteínas, el proceso de apoptosis no solo no se evita, sino que se estimula. En este caso se sugiere, que debe ser necesaria una continua síntesis de alguna proteína reguladora, a fin de mantener el control de la maquinaria necesaria para activar el proceso de la apoptosis (Martin et al., 1990).

En cuanto a los neutrófilos, que en cultivo y en ausencia de citoquinas como G-CSF, GM-CSF o IL-1, sufren el proceso de apoptosis, (aproximadamente entre un 30-50 % de las células), éste parece ser independiente de la síntesis de nuevas proteínas, ya que tiene lugar aún cuando se preincuban las células con cicloheximida. Este dato además pone en evidencia la existencia en este tipo de células de una enzima constitutiva con actividad endonucleasa (Martin et al., 1990; Gottlieb et al., 1995).

El hecho de que la muerte celular pueda ser activada o inhibida por factores que actúan a nivel de la síntesis de ARN o proteínas corrobora la idea de una participación activa de la célula en el desencadenamiento de su muerte (Schwartz et al., 1990; Steller, 1995).

## **1.6.- PRINCIPALES GENES IMPLICADOS EN EL PROCESO DE LA APOPTOSIS.**

La implicación de genes en la inducción de la muerte celular programada se puso de manifiesto por primera vez en el nematode *Caenorhabditis elegans*. En este organismo, debido al pequeño tamaño del mapa genético, se daban unas circunstancias que hacían relativamente fácil el estudio de la regulación del proceso de la muerte celular, así como las alteraciones debidas a cualquier mutación sufrida en alguno de los genes. Se identificaron 14 genes implicados en este proceso (*ced* genes). Durante el desarrollo embrionario, mueren 131 del total de 1090 células somáticas. De los genes implicados en este proceso, dos son necesarios en cada una de las 131 células destinadas a morir. Éstos se identificaron como *ced-3* y *ced-4*; y las mutaciones en cualquiera de los dos conlleva a un bloqueo de la muerte de dichas células (Ellis and Horvitz, 1986). En contraposición, el gen *ced-9* actúa como un bloqueante de la muerte celular programada; una mutación en este gen provocaría la muerte de todas las células (Hengartner et al., 1992).

En células de mamíferos, se han encontrado genes que se encuentran involucrados en la regulación de la muerte celular y que tiene gran homología con los

anteriormente citados, como ocurre entre *bcl-2* y *ced-9*, y entre *ced-3* y la enzima convertidora de interleukina-1 $\beta$  (ICE).

#### 1.6.1.- *bcl-2*

El gen humano *bcl-2*, (B-cell lymphoma /leukaemia-2), se puso de manifiesto en el linfoma folicular, resultante de la traslocación de dicho gen de su normal localización en el cromosoma 18q21, al cromosoma 14q32 en yuxtaposición al gen que codifica la cadena pesada de las inmunoglobulinas. Como consecuencia de esta translocación, en las células de los linfomas se produce un incremento en su transcripción, cuyo resultado es la superproducción de la proteína codificada de 26 kDa *bcl-2* (Tsujimoto et al., 1985).

La expresión del oncogen *bcl-2* conduce a transformaciones malignas (Reed et al., 1988). Entre los oncogenes, es el único cuya expresión no supone un aumento en la proliferación celular, sino una disminución en la tasa de muerte celular inducida (Miyashita and Reed, 1993). Es considerado como un potente inhibidor de la apoptosis (Hockenbery et al., 1990). Este gen se expresa en muchos tejidos fetales, y su expresión disminuye a medida que el proceso de diferenciación celular es mayor, impidiendo de esta manera la muerte en células inmaduras progenitoras de líneas celulares (Lebrun et al., 1993).

Experimentos realizados con animales en los que se induce una sobreexpresión de este gen, han conseguido proteger las células frente a factores desencadenantes de la apoptosis, como puede ser la supresión de factores de crecimiento, tratamiento con agentes químicos y físicos (radiaciones), lesivos para el ADN. Esto hace suponer, que *bcl-2* regula el proceso de apoptosis en fases finales del mismo, ya que las circunstancias anteriormente citadas solamente concurren en los procesos finales del desarrollo de la apoptosis (Reed, 1995).

El gen *bcl-2* forma parte de una familia de genes, que incluye *bcl-x*, *bax*, *mcl-1* y *A1*, todos ellos se encuentran de alguna manera relacionados con el proceso de apoptosis. La homología entre estos genes se encuentra en dos regiones clasificadas como BH-1 y BH-2. Las proteínas resultante de la expresión de estos genes, contienen una región de aminoácidos hidrofóbicos en su extremo C-terminal, que

juegan un papel importante para su interacción con membranas celulares (Tanaka et al., 1993).

La proteína Bcl-2 está asociada a orgánulos celulares, especialmente a la membrana mitocondrial, a la membrana nuclear y del retículo endoplásmico (Chen-Levy et al., 1989; Jacobson et al., 1993). Uno de los mecanismo de acción de la proteína Bcl-2, pasa por su interacción con la proteína Bax (de 21kDa con una homología con Bcl-2 de un 21%), la cual a su vez puede formar homodímeros. No obstante, un exceso en la expresión de bax, acelera la muerte celular en líneas celulares dependientes de IL-3 cuando este factor es eliminado del medio, superando la acción protectora que ejerce bcl-2. Este hecho, lleva a pensar que puede ser la relación en la expresión bcl-2 /bax la que determine la supervivencia o no de la célula. (Oltvai et al., 1993). En caso de predominio de bcl-2, las células se encuentran totalmente protegidas frente a la muerte celular programada, y en caso de que sea bax la proteína predominante, la célula muere por apoptosis.

Respecto a las regiones BH-1 y BH-2, cabe destacar, que mutaciones en estas secuencia que conlleven a variaciones en un aminoácido en la proteína codificada Bcl-2, hace susceptible a la célula de sufrir un proceso de apoptosis. De la misma manera, se ha visto que estas mutaciones imposibilitan la dimerización de Bcl-2 con Bax, si bien la homodimerización Bcl-2-Bcl-2 sigue siendo posible. Se deduce por tanto que la misma región necesaria para la unión con Bax, es necesaria para conferir la actividad inhibidora de la apoptosis, ya que el homodímero de Bcl-2, no es suficiente para proteger a la célula de la muerte programada (Yin et al., 1994).

Otro de los genes de esta familia es bcl-x, cuya expresión tiene como resultado dos proteínas Bcl-x<sub>L</sub> y Bcl-x<sub>S</sub>; ambas diferenciadas en 63 aminoácidos. La homología con bcl-2 es mayor para Bcl-x<sub>L</sub>. Así mientras éste actúa como un inhibidor de la muerte celular, Bcl-x<sub>S</sub> la acelera, probablemente actuando como inhibidor dominante de Bcl-x<sub>L</sub> y de Bcl-2 (Boise et al., 1993; Sato et al., 1994).

En general, existe la teoría de que son las diferentes proporciones entre los miembros de esta familia de proteínas, las que determinan la sensibilidad o resistencia de las células a los estímulos que pueden conducir a una muerte celular programada. Y más concretamente, se cree que estas proteínas, actúan más como reguladoras, que como efectoras de la muerte celular programada (Reed, 1995; Broome et al., 1995).

Se han propuesto diferentes mecanismos por los que al expresar bcl-2 se produce un bloqueo de la apoptosis. Entre ellos se encuentran los siguientes:

-Una acción como antioxidante, ya que se observó que al tratar células que expresan bcl-2 con agentes oxidantes, el daño que se producía era menor que si no expresaban dicho gen. El mecanismo exacto no se conoce todavía; si bien se postula que el efecto no es la inhibición en la producción de radicales libres, sino más bien cierto efecto “secuestrador” de los radicales de oxígeno producidos en la célula (Hockenbery et al., 1993; Steller, 1995; Jacobson, 1996).

-Una acción sobre los flujos de calcio. En células hematopoyéticas dependientes de IL-3, tratadas con tapsigargina, en las que se induce un exceso en la expresión de bcl-2 en ausencia de IL-3, se encuentra una disminución en la salida del calcio del retículo endoplásmico, y simultáneamente una disminución en la aparición de una fragmentación del ADN. Se encuentra además una clara relación entre la expresión del gen y la protección frente a la apoptosis. (Baffy et al., 1993; Lam et al., 1994)

Sobre los factores que determinan una mayor o menor expresión de bcl-2, se han hecho experimentos en células de leucemia mieloide aguda, y se ha observado que la expresión de este gen está muy relacionada con los niveles de GM-CSF. En células con alguna capacidad de reacción frente a este estímulo, no se produce la apoptosis y los niveles de bcl-2 se encuentran elevados. En cambio, las células que no responden a ningún factor de crecimiento, sufren apoptosis en pocas horas de cultivo. Si a las primeras células, se les incubaba en presencia de un anticuerpo anti GM-CSF, entonces disminuyen los niveles de expresión de bcl-2 y se desencadena la apoptosis (Bradbury et al., 1994).

#### 1.6.2.- APO-1/ Fas.

APO-1/ Fas, últimamente designado como CD95, se ha identificado como una proteína de membrana de 45 kDa, relacionada con la transducción de señales apoptóticas al interior celular. Su relación con la apoptosis se puso de manifiesto en estudios en los cuales células transfectadas con antígeno Fas, evolucionaban rápidamente hacia una muerte celular programada cuando se incubaban con

anticuerpos contra esta molécula de superficie (Itoh et al., 1991; Oehm et al., 1992). Sin embargo, no existe una relación directa entre la expresión de Fas y la susceptibilidad a la apoptosis, sin que sean conocidos los mecanismos por los cuales una célula que expresa esta proteína es o no sensible a la apoptosis mediada por Fas (Owen-Schaub et al., 1994).

Esta proteína tiene tres dominios con residuos ricos en cisteína, y su estructura es similar a la del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R) y al factor de crecimiento neuronal (NFG-R). El ligando para este receptor (antiantígeno Fas o anti APO-1), es una proteína de membrana tipo II, de 40kD, con una gran homología con el TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , CD40, CD27 y CD30 (Suda et al., 1993).

A pesar de la semejanza existente entre el antígeno Fas y el receptor del TNF, cuando se analizan los mecanismos a través de los cuales desarrollan su acción, se observa que siguen vías muy diferentes. Los análisis morfológicos ponen de manifiesto que mientras el TNF-R puede inducir tanto una muerte por necrosis como por apoptosis (Wertz and Hanley, 1996; Spiegel et al., 1996); el antígeno Fas lo hace siempre por apoptosis (Tsuchida et al. 1995). La citotoxicidad por TNF está relacionada con la producción de radicales libres, originados a partir de la respiración mitocondrial; estos mediadores no aparecen en la muerte inducida por anticuerpo antiantígeno Fas. Además inhibidores del flujo del calcio, de la ADP ribosilación y de la activación de la fosfolipasa suprimen la citotoxicidad mediada por TNF, pero no la inducida por anticuerpo antiantígeno Fas. Otras diferencias se han establecido a nivel de factores de transcripción, así mientras el factor NF- $\kappa$ B se activa rápidamente por TNF, no resulta activado por el antiantígeno Fas (Schulze-Osthoff et al., 1994).

Un estudio reciente ha encontrado una relación entre la apoptosis mediada por Fas y los radicales libres. A pesar del carácter lesivo de éstos, en este trabajo se describe una disminución en la sensibilidad a la apoptosis mediada por Fas en células expuestas a estos agentes oxidantes, y se destaca que las concentraciones intracelulares de O<sub>2</sub><sup>-</sup> actúan bloqueando la apoptosis en los casos en que está mediada por Fas (Clément and Stamenkovic, 1996).

Se ha observado expresión de esta proteína en neutrófilos, eosinófilos y linfocitos (Matsumoto et al., 1995). La susceptibilidad de estas células a antiFas es

diferente siendo los neutrófilos los más sensibles. esta susceptibilidad parece mediada por bcl-2, a mayor expresión de bcl-2 menor sensibilidad a antiFas (Iwai et al., 1994).

### 1.6.3.- c-myc.

C-myc es un protooncogen cuya expresión tiene como resultado la proteína c-myc. Esta proteína, esta involucrada tanto en el desarrollo del ciclo celular (su expresión es necesaria para el correcto desarrollo del ciclo celular en células normales), como en la inducción de la apoptosis. Los papeles opuestos que puede ejercer c-myc, se deben a que se necesita la expresión de otro gen en la célula que actúe regulando su propia actividad. Se propone que el encargado de esta función pueda ser bcl-2 (Bissonnette et al., 1992; Fanidi et al., 1992). De hecho bcl-2 puede impedir la muerte celular inducida por c-myc. También se ha estudiado la relación existente entre la expresión de c-myc y la de p53 (gen supresor de tumores). En presencia de p53, la activación de c-myc conduce al desarrollo de la apoptosis (Hermeking and Eick, 1994). En cualquier caso c-myc necesita de su dimerización con otra proteína, max, para poder unirse y actuar sobre el ADN (Amati et al., 1993). La activación del protooncogen contribuye al desarrollo de neoplasias, y generalmente supone una expresión desregulada de la proteína c-myc.

En los últimos tiempos, están apareciendo un gran número de genes implicados de alguna manera en el desarrollo de la muerte celular programada. El papel exacto de cada gen no está perfectamente identificado, pero lo que si parece claro es que no existe un único gen responsable del desencadenamiento de la muerte celular. Los genes que se activan en un tipo concreto de células, no son necesarios para inducir la apoptosis en otras. El desencadenamiento de la apoptosis, no se puede achacar por tanto exclusivamente a la activación de determinados factores de transcripción (Osborne and Schwartz, 1994).

#### **1.6.4.- GENES RELACIONADOS CON LA APOPTOSIS DESCRITOS EN LOS NEUTRÓFILOS.**

Estudios realizados en neutrófilos, han puesto de manifiesto, que en estas células la expresión del gen bcl-2 es prácticamente nula (Iwai et al. 1994).

Sin embargo, el antígeno Fas es expresado de manera constitutiva. De hecho, si se incuban estas células con anticuerpos anti antígeno Fas, se encuentra un aumento significativo en la fragmentación del ADN y la aparición de las características morfológicas típicas del proceso de la apoptosis. Incluso en presencia de determinados factores del tipo de citoquina, con los que se previene la muerte celular, se consigue inducir la apoptosis tratando las células con anti antígeno Fas (Iwai et al., 1994).

Estos datos concuerdan con el hecho de que estas células, sufren apoptosis en un período relativamente breve de tiempo, ya que carecen del factor preventivo que supondría la expresión de bcl-2

#### **1.7.- IMPLICACIONES DEL CALCIO EN LA APOPTOSIS.**

El calcio es un ion necesario para gran número de procesos celulares. Entre éstos destacan los de secreción y neurotransmisión, contracción y ensamblaje de proteínas contráctiles, fenómenos de transporte de membrana, reacciones enzimáticas, división y diferenciación celular, y transcripción de genes.

El calcio extracelular se encuentra en unas concentraciones del orden de 1 mM, mientras el intracelular lo está en concentración de (10-100) nM, pudiendo alcanzarse concentraciones del orden de hasta 10  $\mu$ M, como respuesta a algún estímulo externo. Además del gradiente de calcio entre el citosol y el exterior celular, existe otro entre el citosol y depósitos intracelulares: retículo sarcoplásmico (con una  $[Ca^{2+}]$  de aproximadamente 100  $\mu$ M) y mitocondria (Lucas et al., 1983). La existencia de un depósito intracelular de calcio en retículo endoplásmico en células no musculares fue descrito en tejido acinar de páncreas, (Lucas et al., 1978). Las

diferencias de concentración que existen entre los diferentes almacenes de calcio, se establecen por la existencia de unas bombas de calcio dependientes de ATP, que transportan calcio en contra del gradiente y que permiten de esta manera la existencia de unos almacenes intracelulares de calcio.

### 1.7.1.- MODELO EXPLICATIVO DE LAS OSCILACIONES DEL CALCIO.

A la hora de estudiar las alteraciones en las concentraciones de calcio que se producen en la célula como consecuencia de la acción de un estímulo externo, es necesario conocer las relaciones entre los diferentes almacenes intracelulares de calcio y la magnitud de la respuesta originada por la estimulación de cada uno de ellos.

El modelo más aceptado a la hora de explicar los flujos de calcio, es el que se basa en la existencia de dos almacenes intracelulares de calcio; uno sensible al Ins (1,4,5)P<sub>3</sub> (inositol 1,4,5, trifosfato), y otro insensible a Ins (1,4,5)P<sub>3</sub> y sensible a la concentración intracelular de calcio.

En resumen se pueden establecer 5 pasos (Berridge et Irvine, 1989; Dupont et al., 1991; Berridge, 1991), que serían los siguientes:

1. Ante un estímulo externo, se activa la formación de Ins (1,4,5)P<sub>3</sub>, que resulta de la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5 difosfato en DAG e Ins (1,4,5)P<sub>3</sub>. Este paso, requiere la participación de un receptor en la membrana, una proteína G y una fosfolipasa C específica.

2. El Ins (1,4,5)P<sub>3</sub> provoca la salida de Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplásmico proporcionalmente a la señal transmitida por el receptor del estímulo. Esta deplección de Ca<sup>2+</sup> conlleva a su vez a una entrada de Ca<sup>2+</sup> del exterior celular, (la entrada de calcio desde el exterior es secundaria al vaciado de los depósitos intracelulares, ya que este efecto, se observa igualmente cuando se consiguen disminuir los niveles de calcio por un mecanismo diferente al de la estimulación con Ins (1,4,5)P<sub>3</sub> (Alonso-Torre et al., 1993) ). Los depósitos de calcio insensibles a Ins (1,4,5)P<sub>3</sub>, se encargan de actuar como tampones de los niveles de calcio “secuestrando” el calcio del citoplasma hacia su interior.

3. Una vez que estos depósitos se llenan, pierden su capacidad tampón y se produce entonces, un pico máximo en la concentración de calcio intracelular, debido además, a que el exceso de calcio intracelular es la señal requerida para que se produzca el vaciado de estos depósitos al citosol.

4. El calcio es entonces bombeado hacia el exterior de la célula y otra parte es retenida en los almacenes intracelulares de calcio (retículo endoplásmico).

5. Si el estímulo continúa se repite la misma secuencia en fluctuaciones que provocan las ondas características en la concentración de calcio intracelular.

Otros autores, han descrito la existencia de un flujo de calcio entre los dos tipos de depósitos intracelulares, mediados por una proteína G, que activa el proceso de translocación de calcio entre los depósitos sensibles e insensibles a Ins (1,4,5)P<sub>3</sub>. (Al tratar las células con GTP se provoca la salida de Ca<sup>2+</sup> de los depósitos dependientes de Ins (1,4,5)P<sub>3</sub>). En este caso, las alteraciones en las concentraciones de calcio, no se reflejan en el citosol de la célula. (Ghosh et al., 1989).

Otros estudios en hepatocitos de rata, postulan que los sitios de unión del Ins (1,4,5)P<sub>3</sub> no se encuentran exactamente en el retículo endoplásmico, sino en otra estructura diferente: calciosoma, que sería responsable de las oscilaciones en los niveles de calcio, mediadas por Ins (1,4,5)P<sub>3</sub> (Rossier et al., 1991). Estas vesículas de 50-250 nm de diámetro, tienen una proteína con alta afinidad para el calcio, la calsecuestrina, y tienen la característica de que en presencia de Ins (1,4,5)P<sub>3</sub> responden con una liberación de calcio hacia el citosol celular. No obstante la mayoría de los estudios realizados hasta ahora, consideran el retículo endoplásmico como el orgánulo encargado de la regulación de la concentración intracelular de calcio, al mismo tiempo, que es en donde se han descrito mayor número de receptores para Ins (1,4,5)P<sub>3</sub> (Ross et al., 1989).

#### 1.7.2.- TAPSIGARGINA.

Debido a la importancia del calcio en muchos procesos celulares, se han buscado moléculas, que permitan *in vitro*, el estudio de las consecuencias de una concentración alta de ion calcio a nivel intracelular, así como la participación de los

diferentes almacenes intracelulares en estos procesos. Una de las moléculas hoy en día más utilizada con este fin es la tapsigargina.

La tapsigargina es un compuesto con estructura de lactona sesquiterpénica, altamente lipofílico, aislado de la raíz de una planta umbelífera, *Thapsia garganica*, (Rasmussen et al., 1978), que se caracteriza por ser un promotor de tumores, y cuyo mecanismo de acción se basa en el vaciado de los depósitos intracelulares de calcio por inhibición de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de ATP. Esta inhibición, conlleva el incremento en los niveles citoplasmático de calcio, que además actúan como inductor de la entrada de calcio extracelular (Thastrup et al., 1990; Sarkadi et al., 1991).

La tapsigargina interacciona con toda la familia de calcio-ATPasas tanto del retículo endoplásmico como sarcoplásmico (SERCA), con un  $\text{IC}_{50} \approx 30$  nM. Esta inhibición de las isoenzimas de la SERCA, se realiza con igual potencia y se caracteriza por ser rápida, en 15 segundos es completa, estequiométrica y esencialmente irreversible (Lytton et al., 1991).

### 1.7.3.- RELACIÓN ENTRE EL CALCIO CITOPLASMÁTICO Y EL CALCIO NUCLEAR

Tradicionalmente se aceptaba, que el tamaño de los poros de la membrana nuclear, no ofrecían ningún problema a la difusión de iones y moléculas pequeñas, y que por tanto, las variaciones de concentración en algún ion, que ocurrieran en el citosol, se reflejaban de la misma manera a nivel nuclear.

No obstante, ciertos estudios realizados en núcleo de células de músculo liso durante la contracción, pusieron de manifiesto que las concentraciones en este ion puede ser diferentes en el núcleo y citoplasma, tanto en cantidad, como en duración (Williams et al., 1987). Se observó, que cuando se incubaban núcleos de hígado de rata en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y ATP, aumentaba la concentración intranuclear de  $\text{Ca}^{2+}$ ; y estos datos concordaban con la presencia de una bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de ATP que introducía calcio al interior nuclear (Nicotera et al., 1989)

En núcleo aislado se observa, que tras la adición de  $\text{Ins (1,4,5)P}_3$ , una parte del calcio intranuclear es vertido al exterior como si existieran dos compartimentos almacenes de calcio dentro del núcleo, y en uno de ellos se encontrara el calcio que es depleccionado tras el estímulo con  $\text{Ins (1,4,5)P}_3$  (Nicotera et al., 1990).

En cuanto al mecanismo por el cual se regula el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  en el núcleo hay muy pocos datos todavía. Algunos experimentos ponen de manifiesto que la fosforilación del receptor del Ins (1,4,5) $\text{P}_3$  está asociado con un aumento en la deplección de calcio hacia el exterior nuclear (Matter et al., 1993). Otros estudios evidencian una relación entre los niveles  $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$  en el citoplasma y la concentración intranuclear de calcio ( Oishi and Yamaguchi, 1993)

Respecto a la sensibilidad del núcleo a los inhibidores de la SERCA-ATPasa, no hay una conclusión definitiva; mientras unos defienden que la tapsigargina no afecta al aumento en los niveles de calcio intranuclear (Oishi and Yamaguchi, 1993), otros mantienen que previene el aumento en los niveles de calcio (Hechtenberg and Beyersmann, 1993). Esto último, se ve corroborado por los estudios que ponen de manifiesto que en presencia de los inhibidores de la SERCA, se inhibe la fosforilación del receptor de Ins (1,4,5) $\text{P}_3$ .

En cualquier caso, existen datos que apoyan el hecho de que la deplección de  $\text{Ca}^{2+}$  del interior nuclear, no es igual a la que ocurre a nivel del retículo endoplásmico (Nicotera et al., 1989; Nicotera et al., 1990). Estos datos son los siguientes:

-Concentraciones de inhibidores de la SERCA-ATPasa que provocan la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico, no ejercen ningún efecto en el  $\text{Ca}^{2+}$  nuclear.

-Aunque existe una cierta sensibilidad de los transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  a la tapsigargina, no se llega a producir una deplección del  $\text{Ca}^{2+}$  intranuclear.

-Concentraciones de inhibidores de la SERCA-ATPasa, que inhiben el secuestro de  $\text{Ca}^{2+}$  y provocan la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  de los almacenes del retículo endoplásmico sensibles a Ins (1,4,5) $\text{P}_3$ , no tienen ningún efecto sobre los almacenes nucleares de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a Ins (1,4,5) $\text{P}_3$ .

No obstante, y aunque no haya un modelo definitivo de la regulación en los niveles de calcio intranuclear, de lo que sí existen evidencias es de que los cambios en las concentraciones de iones en el núcleo celular están estrechamente relacionadas con la expresión de genes, la conformación de la cromatina y la actividad de alguna endonucleasa, y éstas a su vez con el desencadenamiento del proceso de la muerte celular (Nicotera et al., 1994).

#### **1.7.4.- PARTICIPACIÓN DEL $\text{Ca}^{2+}$ EN EL DESENCADENAMIENTO DE LA APOPTOSIS.**

La homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  es fundamental para el mantenimiento de la función y estructura celular. Alteraciones importantes en las concentraciones de este ion, conducen a la célula a un proceso de necrosis. Últimamente, se han relacionado también las alteraciones en las concentraciones de este ion, con la muerte por apoptosis (Bellomo et al., 1992). De hecho, el calcio es uno de los elementos necesarios, para la activación de alguno de los procesos que desemboca en la muerte celular programada, como la activación de enzimas tipo endonucleasas, proteasas, fosfolipasas, así como cambios en la composición iónica y de agua intracelular que conducen a la condensación del citosol (Lucas and Sanchez-Margalet, 1995).

Los primeros datos que apuntaron en esta dirección, se basaban en el hecho de que cuando disminuían las concentraciones extracelulares de calcio, o se tamponaban los cambios de calcio a nivel intracelular, se evitaban la aparición de los signos típicos de apoptosis y la célula sobrevivía a los estímulos que en condiciones normales provocaban la muerte celular. En diferentes estudios en timocitos se encontró, que incrementos en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  desencadenaban una muerte celular por apoptosis (McConkey et al., 1989a; McConkey et al., 1990). Posteriormente, se estudiaron los efectos que los ionóforos de  $\text{Ca}^{2+}$  ejercían en algunos tipos celulares, observando, que provocaban una activación de algunas endonucleasas, con la consiguiente fragmentación del ADN (McConkey et al., 1989b; McConkey et al., 1991; Caron-Leslie and Cidlowski, 1991). Otros estudios realizados con tapsigargina también favorecían la teoría de la estrecha implicación existente entre las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y el desencadenamiento de la muerte celular por apoptosis. Así, el tratamiento de timocitos con tapsigargina provocaba un aumento en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , que se asociaba a la degradación del ADN y a la aparición de cuerpos apoptóticos (Jiang et al., 1994; Lam et al., 1994). También se observó que cuando se trataban las células con bloqueantes de los canales de calcio, se impedía el desarrollo de la apoptosis ( Mariggio et al., 1994).

En contraposición a estos estudios, donde se encuentra una relación entre la elevación de la concentración de calcio y la apoptosis, otros autores han encontrado que incrementando los niveles de calcio intracelular, se protege a la célula de la

apoptosis inducida por la ausencia de factores de crecimiento. En células dependientes de IL-3, se encuentra una disminución en la concentración de calcio intracelular, con un claro incremento de la muerte por apoptosis cuando se suprime del medio la IL-3. En este caso, se encuentra además que una sobreexpresión de bcl-2 tiene como resultado una inhibición de la apoptosis. Estos datos irían en contra de los anteriormente expuestos, donde uno de los mecanismos atribuibles a bcl-2 era que éste evita de alguna manera el incremento del calcio en la célula (Rodríguez-Tarduchy et al., 1990; Baffy et al., 1993).

Entre las posibles explicaciones de la implicación del calcio en la apoptosis, está la relación existente entre las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y la regulación en la expresión de determinados genes, que se sabe intervienen en el desencadenamiento de la apoptosis; entre otros: c-fos, c-jun y el gen de la calmodulina (Dowd et al., 1991; Smeyne et al., 1993).

Otra explicación estaría relacionada con la activación por parte del calcio de algunas endonucleasas (Anzai et al., 1995; Peitsch et al. 1993b).

En células de músculo liso incubadas en presencia de taspigargina, el vaciamiento en los almacenes intracelulares de calcio está directamente relacionado con una disminución del crecimiento celular. Las células entran en un estado  $G_0$  de manera indefinida, con la consiguiente disminución de la proliferación celular y la fragmentación del ADN de la célula (Short et al., 1993; Furuya et al., 1994). Si se restablecen los niveles de calcio en los almacenes intracelulares, la célula pasa de un estado  $G_0$  a  $G_1$ , y continúa el desarrollo del ciclo celular, de donde se deduce la implicación del calcio de estos almacenes en el correcto desarrollo del ciclo celular (Short et al., 1993). Hay varias explicaciones posibles que justifiquen esta relación; por un lado la necesidad de calcio por parte del retículo endoplásmico para la síntesis y transporte de proteínas sin las cuales el ciclo celular no puede continuar (Sambrook, 1990; Lam et al., 1994). Por otra, la posibilidad de que el calcio de estos depósitos esté involucrado en alguno de los procesos necesarios para el correcto desarrollo del ciclo celular (Berridge and Irvine, 1989).

### **1.7.5.- IMPLICACIONES DEL $Ca^{2+}$ EN LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA DE LOS NEUTRÓFILOS.**

En los neutrófilos incrementos en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  evitan la apoptosis espontánea. De hecho cuando se incuban las células en presencia de quelantes de calcio, se observa que se acelera dicho proceso (Whyte et al., 1993). En la línea celular HL-60, se ha descrito que la elevación en los niveles de  $Ca^{2+}$  se produce una vez se han activado las endonucleasas y el proceso de apoptosis se ha puesto en marcha, pero que no es el motivo que desencadena el proceso (Lennon et al., 1992).

### **1.8.- PKC.**

#### **1.8.1.- DIFERENTES ISOENZIMAS DE LA PROTEIN KINASA C.**

Bajo el término de protein kinasa C se engloban un conjunto de proteínas con actividad fosforilante de proteínas en restos de serina y/o treonina, que son codificadas por al menos 9 genes. La PKC es una proteína que juega un papel importante en la transducción de señales en muchos sistemas celulares.

Las diferentes isoformas de la PKC se han dividido en subtipos atendiendo a diferentes criterios, de estructura molecular y características bioquímicas (Dang et al., 1994; Dang et al., 1995):

-Isoenzimas convencionales:  $\alpha$ ,  $\beta I$ ,  $\beta II$ , y  $\gamma$ . Éstas requieren para su actuación además de fosfatidilserina, la presencia de  $Ca^{2+}$ , y son activadas por 1,2 diacilglicerol (DAG) o PMA, que es un éster de forbol, concretamente forbol-12 miristato-13 acetato. El PMA actúa como un promotor de tumores y la interacción con la PKC se realiza con gran afinidad y de manera irreversible, por este motivo se utiliza con mucha frecuencia para simular la acción del DAG y estudiar los efectos de la activación de la PKC (Slater et al., 1994).

El DAG consigue el máximo de translocación de PKC después de 30 minutos según estudios realizados en monocitos. La concentración de DAG necesaria para conseguir una translocación de la PKC de un 50% es mil veces superior a la necesaria para conseguir el mismo efecto con PMA. Además, con DAG a concentración del orden  $\mu\text{M}$  no se consigue una translocación mayor, a diferencia de lo que ocurre cuando se estimula con PMA, que produce una translocación casi completa de la PKC (Kadri-Hassani et al., 1995).

-Isoenzimas nuevas:  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\mu$ ,  $\eta/L$  y  $\theta$ . Éstas son independientes de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , pero son igualmente activadas por fosfatidilserina DAG o PMA. Parece ser que en este caso el mecanismo de activación es a través de fosfolipasa D, enzima que no produce incremento en la concentración de calcio (Ha and Exton, 1993).

-Isoenzimas atípicas:  $\zeta$ ,  $\iota/\lambda$ . Éstas son igualmente activadas por fosfatidilserina, pero son independientes de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y no se activan ni por PMA ni por DAG.

La mayoría de las células expresan más de un tipo de PKC. Es difícil establecer el papel de cada PKC en la función celular; de hecho, las diferencias en los cofactores que son necesarios, la localización celular y los substratos de cada una de las isoformas de la PKC son los que determinan los efectos de su activación (Jaken, 1996).

Las diferentes isoenzimas de la PKC tienen cuatro regiones conservadas y cinco variables en una única cadena polipeptídica ( $C_1$ - $C_4$ ,  $V_1$ - $V_5$  respectivamente). La región amino terminal se corresponde con el dominio regulador y comprende dos de las regiones conservadas con actividades caracterizadas funcionalmente: la región  $C_1$  que une lípidos activadores, como la fosfatidilserina (y que es la región que une DAG y PMA), y la región  $C_2$  que une calcio. La unión del DAG incrementa la afinidad de la PKC por la fosfatidilserina, y esto contribuye a la redistribución de la PKC soluble, a la membrana de células estimuladas (Newton, 1995). La región  $C_1$  contiene dos secuencias ricas en cisteína, necesarias para establecer las fuerzas de unión de la PKC con las membranas; al menos una de estas regiones es la que interviene posibilitando la unión del PMA a la PKC. Esta región parece ser la responsable del reconocimiento de la proteína que va a ser fosforilada. La translocación del citosol a la membrana, se produce como consecuencia de la interacción del calcio con el dominio regulador  $C_2$

(O'Flaherty et al., 1990). El dominio catalítico se corresponde con el extremo carboxi-terminal y contiene los sitios de unión a los substratos y al ATP. La autofosforilación en determinadas secuencias del extremo carboxiterminal contribuye a la regulación de la distribución de la PKC entre el citoesqueleto y la fracción soluble (Zahng et al., 1994).

La activación de la PKC, es paralela a la translocación del componente de la NADPH oxidasa del citosol a la membrana y al consiguiente ensamblaje de los diferentes componentes que confieren la actividad a la NADPH oxidasa (Kadri-Hassani et al., 1995).

La PKC es la responsable de la fosforilación de numerosas proteínas que se encuentran asociadas a diferentes procesos celulares tales como, secreción, inducción de diferenciación celular, activación de la transcripción de determinados factores nucleares y promoción de tumores.

#### **1.8.2.- ISOENZIMAS PRESENTES EN LOS NEUTRÓFILOS.**

Los neutrófilos humanos expresan 4 isoenzimas diferentes de PKC, concretamente las isoenzimas:

- $\alpha$  (80 kD).
- $\beta$ I (79 kD)
- $\beta$ II (80 kD)
- $\zeta$  (de la cual se detectan 2 bandas de 76 y 81 kD)

Las isoenzimas más abundantes son la  $\beta$ I,  $\beta$ II y  $\zeta$ , y la que se encuentra en menor proporción es la  $\alpha$  (Dang et al., 1994). Según otros autores, se puede apreciar también la presencia de la isoforma  $\delta$  (López et al., 1995).

En estas células, que juegan un papel importante en la defensa del organismo, la activación de la PKC parece relacionada precisamente con esta actividad antibacteriana.

En los neutrófilos, cuando se incuban con PMA o fMLP, se observa la translocación del citosol a la membrana plasmática, de las diferentes isoenzimas de PKC, (aún cuando la isoenzima  $\zeta$  no es activada por ésteres de forbol (O'Flaherty et

al., 1990; Dang et al., 1994)). Cuando los mismo experimentos se realizan con f-MLP, en ausencia de  $Ca^{2+}$ , la translocación de las diferentes isoformas de la PKC ocurre rápidamente pero de manera transitoria. Se sugiere que podrían intervenir en el proceso de activación de la PKC tanto la fosfolipasa C, como la D. La primera es activa en ausencia de calcio y por acción del f-MLP provocaría un incremento en las concentraciones de DAG que daría lugar a una activación momentánea de la PKC. La segunda es activa en presencia de calcio que al mismo tiempo favorece la unión de la PKC a la membrana citoplasmática con lo que la translocación y la activación de la PKC es más duradera (Dang et al., 1995).

### **1.8.3.- PARTICIPACIÓN DE LA PKC EN LA APOPTOSIS.**

La participación de la PKC en el proceso de apoptosis ha sido y sigue siendo muy discutida, ya que los resultados que se obtienen difieren según las células estudiadas (Lucas and Sanchez-Margalet, 1995).

En algunos casos, los resultados ponen de manifiesto que la activación de la PKC tiene como consecuencia la inhibición de la muerte celular por apoptosis, mientras que en otros casos, se evidencia una participación de esta proteína en el sentido de una estimulación de dicho proceso.

Entre los estudios que apoyan la primera de las hipótesis están los siguientes:

-En linfocitos se induce la apoptosis cuando se tratan con un inhibidor de la proteinkinasa C como la polimixina B (Lucas et al., 1991).

-En leucemias linfoides de linfocitos B, se puede activar la apoptosis con el tratamiento con glucocorticoides. Esta apoptosis inducida se inhibe si las células previamente se han tratado con un activador de la PKC como el PMA (McConkey et al., 1991).

-En hepatocitos de rata se describió que la incubación de estas células en presencia de un inhibidor de PKC provocaba la fragmentación del ADN en oligonucleosomas, este efecto era parcialmente contrarrestado si estas células eran tratadas simultáneamente con PMA (Sánchez et al., 1992).

-Un efecto similar se encuentra en linfocitos maduros, cuando se someten a una incubación con estaurosporina (inhibidor de la PKC) se observa un aumento en la fragmentación del ADN (Lucas et al., 1993).

-En la línea celular RIN m5F, la incubación con estaurosporina induce la apoptosis. Este efecto además no se encuentra relacionado con las concentraciones de calcio, ya que no se observaron variaciones en este ion durante el período de incubación con la estaurosporina (Sánchez et al., 1993).

-En linfocitos, el tratamiento con ionóforo de calcio y activadores de la proteinkinasa C (PMA) inhiben la apoptosis provocada en estas células por glucocorticoides (Iseki et al., 1993).

-En células de la línea HL-60 de leucemia promielocítica, la incubación de las células con inhibidores de la PKC tiene como resultado un incremento en la fragmentación de ADN. Esto sugiere un posible efecto protector de la PKC frente al proceso de apoptosis. Además en estos fragmentos se observa un extremo 5' fosfato terminal, lo que lleva a pensar en la actuación de una endonucleasa dependiente de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  (Jarvis et al., 1994a).

-En células de glioma humano se ha observado que la inhibición selectiva de la PKC con calphostin C (que actúa a través de un dominio regulador de la PKC) estimula la apoptosis con la aparición de la fragmentación del ADN (Ikemoto et al., 1995).

Dentro de los estudios que apoyan la idea de una estimulación de la apoptosis por PKC se encuentran los siguientes:

-En linfocitos, la exposición al PMA sólo o unido a ionóforo de calcio induce apoptosis (Mercep et al., 1989).

-En timocitos de rata, la inhibición de PKC evita la apoptosis inducida por glucocorticoides (Ojeda et al., 1990).

-En células de línea mieloide aguda HL-60, la incubación de las células con PMA potencia el efecto inductor de apoptosis que ejerce la mitoxantrona (Bhalla et al., 1993).

-En timocitos de ratón la fragmentación del ADN, que se estimula con inhibidores de tirosinkinasa, se potencia con ésteres de forbol que activan la PKC (Azuma et al., 1993).

-Los ésteres de forbol inducen apoptosis en células de leucemia promielocítica (Macfarlane and O'Donell, 1993).

-En timocitos de ratón la apoptosis inducida por radiación, se evita con inhibidores de PKC y es potenciada por activadores de la PKC, como los ésteres de forbol (Shaposhnikova et al., 1994).

-En macrófagos, el tratamiento con activadores de PKC, tiene como consecuencia la muerte por apoptosis. En estas células, el tratamiento previo con un inhibidor de PKC previene de la muerte celular por apoptosis (Munn et al., 1995).

El mecanismo exacto de actuación de la PKC, ha tratado de aclararse estudiando la posible relación entre la activación de esta proteína y la expresión de determinados genes.

Las proteínas codificadas por la familia de genes Ras, actúan como transductores de señales que median respuestas mitogénicas. En algunas de las vías de activación, es necesaria la interacción entre la PKC y la proteína p21<sup>ras</sup>. En células T Jurkat de línea linfoblásticas y en fibroblastos de rata, se ha observado que la inhibición de PKC, conduce a las células a una muerte celular por apoptosis. Ésta puede ser bloqueada por la activación de bcl-2. La fosforilación de bcl-2 parece ser modulada por p21<sup>ras</sup> en respuesta a la activación de PKC, (Chen and Faller, 1995) y favorece la asociación entre bcl-2 y p21<sup>ras</sup>. Si se inhibe esta fosforilación, desaparece el efecto supresor de la apoptosis que se manifiesta cuando se activa bcl-2 (Chen and Faller, 1996).

En células de glioma humano la inhibición de la PKC con un agente selectivo como la calphostin C, durante un cierto período de tiempo, conlleva una disminución en la expresión del oncogen bcl-2, con la consiguiente disminución en los niveles de proteína bcl-2 (Ikemoto et al., 1995). En otros estudios se ha encontrado una relación directa entre PKC y bcl-2, ya que se observa que los factores de crecimiento hematopoyéticos actúan inhibiendo la apoptosis, por un mecanismo que supone la activación y fosforilación de bcl-2 (May et al., 1993).

#### **1.8.4.- IMPLICACIÓN DE LA PKC EN LA REGULACIÓN DE $[Ca^{2+}]_i$ .**

Varios estudios, han tratado de encontrar una relación entre la activación de la PKC y los niveles intracelulares de calcio. Los resultados obtenidos difieren según el tipo de célula estudiada y los diferentes estímulos utilizados para provocar el incremento en la concentración de iones calcio.

En linfoblastos T humanos el incremento de calcio provocado por la actuación sobre el receptor CD3, se bloquea en presencia de PMA; mientras que si el incremento de calcio es provocado por la taspigargina, el PMA no consigue bloquear su entrada masiva en la célula (Sarkadi et al., 1991).

En células de la línea de adenocarcinoma de mama (BT-20), el tratamiento con activadores de PKC, supone una disminución en las concentraciones de calcio con la consiguiente inhibición del proceso de apoptosis, el TNF- $\alpha$  (Bellomo et al., 1992).

Cuando se incuban los neutrófilos con estaurosporina (un inhibidor de la PKC) y posteriormente se añade f-MLP, no se observa un incremento en las concentraciones intracelulares de calcio, y este hecho lleva a pensar en una posible participación de la PKC en este mecanismo capacitativo de entrada de calcio (Montero et al., 1993).

Estudios realizados en la línea leucémica de células T HPB-ALL, revelan que la activación de la PKC, tiene un efecto inhibitor sobre la elevación en las concentraciones de calcio mediadas por la activación del receptor TCR, así como por la provocada por la acción de la taspigargina (Shivnan and Alexander, 1995).

#### **1.9.- NADPH OXIDASA.**

Los neutrófilos juegan un papel muy importante en la defensa del organismo contra infecciones externas. Uno de los mecanismos que utilizan estas células en su sistema de defensa es la llamada explosión respiratoria, que consiste en un incremento en el metabolismo oxidativo, con el consiguiente aumento de la producción de radicales libres. Este incremento brusco en el consumo de oxígeno en

neutrófilos durante el proceso de fagocitosis, lo pusieron de manifiesto por primera vez Baldrige y Gerard (1933). El hecho de que este proceso no se inhibía en presencia de cianuro, descartaba la implicación de la mitocondria (Sbarra and Karnovsky, 1959).

Un papel importante atribuido a los radicales de oxígeno es la oxidación de agentes reductores de los fagolisosomas y medio extracelular. La eliminación de estos agentes permite a los radicales de oxígeno ejercer su papel citotóxico sobre el agente invasor (Thomas et al., 1988).

En el estallido respiratorio, el anión superóxido es el primer radical libre que se forma; es producido por la NADPH oxidoreductasa comúnmente llamada NADPH oxidasa, que cataliza la transferencia de un único electrón del NADPH del citosol al oxígeno extracelular (Babior et al., 1973; Babior et al., 1981).



El suministro continuo de NADPH se garantiza con la vía de las pentosas fosfatos.

Como consecuencia del estallido respiratorio, no sólo se genera  $\text{O}_2^-$ , sino también una serie de derivados de éste, que se forman por reducción u oxidación espontánea o mediada por otras enzimas. Entre estos compuestos destacan:

-Peróxido de hidrógeno.



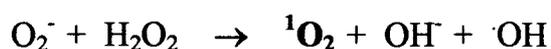
Esta reacción ocurre espontáneamente a pH ácido (en los fagosomas de las células fagocíticas), mientras que a pH neutro esta reacción de dismutación es más lenta; sin embargo, puede acelerarse enzimáticamente gracias a la superóxido dismutasa, (SOD).

-Radical hidroxilo:

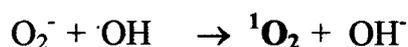


-Singlete de oxígeno. Este agente se produce por distintas reacciones:

Por dismutación del anión superóxido:



Por interacción con otros radicales hidroxilos:



Por interacción del hipoclorito con el peróxido de hidrógeno:



Bajo condiciones fisiológicas, el estallido respiratorio se origina por la unión de determinados agonistas quimiotácticos a sus receptores de membrana, entre ellos el factor del complemento C5a y péptidos originados a partir de proteínas bacterianas como el f-MLP (formil Met-Leu-Phe ). La magnitud y la duración del estallido respiratorio depende de la naturaleza del agonista, así como del estado inicial de activación de los neutrófilos (Morel et al., 1991).

#### 1.9.1.- COMPONENTES DE LA NADPH OXIDASA.

El sistema NADPH oxidasa que cataliza la producción de  $\text{O}_2^-$  permanece inactivo y disociado en células que no estén estimuladas. Consta de una serie de componentes citoplasmáticos (p47-phox, Rac-1, Rac-2), otros que forman parte del citoesqueleto celular, (p67-phox), y otras proteínas que forman parte constitutiva de la membrana (citocromo  $b_{558}$ ).

### Componentes de membrana:

*Citocromo b<sub>558</sub>* : tiene un potencial de reducción muy cercano al par  $O_2/O_2^-$  , por lo que resulta ser un buen agente para la reducción del oxígeno a superóxido. Se localiza en la membrana plasmática y en la membrana de gránulos específicos. En cuanto a su estructura, está formado por dos subunidades: una cadena  $\alpha$  o p21<sup>phox</sup> portadora del grupo hemo, y otra  $\beta$  o gp91<sup>phox</sup> altamente glucosilada. Esta se considera que es la portadora del grupo FAD deshidrogenasa (Segal et al., 1992), con unos pesos moleculares de 21 y de 76-92 kD respectivamente (Royer-Pokora et al., 1986).

*Proteína Rap* : se observó que el citocromo b<sub>558</sub> inmunoprecipita con una proteína de 22 kD. De acuerdo con estudios a partir de ADNc, esta proteína tiene una secuencia idéntica a la de las proteínas relacionadas con la proteína G, esta proteína se identificó como rap 1 (Quin, 1989). El complejo se forma con el citocromo b<sub>558</sub> en el período de activación de la NADPH oxidasa.

### Componentes del citosol:

*Proteínas p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup>* : estas proteínas se identificaron como necesarias en la activación de la NADPH oxidasa al demostrarse su deficiencia en la enfermedad granulomatosa crónica (CGD). Tienen unos pesos moleculares de 47-48 y 65-67 kD respectivamente. La proteína p47<sup>phox</sup> presenta unos sitios susceptibles de fosforilarse por acción de PKC; de hecho, en neutrófilos estimulados con PMA se ha descrito que la fosforilación tiene lugar exclusivamente entre los residuos 303-379, donde hay siete serinas que pueden potencialmente fosforilarse. Se ha encontrado una fosforilación defectuosa de p47<sup>phox</sup> en enfermos con CGD y en pacientes con déficit de citocromo b<sub>558</sub> , esto sugiere que para la translocación de p47<sup>phox</sup> sea necesaria la presencia del citocromo b<sub>558</sub> . La fosforilación de p47<sup>phox</sup> dependiente de PKC está directamente relacionada con la translocación de p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup> a la membrana plasmática (Nauseef et al., 1991). La fosforilación tiene lugar en el citosol de la célula; una vez fosforilada se une a la membrana en un sitio específico que parece estar localizado en el citocromo b<sub>558</sub> (Kleinberg et al., 1990). Esta proteína de 47 kD

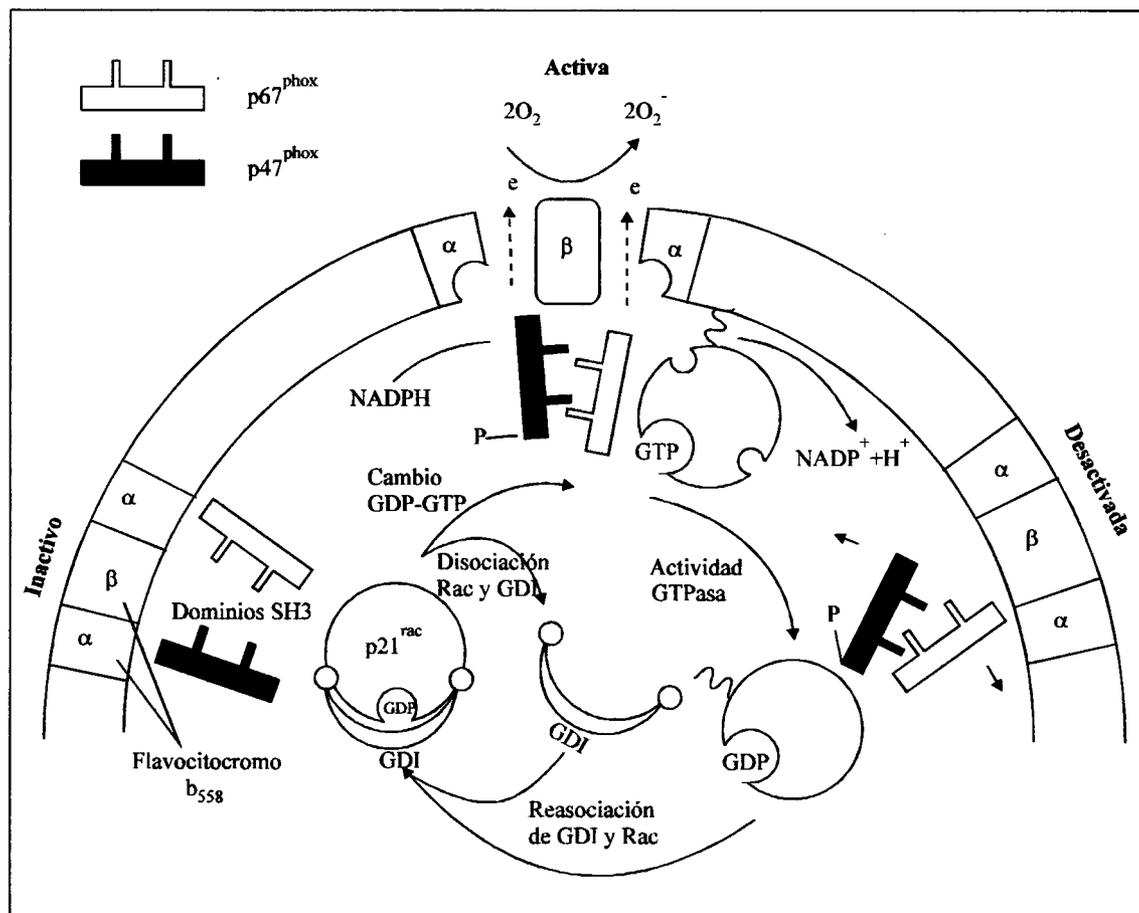
tiene una secuencia muy parecida a la de la proteína que estimula la actividad GTPasica (Lomax et al., 1989) la cual interactúa con proteínas ras.

*Proteína rac1 y rhoGDI* : para la activación de la NADPH oxidasa es necesaria la participación de unas proteínas citosólicas receptoras de GTP, de 21 kD (p21rac1) y 26 kD (GDI, factor inhibidor de la disociación de GDP (Didsbury et al., 1989; Fukumoto et al., 1990)). Rac1 pertenece a la superfamilia Ras de proteínas, con unos pesos moleculares entre 20-30 kD y con capacidad para unirse e hidrolizar GTP. La proteína p21 rac1 se aisló por primera vez del citosol de macrófagos de cobayas. Posteriormente se aisló del citosol de neutrófilos humanos denominándose p21 rac2, con una homología del 92% con p21rac1. Esta proteína está en condiciones normales unida a GTP, en el complejo que forma con GDI (Segal y Abo 1993). La activación de la oxidasa, está asociada a movimientos de p21rac junto con GDI desde el citosol a la membrana. La translocación de p21rac1 ocurre de manera independiente de la de p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup> ya que en ausencia de estas dos proteínas, se observa la translocación de p21rac1. Sin embargo, la unión a la membrana sí es dependiente de la presencia del flavocitocromo, ya que en ausencia de cit b<sub>558</sub> no se observa el ensamblaje de p21rac1 con la membrana (Heyworth et al., 1994).

En neutrófilos sin activar, la NADPH oxidasa se encuentra disociada en sus distintos componentes. Cuando se activa, los componentes se ensamblan a la membrana citoplasmática (Dewald et al., 1979).

Estudios realizados en neutrófilos han puesto de manifiesto la necesidad de la participación de varios grupos tioles en la activación del estallido respiratorio. Cuando se incuban las células en presencia de óxido de fenilarsina, se forma un anillo estable con estos grupos que impide la participación de estos en ninguna acción. En estas circunstancias se inhibe la producción de radicales libres, al estimular con f-MLP. En el caso de que las células estén previamente estimuladas con f-MLP, la NADPH oxidasa permanece activa. Tampoco se modifica en ningún caso la concentraciones de calcio. El bloqueamiento de los grupos tioles también bloquea la activación de la PKC, aunque si se transloca del citosol a la membrana. Otro efecto que tiene lugar cuando se impide la actuación de los grupos tioles, es la inactivación de la fosfotirosinfosfatasa. Estos resultados sugieren la participación de estos grupos

tiolos en la activación del estallido respiratorio, y la intervención de la PKC en este proceso (Kutsumi et al., 1995).



Esquema representativo de la composición y activación del sistema NADPH oxidasa.

### 1.9.2. FOSFOLIPASAS IMPLICADAS EN EL ESTALLIDO RESPIRATORIO.

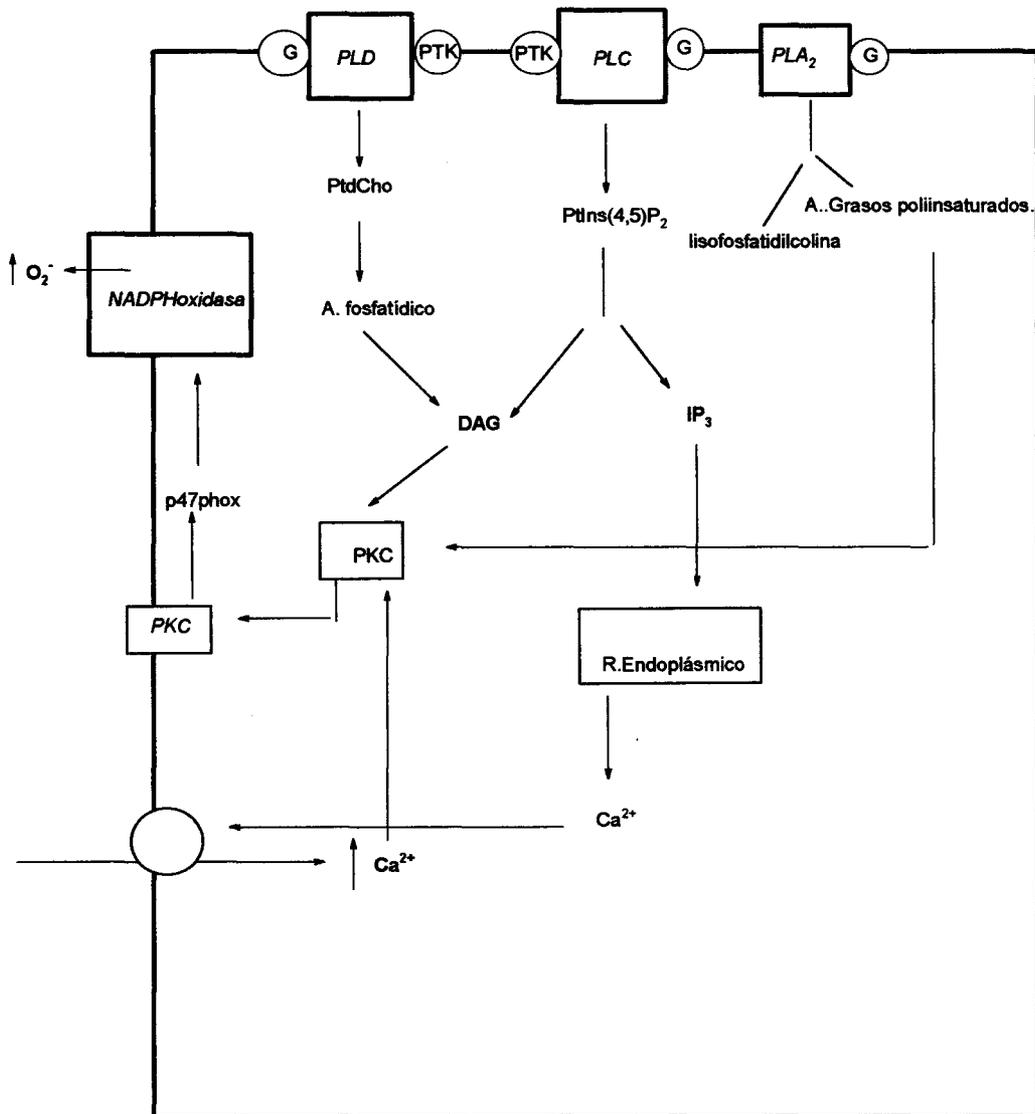
Los estudios realizados en células y en preparaciones de membranas, llevan a la conclusión de que los responsables del estallido respiratorio lo hacen a través de la estimulación de la fosfolipasa C, por una proteína G sensible a toxina pertúsica ( $G_N$ ). La hidrólisis del  $PtdInsP_2$  tiene como resultado la formación de diacilglicerol e  $InsP_3$ , ambos son segundos mensajeros, que estimulan la PKC de manera directa (DAG) y

de manera indirecta a través del aumento en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (el  $\text{InsP}_3$  se une a receptores específicos de los compartimentos intracelulares encargados del almacén del  $\text{Ca}^{2+}$  e induce la deplección del  $\text{Ca}^{2+}$ , y el consiguiente aumento de su concentración intracelular (Pozzan et al., 1983; Volpe et al., 1988)).

Además de la fosfolipasa C, en otros estudios se han descrito implicadas en este proceso la fosfolipasa D y la fosfolipasa  $A_2$ . El principal sustrato de la fosfolipasa D es la fosfatidilcolina. El resultado de la estimulación de fosfolipasa D es la producción de ácido fosfatídico, que posteriormente se descompone por una hidrolasa y uno de los productos resultantes es el DAG (Asaoka et al., 1992). La actividad de la fosfolipasa D sólo se manifiesta cuando se recombinan el citosol y la membrana de las células. Esto sugiere la idea de que a diferencia de lo que ocurre con la fosfolipasa C y  $A_2$ , esta enzima tenga varios componentes que se encuentran distribuidos entre el citosol y la membrana.

La participación en este proceso de la fosfolipasa A se observó como consecuencia de que el tratamiento de las células con inhibidores de esta enzima, tenía como resultado la no activación del estallido respiratorio incluso aunque la célula fuera tratada con PMA. El resultado de la activación de la fosfolipasa  $A_2$  es la formación de lisofosfatidilcolina y ácidos grasos insaturados. Estos últimos son activadores directos de la PKC.

En el caso de la fosfolipasa D y  $A_2$  aparece un fenómeno de retroalimentación positivo, ya que la PKC activada ejerce un efecto potenciador de la actividad de la fosfolipasa D y  $A_2$ , con lo cual la señal inicial provoca un efecto más duradero que la acción sobre la fosfolipasa C (Asaoka et al., 1992). En neutrófilos estimulados la activación de la fosfolipasa A tiene una regulación doble: por un lado depende de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , por otro de la proteína G (Cockcroft et al., 1991).



Esquema representativo de la actuación de las diferentes fosfolipasas sobre la NADPH oxidasa. PTK, protein tirosin kinasa; PLD, fosfolipasa D; PLA<sub>2</sub>, fosfolipasa A<sub>2</sub>, G, proteína G; PtdCho, fosfatidilcolina; PKC, proteinkinasa C; DAG, diacilglicerol; IP<sub>3</sub>, inositoltrifosfato.

### **1.9.3.- INTERVENCIÓN DEL $\text{Ca}^{2+}$ EN LA ACTIVACIÓN DE LA NADPH OXIDASA.**

El calcio es un elemento de gran importancia en la activación de la NADPH oxidasa, aunque su mecanismo de acción no es del todo conocido. En experimentos realizados en neutrófilos se ha conseguido impedir la estimulación de la NADPH oxidasa ejercida por el f-MLP, mediante la adición al medio de incubación de un bloqueante de la bomba de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . La inhibición de esta bomba tiene como resultado la inhibición del flujo de calcio que se considera que de alguna manera participa en la activación de la NADPH oxidasa. Por otro lado incrementos en  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  superiores a 250 nM, provocan una activación directa de la NADPH oxidasa (Simchowitz et al., 1990).

En los primeros estudios realizados sobre este tema, se encontró, que en células en las que se había depleccionado el  $\text{Ca}^{2+}$ , no se provocaba el estallido respiratorio cuando se incubaban en presencia de f-MLP (Lew et al., 1984), y que el estallido respiratorio va siempre precedido de un incremento en los niveles de calcio. Entre ambos sucesos hay un tiempo de retardo, necesario para que tenga lugar la producción de  $\text{InsP}_3$ . La presencia de calcio, es necesaria para la activación de la fosfolipasa C y la consiguiente formación de DAG e  $\text{IP}_3$ .

No obstante, hay otros estudios que apoyan la idea de un camino independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Pozzan et al., 1983), que en determinadas circunstancias se puede poner en marcha. La estimulación de neutrófilos con PMA, tiene como consecuencia un incremento en la actividad de la NADPH oxidasa, sin ir precedido de un incremento en los niveles de calcio (Grzeskowiak et al., 1986).

### **1.9.4.- INTERACCIONES ENTRE LA PKC Y LA NADPH OXIDASA.**

El hecho de que el PMA provocaba la estimulación de la NADPH oxidasa era conocido desde hacía tiempo (Robison et al., 1985).

La NADPH oxidasa puede ser activada a través de mecanismos diferentes, uno de los cuáles es dependiente de PKC. Esta afirmación, está basada fundamentalmente en dos hechos; uno es la relación existente entre la estimulación con PMA y la disminución en la tasa de fosforilación de determinadas proteínas, y el otro es el hecho

de que la PKC se transloca del citosol a la membrana, segundos antes de que se inicie el estallido respiratorio (Christiansen, 1988).

La respuesta de la NADPH oxidasa al PMA tiene un período de latencia de varios segundos (15-25), es duradera y lógicamente bloqueada por inhibidores de PKC; la respuesta al f-MLP tiene un período de latencia menor de 5-10 segundos, tiene una menor duración, es dependiente de calcio y no se afecta por los inhibidores de PKC (Segal and Abo, 1993).

p47-phox contiene dos dominios SH3 (dominios no catalítico de alta homología con los del producto del oncogen src) y varios residuos de serina, que pueden ser reconocidos por PKC. Cuando los neutrófilos son estimulados por PMA, se fosforilan algunos de estos residuos de serina, y la proteína se transloca a la membrana celular a un sitio dependiente de citocromo  $b_{558}$ , en la parte interna de la membrana celular (Segal and Abo, 1993).

Cuando a los neutrófilos, previamente estimulados, se les adiciona algún inhibidor de PKC se encuentra una rápida defosforilación de p47<sup>phox</sup> y una disminución en la producción de radicales  $O_2^-$ . Esto sugiere la participación de fosfatasa cuya acción se ve continuamente contrarrestada por la PKC. Cuando a estas células, en estas condiciones, se le adiciona un antagonista de fosfatasa tanto del tipo 1A como 2A la defosforilación no tiene lugar. Estos datos revelan que la proteína p47<sup>phox</sup> está sometida a un proceso de continua fosforilación y defosforilación en donde predomina el primero durante el tiempo en que la célula permanece activada. (Curnutte et al., 1994).

El tratamiento de estas células con ácido okadaico (inhibidor de fosfatasa), tiene como resultado la disminución en la producción de radicales libres, y se encuentra una hiperfosforilación que se pone de manifiesto con la aparición de la proteína p67<sup>phox</sup> fosforilada.

#### **1.9.5.- RELACIÓN ENTRE LA PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES Y LA ACTIVACIÓN DE LA APOPTOSIS.**

En timocitos se observó una relación entre los radicales libres y la muerte celular programada. Cuando se trataban las células sometidas a radicales libres, con sustancias antioxidantes se veía una desaparición del proceso de apoptosis (Wolfe et

al., 1994). Un estudio reciente revela que la apoptosis inducida en los neutrófilos con posterioridad a una infección por *E. coli*, se debe al incremento en radicales libres provocados por el propio neutrófilo como mecanismo de defensa contra las bacterias (Watson et al., 1996a).

En linfocitos, se han realizado estudios en los que se ha puesto de manifiesto, que los factores de transcripción c-jun y NF- $\kappa$ B son activados en presencia de radicales de oxígeno, así como que inhibidores de tirosinkinasa bloquean la activación de NF- $\kappa$ B por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esto sugiere que estos radicales de oxígeno utilizan la vía de la tirosinkinasa para activar NF- $\kappa$ B. Este factor está involucrado en la estimulación del proceso de apoptosis celular. Numerosos estudios se han realizado con el fin de relacionar la activación de la NADPH oxidasa y la activación de la tirosinkinasa, y la posible intervención de ésta en el proceso de apoptosis. Se han encontrado dos familias de tirosquinasas relacionadas con la transducción de respuestas por la unión del antígeno al receptor en los linfocitos: las familias de kinasas src y syc. Las syc kinasas se encuentran bajo el control de las src kinasas. Inhibidores de tirosinkinasa bloquean la producción de InsP<sub>3</sub> y el incremento en los niveles de Ca<sup>2+</sup> (Schieven et al., 1993). El tratamiento de los linfocitos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiene como resultado un incremento en la fosforilación de restos tirosina (Schieven and Ledbetter, 1994).

En general, los radicales libres se consideran como moléculas que actúan como mensajeros, son moléculas pequeñas, difunden rápidamente, y son altamente reactivas. Por otro lado, pueden ser rápidamente suprimidas por enzimas como la superóxido dismutasa, la catalasa, y el sistema glutatión peroxidasa. Esto permite tener un estrecho control sobre las cantidades de radicales de oxígeno presentes en cada momento. La deplección de estos sistemas protectores de las células también conducen a un incremento de la apoptosis en neutrófilos (Watson et al., 1996b).

En neutrófilos, el incremento en la actividad de la NADPH oxidasa también se encuentra asociado a un incremento en la tirosinfosforilación, concretamente se encuentra una activación en tres de las cinco tirosinkinasa presentes en los neutrófilos: p56/59<sup>hck</sup>, p72<sup>syk</sup>, y p77<sup>blk</sup>. Dado que los radicales de oxígeno disminuyen la actividad de las tirosinfosfatasa, el incremento en la tirosinfosforilación puede considerarse el efecto conjunto de un incremento en la fosforilación y una

disminución en la desfosforilación (Brumell et al., 1996). En otros estudios sin embargo, se pone de manifiesto que el incremento en la actividad tirosinkinasa por GM-CSF, conduce a una disminución de la apoptosis en neutrófilos. (Yousefi et al., 1994).

## **1.10.- OTROS FACTORES IMPLICADOS EN LA APOPTOSIS.**

### **1.10.1.- ATP.**

Esta molécula también se encuentra involucrada en algunos casos de muerte por apoptosis. El hecho de que el ATP sea un inductor de la apoptosis tiene mucho interés, debido a que es una molécula de amplia distribución y fuente de energía en todos los tipos celulares.

En timocitos se observó que el ATP extracelular es capaz de inducir en este tipo de células una muerte celular programada, clasificada como tal por las alteraciones fisiológicas y bioquímicas que ocurren en las células. Estos cambios, van precedidos por un incremento inmediato en los niveles de calcio, aunque en estas células un único incremento en los niveles de calcio no es suficiente para inducir la apoptosis. Cuando estas células se incuban en presencia de un inhibidor de la síntesis de proteínas como la cicloheximida se impide el desencadenamiento de la apoptosis por ATP (Zheng et al., 1991).

Los efectos que este compuesto ejerce en neutrófilos están mediados por un receptor tipo P<sub>2</sub> purino. Este receptor está asociado a la activación de la fosfolipasa C a través de una proteína G, sensible a toxina pertúsica (Gasmi et al., 1996).

### **1.10.2.- AMPc.**

El AMPc a través de la activación de la proteinkinasa A (PKA), parece ser otra molécula implicada en el proceso de apoptosis. En timocitos incrementos en la concentración de AMPc, pueden ser suficientes para la activación de endonucleasas

encargadas de la degradación del ADN. La capacidad del AMPc para mediar efectos de este tipo se pone de manifiesto en ausencia de señales más poderosas que medien los efectos contrarios, como sería el caso de la activación de la PKC. Estos datos, apoyan la idea de que el desencadenamiento de la muerte celular depende del balance existente entre los diferentes factores que intervienen en la activación/desactivación de PKA y PKC (McConkey et al., 1990).

En el caso de los neutrófilos, la apoptosis espontánea puede ser inhibida por acción del AMPc, análogos de éste o por un activador de la adenilatociclasa como la forskolina (Rossi et al., 1995). El efecto del AMPc sería debido a una disminución en la producción de IP<sub>3</sub> con la consiguiente disminución de los flujos de calcio inducidos por la interacción del IP<sub>3</sub> con su receptor en el retículo endoplásmico (Lerner et al., 1988).

### 1.10.3.- GLUCOCORTICOIDES.

*In vivo* se observa que el tratamiento con glucocorticoides modifica la actividad de los neutrófilos. Se encuentra una disminución en muchas de sus funciones características, tales como fagocitosis, quimiotaxis, desgranulación, generación de radicales libres, etc. Paralelamente a esto se observa una neutrofilia. Este incremento en el número de neutrófilos se debe a un retraso en la muerte de estas células, más que a un incremento en la tasa de síntesis de neutrófilos por parte de la médula ósea. Los glucocorticoides con efecto antiinflamatorio, retardan la apoptosis (más que inhibirla) (Meagher et al., 1996). El mecanismo de acción no está claro pero parecen implicados: a) mecanismos de modulación de [Ca<sup>2+</sup>], b) mecanismos de regulación de determinados genes, como el p53; que encontraría disminuida su expresión como consecuencia de la acción de los glucocorticoides, o el antígeno Fas, que ejercería su función controlando los niveles de la ceramida. De hecho se ha encontrado que la dexametaxona incrementa el contenido en esfingomielina de los neutrófilos *in vitro* (Liles et al., 1995).

Sin embargo en otros estudios se ha puesto de manifiesto que la incubación con los glucocorticoides promueve la apoptosis. El tratamiento de linfocitos con glucocorticoides, detiene el ciclo celular e induce la apoptosis como consecuencia de

la activación de una endonucleasa dependiente de calcio. Este efecto se suprime si al medio de incubación se le adiciona un antagonista de glucocorticoides (Caron-Leslie and Cidlowski, 1991).

En otros estudios realizados en un clon de linfocitos T dependientes de IL-2, que se incubaron en presencia de dexametaxona, se observó una inducción de apoptosis, debida a una activación de las endonucleasas que degradan la cromatina en fragmentos de nucleosomas. Ambos sucesos se inhiben en presencia de IL-2 (Nieto and López-Rivas, 1989). Igualmente en células de leucemia linfocítica crónica de células B, se ha descrito que el tratamiento con glucocorticoides induce la fragmentación del ADN característica del proceso de apoptosis (McConkey et al., 1991). En estos casos un posible mecanismo de acción de los glucocorticoides podría atribuirse a la producción de radicales libres en las células (Fernández et al., 1995).

#### **1.10.4.- SEGUNDOS MENSAJEROS DE CARÁCTER LIPIDICO.**

Son varios los segundos mensajeros relacionados con el desarrollo de la muerte celular programada. Entre ellos se encuentran tanto glicerolípidos como esfingolípidos. Entre los primeros y de los mejor estudiados se encuentra el DAG, que actúa como activador fisiológico de la PKC, con la consiguiente activación de la NADPH oxidasa, y producción de radicales libres. El DAG resulta de la hidrólisis del  $PtIns(4,5)P_2$  por acción de la fosfolipasa C. La activación de ésta se consigue bien a través de una proteína G, o bien por la acción de alguna tirosinkinasa.

Dentro de los esfingolípidos, la ceramida es el más estudiado como segundo mensajero en el proceso de inducción de la apoptosis. Las primeras observaciones, se realizaron como consecuencia de que al tratar las células con  $TNF-\alpha$  se producía una activación de la esfingomielinasa (fosfolipasa C específica de esfingomielina) con la consiguiente producción de ceramida. Posteriormente se observó que al incubar las células en presencia de ceramida se obtenían los mismos resultados que si se trataban con el  $TNF-\alpha$ . El efecto era el mismo que si se trataban las células con esfingomielinasa (Obeid et al., 1993; Jarvis et al., 1994b). El mecanismo de acción de la ceramida parece ser la activación de una serin-treonin fosfatasa de la familia PP2A, aunque se ha implicado también en la regulación de la expresión de determinados

genes. Así al tratar las células con ceramida se aprecia una inducción de c-myc y una detención del ciclo celular (Testi, 1996). Esta acción inductora de la apoptosis se puede inhibir añadiendo al medio un activador de PKC. El mecanismo que relaciona ambos estímulos no está aún bien descrito (Hannun and Obeid, 1995). También se ha propuesto como mecanismo de acción de la ceramida la inhibición de la PKC, lo que justificaría que la activación de la PKC impidiera la apoptosis (Ohta et al., 1994; Lucas and Sanchez-Margalet, 1995).

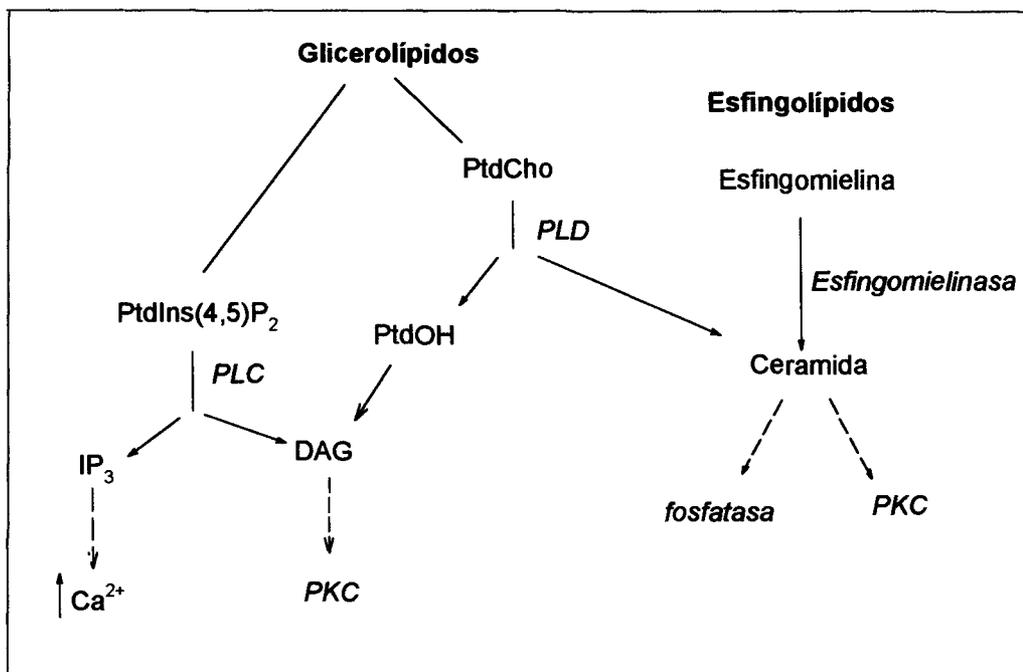
Otras dianas de la acción de la ceramida además de la fosfatasa, pueden ser una proteinkinasa C activada por ceramida (CAPK), y la isoforma PKC  $\zeta$  que parece directamente relacionada con la activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B. (Liu et al., 1994; Yao et al., 1995).

En estudios realizados preincubando los neutrófilos con n-acetilesfingosina ( $C_2$  ceramida), una ceramida a la que la membrana plasmática es permeable, al adicionar PMA no se produce el estallido respiratorio ni variación en el grado de fosforilación de las proteínas. La  $C_2$  ceramida por si sola no altera los niveles de calcio, pero inhibe los flujos de calcio en células estimuladas con f-MLP. El mecanismo por el que la ceramida inhibe la producción de radicales libres no está perfectamente descrito, pero el hecho de que evite el flujo de calcio provocado por el f-MLP, hace suponer que no es a nivel de deplección de  $InsP_3$  sino que sea más bien a través de PKC, como ejerce su acción bloqueante de los flujos de calcio e inhibidora de la producción de radicales libres. Por otro lado la ceramida activa una serin-treonin fosfatasa independiente de cationes que pertenece a la familia de fosfatasas del tipo 2A y que está implicada en la defosforilación de proteínas substratos de PKC. Estos datos sugieren que la fosfatasa tipo 2A puede prevenir la entrada de calcio, actuando sobre algún factor responsable del flujo de calcio. Otro sitio de acción posible para la fosfatasa tipo 2A puede ser la proteína  $p47^{phox}$ ; una defosforilación de esta proteína dificultaría el ensamblaje de la NADPH oxidasa con la consiguiente inhibición en la producción de radicales libres (Wong et al., 1995)

La fosfolipasa D cataliza la hidrólisis de fosfatidilcolina para generar ácido fosfatídico más colina; el ácido fosfatídico puede actuar directamente o ser metabolizado a DAG por una fosfohidrolasa. La activación de la fosfolipasa D

mediada por ésteres de forbol es dependiente de ATP y su actividad es inhibida por estaurosporina.

En neutrófilos la activación de la fosfolipasa D, puede observarse tras un tratamiento de las células con ésteres de forbol. La activación se realiza a través de la fosforilación de alguna proteína de membrana; es necesaria la presencia de componentes de membrana y del citosol, y también la presencia de concentraciones micromolares de calcio. Uno de los componentes de membrana es una proteína G de pequeño peso molecular que pertenece a la familia de las proteínas Rho; otra de las proteínas G es ARF (que sinergiza con una proteína de 50 kD que se sabe activa fosfolipasa D). Las isoenzimas involucradas en la activación de la fosfolipasa D son las formas convencionales, aunque no todas actúan con igual especificidad ( $\beta > \alpha > \gamma$ ) (López et al., 1995)..



*Esquema representativo las diferentes señales que se pueden activar partiendo de los distintos lípidos. (PtdCho, fosfatidilcolina. PtdOH, ácido fosfatídico. PLC, fosfolipasa C. PLD, fosfolipasa D. PKC, proteinkinasa C. PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, fosfatidilinositol 4,5 difosfato. IP<sub>3</sub>, inositoltrifosfato. DAG, diacilglicerol).*

## **2.- OBJETIVOS**

A la vista de la diversidad de factores y de las contradicciones encontradas en la bibliografía sobre la intervención de distintos factores en el desencadenamiento de la apoptosis, se planteó el estudio de la apoptosis en neutrófilos, centrado en tres aspectos, el papel del calcio, la participación de la PKC y la intervención de metabolitos reactivos del oxígeno, ya que el neutrófilo es una células potencialmente apoptótica, con un potencial oxidativo grande y que se activa por mecanismos en los que están implicados el  $\text{Ca}^{2+}$  y la PKC.

- En relación al calcio, se planteó estudiar las variaciones en las concentraciones intracelulares de calcio en neutrófilos sometidos a diferentes estímulos, apoptóticos y no apoptóticos, con el fin de comprobar si en este tipo de célula las variaciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  estaban relacionadas con el proceso de apoptosis. Particularmente estudiando el efecto de taspigargina, potente activador de apoptosis y regulador de los flujos celulares de calcio.

- Respecto a la proteinkinasa C, se trató de estudiar el comportamiento de estas células en presencia de activadores e inhibidores de esta proteína, y observar si existía alguna relación entre la activación o inhibición de la PKC y el desencadenamiento de la apoptosis en los neutrófilos. Una vez que se estudió la participación de la PKC en el desencadenamiento de la apoptosis y su actuación en la regulación de los flujos de calcio, se planteó ver la posible regulación de estos hechos por la fosforilación de alguna proteína de membrana.

- Respecto a los metabolitos reactivos del oxígeno, parece aceptado mayoritariamente que son responsables de la activación del proceso de apoptosis. En estas células, el estudio de este supuesto era especialmente importante por ser precisamente los neutrófilos los responsables de la producción de los radicales libres,

y verse sometidos de manera continua a altas concentraciones de los mismos. El planteamiento era estudiar si la activación en la producción de MRO suponía un incremento en la apoptosis en estas células, que por otro lado se sabía que sufren apoptosis espontánea. Suponiendo además que la inducción de la apoptosis del neutrófilos por MRO podría ser de alguna manera un mecanismo de defensa tisular, ya que evitaría las lesiones que los radicales libres pueden producir en los tejidos adyacentes a la zona donde tiene lugar la reacción de inflamación.

### **3.- MATERIAL Y MÉTODO.**

### **3.1.- AISLAMIENTO DE POLIMORFONUCLEARES.**

#### **3.1.1.- REACTIVOS.**

- Dextrano T 500 al 6% en NaCl al 0.9%.
- Solución Ficoll-Hypaque para el aislamiento de linfocitos.
- NaCl al 0.9%.
- Solución hipotónica.

#### **3.1.2.- MÉTODO.**

El aislamiento de neutrófilos de sangre periférica se realiza básicamente en tres etapas: sedimentación en dextrano, con el fin de sedimentar los hematíes, centrifugación en gradiente de Ficoll, para separar los neutrófilos de las plaquetas y células mononucleares, (Boyum, 1968) y choque hipotónico, para lisar los hematíes remanentes.

- Partir de 10 ml de sangre periférica por punción venosa y extracción por el sistema vacutainer en tubos de EDTA.K<sub>3</sub>.
- Mezclar la sangre con 2.5 ml de dextrano al 6% en solución salina. Dejar reposar durante una hora a temperatura ambiente.
- Recoger el sobrenadante con una pipeta Pasteur y añadir sobre 2.5 ml de Ficoll-Hypaque.
- Centrifugar 20 minutos a 2500 r.p.m.
- Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet en 2 ml de solución salina.
- Dar un choque hipotónico a fin de eliminar los eritrocitos remanentes.
- Centrifugar durante 5 minutos a 1000 r.p.m.
- Eliminar el sobrenadante.
- Someter las células a dos lavados en 10 ml de NaCl 0.9% tras cada uno de ellos centrifugar durante 5 minutos a 1000 r.p.m.

-Resuspender el pellet finalmente en el buffer en que se vayan a llevar a cabo los experimentos.

En cada experimento los neutrófilos utilizados son de un mismo donante. En casos de experimentos en los que se necesitó gran cantidad de sangre se mezclaron los neutrófilos una vez aislados, con la intención siempre de evitar en la medida de lo posible las variaciones debidas al diferente estado de activación en los neutrófilos de los diferentes donantes.

### **3.2.- ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR.**

#### **3.2.1.- REACTIVOS.**

-Azul Tripán al 1% en NaCl al 0.9%.

-PBS suplementado con  $\text{CaCl}_2$  1.2 mM y  $\text{MgCl}_2$  1.2 mM (PBSS).

-Buffer Krebs-Hepes suplementado con  $\text{CaCl}_2$  1.2 mM y glucosa 10 mM.

#### **3.2.2.- MÉTODO**

Inmediatamente después de la obtención de las preparaciones celulares, se procede al estudio de la viabilidad celular tanto en PBSS como en el buffer Krebs-Hepes suplementado. Para ello se utilizó el método de exclusión de azul tripán, basado en que las células no viables son permeables al colorante y aparecen por tanto teñidas cuando se observan al microscopio. Las células se incuban con el colorante durante 5 minutos y posteriormente se observan al microscopio.

La viabilidad media obtenida en las preparaciones utilizadas fue del (97-99) %.

Se estudió la viabilidad en los neutrófilos sometidos a diferentes tiempos de incubación con DMSO que era el disolvente utilizado para los estímulos que se iban a utilizar, (tanto el PMA como la taspigargina iban disueltos en DMSO). No se observó ninguna diferencia con respecto a la viabilidad obtenida en células control.

### 3.3.- ESTUDIO DE LA FRAGMENTACIÓN DE ADN.

#### 3.3.1 TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS.

##### 3.3.1.1. Reactivos.

-Buffer Krebs-Hepes (pH 7.4).

NaCl.....	120 mM.
Hepes.....	25 mM.
KCl.....	4.8 mM.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1.2 mM.
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	1.2 mM.

Este buffer se suplementa con CaCl<sub>2</sub> 1.2 mM y glucosa 10 mM para la realización de los experimentos (Buffer HS: buffer hepes suplementado).

-Tapsigargina 500 μM, (en DMSO).

-PMA 50 μM, en (DMSO).

-Estaurosporina 100 μM.

##### 3.3.1.2. Método.

Los neutrófilos una vez aislados se resuspenden en el Buffer HS, a una concentración de  $1 \times 10^6$  células /ml. Se incuban las células (1 ml), a 37 °C durante tiempo variable con el estímulo específico del experimento. Pasado este tiempo se toma una alícuota para estudiar la viabilidad celular. Posteriormente se centrifugan 5 minutos a 4000 r.p.m. y se procede a la extracción del ADN.

Antes de la realización de este tipo de experimentos se comprobó que el DMSO, que se utiliza como disolvente de los efectores, no ejerciera ningún efecto adicional en las células. Para ello se sometieron los neutrófilos a un periodo de incubación de 8, 18 y 24 horas con 1 μl de DMSO, y se comprobó que no había

ninguna variación en el patrón de fragmentación del ADN entre las células controles y las incubadas con DMSO.

El estudio de la fragmentación del ADN se realizó también con otros tipos celulares como macrófagos peritoneales de rata y células de la línea celular RINm5F. El medio de incubación de las células en ambos casos fue RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10%, glutamina 2 mM, penicilina 100 U / ml, estreptomycin 0.1 mg / ml. Las concentraciones de las células y la temperatura de incubación fueron las mismas que para los neutrófilos. Una vez incubadas con los estímulos el tratamiento que se siguió con estas células fue el mismo que para los neutrófilos.

### 3.3.2.- EXTRACCIÓN DE ADN.

#### 3.3.2.1. Reactivos.

-Proteinasa K: 20 mg / ml.

-Ribonucleasa A: 10 mg / ml.

- Buffer de lisis

NaCl.....0.5 M

EDTA.....2 mM

Tris.ClH.....10 mM pH 7.4

-SDS al 10%

-Fenol-cloroformo-isoamilalcohol (25:24:1)

-Cloroformo-isoamilalcohol (24:1)

-Buffer T.E.

Tris.....10 mM pH 7.6

EDTA.....1 mM

-Etanol absoluto.

### 3.3.2.2. Método.

- Centrifugar las suspensión celular ( $1 \times 10^6$ ) a 2500 r.p.m. durante 10 minutos.
- Resuspender el pellet de los neutrófilos en 100  $\mu$ l de buffer de lisis. Añadir SDS (concentración final: 0.5%).
- Añadir proteinasa K (concentración final 0.5 mg / ml). Incubar 1 hora agitando a 50°C, o toda la noche a 37°C.
- Someter a un choque térmico 10 minutos a 90°C para desnaturalizar la proteinasa K.
- Dejar enfriar y añadir ribonucleasa A (concentración final: 0.5 mg / ml). Incubar a 50°C 1 hora.
- Mezclar con igual volumen de fenol-cloroformo-isoamilalcohol. Agitar en vortex hasta homogenado.
- Centrifugar 10 minutos a 5000 r.p.m.
- Transferir la fracción acuosa a otro tubos Eppendorf y añadir igual volumen de cloroformo-isoamilalcohol . Agitar en vortex hasta homogenado.
- Centrifugar a 5000 r.p.m. durante 10 minutos.
- Transferir la fracción acuosa a otro tubos Eppendorf y añadir 3 volúmenes de etanol absoluto. Mantener durante toda la noche a -20°C.
- Centrifugar durante 15 minutos a 4°C a 14000 r.p.m.
- Resuspender el pellet en 100  $\mu$ l de buffer T.E.

### 3.3.3. CUANTIFICACIÓN DEL ADN.

La cantidad y 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 1.6 en un ADN hidratado bien purificado. Una solución patrón de ADN de concentración conocida 50  $\mu$ g / 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 distintas preparaciones de ADN oscilaron entre 1.6 - 1.8.

Las concentraciones obtenidas de ADN en los distintos experimentos oscila entre 45-55  $\mu\text{g} / 10^6$  células, sin que se aprecien diferencias significativas en función de los diferentes estímulos a los que se somete las células.

### 3.3.4.- MARCAJE DE ADN CON $^{32}\text{P}$ .

La reacción de marcaje se realizó con la polimerasa Klenow.

El buffer de la reacción es el siguiente:

Tris.ClH.....10 mM pH 7.5

MgCl<sub>2</sub> .....5 mM

polimerasa Klenow.....2.5 U /  $\mu\text{l}$

$^{32}\text{PdCTP}$  .....0.5  $\mu\text{Ci} / \mu\text{l}$ .

En 20  $\mu\text{l}$  del buffer se incuban 10  $\mu\text{l}$  del ADN durante 10 minutos a T<sup>a</sup> ambiente, y pasado este tiempo se para la reacción con EDTA, (concentración final 10 mM).

### 3.3.5- ELECTROFORESIS Y VISUALIZACIÓN DEL ADN.

#### 3.3.5.1. Reactivos

-Buffer de electroforesis.

Tris-borato .....0.09 M

EDTA.....0.002 M

-Buffer de carga de la muestra:

Glicerol.....30%

Azul de bromofenol...0.25%

Azul de xilencianol.....0.25%

-Agarosa .

### **3.3.5.2. Método.**

La muestra de ADN se carga en el pocillo con el buffer de carga (6:1), la electroforesis se realiza en un gel de agarosa al 1.8%, durante 1.5 hora a 80 voltios. Si la muestra se ha marcado radiactivamente, se seca el gel y se revela por autorradiografía con una placa de rayos X, después de estar en contacto el gel con la placa durante toda la noche a -80°C. Si no se ha marcado, se tiñe el gel con bromuro de etidio, (10µl / 100 ml ) de una preparación 10 mg / ml, y se mira por transiluminación con luz ultravioleta.

## **3.4.- ESTUDIO DE LA APOPTOSIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.**

### **3.4.1. REACTIVOS.**

- Glutaraldehído al 2% tamponado con fosfato de Milloning 0.2 (pH 7.3).
- Solución fijadora de tetróxido de osmio al 1% en el mismo tampón fosfato.
- Acetona de diferente gradación.
- Solución acuosa de acetato de uranilo.
- Citrato de plomo.

### **3.4.2. MÉTODO.**

A partir de sangre periférica se aislan neutrófilos por el método ya descrito. Una vez sometidos a los diferentes períodos de incubación con los estímulos, se procede a centrifugar las preparaciones, el pellet de células se coloca en glutaraldehído al 2% tamponado, durante una hora a 4°C. A continuación se coloca en solución de tetróxido de osmio, durante media hora a 4°C. Posteriormente se procede a deshidratar las células con acetona de gradación creciente y la inclusión en resina se realiza de acuerdo con la técnica de SPURR.

Tantos los cortes semifinos como los ultrafinos se realizan con ultramicrotomos Reichert modelo "Omu 2". Para contrastar los cortes ultrafinos se utiliza una solución acuosa de acetato de uranilo durante 15 minutos y citrato de plomo durante 3 minutos.

La observación se hace en un microscopio Zeiss 900.

### 3.5.- QUIMIOLUMINISCENCIA.

#### 3.5.1. FUNDAMENTO.

La quimioluminiscencia tiene su fundamento en el hecho de que como resultado de una reacción química se liberan fotones. Este término fue utilizado por primera vez por Wieddemann en 1888, para diferenciar el fenómeno de emisión de luz "fría" del de incandescencia donde la emisión de luz procedía de la energía liberada por las moléculas sometidas a calor.

Respecto a otras formas de energía, la quimioluminiscencia tiene importantes particularidades:

-Cada molécula que reacciona alcanza un estado energéticamente excitado que es el responsable de la emisión de la luz y el producto resultante tiene una estructura diferente del producto inicial (Campbell, 1986)

-Se pueden poner de manifiesto reacciones donde tenga lugar un proceso de este tipo, siendo mínima la energía liberada si se utilizan los aparatos adecuados para su detección. La utilidad de un tubo fotomultiplicador acoplado al luminómetro se pone de manifiesto cuando el número de fotones es insuficiente para ser detectado por el ojo humano. El ojo humano puede percibir una imagen si se emiten fotones en una cantidad de  $3 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ . Un buen luminómetro puede llegar a detectar del orden de  $10^{-21} \text{ mol. s}^{-1}$  excitados como consecuencia de una reacción química.

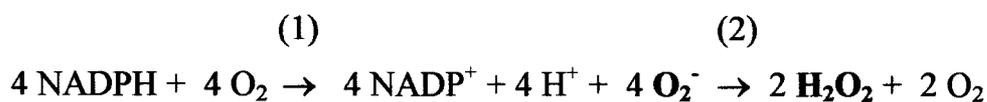
-Es una medición que se realiza acoplada a una reacción biológica y permite un registro continuo de dicha reacción.

La base de la quimioluminiscencia está en la producción de determinados metabolitos del oxígeno por parte de las células,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ , oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), que se originan como consecuencia de la activación de la NADPH oxidasa. Las reacciones que dan lugar a la producción de estos compuestos son numerosas y muy interrelacionadas entre sí, lo que dificulta el conocimiento exacto de la participación de cada uno de estos compuestos en la quimioluminiscencia. No obstante lo que si está bien establecido es que la producción de la quimioluminiscencia es directamente proporcional a la activación celular y el estallido respiratorio en estas células, y por tanto es un método válido para el estudio de la activación de los neutrófilos. (Allen et al., 1972).

Este estallido respiratorio se ha observado en polimorfonucleares, macrófagos y monocitos, entre otras células. Se descartó la idea de que su origen fuera la respiración mitocondrial ya que no se inhibe por  $\text{CN}^-$ .

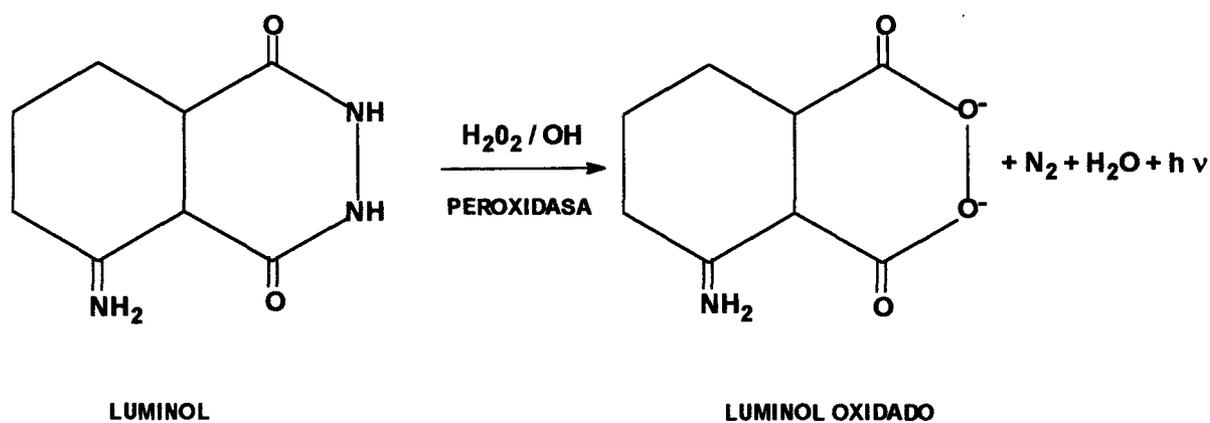
La producción de radicales de oxígeno detectada por quimioluminiscencia, se estimula por gran variedad de agonistas fisiológicos, principalmente del sistema inmune como C3a, C3b, C5a, y también por otros estímulos experimentales, como A23187 (ionóforo de calcio), PMA y fMLP

En las células fagocíticas alguna de las reacciones que tienen como resultado la producción de estos compuestos son las siguientes:



- (1) NADPH oxidasa
- (2) Superoxidodismutasa
- (3) Mieloperoxidasa

La sensibilidad de estos ensayos se incrementa si se utilizan ciertos compuestos químicos como hidracidas cíclicas (luminol: 5-amino-2,3,dihidro-1,4,ftalazina-diona) y sales de acridina (ésteres de N-metil acridina) que actúan como sustratos para los agentes oxidantes y aumentan la emisión de luz entre ( $10^3$ - $10^4$ ) veces. Estos compuestos químicos reaccionan a pH alcalino por lo que se puede estudiar este fenómeno en condiciones fisiológicas. Para que tengan lugar estas reacciones se requieren algunos compuestos que actúan como catalizadores: peroxidasas, mieloperoxidasas...



En el proceso de activación del “estallido respiratorio” en neutrófilos, además de la activación de la NADPH oxidasa se produce la exocitosis de gránulos conteniendo mieloperoxidasa y por tanto conviene asegurarse que la mieloperoxidasa endógena no interfiere la reacción de oxidación de luminol. Esto se evita añadiendo azida sódica  $100 \mu\text{M}$ , para inhibir la acción de mieloperoxidasa endógena y peroxidasa de rábano que es insensible a dicha concentración de azida y como enzima auxiliar proporciona el componente catalítico de la reacción de oxidación del luminol.

### 3.5.2. REACTIVOS.

- PBS suplementado con Hepes 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.2 mM y glucosa 10 mM (PBSS).
- Peroxidasa 1000 UI / ml.
- NaN<sub>3</sub> 100 mM.
- Luminol 11 mM (en DMSO).
- PMA 50 μM.
- Tapsigargina 500 μM.
- Estaurosporina 100 μM.
- Ionóforo de calcio A23187 2 mM.

### 3.5.3 MÉTODO.

La medida se realiza en un luminómetro Berthol LB 9500 con cámara oscura termostaticada a 37° C acoplada a un fotomultiplicador convenientemente modificado para permitir la inyección de los diferentes estímulos por medio de una microjeringa Hamilton a través de un orificio.

Para la realización de los estudios, los neutrófilos recién aislados se resuspenden en PBSS y las determinaciones se hacen en un tiempo máximo de una hora ya que transcurrido este tiempo varía el grado de activación.

- Añadir 100 μl de la suspensión celular ( $5 \times 10^4$  células) a 900 μl del buffer de reacción que contiene : buffer PBSS , luminol 10 μM, peroxidasa 2 UI /ml y NaN<sub>3</sub> 100 μM.
- Incubar la mezcla de reacción con los neutrófilos a 37° C en el luminómetro durante dos minutos para conseguir una atemperación de las células.
- Inyectar el estímulo por medio de una microjeringa.

La máxima intensidad de luz con esta concentración de luminol 11 μM puede llegar a ser de  $10^5$  c.p.s. por  $10^6$  células. En condiciones óptimas (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + microperoxidasa, pH 11) el luminol produce  $5 \cdot 10^{18}$  cuentas.mol<sup>-1</sup>. Asumiendo que a

pH 7.4 se produce igual cantidad de cuentas, el consumo de luminol es sólo de 0.5 fmol  $s^{-1}/10^6$  células mientras que la producción de oxígeno es aproximadamente 30 pmol de  $O_2 s^{-1}/10^6$  células. De donde se deduce que no existe el problema en este método analítico del consumo del sustrato.

El luminómetro permite la determinación del número de cuentas que se emiten por dos segundos que puede representarse a través de un registrador gráfico acoplado al luminómetro y obtener las curvas de reacción con el registro continuo, así como, la variación en la velocidad de emisión a lo largo del tiempo.

### **3.6.- MEDIDA DE CALCIO INTRACELULAR.**

#### **3.6.1. REACTIVOS.**

- Fluo-3/AM 2 mM (en DMSO).
- Buffer Krebs-Hepes con calcio 1.2 mM (pH 7.4), glucosa 10 mM, (buffer HS).
- Ionóforo: A23187 2 mM (en DMSO).
- Digitonina 5 mM
- EGTA 2 mM en NaOH 0.2M.
- PMA 50  $\mu$ M.
- Tapsigargina 500  $\mu$ M.

#### **3.6.2. MÉTODO.**

- Resuspender los neutrófilos en el buffer HS ( $5 \cdot 10^6$  células / ml)
- Cargar los neutrófilos con Fluo-3/AM. Para ello:
  - Sobre la suspensión celular añadir Fluo-3 (concentración final 4  $\mu$ M)
  - Incubar durante 30 minutos a 37° en oscuridad y agitación.
  - Tomar una alícuota ( $1 \cdot 10^6$  células / ml).
  - Centrifugar durante 5 minutos a 1000 r.p.m.

- Resuspender el pellet en 1 ml del buffer y efectuar dos lavados consecutivos, seguidos de centrifugación durante 5 minutos a 1000 r.p.m.
- Resuspender el pellet en 1 ml del buffer.

Los neutrófilos así cargados se transfieren a una cubeta de cuarzo, termostatizada a 37°C y con agitación magnética constante. La emisión de fluorescencia fue recogida utilizando un espectrofotómetro Hitachi F-2000. La excitación y emisión de fluorescencia fue de 506 y 526 nm respectivamente. La autofluorescencia recogida fue alrededor del 10% de la señal total. La salida del Fluo-3 del interior celular hacia el medio es menor del 10% durante un periodo de 60 minutos. El proceso de calibración incluye las medidas de tanto la  $F_{\max}$  como la  $F_{\min}$ , valores que se consiguen por la adición al medio de digitonina y posteriormente de EGTA respectivamente (Grynkiewicz et al., 1985; Kao et al., 1989).

El calcio libre intracelular  $[Ca^{2+}]_i$  se calcula mediante la ecuación:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d (F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)$$

Siendo:

$K_d$ : la constante de disociación para el  $Ca^{2+}$  unido al Fluo-3.

$K_d = 400$  nM

F: el valor obtenido de fluorescencia experimental.

$F_{\max}$ : fluorescencia máxima.

$F_{\min}$ : fluorescencia mínima.

Para comprobar la integridad de la membrana celular y tener la certeza de que los resultados obtenidos no son el resultado de alteraciones en estructura de la membrana sino que se debe al efecto provocado por los distintos estímulos, una vez

finalizado cada experimento se añadió a la célula un ionóforo de calcio, seguido de la adición de digitonina y EGTA. Al añadir el ionóforo se observa un incremento significativo de los niveles de calcio, de manera rápida. Al añadir la digitonina se produce una desestructuración de la membrana nuclear con lo que tienden a igualarse las concentraciones de calcio en el interior y en el exterior celular, y cuando se inyecta el EGTA se observa una disminución rápida en las fluorescencias debido a la acción quelante de calcio.

### **3.7.- ESTUDIO DE FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA.**

#### **3.7.1. TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS.**

Las neutrófilos,  $1 \times 10^6$  células / ml se resuspenden en buffer HS. Se añaden los estímulos a estudiar y se incuban durante un determinado tiempo, pasado el cual se procede a la centrifugación de las muestras y a la obtención de la fracción cruda de membranas plasmáticas.

#### **3.7.2. OBTENCIÓN DE LAS MEMBRANAS CELULARES.**

##### **3.7.2.1. Reactivos.**

-Buffer Hepes 5 mM-EDTA 1 mM pH 7.5 con inhibidores de proteasas y fosfatasas:

PMSF.....5 mg / 100 ml.

Bacitracina.....10 mg / 100 ml.

Leupeptina.....1 mg / 100 ml.

TLKC.....1 mg / 100 ml.

NaF (concentración final 1 mM)

-Buffer Hepes 20 mM pH 7.5 con PMSF (5 mg / 100 ml).

### 3.7.2.2. Método.

- Resuspender el pellet obtenido tras la centrifugación de los neutrófilos en 1 ml de Hepes 5 mM, con los inhibidores de proteasas y fosfatasa.
- Incubar 15 minutos en frío.
- Sonicar la suspensión celular a una intensidad media, en un baño de hielo, 3 veces durante 15 segundos cada vez, con un descanso de 1 minuto entre cada sonicación.
- Centrifugar a 600 g en una centrífuga J21, durante 10 minutos a fin de eliminar las células intactas, los núcleos, restos de membranas y mitocondrias.
- Recoger el sobrenadante y centrifugar 30 minutos a 30000 g a 4°C.
- Lavar el pellet en Hepes 20 mM con PMSF: 5 mg / 100 ml.
- Volver a centrifugar 30 minutos a 30000 g a 4°C.
- Decantar el sobrenadante.
- Almacenar a -80°C para su posterior utilización.

### 3.7.3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

Se sigue el protocolo descrito por Bradford (1976).

- Se preparan unas diluciones de concentración conocida con BSA standard 1000 µg/ml, de 5, 10, 20 y 40 µg / ml respectivamente.
- Se añaden a 800 µl del patrón, 200 µl del reactivo de Bradford y pasados 5 minutos, se miden las absorbancias en un espectrofotómetro a 595 nm, y se obtiene una gráfica representando absorbancias frente a concentraciones.
- El mismo procedimiento se sigue con las muestras problema, y una vez medida la absorbancia se calcula la concentración de proteínas que le corresponde de acuerdo con la curva de calibración previamente obtenida.

Se comprobó que el buffer en que iba a realizarse la reacción de fosforilación de membranas (Tris 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM) no interfería la medida en el espectrofotómetro. Para ello se prepararon las soluciones patrón tanto en agua como

en el buffer de resuspensión de las membranas y se midieron las absorbancias, que eran iguales en ambos casos. La cuantificación de proteínas se hizo siempre en el buffer de fosforilación.

La cantidad de proteína utilizada en reacción de fosforilación fue de  $(100 \pm 12)$  ng.

### **3.7.4. REACCIÓN DE FOSFORILACIÓN.**

#### **3.7.4.1. Reactivos.**

-Buffer de reacción:

-TrisClH.....50 mM.

-MgCl<sub>2</sub>.....10 mM

-[<sup>32</sup>P-γ]ATP....0.1μM (10 μCi /μl).

#### **3.7.4.2. Método**

El pellet de las membranas se resuspende bien en el medio de reacción, se añade el [<sup>32</sup>P-γ]ATP y se deja que tenga lugar la reacción de fosforilación durante 15 minutos a 37°C. Una vez realizada la fosforilación de las proteínas de membrana se añade igual volumen de buffer de carga con el fin de desnaturizar las proteínas y se calienta a 95° durante 10 minutos.

### **3.7.5. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.**

#### **3.7.5.1. Reactivos.**

-Gel de poliacrilamida al 8% (30 ml).

-Acrilamida y N,N' metilenbisacrilamida 40%

-SDS al 10%

-Tris.ClH 1.5 M

-Persulfato amónico 10%

-TEMED

-H<sub>2</sub>O desionizada

-Buffer de electroforesis.

-Tris.....25 mM

-Glicina .....250 mM pH 8.3

-SDS.....0.1 %

-Buffer de carga

-TrisClH.....50 mM

-SDS.....2 %.

-Azul de bromofenol.....0.1 %

-Glicerol.....10 %.

-Ditiotreitol.....100 mM

Se cargan 10 µl de muestra y la electroforesis se realiza a 180 voltios durante 4 horas. Pasado este tiempo se deseca el gel durante una hora a 80°C, y se revela por autorradiografía con una placa de rayos X, que se deja en contacto con el gel durante 24 h a -80°C.

## **4.- RESULTADOS.**

#### 4.1.- ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DE NEUTRÓFILOS.

Los neutrófilos son células con una vida media *in vivo* corta y por ello los primeros experimentos tuvieron como objetivo estudiar el comportamiento de los neutrófilos *in vitro*. Para ello, una vez aislados, se sometieron a diferentes tiempos de incubación en el buffer Hepes suplementado (buffer HS, véase Material y Método), ya que era donde iban a desarrollarse la mayoría de los experimentos. Los estudios de viabilidad se realizaron por el método de tinción de azul tripán, por tanto, lo que se determinó fue la integridad de la membrana citoplasmática.

Este estudio se realizó de la siguiente manera: tras obtener los neutrófilos de sangre periférica, se resuspendieron en el buffer de incubación a una concentración de  $1 \times 10^6$ /ml, se tomaron alícuotas de 1 ml cada una en tubos Eppendorf y se sometieron a un período de incubación de 24 horas, con una temperatura de incubación de 37°C. Pasado este tiempo, se centrifugaron los tubos, se tiró el sobrenadante y se procedió a la tinción de las células con azul tripán.

La viabilidad de los neutrófilos no sometidos a ningún agente externo fue de  $(97 \pm 2)$  %. Estos resultados se obtuvieron tras el estudio de viabilidad en al menos 10 preparaciones celulares diferentes.

La viabilidad de las células sometidas a los diferentes estímulos se realizó de la misma manera, pero en estos casos, tras alicuotar las células se añadió el estímulo que se iba a estudiar: tapsigargina 0.5  $\mu$ M, PMA 50 nM, estaurosporina 0.1  $\mu$ M, tapsigargina más PMA y estaurosporina más PMA. La viabilidad en estos casos resultó ser la siguiente:

Células incubadas con tapsigargina (0.5  $\mu$ M )..... $(97 \pm 2)$  %

Células incubadas con PMA (50 nM )..... $(90 \pm 3)$  %

Células incubadas con estaurosporina (0.1  $\mu$ M)..... $(94 \pm 4)$  %

Células incubadas con tapsigargina más PMA .....(90 ± 3) %

Células incubadas con estaurosporina más PMA .....(92± 3) %

Otra medida que se realizó, para comprobar si había alguna modificación a lo largo del tiempo en el medio de incubación por la adición de los estímulos, fue la medida de pH del medio. Para ello una vez pasado el tiempo de incubación se centrifugaron las células durante cinco minutos a 3000 r.p.m. y se midió el pH en el sobrenadante, no se observó ninguna diferencia con respecto al pH del medio en el inicio del experimento que era de 7.4. Las mediciones se realizaron tras incubar las células con los distintos estímulos durante 24 horas.

## **4.2.- ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO LIBRE IÓNICO EN EL CITOPLASMA DEL NEUTRÓFILO.**

Con el fin de estudiar la posible intervención del ion calcio en el desencadenamiento de la apoptosis celular, se procedió a analizar las variaciones intracelulares de calcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ), tras la adición de los diferentes estímulos que se iban a estudiar.

Para ello se cargaron las células con Fluo-3/AM (ver Material y Método), y se procedió al registro de las variaciones en las concentraciones intracelulares de calcio provocadas por los diferentes estímulos. Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes.

### **4.2.1.- REGISTRO CONTINUO**

En un primer tipo de experimento se obtuvo a través del software del fluorímetro el registro continuo de  $[Ca^{2+}]_i$  tanto en condiciones basales como cuando se adicionaron los diferentes efectores. Durante el tiempo que duró cada registro, el

resto de las células se continuaron incubando con Fluo-3/AM, de manera que en cada caso el registro se obtuviera con las células perfectamente cargadas.

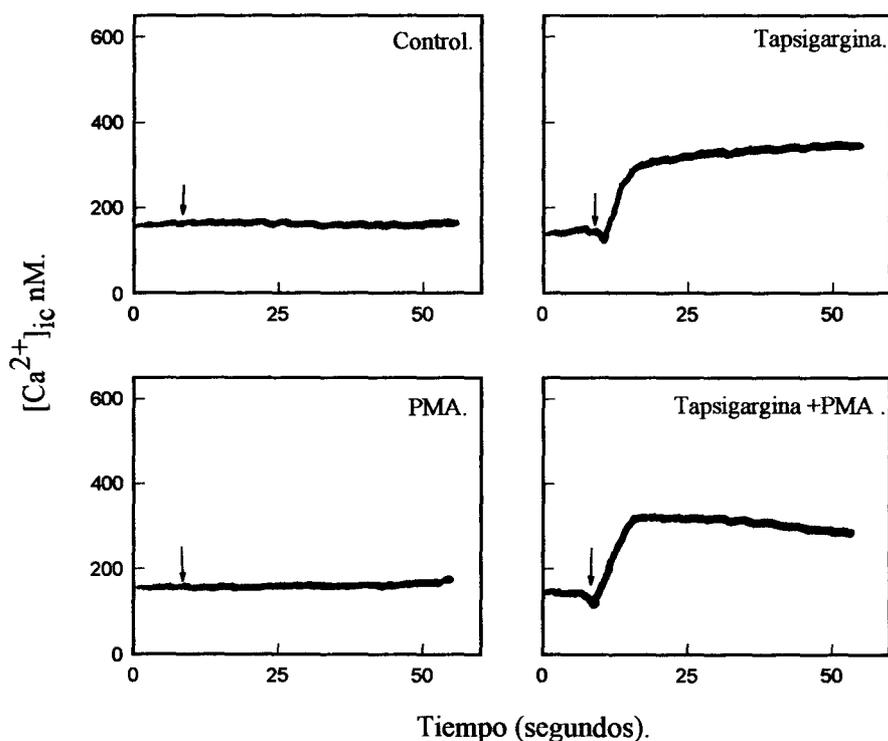
En cada caso tras preparar la alícuota en la que se va a realizar el estudio se dejó estabilizar la medida en el fluorímetro durante 15-20 segundos. Pasado este tiempo se añadió el efector objeto de estudio. En todos los casos se partió de valores basales similares, comprendidos entre 135-140 nM. Los resultados que se obtuvieron (figura 1) fueron los siguientes:

-En células control se produjo un ligero incremento en la concentración de iones calcio en el transcurso del tiempo, que de manera progresiva llega hasta 180 nM al cabo de 60 segundos (Figura 1, panel A)

-Cuando las células se estimularon con tapsigargina, se observó un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  que se produjo de manera rápida y era permanente en el tiempo, pasando de una concentración basal de 140 nM a una concentración de 290 nM en pocos segundos, a partir de aquí la  $[Ca^{2+}]_i$  continuó incrementándose hasta alcanzar al cabo de 60 segundos concentraciones del orden de 400 nM. Se produce por tanto un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  de casi tres veces respecto a las condiciones basales (Figura 1, panel B).

-Cuando los neutrófilos se incubaron en presencia de PMA, se observó que los niveles de calcio no se incrementaron. En este caso se observó incluso una ligera disminución del mismo a lo largo del tiempo. Tras los 60 segundos de duración del experimento, la  $[Ca^{2+}]_i$  disminuyó hasta 95-100 nM (Figura 1, panel C).

-En el caso en que se incubaron las células con PMA y tapsigargina añadidos de manera simultánea, el patrón de respuesta fue diferente al de los casos anteriores, encontrándose que en los primeros 8 segundos tras la inyección de PMA y tapsigargina, aparecía un incremento significativo en la  $[Ca^{2+}]_i$  que alcanzaba valores de 310-320 nM, pero que decaían progresivamente a valores de 255-260 nM en 60 segundos (Figura 1, panel D).



**Figura 1.** Concentración de calcio intracelular en neutrófilos en respuesta a tapsigargina, PMA y ambos añadidos conjuntamente. Los neutrófilos cargados con Fluo3/AM se prepararon como se describe en Material y Método. La emisión de fluorescencia se registró a 526 nm y la  $[Ca^{2+}]_i$  se calculó en nmoles / l. En el panel A se observa el registro obtenido en los neutrófilos utilizados como control. En el panel B cuando el efector fue la tapsigargina 0.5  $\mu$ M. En el C cuando el efector fue el PMA 50 nM. Y en el D cuando se añadieron conjuntamente la tapsigargina y el PMA. La inyección de los estímulos se realizó en los tiempos indicados por las flechas. Experimento representativo de otros cuatro.

#### 4.2.2.- REGISTRO DISCONTINUO.

En un segundo tipo de experimento, y con el fin de controlar las posibles diferencias debidas a un excesivo período de incubación de las células previo a la realización de las medidas, se realizaron unos registros discontinuos de  $[Ca^{2+}]_i$ . Tras cargar las células con el Fluo-3/AM, se tomaron 4 alícuotas a las que se añadieron los diferentes efectores, tapsigargina, PMA y ambos añadidos conjuntamente. En todos los casos y tras estabilización de las células se anotaron los valores iniciales de fluorescencia, como  $[Ca^{2+}]_i$  basal. Durante el tiempo que duró el experimento las células se mantuvieron a 37°C. Los estímulos se añadieron con una diferencia de 1 minuto entre cada alícuota. La intensidad de fluorescencia se midió tras la estabilización a los 0 segundos y a los 5 segundos, y se devolvió la preparación celular a su tubo. De la misma manera se procedió a realizar la medición en los tubos siguientes. Se hicieron mediciones posteriores a los 6, 10 y 15 minutos (Tabla 1).

En todos los casos se parten de valores basales de  $[Ca^{2+}]_i$  próximos a 120 nM. Los resultados fueron los siguientes:

-En las células control se observó un incremento paulatino en las  $[Ca^{2+}]_i$  que llegó hasta valores de 380 nM pasados 15 minutos.

-La tapsigargina provocó en las células un incremento superior a un 100% en las  $[Ca^{2+}]_i$  al cabo de tan sólo 5 segundos. La concentración continuó elevándose de manera gradual hasta alcanzar, al cabo de los 15 minutos, valores de 570 nM, lo que supuso un incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  de 5 veces.

-En las células tratadas con PMA se observó que partiendo de valores basales similares a los de los otros casos, se producía un descenso en la  $[Ca^{2+}]_i$  de manera progresiva. Pasados los 15 minutos de duración del experimento se alcanzaron concentraciones de 95 nM, lo que suponía un descenso de un 24% en la  $[Ca^{2+}]_i$ .

-Cuando se estimularon las células de manera simultánea con tapsigargina y con PMA se encontró que en la medida a los 5 segundos se había producido un incremento en las concentración de calcio, que pasaba de 125 nM a casi triplicar su valor con unos valores de  $[Ca^{2+}]_i$  de 325 nM. Al realizar la siguiente determinación a los 6 minutos se observó un descenso hasta valores de 140 nM, manteniéndose la

tendencia a la disminución en la  $[Ca^{2+}]_i$ , que pasados los 15 minutos alcanzó valores de 80 nM.

	0 (segundos)	5 (segundos)	6 (minutos)	10 (minutos)	15 (minutos)
control	122 ± 7	128 ± 10	213 ± 89	297 ± 78	380 ± 92
tapsigargina	117 ± 5	298 ± 63	544 ± 154	529 ± 14	570 ± 57
PMA	123 ± 25	105 ± 16	102 ± 21	101 ± 5	94 ± 6
tapsigargina+PMA	125 ± 4	324 ± 75	141 ± 12	87 ± 3	82 ± 7

**Tabla 1.** Medida discontinua de la  $[Ca^{2+}]_i$  en neutrófilos control, estimulados con tapsigargina, PMA y ambos inyectados conjuntamente. Los neutrófilos cargados con Fluo3/AM, se prepararon como se describe en Material y Método. La emisión de fluorescencia se registró a 526 nm en los tiempos indicados en la tabla, y la  $[Ca^{2+}]_i$  se calculó en nmoles/l. La concentración de los efectores fue la siguiente: tapsigargina 0.5µM, PMA 50 nM. Los resultados se expresan como la media ± ESM de cuatro experimentos.

### **4.3.- ESTUDIO DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN.**

El objetivo de estos experimentos era analizar si en los neutrófilos, en las condiciones estudiadas, se producía un patrón de fragmentación del ADN que fuera compatible con una muerte por apoptosis. Esto suponía la existencia de una endonucleasa cuya activación tuviera como consecuencia la ruptura del ADN en fragmentos de 180-200 pares de bases.

Los neutrófilos se aislaron de acuerdo con lo descrito en Material y Método, una vez resuspendidos en el buffer de incubación de manera que la concentración final fuera de  $1 \times 10^6$ / ml, se dividieron en alícuotas de 1 ml. Posteriormente se añadió a cada tubo el estímulo que se iba a estudiar, dejando siempre un tubo al que no se añadió ningún efector y que servía como control. Tras la adición del estímulo se agitaron suavemente los tubos. La incubación según el protocolo de cada experimento se realizó a diferentes tiempos siempre a 37°C. Pasado el período de incubación con el estímulo, los tubos se centrifugaron a 14000 r.p.m. con el fin de evitar la posible pérdida de ADN por la posible ruptura de la membrana nuclear y citoplasmática. Posteriormente se extrajo el ADN del pellet tal y como se describe en Material y Método y una vez solubilizado, se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 1.8%. Se tiñó el gel con bromuro de etidio y se visualizó por transiluminación con luz ultravioleta o por autorradiografía en el caso en que el ADN se hubiera marcado previamente con  $^{32}\text{PdCTP}$ .

#### **4.3.1.- ESTUDIO DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN CÉLULAS NO SOMETIDAS A NINGÚN ESTÍMULO EXTERNO (APOPTOSIS ESPONTÁNEA).**

El objetivo de este experimento era estudiar cuánto tiempo era necesario para el desarrollo de la apoptosis espontánea en neutrófilos *in vitro*. Se estudió para ello el patrón de fragmentación del ADN celular. Los neutrófilos se separaron en alícuotas de 1 ml con  $1 \times 10^6$  células. A estas preparaciones no se añadió ningún estímulo.

La primera alícuota se tomó a tiempo cero, es decir, inmediatamente después de extraer los neutrófilos, con el fin de que sirviera como control negativo del experimento. Transcurridos los tiempos establecidos se centrifugaron los tubos a 14000 r.p.m., y tras tirar el sobrenadante se procedió a congelar las células para posteriormente hacer la extracción del ADN de todos los tubos al mismo tiempo.

La segunda serie se dejó un período de incubación de 8 horas y la tercera serie se dejó un período de incubación de 18 horas. Pasados estos tiempos, se procedió igual que en la primera serie.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

-En las células sin incubar no se observó ningún tipo de fragmentación en el ADN, tan sólo apareció una banda de alto peso molecular.

-En el caso de incubar durante 8 horas no se encontraron bandas de ADN fragmentado, sino una sola banda de alto peso molecular, igual que en el caso anterior.

-En las células incubadas durante 18 horas se apreció una clara fragmentación del ADN, con fragmentos múltiples de 180-200 pares de bases.

El grado de fragmentación se estimó que era de un 50% como máximo (Fotografía 1).

#### **4.3.2.- ESTUDIO DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN CÉLULAS SOMETIDAS A DIFERENTES ESTÍMULOS.**

Una vez descubierto que los neutrófilos sufrían apoptosis espontánea y que ésta era dependiente del tiempo, se estudió el efecto que ejercían los diferentes estímulos sobre la fragmentación del ADN. Para ello se hicieron varias alícuotas de 1 ml con  $1 \times 10^6$  neutrófilos / ml. Se añadieron los efectores, se incubaron las células durante 24 horas a 37°C, y posteriormente se centrifugaron los tubos a 14000 r.p.m. y tras tirar el sobrenadante se extrajo el ADN celular y se hizo la electroforesis en agarosa al 1.8 %. Los resultados fueron los siguientes:

- Efecto de la tapsigargina: en células control (no incubadas con ningún estímulo), aparecía una fragmentación del ADN que se correspondía con el patrón descrito para apoptosis. La tapsigargina aumentó el grado de fragmentación del ADN, con una intensidad en las bandas mayor que en el caso anterior.

Con el fin de comprobar el efecto de la tapsigargina sobre estas células se procedió a estudiar la fragmentación del ADN haciendo una dependencia de tiempo. Se observó que cuando las células son incubadas 8 horas con tapsigargina ya aparece el patrón típico de fragmentación de la apoptosis, a diferencia de lo que ocurría en el caso de las células no sometidas a ningún estímulo que hasta pasada las 18 horas de incubación no se fragmenta el ADN. En resumen, la tapsigargina acelera la fragmentación del ADN, que aparece antes, a unos tiempos en los que la apoptosis espontánea aún no ha tenido lugar (Fotografía 2).

- Efecto del PMA. Los resultados obtenidos con PMA (Fotografía 3) fueron muy significativos:

-En células incubadas con PMA durante 24 horas no aparecieron bandas de ADN que indicaran su fragmentación, tan sólo aparecía una banda de ADN de alto peso molecular.

-En células incubadas simultáneamente con tapsigargina y PMA durante 24 horas no apareció el ADN fragmentado, sino que igual que en el caso anterior tan solo se observó ADN de alto peso molecular.

En resumen, el PMA bloqueaba tanto la ruptura espontánea de ADN como la inducida por tapsigargina.

-Estudios en macrófagos peritoneales de rata y células RINm5F.

Los estudios de fragmentación del ADN se realizaron además de en neutrófilos, en macrófagos peritoneales de ratón, y en células de la línea pancreática RINm5F. Ambos tipos de células tuvieron un comportamiento similar frente a la tapsigargina y al PMA, pero en ninguno de los dos casos se encontró un patrón de fragmentación en células control. Las concentraciones de células utilizadas fueron las mismas que en el caso de los neutrófilos, es decir  $1 \times 10^6$  células /ml. En ambos casos el medio de incubación fue RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal, antibióticos y glutamina como se describe en Material y Método. Se hicieron

alícuotas con las células y se añadieron los efectores, PMA 50 nM, taspigargina 0.5  $\mu$ M, y ambos efectores conjuntamente, se realizó una incubación durante 24 horas a 37°C, y pasado este tiempo se procedió a la extracción del ADN de las células y a su visualización por transiluminación con luz ultravioleta, tras tinción con bromuro de etidio o por autorradiografía. Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes:

-En células no sometidas a ningún estímulo, se observó una única banda de ADN de alto peso molecular.

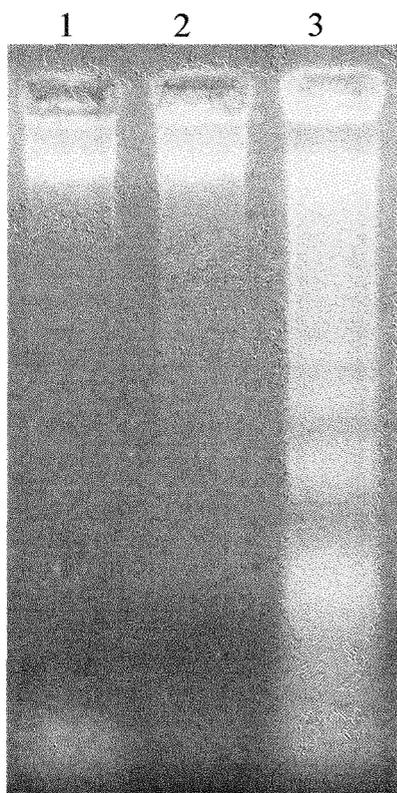
-En células incubadas con taspigargina se observó un patrón de fragmentación del ADN que se correspondía con el descrito para la apoptosis, con bandas de un peso molecular múltiplo de 180-200 pares de bases (Autorradiografía 1).

-En células tratadas con PMA, aparece igual que en el primer caso una única banda de alto peso molecular.

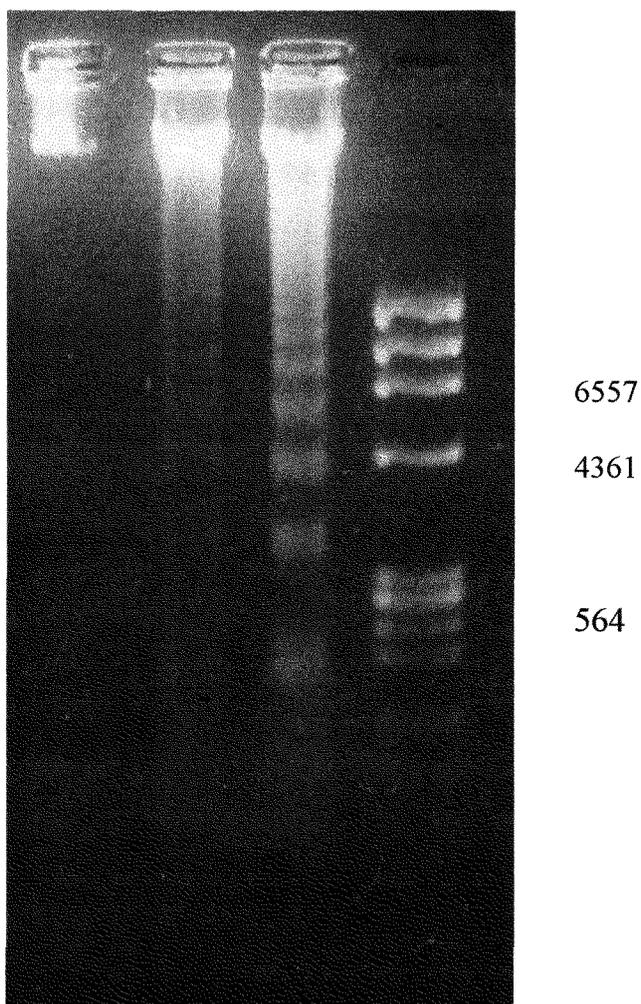
-Cuando se tratan las células con ambos efectores se encontró una situación similar a la descrita para el PMA .

#### **4.3.3.- EFECTO ACTIVADOR DE LA ESTAUROSPORINA EN LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN.**

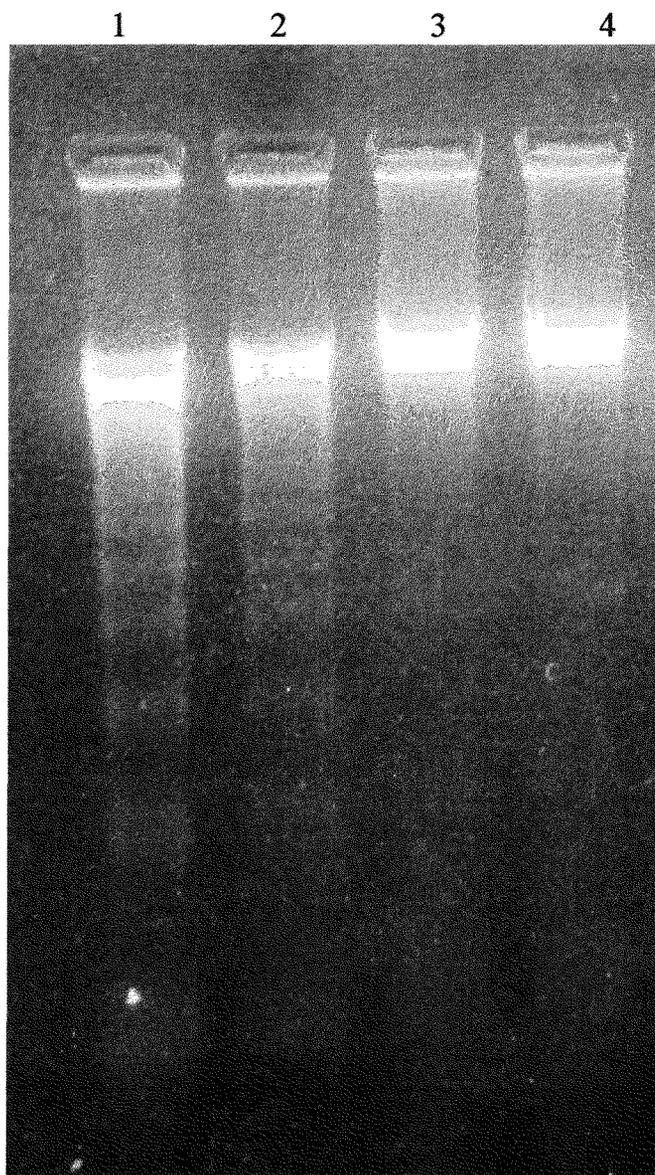
Para comprobar que efectivamente el PMA ejercía su acción bloqueante de la apoptosis a través de PKC, se incubaron las células con estaurosporina, un inhibidor potente de PKC. Los neutrófilos se trataron como en los casos anteriores: una vez extraídos se alicuotaron en tubos de manera que en cada uno hubiera 1 ml con  $1 \times 10^6$  neutrófilos / ml. A cada tubo se añadieron uno de los estímulos a estudiar: a) PMA 50 nM, b) estaurosporina 0.1  $\mu$ M, c) ambos añadidos simultáneamente, y d) a uno de los tubos no se añadió ningún efector para utilizarlo como control. Las células se incubaron durante 24 horas a 37°C y pasado este tiempo se procedió a extraer el ADN como en los casos anteriores. La visualización se realizó tras electroforesis en agarosa al 1.8%, tinción con bromuro de etidio y transiluminación con ultravioleta (Fotografía 4).



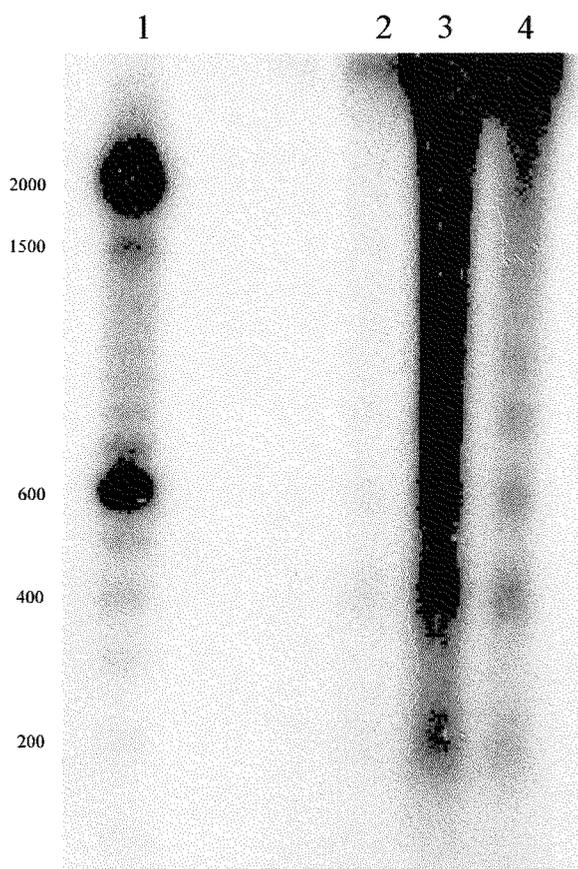
**Fotografía 1.** *Estudio de la fragmentación del ADN en neutrófilos sometidos a 8 y 18 horas de incubación.* En el carril 1, ADN de neutrófilos recién obtenidos de sangre periférica y resuspendidos en el buffer de incubación. En el carril 2 los neutrófilos se incubaron durante 8 horas a 37°C. En el carril 3, los neutrófilos se incubaron 18 horas a 37°C.



**Fotografía 2.** Estudio de la fragmentación del ADN en neutrófilos incubados con taspigargina durante diferentes tiempos. Carril 1, neutrófilos recién aislados a los que se añadió taspigargina. En el carril 2, neutrófilos incubados con taspigargina durante 8 horas. En el carril 3, neutrófilos incubados con taspigargina durante 18 horas. En el carril 4 maracador de peso molecular.



**Fotografía 3.** Estudio de la fragmentación del ADN en neutrófilos incubados durante 24 horas a 37°C con tapsigargina, PMA, y ambos añadidos conjuntamente. Pasado el tiempo de incubación se procedió a la extracción del ADN. Posteriormente se realizó una electroforesis y se tiñó con bromuro de etidio. En el carril 1 neutrófilos control, sin ningún estímulo adicional. En el carril 2 neutrófilos incubados con tapsigargina 0.5  $\mu$ M. En el carril 3 neutrófilos incubados con PMA 50 nM. En el carril 4, neutrófilos incubados conjuntamente con tapsigargina 0.5  $\mu$ M y PMA 50 nM.



**Autorradiografía 1.** Estudio de la fragmentación del ADN en macrófagos de ratón y células RINm5F incubadas con tapsigargina  $0.5 \mu\text{M}$ . En el carril 1 marcador de peso molecular. En el carril 2 ADN de macrófagos incubados con tapsigargina durante 8 horas. En el carril 3 ADN de macrófagos incubados con tapsigargina durante 24 horas. En el 4, ADN de células RINm5F incubadas con tapsigargina durante 24 horas. Todas las incubaciones se realizaron a  $37^\circ\text{C}$ .



**Fotografía 4.** Estudio de la acción de la estaurosporina en la fragmentación del ADN. Los neutrófilos se incubaron durante 24 horas a 37°C, pasado este tiempo se procedió a la extracción del ADN. En el carril 1 neutrófilos incubados con PMA 50nM. En el carril 2, neutrófilos incubados con estaurosporina 0.1  $\mu$ M. En el carril 3 neutrófilos incubados conjuntamente con estaurosporina y PMA.

#### **4.3.4.- ESTUDIO DE LA APOPTOSIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.**

Con el fin de comprobar que efectivamente la muerte que tenía lugar en estas células era por apoptosis, y dado que el estudio de la fragmentación del ADN no es suficiente para establecer dicha afirmación, se procedió a la observación de las células en el microscopio electrónico. De esta manera se pudo observar la disminución del volumen celular, condensación de la cromatina y la aparición de los cuerpos apoptóticos.

A las 24 horas en la mayoría de los neutrófilos se aprecia la retracción del núcleo y la condensación de la cromatina, en tanto que la formación de los cuerpos apoptóticos todavía no es lo suficientemente importante y tan sólo se observa en algún neutrófilo aislado (fotografías 6, 7, 8 y 9).

Las células preparadas y tratadas de la misma manera que para el estudio de la fragmentación del ADN, se incubaron con los diferentes estímulos durante 24 horas. Posteriormente se centrifugaron, y el pellet de célula se introdujo en una solución con glutaraldehído. La fijación y preparación de los cortes se realizó como se describe en Material y Método. La observación se realizó en un microscopio Zeiss 900.



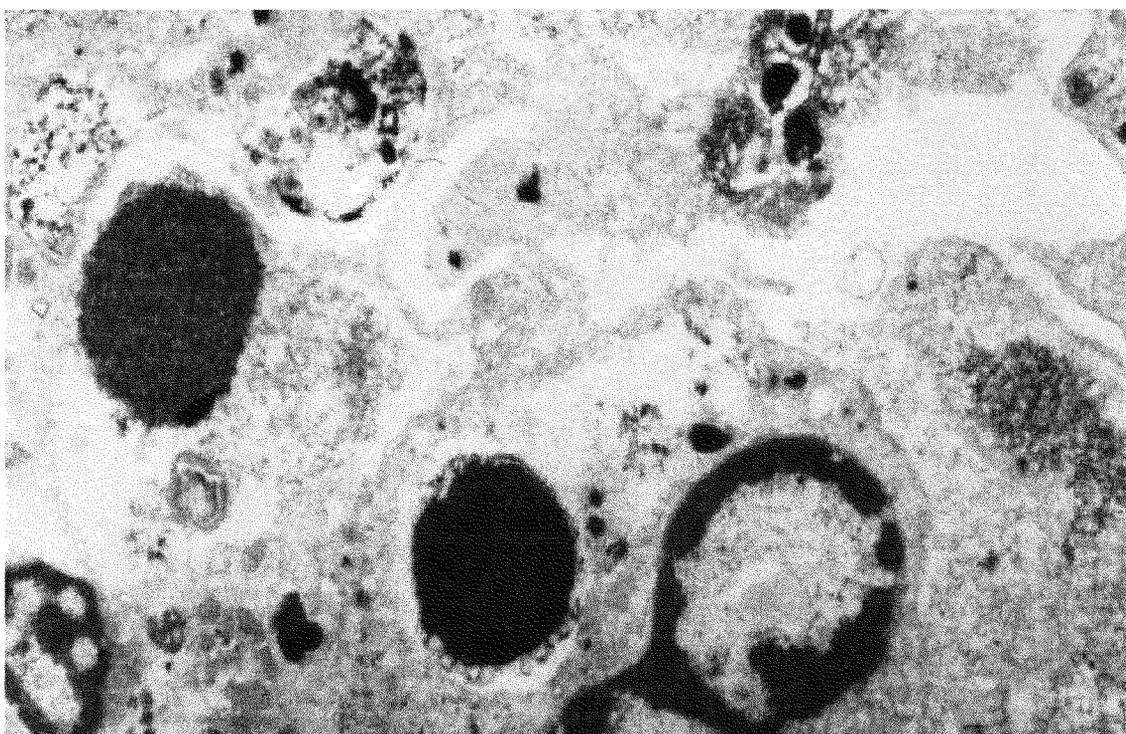
**Fotografía 6.** Estudio de la morfología de los neutrófilos tras 24 horas de incubación con taspigargina  $0.5 \mu\text{M}$ . En la imagen se observa la condensación de la cromatina en la periferia de la membrana nuclear y la ruptura del núcleo en varios fragmentos.



**Fotografía 7.** Estudio de la morfología de los neutrófilos incubados durante 24 horas con taspigargin  $0.5 \mu\text{M}$ . En la imagen se observa la condensación de la cromatina en la membrana nuclear formando agregados densos.



**Fotografía 8.** Estudio de la morfología celular en neutrófilos incubados durante 24 horas con tapsigargina  $0.5\mu\text{M}$ . En la imagen se observa el inicio de la retracción de la cromatina hacia la membrana nuclear.



**Fotografía 9.** Estudio de la morfología de los neutrófilos incubados durante 24 horas con taspigargina 0.5  $\mu\text{M}$ . En la imagen se observa la condensación de la cromatina, que forma agregados densos, en la periferia de la membrana nuclear

#### **4.4.- ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS REACTIVOS DEL OXÍGENO Y LA APOPTOSIS EN NEUTRÓFILOS.**

Teniendo en cuenta por un lado los diferentes datos que apoyan que los radicales libres están estrechamente vinculados con el desencadenamiento de la muerte celular por apoptosis, y por otro que los neutrófilos son células cuya principal actividad es la de defender al organismo frente a agentes extraños y que para ello utilizan la producción de radicales libres; se planteó estudiar la posibilidad de que el mecanismo de defensa de los neutrófilos estuviera al mismo tiempo actuando como controlador del tiempo de supervivencia de los mismos por inducción de la muerte apoptótica.

##### **4.4.1.- ACTIVACIÓN DE LA NADPH OXIDASA.**

Lo primero que se hizo fue estudiar el poder activador que poseían los diferentes estímulos sobre la NADPH oxidasa, como enzima responsable de la activación del estallido respiratorio.

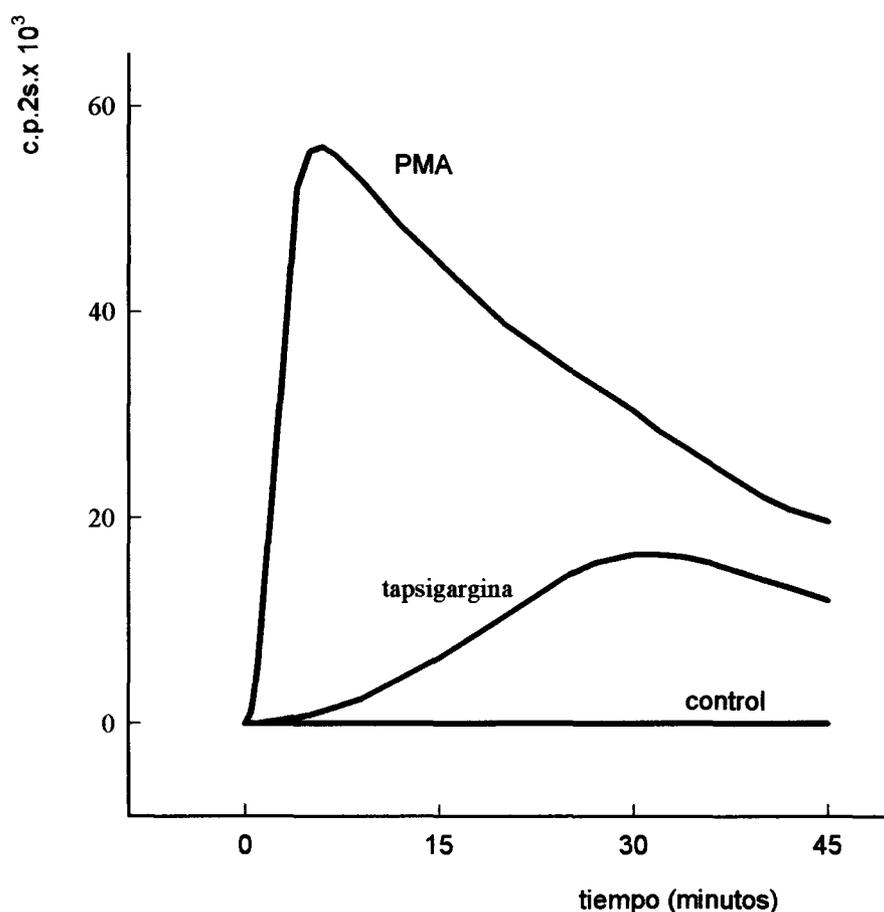
##### **4.4.1.1.- Medida continua de quimioluminiscencia.**

Se analizó la actividad de este enzima en un registro continuo durante 45 minutos. Para ello los neutrófilos obtenidos de sangre periférica y preparados como se indica en Material y Método se incubaron durante dos minutos a 37°C, y posteriormente se añadió el efector objeto de estudio.(Figura 2 )

Cuando el estímulo añadido fue el PMA 50 nM se observó una clara activación de la NADPH oxidasa con un tiempo de latencia corto, que alcanzó un valor máximo al cabo de 6 minutos. La actividad máxima se mantuvo durante unos minutos, y a partir de aquí empezó a disminuir paulatinamente, hasta alcanzar unos valores de la mitad del máximo pasados 45 minutos desde la inyección del estímulo.

En el caso en que el efector añadido fue tapsigargina  $0.5\mu\text{M}$  se observó una activación de la NADPH oxidasa de menor intensidad que en el caso anterior, que alcanzó un valor máximo pasados 30 minutos. La respuesta se inicia muy lentamente, el máximo grado de activación se inicia a partir de los 9 minutos. Una vez alcanzado el valor máximo de respuesta de quimioluminiscencia se apreció una disminución en la misma más lenta que en el caso anterior, manteniéndose a los 45 minutos valores próximos a los del PMA al mismo tiempo.

En las células control no se produce ningún efecto a lo largo del tiempo. La NADPH oxidasa permanece en reposo. La velocidad permanece en estado basal de 50-60 c.p.2s.



**Figura 2.** Registro gráfico de la respuesta de quimioluminiscencia inducida en neutrófilos a lo largo del tiempo por PMA o por taspigargina. Los neutrófilos obtenidos de sangre periférica se incubaron a 37°C en el luminómetro durante 2 minutos y se añadieron: taspigargina 0.5 $\mu$ M ó PMA 50 nM. Una de las preparaciones con neutrófilos se utilizó como control. En la gráfica se representa a partir del momento en que se inyectan los efectores.

El mismo experimento se realizó de manera discontinua con el fin de estudiar el tiempo de latencia en respuesta a la acción del efector durante los dos primeros minutos.

Los neutrófilos se incubaron durante dos minutos a 37°C, y se realizó la medida de la intensidad de quimioluminiscencia en un primer minuto. Posteriormente se añadió el estímulo y se registró la medida transcurridos dos minutos desde la inyección del mismo. Debido a la variabilidad existente en el grado de activación de los neutrófilos, los valores se estandarizaron frente a la quimioluminiscencia basal en cada caso. Para ello se expresa la siguiente relación: c.p.2s. a los dos minutos de la inyección del estímulo entre las c.p.2s. tras el minuto de estabilización en el luminómetro.

En el caso de los neutrófilos no sometidos a ningún estímulo se apreció un incremento en la respuesta de quimioluminiscencia de 5 veces el valor basal, mientras que en el caso de la tapsigargina el incremento en la respuesta de quimioluminiscencia fue de 17 veces. En el caso de las células tratadas con PMA el incremento de la respuesta de quimioluminiscencia en los dos primeros minutos fue de 247 veces (Tabla 2).

---

	<b>CPS2MIN/ CPS BASALES</b>
<b>CONTROL</b>	5 ± 2
<b>TAPSIGARGINA</b>	17 ± 7
<b>PMA</b>	247 ± 138

**Tabla 2..** *Tiempo de latencia en la activación de la NADPH oxidasa de los neutrófilos cuando se estimulan con tapsigargina y PMA. Los neutrófilos, se incubaron dos minutos a 37°C, posteriormente se añadieron los estímulos; tapsigargina 0.5 μM o PMA 50 nM. Los valores se refieren al cociente de la velocidad de quimioluminiscencia basa y a los dos minutos de añadir el estímulo. Los resultados se expresan como la media ± ESM de 10 experimentos diferentes.*

#### **4.4.1.2.- Medida discontinua de la quimioluminiscencia.**

Otro experimento realizado con el fin de evitar las diferencias en el grado de activación de los neutrófilos que pueden aparecer tras períodos excesivos de incubación, fue la realización de medidas discontinuas en la respuesta de quimioluminiscencia.

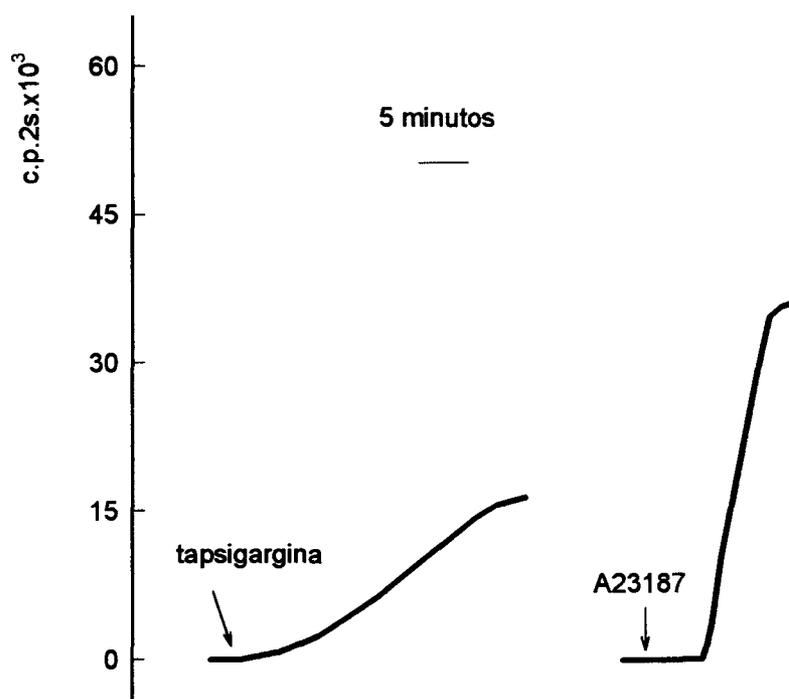
Los neutrófilos se prepararon de acuerdo con lo descrito en Material y Método, y se hicieron tres alícuotas que se mantuvieron durante el tiempo de realización del experimento a 37°C. Tras el registro de la medida en condiciones basales, se añadieron los estímulos (PMA o tpsigargina) con un intervalo de 4 minutos entre cada adición. En cada caso se registró la medida pasados los dos primeros minutos. Posteriormente se llevaron los neutrófilos a 37°C y se procedió al registro de la medida en los otros tubos. Transcurridos los 18 minutos de inyección del estímulo a cada serie de neutrófilos, se registró la última medida (Tabla 3)

	BASAL	2 MINUTOS	18 MINUTOS
Control	1470 ± 52	7767 ± 2900	7600 ± 2840
tapsigargina	1554 ± 224	23400 ± 2500	43200 ± 2300
PMA	1613 ± 132	370000 ± 28000	29250 ± 8100

**Tabla 3.** Efecto de la tapsigargina y PMA en la activación de la NADPH oxidasa en neutrófilos. Los neutrófilos se incubaron durante dos minutos a 37°C y posteriormente se añadieron los distintos efectores: tapsigargina 0.5  $\mu$ M o PMA 50 nM. Las medidas de quimioluminiscencia se realizan en los tiempos indicados en la tabla. Se representan la media  $\pm$  ESM correspondiente a 6 experimentos diferentes. Los valores son la integral de quimioluminiscencia en c.p.m.

#### **4.4.2.- ESTUDIO DE LA SIMILITUD DE EFECTO SOBRE LA NADPH OXIDASA ENTRE LA TAPSIGARGINA Y EL IONÓFORO DE CALCIO.**

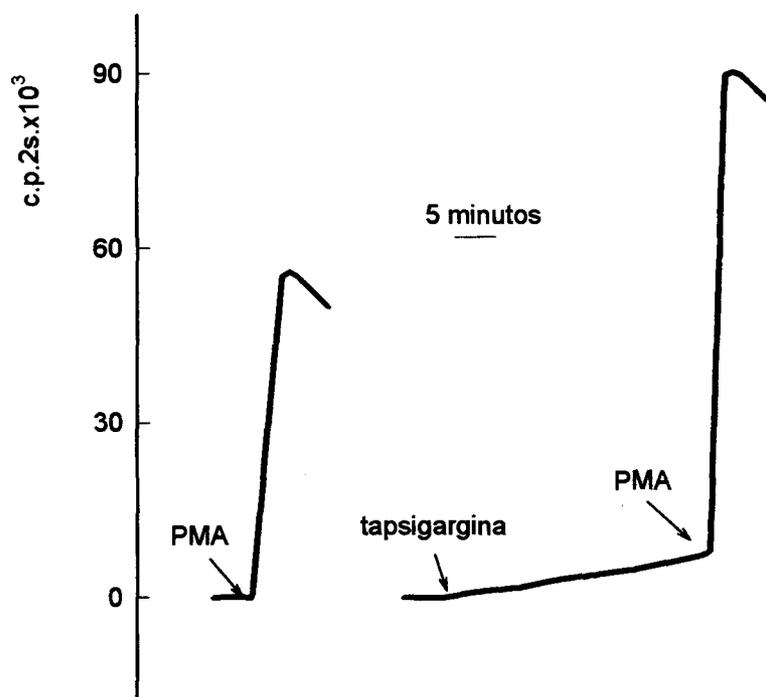
Debido al efecto que produce la tapsigargina, y para comprobar que está mediado por calcio, se realizó el mismo experimento pero utilizando como estímulo un ionóforo de calcio. Los neutrófilos se incubaron durante dos minutos a 37°C, posteriormente se añadió, tapsigargina 0.5  $\mu\text{M}$  ó el ionóforo de calcio A23187 2  $\mu\text{M}$ . (Figura 3). En el caso de los neutrófilos tratados con tapsigargina se observó una respuesta lenta, con un máximo del orden de 16000 c.p.2s., en un tiempo de 30 minutos. Para el ionóforo de calcio la respuesta que se obtuvo fue de mayor intensidad que en el caso anterior, alcanzándose un valor máximo de 38000 c.p.2s., en un tiempo de 12 minutos y con un período de latencia de aproximadamente unos seis minutos, a partir de este momento la respuesta fue más rápida que en el caso de la tapsigargina.



**Figura 3.** Efecto del ionóforo A23187 en la activación de la NADPH oxidasa comparado con la activación que produce la tapsigargina. Los neutrófilos se incubaron durante dos minutos a 37°C, seguidamente se añadieron los efectores, tapsigargina 0.5  $\mu$ M y A23187 2  $\mu$ M. Experimento representativo de otros tres.

#### **4.4.3.- POTENCIACIÓN DEL EFECTO DEL PMA CUANDO LAS CÉLULAS SE PREINCUBAN CON TAPSIGARGINA.**

Una vez conocido que tanto el PMA como la tapsigargina, activaban la NADPH oxidasa, se trató de estudiar la acción conjunta del PMA y la tapsigargina en la activación de esta enzima. Los neutrófilos se incubaron durante dos minutos a 37°C y transcurrido este tiempo se añadieron conjuntamente los dos efectores. La adición de los dos factores al mismo tiempo no modificó el grado de activación ejercido por el PMA, sino que se encontró una disminución en la respuesta frente a lo esperado. Ahora bien, cuando se esperó a que la tapsigargina alcanzara el máximo de su activación sobre la NADPH oxidasa y se añadió el PMA, se observó un incremento de un 33% en el grado de activación de la NADPH oxidasa. La respuesta fue más rápida y alcanzó el máximo de activación en el primer minuto posterior a la adición del PMA, a diferencia de lo que ocurrió cuando se adicionó únicamente PMA, en que el máximo de respuesta se observaba a los 6 minutos. (Figura 4)



**Figura 4.** Efecto potenciador de la tapsigargina sobre la estimulación de la NADPH oxidasa por el PMA. Los neutrófilos se incubaron durante 2 minutos a 37°C, y seguidamente se añadieron los estímulos. En el registro de la izquierda se representa la respuesta cuando se añadió PMA 50 nM, y en el registro de la derecha cuando se añadió PMA 50 nM previa incubación de 30 minutos con tapsigargina 0.5  $\mu$ M. Experimento representativo de otros cuatro.

#### **4.4.4.- IMPLICACIÓN DEL CALCIO EN LA ACTIVACIÓN DE LA NADPH OXIDASA.**

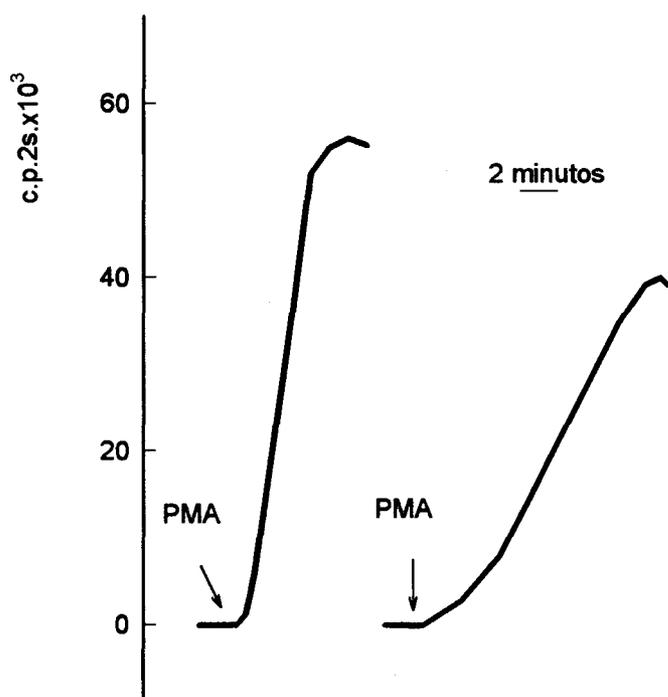
Dado que la tapsigargina incrementa los niveles de calcio, y dado que este aumento puede estimular la NADPH oxidasa se trató de estudiar si el calcio era necesario y en que medida para la activación de dicha enzima.

Para ello se realizaron varios ensayos variando la concentración de calcio en el medio de incubación.

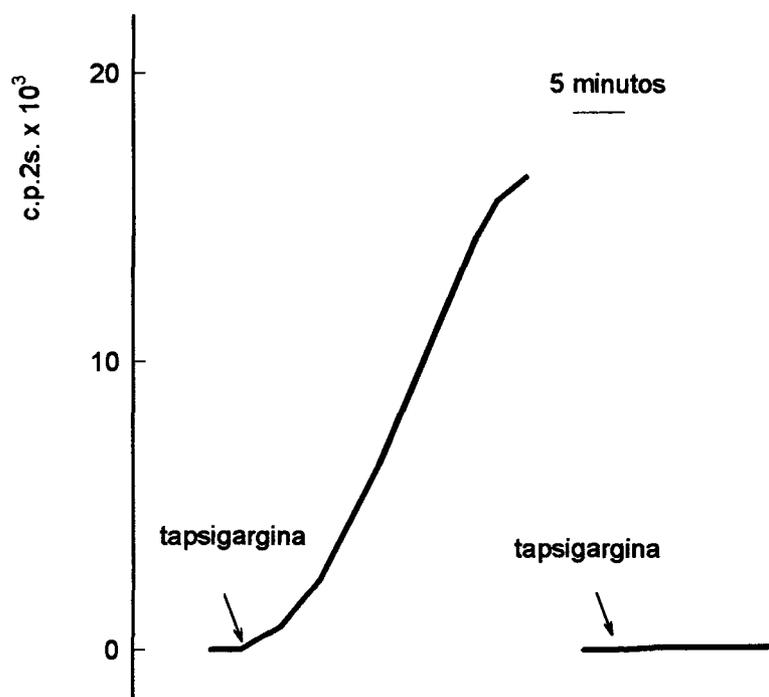
Los experimentos se realizaron tanto cuando se sometieron las células a la acción del PMA, como cuando se estimularon con tapsigargina (Figuras 5 y 6). Se utilizaron dos medios de incubación, para las células control el medio de incubación descrito en Material y Método, y para las células en las que se pretendía estudiar el efecto del calcio un medio como el anterior pero carente de calcio. Los neutrófilos se incubaron a 37°C en los distintos medios y pasados dos minutos se añadió el efector y se registró la activación de la NADPH oxidasa.

En el caso en que el efector estudiado fue el PMA en un medio sin calcio, el grado máximo de activación de la NADPH oxidasa era menor que en el caso en que había calcio en el medio. La disminución de la respuesta fue de un 27%.

Cuando el estímulo añadido fue la tapsigargina, no se encontró prácticamente actividad NADPH oxidasa en el medio carente de calcio.



**Figura 5.** Efecto del calcio en la activación de la NADPH oxidasa por PMA. Los neutrófilos se incubaron durante 2 minutos a 37°C, posteriormente se inyectó PMA (50 nM). En el registro de la izquierda se representa la medida de quimioluminiscencia cuando el buffer utilizado fue PBS, con HEPES 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.2 mM y glucosa 10 mM. En la de la derecha se representa la medida de la quimioluminiscencia obtenida cuando el buffer no contenía calcio (PBS, con HEPES 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.2 mM y glucosa 10 mM). Experimento representativo de otros tres.



**Figura 6.** Efecto del calcio en la activación de la NADPH oxidasa por tapsigargina. Los neutrófilos se incubaron durante 2 minutos a 37°C, transcurrido este tiempo se inyectó tapsigargina (0.5  $\mu$ M), en el registro de la izquierda se representa la medida de quimioluminiscencia obtenida cuando las células fueron incubadas en PBS, con Hepes 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.2 mM y glucosa 10 mM, en la zona de la derecha se representa la medida obtenida cuando el buffer carecía de calcio (PBS, con Hepes 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.2 mM y glucosa 10 mM).

#### **4.4.5.- EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA PKC EN LA ACTIVACIÓN DE LA NADPH OXIDASA.**

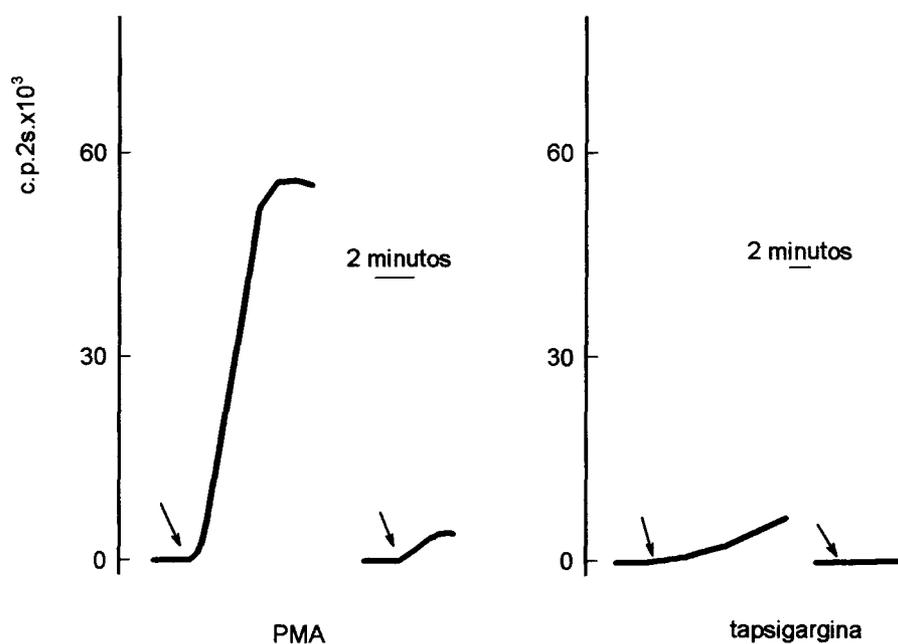
Con el fin de averiguar hasta que punto la activación de la NADPH oxidasa era mediada por PKC, se realizaron una serie de experimentos con estaurosporina, un inhibidor de esta enzima. Para ello los neutrófilos se sometieron a dos tipos diferentes de experimentos.

En una primera serie, se trataron las células previamente con la estaurosporina y posteriormente se realizó la medida de quimioluminiscencia. Y en un segundo tipo de experimento se añadió la estaurosporina cuando las células ya habían sido estimuladas con los distintos efectores.

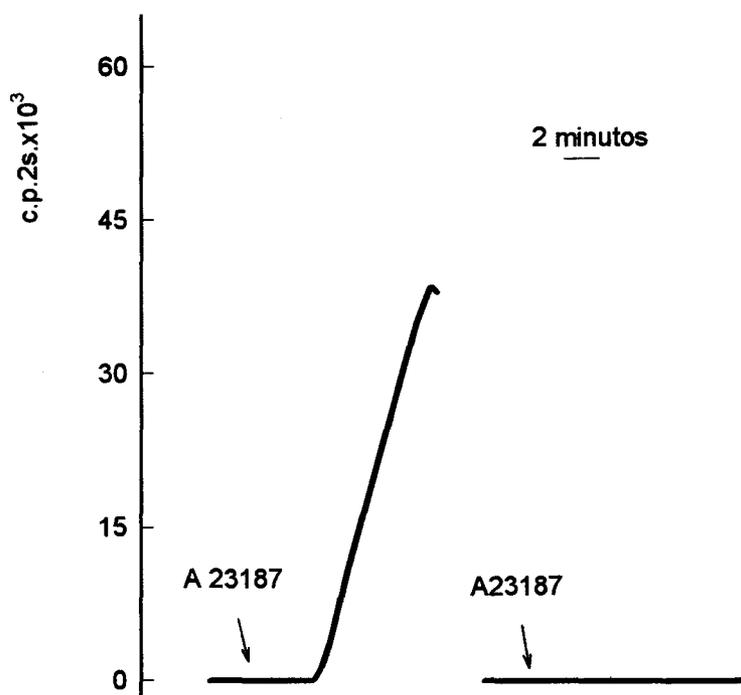
Para la realización del primer tipo, los neutrófilos tras dos minutos de incubación con estaurosporina 0.1  $\mu\text{M}$  a 37°C, se estimularon con PMA 50 nM. El resultado fue una disminución de un 94% en la actividad de la NADPH oxidasa. Cuando se realizó este mismo experimento tratando las células con taspigargina tras la incubación durante 2 minutos a 37°C con estaurosporina, se observó que se producía una inhibición prácticamente total de la activación de la NADPH oxidasa, concretamente de un 99% (Figura 7).

Este mismo tipo de experimento se efectuó utilizando como efector el ionóforo de calcio A23187. Tras incubar los neutrófilos durante dos minutos a 37°C, se inyectó el ionóforo (2  $\mu\text{M}$ ), y se obtuvo la respuesta anteriormente descrita. Cuando las células se preincubaron durante dos minutos con estaurosporina se encontró una disminución prácticamente total (de más de un 99%) de la actividad de la NADPH oxidasa (Figura 8)

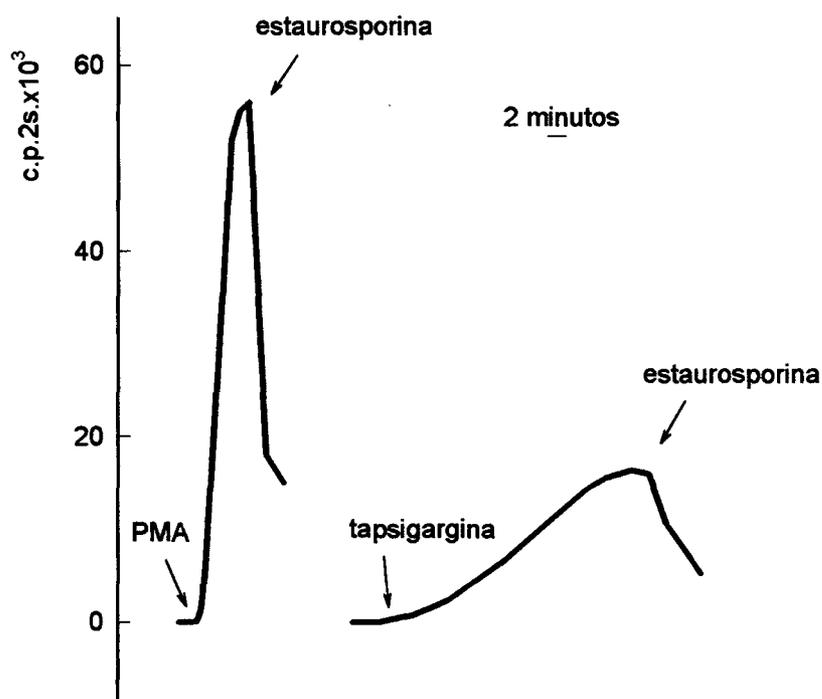
Para la realización del segundo tipo de experimento se incubaron durante 2 minutos los neutrófilos a 37°C y posteriormente se añadió el estímulo. La inyección de estaurosporina en condiciones de máxima actividad de la NADPH oxidasa, produjo una disminución de un 73% en la actividad de la NADPH oxidasa de manera rápida en un período de 2-3 minutos. En el caso de que el estímulo añadido fue taspigargina, al inyectar la estaurosporina se produjo una disminución de un 75% en la medida de quimioluminiscencia (Figura 9).



**Figura 7.** Efecto de la estaurosporina en la estimulación de la NADPH oxidasa por el PMA y la tapsigargina. Los neutrófilos incubados durante dos minutos a 37°C, se estimularon con PMA 50 nM, en el caso de los registros de la izquierda y con tapsigargina 0.5  $\mu$ M en los de la derecha. En ambos casos se representa la medida de quimioluminiscencia obtenida cuando los neutrófilos se preincubaron sin y con estaurosporina 0.1  $\mu$ M durante dos minutos a 37°C (izquierda y derecha de cada caso respectivamente).



**Figura 8.** Efecto de la estaurosporina en la estimulación de la NADPH oxidasa por el ionóforo A23187. Los neutrófilos incubados durante dos minutos a 37°C en ausencia (a la izquierda) y presencia (a la derecha) de estaurosporina, se estimularon con el ionóforo de calcio A23187 2 $\mu$ M. Experimento representativo de otros dos.



**Figura 9.** Efecto de la estauosporina sobre la estimulación previamente ejercida por el PMA y la tapsigargina sobre la NADPH oxidasa. Los neutrófilos incubados durante dos minutos a 37°C se estimularon con PMA 50 nM (a la izquierda) y con tapsigargina 0.5  $\mu$ M (a la derecha). En cada caso en el momento de mayor activación se añadió estauosporina 0.1  $\mu$ M. Experimento representativo de otros tres.

#### **4.5.- INTERVENCIÓN DE LA PKC EN LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA.**

Los últimos experimentos planteados tuvieron como finalidad estudiar la hipótesis de que la acción de la PKC estuviera mediada por una proteína de membrana susceptible de fosforilarse por la PKC.

La hipótesis era que durante una reacción de autofosforilación, las proteínas de membrana incorporarían o no,  $^{32}\text{P}$  procedente de  $[\gamma\text{-}^{32}]\text{-ATP}$ , según el estado de fosforilación de las mismas previamente incubadas con diferentes estímulos. Durante el periodo de incubación de las células con tapsigargina o PMA, se podría producir la fosforilación de proteínas de membrana con ATP endógeno. Estas proteínas fosforiladas no incorporarían  $^{32}\text{P}$  cuando las membranas aisladas se sometieran a una reacción de autofosforilación con  $[\gamma\text{-}^{32}]\text{-ATP}$ . Al hacer la electroforesis y revelar la autorradiografía encontraríamos que en las células en que se hubiera producido fosforilaciones por efecto de los estímulos iniciales no habría incorporación de  $^{32}\text{P}$ , mientras que las proteínas no fosforiladas por los por efecto de los estímulos serían susceptibles de fosforilarse durante la incubación con  $[\gamma\text{-}^{32}]\text{-ATP}$ .

Los neutrófilos ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ ) se incubaron con tapsigargina  $0.5 \mu\text{M}$  o con PMA  $50 \text{ nM}$  durante 15 minutos, posteriormente se procedió a la extracción de la membrana con inhibidores de fosfatasa y a la reacción de autofosforilación con el  $[\gamma\text{-}^{32}]\text{-ATP}$  (vease Material y Método). La electroforesis se realizó en un gel de poli acrilamida durante 3 horas a  $180 \text{ V}$ . (Autorradiografía 2)

Los resultados mostraron que en la membrana aislada de neutrófilos se producen fenómenos de autofosforilación con las siguientes características:

-En la membrana de neutrófilos control se observaron dos proteínas fosforiladas de pesos moleculares de aproximadamente  $50$  y  $65 \text{ kDa}$ .

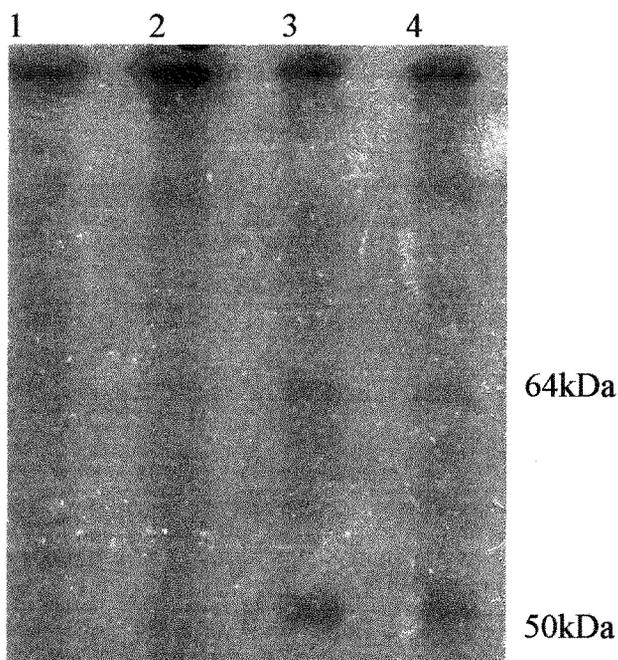
-En las células tratadas con tapsigargina no se modificó el patrón de autofosforilación observado en la preparación de membranas de células control, aparecían fosforiladas dos proteínas de pesos moleculares de  $50$  y  $65 \text{ kDa}$  aproximadamente.

-En la membrana de neutrófilos incubados con PMA durante 15 minutos no se encontró la fosforilación de estas proteínas, incluso cuando el medio de la fosforilación de la membrana se suplementó con el citosol de la célula.

-En el caso en que las células fueron tratadas con PMA conjuntamente con tapsigargina se observó el mismo patrón de fosforilación que cuando se incubaron con PMA solamente, no se observó la autofosforilación de proteínas con [ $\gamma$ - $^{32}$ ]-ATP.

Estos resultados hacen suponer que en los neutrófilos no sometidos a ningún estímulo o incubados con tapsigargina hay unas proteínas de aproximadamente 50 y 65 kD que no son fosforiladas por fósforo procedente de ATP endógeno, lo que posibilita la incorporación de  $^{32}$ P en el ensayo de autofosforilación.

En las células tratadas con PMA se fosforilan unas proteínas de 50 y 65 kDa aproximadamente, lo que imposibilita la incorporación del  $^{32}$ P en la reacción de autofosforilación.



**Autorradiografía 2.** Estudio de la fosforilación de proteínas de membrana en neutrófilos control y sometidos a tapsigargina, PMA y ambos inyectados conjuntamente. Las células se incubaron durante 15 minutos con PMA 50 nM (carril 1), con tapsigargina y PMA (carril 2), con tapsigargina 0.5  $\mu$ M (carril 3), y sin ningún estímulo (carril 4). Inmediatamente se aislaron las membranas y se procedió a la reacción de fosforilación con  $[\gamma\text{-}^{32}]\text{-ATP}$  durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente se desnaturalizaron las proteínas a 95°C durante 10 minutos y se realizó la electroforesis a 180 V durante 3 horas.

## **5.- DISCUSIÓN.**

## 5.1. EL MÉTODO.

### 5.1.1. MEDIDA DE QUIMIOLUMINISCENCIA.

Existen diferentes maneras de determinar la actividad de la NADPH oxidasa. Una de las más complejas conlleva la medida simultánea de superóxido y peróxido de hidrógeno por espectrofotometría de absorción. Sin embargo, este método es insensible y está sujeto a artefactos potenciales, que producen pequeños cambios en la transmisión de la luz.

Una mejora de la sensibilidad de la técnica, puede obtenerse con el uso de métodos fluorescentes o quimioluminiscentes de medida de peróxido de hidrógeno. Éste tiene capacidad para oxidar el p-hidroxifenilacetato, dando lugar a un compuesto fluorescente, o bien, puede oxidar el luminol formando un producto químicamente excitado, el 3 aminoftalato. En esta reacción se emite luz en proporción directa a la cantidad de  $H_2O_2$ . En estos casos es necesario minimizar las reacciones que convierten al anión  $O_2^-$  en otras especies diferentes de  $H_2O_2$  o especies no detectables por el método analítico (Wymann et al. 1987). Esto se consigue con la adición de la azida sódica, que inhibe la acción de enzimas celulares (mieloperoxidasas) que descomponen el  $H_2O_2$ .

Las principales ventajas que presenta la quimioluminiscencia son:

-la sensibilidad, ya que detecta producción de radicales libres en concentración mucho menores que con otros métodos, el número de células necesarios es por tanto considerablemente menor.

- la detección continua de los radicales que se van formando, y permite el estudio de la producción de radicales en células intactas.

- se puede acoplar un registrador, con lo que permite obtener una medida continua del grado de actividad de la NADPH oxidasa.

A pesar de las ventajas anteriormente citadas, que hacen de la quimioluminiscencia el método de elección para medir actividad de NADPH oxidasa, esta técnica puede presentar varios problemas. El luminol reacciona tanto con  $O_2^-$

como con  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^\cdot$  y  $^1\text{O}_2$ , por tanto no se puede saber cual está siendo el metabolito principal, aunque se aumenta la sensibilidad del método. El luminol actúa como un indicador de la producción de radicales, pero resulta muy difícil la medición de la cantidad absoluta producida. Aunque el luminol aumenta la sensibilidad del método para la detección de radicales de oxígeno, es cierto que introduce variables adicionales como son las posibles interferencias con la reacción de oxidación del luminol, o bien que el estado de las células altere la emisión de luz observada en ausencia de efectos directos de los estímulos sobre la producción de radicales. Es por tanto necesario un especial cuidado en la comprobación del efecto de cada uno de los solventes y reactivos utilizados, descartando aquellos que produzcan algún tipo de interferencia.

#### **5.1.2. DETERMINACIÓN DE LA APOPTOSIS CELULAR.**

El análisis del estado del DNA se ha considerado durante cierto tiempo suficientemente indicativo para diferenciar la muerte de una célula como apoptosis o necrosis. La aparición de bandas de DNA de peso molecular múltiplo de 180-200 pares de bases fue una de las primeras características de la muerte celular programada (Wyllie, 1980). No obstante, algunos autores encontraron que células que sufrían claramente un proceso de apoptosis, no presentaban el patrón característico de fragmentación del DNA anteriormente citado. Se sigue hoy especulando si los fragmentos de mayor tamaño que se observaban en estos casos, eran los precursores de los de menor tamaño, o si se corresponden con otro tipo de patrón de fragmentación llevado a cabo por las endonucleasa (Walker et al. 1991; Bortner et al. 1995). En este trabajo se han considerado además de los datos de fragmentación del DNA estudiados por electroforesis en agarosa, las características morfológicas que se derivan del estudio de las preparaciones celulares por microscopía óptica y electrónica: condensación de cromatina, formación de cuerpos apoptóticos, retracción del citosol. Son datos que confirman la muerte celular por apoptosis en cualquier tipo de célula independientemente del patrón de fragmentación del DNA.

## 5.2. LOS RESULTADOS.

Los neutrófilos son unas células con una vida media corta y es conocido que *in vivo* sufren una apoptosis espontánea en varias horas (Haslett, 1992). Una de sus principales funciones es la de defensa frente a agentes externos y para ello cuentan con un sistema de producción de radicales libres por la NADPH oxidasa (Babior et al., 1973). La activación de esta enzima se puede conseguir directamente a través de PKC (Christiansen, 1988). La gran producción de metabolitos reactivos del oxígeno por los neutrófilos, debido a su propia función de defensa, podría causar lesiones a nivel molecular y celular en los mismos neutrófilos que fueran las desencadenantes de la muerte rápida de estas células. En este trabajo se han tratado de relacionar las posibles implicaciones del  $\text{Ca}^{2+}$ , de la PKC y de los metabolitos reactivos del oxígeno en el desencadenamiento de la muerte programada en el neutrófilo, así como los diferentes mecanismos de acción de cada uno de los efectores citados.

### 5.2.1.- ACCIÓN DEL $\text{Ca}^{2+}$ COMO MEDIADOR DE LA APOPTOSIS EN EL NEUTRÓFILO.

Desde hace algún tiempo se vienen realizando estudios con el fin de aclarar la posible intervención del ion calcio en el desencadenamiento y desarrollo de la muerte celular por apoptosis. Los resultados que se han obtenido son diferentes y contradictorios según el tipo celular estudiado y la metodología utilizada para este fin. La mayoría de autores coincide en que un incremento en  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en una célula acelera o induce la apoptosis en la misma (McConkey et al. 1989b; McConkey et al. 1991; Caron-Leslie and Cidlowski, 1991; Jiang et al. 1994; Lam et al. 1994). No obstante, otros autores encuentran una inhibición del proceso de apoptosis al incrementarse el valor de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . (Rodriguez- Tarduchy et al. 1990, Baffy et al. 1993).

En neutrófilos, los pocos experimentos realizados con el fin de estudiar la intervención del calcio en la apoptosis apoyan la teoría de que un incremento en las concentraciones intracelulares de calcio ejerce una acción bloqueante de la apoptosis en estas células (Whyte et al. 1993). Los autores que encuentran que la apoptosis va

acompañada de incremento de  $[Ca^{2+}]_i$ , consideran que este hecho es secundario a la activación de las endonucleasas e inducción de la apoptosis (Lennon et al. 1992).

Sin embargo, en el presente trabajo los resultados obtenidos evidencian una relación directa entre el incremento en  $[Ca^{2+}]_i$  y el desencadenamiento de la apoptosis. Así se pone de manifiesto en los experimentos en que se tratan las células con tapsigargina. En este caso se observa una clara aceleración del proceso de apoptosis, acompañada de un incremento significativo, rápido y mantenido de los niveles de calcio intracelular. Estos resultados se avalan tanto por el estudio de los fragmentos del DNA en múltiplos de 180-200 pares de bases, como por el análisis de las características morfológicas que se observan en las fotografías realizadas en el microscopio electrónico, donde se evidencia la condensación de la cromatina y la aparición de los cuerpos apoptóticos.

De los resultados que se obtienen al estimular las células con tapsigargina y con PMA simultáneamente, se puede deducir que un incremento inicial en las  $[Ca^{2+}]_i$  no es suficiente para desencadenar la apoptosis en los neutrófilos, porque aunque en un primer momento se alcanzan valores similares de  $[Ca^{2+}]_i$  a los obtenidos por la acción exclusiva de la tapsigargina, en estas células incubadas con tapsigargina y PMA la apoptosis no tiene lugar y esto se acompaña de una estabilización del calcio en valores basales (ver Resultados, fotografía 3 y figura 1, panel D)

En células incubadas con PMA se observa una inhibición del proceso de apoptosis, ya que se bloquea incluso la apoptosis espontánea. Al mismo tiempo, se observa que en estas células tratadas con PMA, no sólo no se produce un incremento en  $[Ca^{2+}]_i$ , sino que se evita el incremento que tiene lugar de manera espontánea y que se pone de manifiesto en los experimentos realizados con neutrófilos incubados sin ningún estímulo (ver figura 1, panel C) Este incremento paulatino en las concentraciones de calcio en las células control, se puede deber a una difusión del calcio a través de la membrana plasmática.

El hecho de que el incremento de calcio intracelular en neutrófilos conduzca a una activación de la apoptosis, apoyaría en cierta medida la participación de una endonucleasa dependiente de calcio responsable de la degradación del DNA (Anzai et al., 1995). Aunque esto iría en contraposición con lo encontrado por algunos autores que rechazan la posible participación de una endonucleasa dependiente de

calcio y que mantienen la existencia de una única endonucleasa que actúa cuando el pH de interior celular disminuye lo suficiente para su activación (Gottlieb et al., 1995).

### 5.2.2.- PARTICIPACIÓN DE LA PKC EN LA APOPTOSIS DEL NEUTRÓFILO.

A pesar de los datos contradictorios que existen respecto a la participación de la PKC en la activación o inhibición de la apoptosis en diferentes células, (Lucas and Sanchez-Margalet, 1995), los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto que, en el neutrófilo y en las condiciones de experimentación descritas, la activación por PMA conduce a una inhibición de la apoptosis, tanto de la espontánea como la inducida por efectores que incrementan la concentración intracelular de calcio (ver fotografía 3).

A la vista de la relación existente por un lado entre  $[Ca^{2+}]_i$  y el desencadenamiento de la apoptosis, y por otro al hecho de que el PMA consigue bloquear la entrada de calcio en la células, cabe plantearse un posible mecanismo de actuación del PMA bloqueando la apoptosis a través de un control del calcio iónico intracelular.

El efecto del PMA de bloquear el incremento en la concentración de calcio ha sido descrito en diferentes tipos de células, (Sarkadi et al 1991; Bellomo et al. 1992; Shivnan et Alexander, 1995; Murphy et al., 1996), pero el mecanismo por el cual realiza esta acción no ha sido descifrado todavía.

El PMA es un activador bien conocido de la PKC. Cabe pensar que su mecanismo de acción esté mediado por la fosforilación de alguna proteína de membrana plasmática, diana de la PKC y que sea ésta la que de manera directa o indirecta bloquee la entrada de calcio en la célula. En los experimentos en que se trataron las células con tapsigargina y con PMA se encontró un incremento inicial de los niveles de calcio (ver figura 1, panel D), de donde se deduce que el PMA debe ejercer su acción a nivel del calcio que entra desde el exterior (la así denominada entrada capacitativa) y no sobre los depósitos intracelulares de calcio, donde ejerce su acción la tapsigargina. El vaciamiento de los depósitos intracelulares de calcio por acción de la tapsigargina sería el responsable del incremento inicial en  $[Ca^{2+}]_i$ . Por

este motivo cabe suponer que la proteína diana de la PKC sea una proteína de membrana plasmática implicada de alguna manera en la regulación de los niveles intracelulares de calcio.

En los experimentos diseñados para detectar la posible participación de esta proteína de membrana plasmática en este proceso, se encontró que, cuando se trataron las células con PMA, se producía la fosforilación de una proteína de membrana, que no tenía lugar cuando las células se incubaban con tapsigargina o en las células control. La fosforilación inducida por el PMA tiene lugar incluso en presencia de tapsigargina (ver Resultados, autorradiografía 2)

El bloqueo en la entrada de calcio por parte del PMA, puede considerarse incluso como un mecanismo de retroalimentación negativo que evite la activación permanente de la PKC, ya que la mayoría de las isoenzimas de PKC dependen para su actuación del calcio. Si se inhibe la entrada de calcio en la célula en cierta forma se explicará el mecanismo de acción del PMA inhibiendo la acción de la PKC.

En esta teoría sobre un posible mecanismo de acción de la PKC en la apoptosis, se podría encontrar una contradicción aparente, debido a que el calcio se comporta igualmente como activador de la PKC, como se demuestra en las células tratadas con ionóforo de calcio, A23187 o tapsigargina. En estas células se produce una activación de la NADPH oxidasa mediada por PKC, ya que el efecto estimulador sobre esta enzima se inhibe en presencia de estaurosporina. Se podría por tanto pensar que si en estas células se produce una activación de PKC, se produciría igualmente la fosforilación de proteínas de membrana, con el consiguiente bloqueo de los flujos de calcio, sin embargo esto no es así. En las células incubadas con tapsigargina no se encuentra la fosforilación de estas proteínas de membrana, ni el bloqueo de los flujos de calcio.

Pueden existir varias explicaciones para justificar esta situación:

-En los neutrófilos se han descrito diferentes isoenzimas de la PKC, entre ellas las más abundantes pertenecen al grupo de isoenzimas convencionales ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II). Estas se caracterizan porque requieren para su actuación tanto DAG o PMA, como calcio, (Dang et al., 1994) y posiblemente sean estas isoenzimas las responsables de

la activación de la NADPH oxidasa, cuando las células se incuban con tapsigargina. En este caso el calcio sería el responsable de la activación de la PKC. Pero en el neutrófilo existe además otra forma descrita de PKC, que es la isoforma  $\zeta$ , incluida dentro del grupo de isoenzimas atípicas, la cual en principio no necesita ni de PMA ni de calcio para su activación. No obstante se ha descrito que la incubación de los neutrófilos con PMA provoca una translocación de esta isoenzima a la membrana, y su consiguiente activación (Dang et al., 1995). La isoenzima  $\zeta$  podría por tanto ser la responsable de la fosforilación de la proteína de membrana que se observa cuando los neutrófilos se incuban con PMA, ya que no se necesita calcio para su activación. Esta isoenzima ejercería su acción sobre un sustrato diferente al de las isoenzimas ( $\alpha$ ,  $\beta$ I o  $\beta$ II), de esta manera quedaría justificado que sólo por acción de esta enzima se fosforilen las proteínas implicadas en el control de los niveles intracelulares de calcio.

-Por otro lado y aunque este trabajo esté centrado en la actuación de la tapsigargina y el PMA en los flujos de calcio y la activación de la PKC, no se puede ignorar el conjunto de reacciones paralelas que se pueden desencadenar con los dos agentes y que pueden ser las responsables indirectas de los efectos observados. Así por ejemplo, como resultado del tratamiento de las células con PMA se provoca un incremento en la actividad de la fosfolipasa D, con el consiguiente incremento de la producción de DAG y la variación en la composición lipídica de la membrana celular (López et al., 1995). Hay autores que han observado una variación tanto en el grado de activación como en el efecto final, según la activación de la PKC sea debida a la acción del PMA o del DAG (Slater et al., 1994; Asaoka et al., 1992). Igualmente se ha descrito que las acciones ejercidas por PKC difieren en función del grado y tiempo de activación. De hecho, el mantenimiento sostenido de la actividad de la PKC es el que se encuentra relacionado con procesos de diferenciación y proliferación celular, sin que se atribuyan estos efectos a un incremento momentáneo de la actividad de la PKC (Asaoka et al., 1992).

### 5.2.3. INTERVENCIÓN DE LOS METABOLITOS REACTIVOS DEL OXÍGENO (MRO) EN LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA DEL NEUTRÓFILO.

Los se consideran elementos desencadenantes de muerte por apoptosis en diferentes tipos celulares (Wolfe et al. 1994; Schieven et al. 1993; Mc Conkey and Orrenius, 1994). Concretamente en neutrófilos, se ha observado una relación entre la producción de radicales libres durante el proceso de infección por *E. coli* y el desencadenamiento de la apoptosis (Watson et al., 1996a).

Los neutrófilos son las principales células del organismo responsables del desencadenamiento de llamado estallido respiratorio, con la consiguiente aparición de los radicales libres que de éste se derivan,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^-$ . Dado que estas células tienen una vida media corta y sufren apoptosis espontánea (Haslett, 1992), se podría esperar que hubiera una relación directa entre la producción de MRO en los neutrófilos y el desencadenamiento de la apoptosis.

Sin embargo, a partir de los resultados que se derivan de la realización de este trabajo, no se encuentra una relación directa entre la mayor activación de la NADPH oxidasa y la aparición de la muerte celular en los neutrófilos. Cuando los neutrófilos se incuban en presencia de PMA, se consiguen los mayores niveles de activación de la NADPH oxidasa, que sólo se superan en los casos en que se estimulan las células conjuntamente con PMA y tapsigargina. Si se incuban las células en presencia de PMA, o de ambos efectores, durante 24 horas se podría esperar que los radicales libres formados por la activación de la NADPH oxidasa, actuaran como elementos desencadenantes de la apoptosis celular. Sin embargo en ninguno de los dos casos esto tiene lugar, ya que no se produce la fragmentación del ADN ni se aprecian variaciones significativas en la morfología celular estudiada al microscopio electrónico. De hecho el PMA inhibe la apoptosis espontánea y la dependiente de tapsigargina.

Cuando se incubaron las células en presencia de tapsigargina, se observó una activación en la NADPH oxidasa, y en estas células si se producía la apoptosis. Ahora bien no se puede atribuir a la activación de la NADPH oxidasa el desencadenamiento de la apoptosis ya que de ser así, la apoptosis debería aparecer con mucha mayor intensidad en los neutrófilos incubados con PMA o con PMA y tapsigargina.

Por otro lado, y de acuerdo con los datos anteriores al tratar las células con estaurosporina se encuentra una aceleración de la apoptosis, mientras que se encuentra una inhibición prácticamente total de la actividad de la NADPH oxidasa

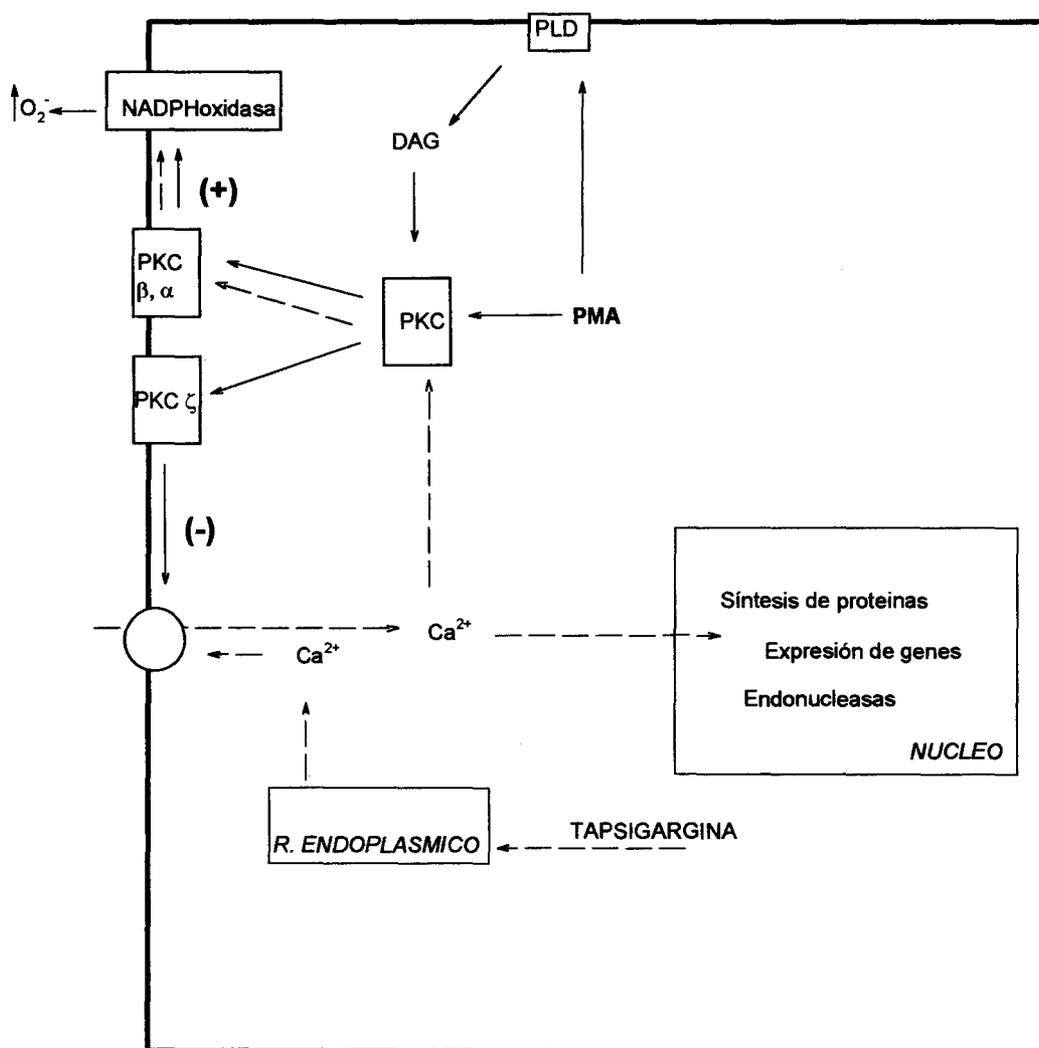
La activación de la NADPH oxidasa tanto por PMA como por tapsigargina está mediada por PKC. El calcio y los ésteres de forbol son conocidos activadores de las isoformas convencionales de PKC que son las que se encuentran mayoritariamente en neutrófilos (Morel et al., 1991; Spiegel et al., 1996). El efecto de la tapsigargina sobre la PKC puede estar mediado por calcio ya que el efecto es similar al provocado por el ionóforo de calcio, e igual que sucede con éste, si del medio de reacción se retira el calcio, la tapsigargina no produce la activación de la NADPH oxidasa.

De todos estos datos se deduce que tanto el PMA como la tapsigargina activan la PKC. Sin embargo tan solo en las células incubadas con tapsigargina se desencadena el proceso de la apoptosis. Por tanto no existe una relación directa entre ambos sucesos ya que el PMA es un potente activador de la PKC, así como un bloqueante de la apoptosis.

En un estudio reciente se ha encontrado una relación entre la presencia de radicales libres y una disminución a la sensibilidad a la apoptosis mediada por Fas (Clément and Stamenkovic, 1996). En presencia de estos agentes oxidantes se encuentra una disminución de la apoptosis inducida por la interacción de Fas a su ligando. Por otro lado en los neutrófilos existe una expresión mantenida de esta proteína. (Matsumoto et al., 1995). Estos datos concordarían con el hecho de que se encuentre una inhibición de la apoptosis en células tratadas con PMA pero no justificarían la apoptosis inducida por tapsigargina donde se encuentra también una elevación de la actividad de la NADPH oxidasa, ni el hecho de que en células tratadas con estaurosporina donde se encuentra una inhibición de la NADPH oxidasa se encuentre una activación del proceso de apoptosis

El hecho de que los MRO producidos no provoquen la activación de la apoptosis puede considerarse como un sistema de defensa de estas células frente a sus propios productos. La función de defensa del neutrófilo se podría afectar

negativamente en caso de una infección prolongada, o masiva si el exceso de MRO provocara la disminución del número de neutrófilos en las zonas afectadas.



*Esquema representativo del posible mecanismo de acción del PMA y de la tapsigargina a partir de los resultados obtenidos. Las flechas con línea continua marcan los efectos atribuidos al PMA, las flechas con línea discontinua los atribuidos a la tapsigargina. La tapsigargina inhibe la bomba de calcio del retículo endoplásmico, y da lugar a la entrada de calcio desde el exterior celular. El calcio*

activa las isoformas convencionales de PKC y consecuentemente se produce la activación de la NADPH oxidasa y el incremento en la producción de radicales libres. El incremento en la  $\text{Ca}^{2+}$  actuaría a nivel nuclear activando endonucleasas, factores de transcripción y enzimas que intervendrían en el desencadenamiento de la muerte celular. El PMA actuaría a través de las isoformas de PKC que no requieren calcio para su activación, en el neutrófilo la más abundante es la isoforma  $\zeta$ . Esta enzima tendría como sustrato proteínas de membrana que en función de su estado de fosforilación/defosforilación inhibiría/permitiría respectivamente la entrada de calcio. Por otro lado el PMA activaría directamente a la fosfolipasa D, se produciría un incremento en la concentración de DAG y la activación de las isoformas convencionales de PKC, responsables de la activación de la NADPH oxidasa.

## **6.- CONCLUSIONES.**

1.- El neutrófilo control, sin tratar, sufre un incremento paulatino en la concentración de calcio libre en el citoplasma,  $[Ca^{2+}]_i$ .

2.- En los neutrófilos existe una relación directa entre el incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  y el desencadenamiento de la apoptosis. El tratamiento de los neutrófilos con tapsigargina induce la entrada de calcio desde el espacio extracelular, simultáneamente se observa una aceleración de la muerte celular programada.

3.- El incremento en la concentración de calcio relacionado con la apoptosis debe ser sostenido, ya que incrementos transitorios en la concentración de calcio no supone una activación de la apoptosis.

4.- El éster de forbol PMA (forbol miristato acetato, agente promotor de tumores), tiene un efecto bloqueante de la entrada de calcio en neutrófilos. Bloquea tanto la entrada de calcio espontánea que ocurre en el neutrófilo, como la inducida por la tapsigargina. La incubación de los neutrófilos con tapsigargina y PMA da lugar a un incremento inicial de las concentraciones de calcio, que vuelve a sus valores basales a los pocos minutos. Esto pone de manifiesto que el PMA ejerce su acción sobre la entrada de calcio extracelular y no sobre la primera fase de deplección de los depósitos intracelulares.

5.- El PMA ejerce una acción bloqueante de la apoptosis en neutrófilos, evitando tanto la apoptosis espontánea como la que se induce con agentes que incrementan la concentración de calcio. El tratamiento con inhibidores de PKC conduce a una activación de la apoptosis en los neutrófilos. Por tanto se puede afirmar que la activación de PKC conduce a una inhibición de la apoptosis en los neutrófilos.

6.- En las células tratadas con PMA (tanto solo como con tapsigargina), se observa la fosforilación de unas proteínas de membranas de 50 y 65 kDa aproximadamente, que no se observan en las células tratadas con tapsigargina o en las células utilizadas como control..

7.- La producción de metabolitos reactivos del oxígeno (MRO), no supone la activación de la muerte por apoptosis, ya que al estimular la NADPHoxidasa por PMA se incrementa notablemente la producción de estos metabolitos sin encontrar en ningún caso una activación de la muerte celular programada. Es más, el PMA bloquea la apoptosis aún siendo un potente activador de la NADPH oxidasa, lo que evidencia que no existe una relación entre los metabolitos reactivos del oxígeno y la apoptosis en el neutrófilo.

8.- El tratamiento de las células con estaurosporina conduce a una disminución de la actividad de la NADPHoxidasa y sin embargo se observa una activación de la apoptosis. Esto confirma que no hay una participación de los metabolitos reactivos del oxígeno en el desencadenamiento de la apoptosis.

## **7.-BIBLIOGRAFÍA.**

Adachi, Y., Käs, E. and Laemmli, U.K. (1989).- *Preferential, cooperative binding of DNA topoisomerase II to scaffold-associated regions.* EMBO J. 8, 3997-4006.

Allen, R.C., Stjernholm, R.L. and Steele, R.H. (1972).- *Evidence for the generation of electronic situation states in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 679-684.

Alonso, M.T., Alvarez, J., Montero, M., Sanchez, A. and García Sancho, J. (1991).- *Agonist induced  $Ca^{2+}$  influx into human platelets is secondary to the emptying of intracellular  $Ca^{2+}$  stores.* Biochem. J. 280, 783-789.

Alonso-Torre, R., Alvarez, J., Montero, M. and García Sancho, J. (1993).- *Control of entry into HL60 and U937 human leukemia cells by the filling state of the intracellular  $Ca^{2+}$  stores.* Biochem. J. 289, 761-766.

Amati, B., Littlewood, T.D., Evan, G.I. and Land, H. (1993).- *The c-Myc protein induces cell cycle progression and apoptosis through dimerization with Max.* EMBO J. 12, 5083-5087.

Anzai, N., Kawabata, H., Hiramata, T., Masutani, H., Ueda, Y., Yoshida, Y. and Okuma, M. (1995).- *Types of nuclear endonucleasa activity capable of inducing internucleosomal DNA fragmentation are completely different between human  $CD34^{+}$  cells and their granulocytic descendants.* Blood 86, 917-923.

Arends, M.J., Morris, R.G. and Wyllie, A.H. (1990).- *Apoptosis. The role of the endonuclease.* Am. J. Pathol. 136, 593-608.

Asaoka, Y., Nakamura, S.I., Yoshida, K. and Nishizuda, Y. (1992).- *Proteinkinasa C, calcium and phospholipid degradation.* Trends Biochem. Sci. 17, 414-417.

Azuma, Y., Onishi, Y., Sato, Y. and Kizaki, H. (1993).- *Induction of mouse thymocyte apoptosis by inhibitors of tyrosine kinases is associated with dephosphorylation of nuclear proteins.* Cell Immunol. 152, 271-278.

Babior, B.M., Kipnes, R.S. and Curnutte, J.T. (1973).- *Biological defense mechanisms: the production by leukocytes of superoxide, a potencial bactericidal agent.* J. Clin. Invest. 52, 741-744.

Babior, G.L., Rosin, R.E., McMurrich, B.J., Peters, W.A. and Babior, B.M. (1981).- *Arrangement of the respiratory burst oxidase in the plasma membrane of the neutrophil.* J. Clin. Invest. 67, 1724-1728.

Baffy, G., Miyashita, T., Williamson, J. and Reed, J.C. (1993).- *Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 from an IL-3 dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production.* J. Biol. Chem. 268, 6511-6519.

Baldrige, C.W. and Gerard, R.W. (1933).- *The extra respiration of phagocytes.* Am. J. Physiol. 103, 235-236.

Bellomo, G., Perotti, M., Taddei, F., Mirabelli, F., Finardi, G., Nicotera, P. and Orrenius, S. (1992).- *Tumor necrosis factor  $\alpha$  induces apoptosis in mammary adenocarcinoma cells by an increase in intranuclear free  $Ca^{2+}$  concentration and DNA fragmentation.* Cancer Res. 52, 1342-1346.

Berridge, M.J. and Irvine, R.F. (1989).- *Inositol phosphate and cell signalling.* Nature 341, 197-205.

Berridge, M.J. (1991).- *Cytoplasmic calcium oscillations: a two pool model.* Cell Calcium 12, 63-72.

Bhalla, K., Ibrado, A.M., Tourkina, E., Tang, C., Grant, S., Bullock, G., Huang, Y., Ponnathpur, V. and Mahoney, M.E. (1993).- *High dose mitoxantrona induces programmed cell death or apoptosis in human myeloid leukemia cells.* Blood 82, 3133-3140.

Bissonnette, R.P., Echevarri, F., Mahboubi, A. and Green, R. (1992).- *Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2.* Nature 359, 552-554.

Boise, L.H., Gonzalez García, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nuñez, G. and Thompson, C.B. (1993).- *Bcl-x, a bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death.* Cell 74, 597- 608.

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

Boyum, A. (1968).- *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human peripheral blood.* Scand. J. Lab. Invest. 21, 77-89.

Bradbury, D., Zhu, Y.M. and Russell, N. (1994).- *Regulation of bcl-2 expression and apoptosis in acute myeloblastic leukaemia cells by granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor.* Leukemia 8, 786-791.

Bradford, M.M. (1976).- *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding.* Anal. Biochem. 72, 248-254.

Broome, H.E., Dargan, C.M., Krajewski, S. and Reed, J.C. (1995).- *Expression of Bcl-2, Bcl-x and Bax after T cell activation and IL-2 withdrawal.* J. Immunol. 155, 2311-2317.

Brumell, J.H., Burkhardt, A.L., Bolen, J.B. and Grinstein, S. (1996).- *Endogenous reactive oxygen intermediates activate tyrosine kinases in human neutrophils.* J. Biol. Chem. 271, 1455-1461.

Campbell, A.K. (1986).- *Living light: chemiluminiscence in the research and clinical laboratory.* Trends Biochem. Sci. 11, 104-108.

Caron-Leslie, L.A. and Cidlowski, J.A. (1991).- *Similar actions of glucocorticoids and calcium on the regulation of apoptosis in S49 cells.* Mol. Endocrinol. 5, 1169-1179.

Caron-Leslie, L.A., Schwartzman, R.A., Gaido, M.L., Compton, M.M. and Cidlowski, J.A. (1991).- *Identification and characterization of glucocorticoid-regulated nuclease(s) in lymphoid cells undergoing apoptosis.* J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 40, 661- 671.

- Chen, C-Y. and Faller, D.V. (1995).- *Direction of p21<sup>ras</sup>-generated signals towards cell growth or apoptosis is determined by protein kinase C and Bcl-2.* Oncogene 11, 1487-1498.
- Chen, C-Y and Faller, D.V. (1996).- *Phosphorylation of Bcl-2 protein and association with p21<sup>ras</sup> in Ras-induced apoptosis.* J. Biol. Chem. 271, 2376-2379.
- Chen-Levy, Z., Nourse, J. and Clearly, M.L. (1989).- *The bcl-2 candidate proto-oncogen product is a 24 kilodalton integral-membrane protein highly expressed in lymphoid cell lines and lymphoma carrying the t(14;18).* Mol. Cell. Biol. 9, 701-710.
- Christiansen, N.O. (1988).- *A time-course study on superoxide generation and protein kinase C activation in human neutrophils.* FEBS Lett. 239, 195-198.
- Clément, M.V. and Stamenkovic, I. (1996).- *Superoxide anion is a natural inhibitor of Fas-mediated cell death.* EMBO J. 15, 216-225.
- Cockcroft, S., Nielson, C.P. and Stutchfield, J. (1991).- *Is phospholipase A<sub>2</sub> activation regulated by G protein ?* Biochem. Soc. Trans. 19, 333-336.
- Cohen, J.J. and Duke, R.C. (1984).- *Glucocorticoid activation of a calcium dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death .* J. Immunol. 132, 38-42.
- 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.
- Curnutte, J.T., Erickson, R.W., Ding, J. and Badwey, J.A. (1994).- *Reciprocal interaction between Protein Kinase C and components of the NADPH oxidase complex may regulate superoxide production by neutrophils stimulated with a phorbol ester.* J. Biol. Chem. 269, 10813-10819.
- Dang, P.M.C., Hakim, J. and Perianin, A. (1994).- *Immunochemical identification and translocation of Protein Kinase C zeta in human neutrophils.* FEBS Lett. 349, 338-342.

- Dang, P.M.C., Rais, S., Hakim, J. and Perianin, A. (1995).- *Redistribution of Protein Kinase C isoforms in human neutrophils stimulated by peptides and Phorbol Myristate Acetate.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 212, 664-672.
- Dewald, B., Baggioleni, M., Curntte, J.T., Babior, B.M. (1979).- *Subcellular localization of the superoxide forming system in human neutrophils.* J. Clin. Invest. 63, 21-29.
- Didsbury, J.R., Webwer, R.F., Bokoch, G.M., Evans, T., and Snyderman, R. (1989).- *Rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrate.* J. Biol. Chem. 264, 16378-16382.
- Dowd, D.R., MacDonald, P.N., Komm, B.S., Maussler, M.R. and Miesfeld, R. (1991).- *Evidence for early induction of calmodulin gene expression in lymphocytes undergoing glucocorticoid-mediated apoptosis.* J. Biol. Chem. 266, 18423-18426.
- Dransfield, Y., Stocks, S.C. and Haslett, C. (1995).- *Regulation of cell adhesion molecule expression and function associated with neutrophils apoptosis.* Blood 85, 3264-3273.
- Dupont, G., Berridge, M.J. and Goldbeter, A. (1991).- *Signal induced  $Ca^{2+}$  oscillations: Properties of a model based on  $Ca^{2+}$  induced  $Ca^{2+}$  release.* Cell Calcium 12, 73-85.
- Duvall, E., Wyllie, A.H. and Morris, R.G. (1985).- *Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis).* Immunology 56, 351-358.
- Duvall, E. and Wyllie, A.H. (1986).- *Death and the cell.* Immunol. Today 7, 115-119.
- Ellis, H.M. and Horvitz, H.R. (1986).- *Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*.* Cell 44, 817-829.
- Ellis, R.E., Yuan, J. and Horvitz, H.R. (1991).- *Mechanisms and functions of cell death.* Annu. Rev. Cell Biol. 7, 663-698.
- Fanidi, A., Harrington, E.A. and Evan, G.I. (1992).- *Cooperative interaction between *c-myc* and *bcl-2* proto-oncogenes.* Nature 359, 554-556.

Fernandez, A., Kiefer, J., Fosdick, L. and McConkey, D.J. (1995).- *Oxygen radical production and thiol depletion are required for  $Ca^{2+}$  mediated endogenous endonuclease activation in apoptotic thymocytes.* J. Immunol. 155, 5133-5139.

Fesus, L., Davies, P.J.A. and Piacentini, M. (1991).- *Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death.* Eur. J. Cell Biol. 56, 170-177.

Fukumoto, Y., Kabuchi, K., Hori, Y., Fujiok, H., Araki, S., Ueda, T., Kikuchi, A. and Takai, Y. (1990).- *Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21- like small GTP- binding proteins.* Oncogene 5, 1321-1328.

Furuya, Y., Lundmo, P., Short, A.D., Gill, D.L. and Isaacs, J.T. (1994).- *The role of calcium, pH and cell proliferation in the programmed (apoptotic) death of androgen-independent prostatic cancer cells induced by thapsigargin.* Cancer Res. 54, 6167-6175.

Gaido, M.L. and Cidlowski, J.A. (1991).- *Identification, purification, and characterization of a calcium-dependent endonuclease (NUC18) from apoptotic rat thymocytes.* J. Biol. Chem. 266, 18580-18585.

Gasmi, L., McLennan, A.G. and Edwards, S.W. (1996).- *The diadenosine polyphosphates  $Ap_3A$  and  $Ap_4A$  and adenosine triphosphate interact with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to delay neutrophil apoptosis: implications for neutrophil : platelet interactions during inflammation.* Blood 87, 3442-3349.

Ghosh, T.K., Mullaney, J.M., Tarazi, F.I. and Gill, D.L. (1989).- *GTP-activated communication between distinct inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive and -insensitive calcium pools.* Nature 340, 236-239.

Golstein, P., Ojcius, D.M. and Young, D.E. (1991).- *Cell death mechanisms and the immune system.* Immunol. Rev. 121, 29-65.

Gottlieb, R.A., Giesing, H.A., Engler, R.L. and Babior, B.M. (1995).- *The acid deoxyribonuclease of neutrophils: a possible participant in apoptosis-associated genome destruction.* Blood 86, 2414-2418.

Grynkiewicz, G., Poeni, M. and Tsein, R.Y. (1985).- *A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence property.* J. Biol. Chem. 260, 3440-3450.

Grzeskowiak, M., Della Bianca V., Cassatella, M.A. and Rossi, F. (1986).- *Complete dissociation between the activation of phosphoinositide turnover and of NADPHoxidase by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils depleted of Ca<sup>2+</sup> and primed by subthreshold doses of phorbol 12 myristate, 13 acetate.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 135, 785-794.

Ha, K.S. and Exton, J.H. (1993).- *Differential translocation of protein kinase C isozymes by thrombin and platelet-derived growth factor. A possible function for phosphatidylcholine-derived diacylglycerol.* J. Biol. Chem. 268, 10534-10539.

Hannun, Y.A. and Obeid, L.M. (1995).- *Ceramide: an intracellular signal for apoptosis.* Trends Biochem. Sci. 20, 73-77.

Haslett, C. (1992).- *Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in the tissue fate of granulocytes.* Clin. Sci. 83, 639-648

Hechtenberg, S. and Beyersmann, D. (1993).- *Differential control of free calcium and free zinc levels in isolated bovine liver nuclei.* Biochem. J. 289, 757-760.

Hengartner, M.O., Ellis, R.E. and Horvitz, H.R. (1992).- *Caenorhabditis elegans gene ced-9 protects cells from programmed cell death.* Nature 356, 494-499.

Henson, P.M. and Johnston, R.B. (1987).- *Tissue injury in inflammation: oxidants, proteinases and cationic proteins.* J. Clin. Invest. 79, 669-674.

Hermeking, H. and Eick, D. (1994).- *Mediation of c-Myc induced apoptosis by p53.* Science 265, 2091-2093.

- Hewish, D.R. and Burgoyne, L.A. (1973).- *Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regulatory sites by a nuclear deoxyribonuclease.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 504-510.
- Heyworth, P.G., Bohl, B.P., Bockoch, G.M., and Curnutte, J.T. (1994).- *Rac translocates independently of the neutrophil NADPHoxidase components p47<sup>phox</sup> and p67<sup>phox</sup>.* J. Biol. Chem. 269, 30749-30752.
- Hockenberry, D., Nuñez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D. and Korsmeyer, S.J. (1990).- *Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death.* Nature 348, 334-336.
- Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X-M., Milliman, C.L. and Korsmeyer, S.J. (1993).- *Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis.* Cell 75, 241-251.
- Ikemoto, H., Tani, E., Matsumoto, T., Nakano, A. and Furuyama, J.I. (1995).- *Apoptosis of human glioma cells in response to calphostin C a specific protein kinase C inhibitor.* J. Neurosurg. 83, 1008-1016.
- Iseki, R., Kudo, Y. and Iwata, M. (1993).- *Early mobilization of Ca is not required for glucocorticoid-induced apoptosis in thymocytes.* J. Immun. 151, 5198-5207.
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., and Nagata, S. (1991).- *The polipeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediated apoptosis.* Cell 66, 233-243.
- Iwai, K., Miyawaki, T., Takizawa, T., Konno, A., Ohta, K., Yachie, A., Seki, H. and Taniguchi, N. (1994).- *Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti -Fas mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes and neutrophils.* Blood 84, 1201-1208.
- Jacobson, M.D., Burne, J.F., King, M.P., Miyashita, T., Reed, J.C. and Raff, M.C. (1993).- *Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA.* Nature 361, 365-369.

Jacobson, M.D. (1996).- *Reactive oxygen species and programmed cell death*. Trends Biochem. Sci. 21, 83-86.

Jaken, S. (1996).- *Protein kinase C isozymes and substrates*. Curr. Opin. Cell Biol. 8, 168-173.

Jarvis, W.D., Turner, A.J., Povirk, L.F., Traylor, R.S. and Grant, S. (1994a).- *Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death in HL-60 human promyelocytic leukemia cells by pharmacological inhibitors of protein kinase C*. Cancer Res. 54, 1707-1714.

Jarvis, W.D., Kolesnick, R.N., Fornari F.A., Traylor, R.S., Gerwitz, D.A. and Grant, S. (1994b).- *Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91, 73-77.

Jiang, S.A., Chow, S.C., Nicotera, P. and Orrenius, S. (1994).- *Intracellular  $Ca^{2+}$  signals activate apoptosis in thymocytes. Studies using the  $Ca^{2+}$  ATPase inhibitor, thapsigargin*. Exp. Cell Res. 212, 84-92.

Jones, J. and Morgan, B.P. (1995).- *Apoptosis is associated with reduced expression of complement regulatory molecules, adhesion molecules, and other receptors on polymorphonuclear leucocytes: functional relevance and role in inflammation*. Immunology 86, 651-660.

Kadri-Hassani, N., Lèger, C.L. and Descomps, B. (1995).- *The fatty bimodal action on superoxide anion production by human adherent monocytes under phorbol 12-myristate 13-acetate or diacylglycerol activation can be explained by the modulation of protein kinase C and  $p47^{phox}$  translocation*. J. Biol. Chem. 270, 15111-15118.

Kao, J.P.Y., Harootunian, A.T. and Tsien, R.Y. (1989).- *Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by Fluo-3*. J. Biol. Chem. 264, 8179-8184.

Kauffmann, 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.

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.

Kleinberg, M.E., Malech, H.L. and Rotrosen, D. (1990).- *The phagocyte 47-kilodalton cytosolic oxidase protein is an early reactant in activation of the respiratory burst.* J. Biol. Chem. 265, 15577-15583.

Kreimeyer, A., Wielckns, K., Adamietz, P. and Hilz, H. (1984).- *DNA repair associated ADP ribosylation in vivo. Modification of histone H1 differs from that of the principal acceptor proteins.* J. Biol. Chem. 259, 890-896.

Kutsumi, H., Kaway, K., Johnston, R.B. and Rokutan, K. (1995).- *Evidence for participation of vicinal dithiols in the activation sequence of the respiratory burst of human neutrophils.* Blood 85, 2556-2569.

Lagasse, E. and Weissman, Y. (1994).- *bcl-2 inhibits apoptosis of neutrophils but not their engulfment by macrophages.* J. Exp. Med. 179, 1047-1052.

Lam, M., Dubyak, G., Chen, L., Nuñez, G., Miesfeld, R.L. and Distelhorst, C.W. (1994).- *Evidence that bcl-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated  $Ca^{2+}$  fluxes.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 6569-6573.

Lebrun, D.P., Warnke, R.A. and Clearly, M.L. (1993).- *Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis.* Am. J. Pathol. 142, 743-753.

Lennon, S.V., Kilfeather, S.A., Hallett, M.B., Campbell, A.K. and Cotter, T.G. (1992).- *Elevation in cytosolic free  $Ca^{2+}$  are not required to trigger apoptosis in human leukaemia cells.* Clin. Exp. Immunol. 87, 465-471.

Lerner, A., Jacobson, B. and Miller, R. (1988).- *Cyclic AMP concentrations modulate both calcium flux and hydrolysis of phosphatidylinositol phosphates in mouse T lymphocytes.* J. Immunol. 140, 936-940.

- Lew, P.D. , Wollheim, C.B., Waldvogel, F.A. and Pozzan, T. (1984).- *Modulation of cytosolic free calcium transients by changes in intracellular calcium buffering capacity. Correlation with exocytosis and O<sub>2</sub> production in human neutrophils.* J. Cell Biol. 99, 1212-1220.
- Liao, T.H. (1985).- *The subunit structure and active site sequence of porcine spleen deoxyribonuclease.* J. Biol. Chem. 260, 10708-10713.
- Liles, W.C., Dale, D.C. and Klebanoff, S.J. (1995).- *Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils.* Blood 86, 3181-3188.
- Liu, J., Mathias, S., Yang, Z. and Kolesnick, R.N. (1994).- *Renaturation and TNF $\alpha$  stimulation of a 97 kDa ceramide-activated protein kinases.* J. Biol. Chem. 269, 3047-3052.
- Lomax, K.J., Leto, T.L., Nuno, H., Gallig, J.I. and Malech, H.J. (1989).- *Recombinant 47 kilodalton cytosol factor restores NADPHoxidase in chronic granulomatous disease.* Science 246, 987.
- López, I., Burns, D.J. and Lambeth, J.D. (1995).- *Regulation of phospholipase D by protein kinase C in human neutrophils.* J. Biol. Chem. 270, 19465-19472.
- Lucas, M., Schmid, G., Kromas, R. and Loeffler (1978).- *Calcium metabolism and enzyme secretion in guinea pig pancreas. Uptake and release of calcium in whole cells and mitochondrial and microsomal fractions.* Eur. J. Biochem. 85, 608-619.
- Lucas, M., Galván, A., Solano, F. and Goberna, R. (1983).- *Compartmentation of calcium in digitonin-disrupted guinea pig pancreatic acinar cell.* Biochem. Biophys. Acta 731, 129.
- Lucas, M., Solano, F. and Sanz, A. (1991).- *Induction of programmed cell death (apoptosis) in mature lymphocytes.* FEBS Lett. 279, 19-20.
- Lucas, M., Sanchez-Margalet, V., Sanz, A. and Solano, F. (1993).- *Protein kinase C activation promotes cell survival in mature lymphocytes prone to apoptosis.* Biochem. Pharmacol. 47, 667-672.

- Lucas, M. and Sanchez Margalet, V. (1995).- *Protein Kinase C involvement in Apoptosis*. Gen. Pharmac. 26, 881-887.
- Lytton, J., Westlin, M. and Hanley, M.R. (1991).- *Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps*. J. Biol. Chem. 266, 17067-17071.
- Macfarlane, D.E. and O'Donnell, P.S. (1993).- *Phorbol ester induces apoptosis in HL-60 promyelocytic leukemia cells but not in HL-60 PET mutant*. Leukemia 7, 1846-1851.
- Mariggio, M.A., Fulle, S., Calissano, P., Nicoletti, Y. and Fano, G. (1994).- *The brain protein S-100ab induces apoptosis in PC12 cells*. Neuroscience 60, 29-35.
- Martin, S.J., Lennon S.V., Bonham, A.M. and Cotter, T.G. (1990).- *Induction of apoptosis (programed cell death) in human leukemic cells by inhibition of RNA or protein synthesis*. J. Immunology 145, 1859-1867.
- Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P., McGahon, A.J., Rader, J.A., van Schie, R.C., LaFace, D.M. and Green, D.R. (1995).- *Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl*. J. Exp. Med. 182, 1545-1556.
- Matsumoto, K., Schleimer, R.P., Saito, H., Likura, Y. and Bochner, B.S. (1995).- *Induction of apoptosis in human eosinophils by anti-Fas antibody treatment in vitro*. Blood 86, 1437-1443.
- Matter, N., Ritz, M.F., Freyermuth, S., Rogue, P. and Malviya, A.N. (1993).- *Stimulation of nuclear protein kinase C leads to phosphorylation of nuclear inositol 1,4,5- trisphosphate receptor and accelerated calcium release by inositol 1,4,5 trisphosphate from rat liver nuclei*. J. Biol. Chem. 268, 732-736.
- May, W.S., Tyler, P.G., Armstrong, D.K. and Davidson, N.E. (1993).- *Role for serine phosphorylation of Bcl-2 in an antiapoptotic signaling pathways triggered by IL-3, EPO, and bryostain*. Blood 82, 1738.

McConkey, D.J., Nicotera, P., Hartzell, D.J., Bellomo, G., Wyllie, A.H. and Orrenius, S. (1989a).- *Glucocorticoids activate a suicide process in thymocytes through an elevation of cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration.* Arch. Biochem. Biophys. 269, 365-370.

McConkey, D.J., Hartzell, P., Nicotera, P. and Orrenius, S. (1989b).- *Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thymocytes.* FASEB J. 3, 1843-1849.

McConkey D.J., Orrenius, S. and Jondal, M. (1990).- *Cellular signaling in programmed cell death (apoptosis).* Immunol. Today 11, 120-121.

McConkey, D.J., Aguilar-Santelises, M., Hartzell, P., Eriksson, Y., Mellstedt, H., Orrenius, S. and Jondal, M. (1991).- *Induction of DNA fragmentation in chronic B-lymphocytic leukemia cells.* J. Immunol. 146, 1072-1076.

McConkey, D.J. and Orrenius, S. (1994).- *Signal transduction pathways to apoptosis.* Trends Cell Biol. 4,370-375.

Meagher, L.C., Cousin, J.M., Seckl, J.R. and Haslett, C. (1996).- *Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes.* J. Immunol. 156, 4422- 4428.

Mercep, M., Noguchi, P.D. and Ashwell, J.D. (1989).- *The cell cycle block and lysis of an activated T-cell hybridoma are distinct processes with different  $Ca^{2+}$  requirements and sensitivity to cyclosporine A.* J. Immunol. 142, 4085-4092.

Miyashita, T. and Reed, J.C. (1993).- *Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy- induced apoptosis in a human leukemia cell line.* Blood 81, 151-157.

Montero, M., García Sancho, J. and Alvarez, J. (1993).- *Transient inhibition by chemotactic peptide of a store-operated  $Ca^{2+}$  entry pathway in human neutrophils.* J. Biol. Chem. 268, 13055-13061.

- Morel, F., Doussiere, J. and Vignais, V. (1991).- *The superoxide generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects.* Eur. J. Biochem. 201, 523-546.
- Munn, D.H., Beall, A.C., Song, D., Wrenn, R.W. and Throckmorton, D.C. (1995).- *Activation-induced apoptosis in human macrophage: developmental regulation of a novel cell death pathway by macrophage colony-stimulating factor and interferon  $\gamma$ .* J. Exp. Med. 181, 127-136.
- Murphy, C.T., Bullock, A.J. and Westwick, J. (1996).- *A role for protein phosphorylation in modulating  $Ca^{2+}$  elevation in rabbit platelets treated with thapsigargin.* Biochem. J. 313, 83-89.
- Nauseff, W.M., Volpp, B.D., McCornick, S., Leidal, K.G. and Clark, R.A. (1991).- *Assembly of the neutrophil respiratory burst. Proteinkinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components.* J. Biol. Chem. 266, 5911-5917.
- Newton, A.C. (1995).- *Seeing two domains.* Curr. Biol. 5, 973-976.
- Nicotera, P., McConkey, D.J., Jones, D.P and Orrenius, S. (1989).- *ATP stimulated  $Ca^{2+}$  uptake and increases in the free  $Ca^{2+}$  concentration in isolated rat liver nuclei.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 453-457.
- Nicotera, P., Orrenius, S., Nilsson, T. and Berggren, P.O. (1990).- *An inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive  $Ca^{2+}$  pool in liver nuclei.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6858-6862.
- Nicotera, P., Zhivotovsky, B. and Orrenius, S. (1994).- *Nuclear calcium transport and the role of calcium in apoptosis.* Cell Calcium 16, 279-288.
- Nieto, M.A. and López-Rivas, A. (1989).- *IL-2 protects T lymphocytes from glucocorticoid-induced DNA fragmentation and cell death.* J. Immunol. 143, 4166-4170.
- Nosseri, C., Coppola, S. and Ghibelli, L. (1994).- *Possible involvement of poly (ADP-ribose) polymerase in triggering stress-induced apoptosis.* Exp. Cell Res. 212, 367-373.

Obeid, L M., Linardic, C.M., Karolak, L.A. and Hannun, Y.A. (1993).- *Programmed cell death induced by ceramide*. Science 259, 1769-1771.

Oberhammer, F., Bursch, W., Parzefall, W., Breit, P., Erber, E., Stadler, M. and Shulte-Hermann, R. (1991).- *Effect of transforming growth factor  $\beta$  on cell death of cultured rat hepatocytes*. Cancer Res. 51, 2478-2485.

Oberhammer, F., Pavelka, M., Sushitra, S., Tiefenbacher, R., Purchio, A.F., Bursch, W. and Schulte-Hermann, R. (1992).- *Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor  $\beta$ 1*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5408-5412.

Oehm, A., Behrmann, Y., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li, W.M., Richards, S. and Trauth, B.C. (1992).- *Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve*. J. Biol. Chem. 267, 10709-10715.

O'Flaherty, J.T., Jacobson, D.P., Redman J.F. and Rossi, A.G. (1990).- *Translocation of Protein Kinase C in human polymorphonuclear neutrophils*. J. Biol. Chem. 265, 9146-9152.

Ohta, H., Yatomi, Y., Sweeney, E.A., Hakomori, S. and Igarasi, Y. (1994).- *A possible role of sphingosine in induction of apoptosis by tumor necrosis factor- $\alpha$  in human neutrophils*. FEBS Lett. 355, 267-270.

Oishi, K. and Yamaguchi, M. (1993).- *Effect of nicotinamide-adenine dinucleotides on  $Ca^{2+}$  transport system in rat liver nuclei: stimulation of  $Ca^{2+}$  release by  $NAD^+$* . Mol. Cell Biochem. 121, 127-133.

Ojeda, F., Guarda, M.I., Maldonado, C. and Folch, H. (1990).- *Protein kinase C involvement in thymocyte apoptosis induced by hydrocortisone*. Cell Immunol. 125, 535-539.

Oltvai, Z.N., Millman, C.L. and Korsmeyer, S.J. (1993).- *Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death*. Cell 74, 609-619.

- Osborne, B.A. and Schwartz, L.M. (1994).- *Essential genes that regulate apoptosis*. Trends Cell Biol. 4, 394-398.
- Owens, G.P., Hahn, W.E. and Cohen, J. (1991).- *Identification of mRNAs associated with programmed cell death in immature thymocytes*. Mol. Cell Biol. 11, 4177-4188.
- Owen-Schaub, L.B., Radinsky, R., Kruzel, E., Berry, K. and Yonehara, S. (1994).- *Anti-Fas on nonhematopoietic tumors: levels of Fas/APO-1 and bcl-2 are not predictive of biological responsiveness*. Cancer Res. 54, 1580-1586.
- Peitsch, M.C., Muller, C. and Tschopp, J. (1993a).- *DNA fragmentation during apoptosis is caused by fragment single strand cuts*. Nucleic Acid Res. 18, 4206-4209.
- Peitsch, M.C., Polzar, B., Stephan, H., Crompton, T., MacDonald, H.R., Mannherz, H.G. and Tschopp, J. (1993b).- *Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis*. EMBO J. 12, 371-377.
- Peitsch, M.C., Mannherz, H.G. and Tschopp, J. (1994).- *The apoptosis endonucleases: cleaning up after death?* Trends Cell Biol. 4, 37-41.
- Pfaffle, P., Gerlach, V., Bunzel, L. and Jackson, V. (1990).- *In vitro evidence that transcription-induced stress causes nucleosome dissolution and regeneration*. J. Biol. Chem. 265, 16830-16840.
- Polzar, B. and Mannherz, H.G. (1990).- *Nucleotide sequence of a full length cDNA clone encoding the deoxyribonuclease I from the rat parotid gland*. Nucleic Acids Res. 18, 7151.
- Pozzan, T., Lew, D.P., Wollheim, C.B. and Tsien, R.Y. (1983).- *Is cytosolic ionized calcium regulating neutrophil activation?* Science 211, 1413-1415.
- Quin, M.T., Parkos, C.A., Walker, L., Orkin, S.H., Dinauer, M.C. and Jesaitis, A.J. (1989).- *Association of a Ras-related protein with cytochrome b of human neutrophils*. Nature 342, 198-200.

- Rasmussen, U., Christensen, S.B. and Sandberg, F. (1978).- *Thapsigargin and thapsigargin, two new histamine liberators from Thapsia garganica*. Acta Pharmaceut. Suec. 15, 133-140.
- Reed, J.C., Cuddy, M., Slabiak, T., Croce, C.M. and Nowell, P.C. (1988).- *Oncogenic potential of bcl-2 demonstrated by gene transfer*. Nature 336, 259-261.
- Reed, J.C. (1995).- *Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance*. Curr. Opin. Oncol. 7, 541-546.
- Rice, W.G., Hillyer, C.D., Harten, B., Schaeffer, C.A., Dorminy, M., Lackey, D.A., Kirsten, E., Mendeleyev, J., Buki, K.G., Hakam, A. and Kun, E. (1992).- *Induction of endonuclease-mediated apoptosis in tumor cells by c-nitroso -substituted ligands of poly(ADP-ribose) polimerase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 7703-7707.
- Robison, J.M., Badwey, J.A., Karnovsky, M.L. and Karnovsky, M.J. (1985).- *Release of superoxide and changes in morphology by neutrophil in response to phorbol esters: antagonism by inhibition of calcium-binding protein*. J. Cell Biol. 101, 1052-1058.
- Rodriguez-Tarduchy, G., Collins, M. and López-Rivas, A. (1990).- *Regulation of apoptosis in interleukin-3-dependent hemopoietic cells by interleukin-3 and calcium ionophores*. EMBO J. 9, 2997-3002.
- Ross, C.A., Meldolesi, J., Milner, T.A., Satoh, T., Supattapone, S. and Snyder, S.H. (1989).- *Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor localized to endoplasmic reticulum in cerebellar Purkinje neurons*. Nature 339, 468-470.
- Rossi, A.G., Cousin, J.M., Drandsfield, Y., Lawson, M.F., Chilvers, E.R. and Haslett, C. (1995).- *Agents that elevates cAMP inhibit human neutrophil apoptosis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 217, 892-899
- Rossier, M.F., Bird, G.J., and Putney, J.W. (1991).- *Subcellular distribution of the calcium-storing inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive organelle in rat liver*. Biochem. J. 274, 643-650.

Royer-Pokora, B., Kunkel, L.M., Monaco, A.P., Goff, S.C., Newburger, P.E., Baehner, R.L., Cole, F.S., Curnutte, J.T. and Orkin, S.H. (1986).- *Cloning the gene for an inherited human disorder-chronic granulomatous disease on the basis of its chromosomal localization.* Nature 322, 32-38.

Sambrook, J.F. (1990).- *The involvement of calcium in transport of secretory proteins from the endoplasmic reticulum.* Cell 61, 197-199.

Sanchez, V., Lucas, M., Sanz, A. and Goberna, R. (1992).- *Decrease protein kinase C activity is associated with programmed cell death (apoptosis) in freshly isolated rat hepatocytes.* Bioscience Reports 12, 199-206.

Sanchez, V., Lucas, M., Solano, F. and Goberna, R. (1993).- *Sensitivity of insulin-secreting RINm5F cells to undergoing apoptosis by the protein kinase C inhibitor staurosporina.* Exp. Cell Res. 209, 160-163.

Sarkadi, B., Tordai, A., Homolya, L., Scharff, O. and Gardos, G. (1991).- *Calcium influx and intracellular calcium release in anti-CD3 antibody stimulated and thapsigargin treated human T lymphoblasts.* J. Membrane Biol. 123, 9-21.

Sato, T., Hanada, M., Bodrug, S., Irie, S., Iwama, N., Boise, L.H., Thompson, C.B., Golemis, E., Fong, L., Wang, H.G. and Reed, J.C. (1994).- *Interaction among members of the bcl-2 protein family analyzed with a yeast two hybrid system.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 9238-9242.

Savill, J.S., Wyllie, A.H., Henson, J.E., Walport, M.J., Henson, P.M. and Haslett, C. (1989).- *Macro-phage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation.* J. Clin. Invest. 83, 865-875.

Savill, J., Dransfield, Y., Hogg, N. and Haslett, C. (1990).- *Vitronectin receptor mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis.* Nature 343, 170-173

Sbarra, A.J. and Karnovsky, M.L. (1959).- The biochemical basis of phagocytosis: Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. J. Biol. Chem. 234, 1355-1362.

Schieven, G.L., Kiriwara, J.M., Myers, D.E., Ledbetter, J.A. and Uckun, F.M. (1993).- *Reactive oxygen intermediates activate NF $\kappa$ B in a tyrosine kinase dependent mechanism and in combination with vanadate activate the p56lck and p59fyn tyrosin kinases in human lymphocytes.* Blood 82, 1212-1220

Schieven, G.L. and Ledbetter, J.A. (1994).- *Activation of tyrosin kinase signal pathways by radiation and oxidative stress.* Trend. Endocrinol. Metab. 5, 383-388.

Schulze-Osthoff, K., Krammer, P.H. and Dröge, W. (1994).- *Divergent signalling via APO-1/Fas and the TNF receptor, two homologous molecules involved in physiological cell death.* EMBO J. 13, 4587-4596.

Schwartz, L.M., Kosz, L. and Kay, B.K. (1990).- *Gene activation is required for developmentally programmed cell death.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6594-6598.

Segal, A.W., West, J., Wientjes, F., Nugent, J.H., Chavan, A.J., Hatey, B., García, R.C., Rosen, A. and Scrace, G. (1992).- *Cytocrome b-245 is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes.* Biochem. J. 284, 781-788

Segal, A.W. and Abo, A. (1993).- *The biochemical basis of the NADPHoxidase of phagocytes.* Trends Biochem. Sci. 18, 43-47.

Shaposnikova, V.V., Dobrovinskaya, O.R., Eidus, L.K. and Korystov, Y.N. (1994).- *Dependence of thymocyte apoptosis on protein kinase C and phospholipase A<sub>2</sub>.* FEBS Lett. 340, 319-319.

Shivnan, E. and Alexander, D.R. (1995).- *Proteinkinase C activation inhibits TCR-mediated calcium influx but not inositol trisphosphate production in HPB-ALL T cells.* J. Immunol. 154, 1146-1156.

Short, A.D., Bian, J., Ghosh, T.K., Waldron, R.T. and Rybak, S.L. (1993).- *Intracellular  $Ca^{2+}$  pool content is linked to control of cell growth*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 4986-4990.

Simchowicz, L., Foy, M.A. and Cragoe, E.J. (1990).- *A role for  $Na^+/Ca^{2+}$  exchange in the generation of superoxide radicals by human neutrophils*. J. Biol. Chem. 265, 13449-13456.

Slater, S.J., Kelly, M.B., Rubin, E. And Stubber, C.D. (1994).- *Evidence for discrete diacylglycerol and phorbol ester activator sites on protein kinase C*. J. Biol. Chem. 269, 17160-17165.

Smeyne, R.J., Vendrell, M., Hayward, M., Baker, S.J., Miao, G.G., Schilling, K., Robertson, L.M., Curran, T., Morgan, J.I. (1993).- *Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo*. Nature 363, 166-169.

Spiegel, S., Foster, D. and Kolesnick, R. (1996).- *Signal transduction through lipid second messengers*. Curr. Opin. Cell Biol. 8, 159- 167.

Steller, H. (1995).- *Mechanisms and genes of cellular suicide*. Science 267, 1445-1449.

Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P. and Nagata, S. (1993).- *Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family*. Cell 75, 1169-1178.

Sun, X.M. and Cohen, G.M. (1994).-  *$Mg^{2+}$  dependent cleavage of DNA into kilobase pair fragments is responsible for the initial degradation of DNA in apoptosis*. J. Biol. Chem. 269, 14857-14860.

Tanaka, S., Saito, K. and Reed, J.C. (1993).- *Structure-Function analysis of the bcl-2 oncoprotein*. J. Biol. Chem. 268, 10920- 10926.

Testi, R. (1996).- *Sphingomyelin breakdown and cell fate*. Trends Biochem. Sci. 21, 468-471.

- Thastrup, O., Cullen, P.I., Drobak, K., Hanley, M.K. and Dawson, A.P. (1990).- *Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular  $Ca^{2+}$  stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2466-2470.
- Thomas, L.E., Learn, D.B., Jefferson, M.M. and Weatherred, W. (1988).- *Superoxide-dependent oxidation of extracellular reducing agents by isolated neutrophils.* J. Biol. Chem. 263, 2178-2186.
- Trevani, A.S., Andonegui, G., Giordano, M., Nociari, M., Fontan, P., Dran G. and Geffner J.R. (1996).- *Neutrophil apoptosis induced by proteolytic enzymes.* Lab. Invest. 74, 711-721.
- Tsujimoto, Y., Cossman, E., Jaffe, E. and Croce, C.M. (1985).- *Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma.* Science 228, 1440- 1443.
- Volpe, P., Krause, K.H., Hashimoto, S., Zorzato, P., Pozzan, T, Meldolesi, J. and Lew, D.P. (1988).- *"Calciosome" a cytoplasmic organelle: the inositol 1,4,5- triphosphate-sensitive  $Ca^{2+}$  store of nonmuscle cells?.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1091-1095..
- Walker, P.R., Smith, C., Youdale, T., Leblanc, J., Whitfield, J.F., and Sikorska, M. (1991).- *Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes.* Cancer Res. 51, 1078-1085.
- Watson, R.W., Redmond, H.P., Wang, J.H., Condron, C. and Bouchier-Hayes, D. (1996a).- *Neutrophils undergo apoptosis following ingestion of Escherichia coli.* J. Immunol. 156, 3986-3992.
- Watson, R.W., Rotsein, O.D., Nathens, A.B., Dackiw, A.P. and Marshall, C. (1996b).- *Thiol mediated redox regulation of neutrophil apoptosis.* Surgery 120, 150-157.
- Weiss, S.J. (1989).- *Tissue destruction by neutrophils.* N. Engl. J. Med. 320, 365-375.
- Wertz, I.E. and Hanley, M.R. (1996).- *Diverse molecular provocation of programmed cell death.* Trends Biochem. Sci. 21, 359-363.

- White, M.K.B., Hardwick, S.J., Meager, L.C., Savill, J.S. and Haslett, C. (1993).- *Transient elevation of cytosolic free calcium retard subsequent apoptosis in neutrophils in vitro*. J. Clin. Invest. 92, 446-455.
- Williams, J.R., Little, J.B. and Shipley, W.U. (1974).- *Association of mammalian cell death with a specific endonucleolytic degradation of DNA*. Nature 252, 754-755.
- Williams, D.A., Becker, P.L. and Fay, F.S. (1987).- *Regional changes in calcium underlying contraction of single smooth muscle cells*. Science 235, 1644-1648.
- Wolfe, J.T., Ross, D. and Cohen, G.M. (1994).- *A role for metal and free radicals in the induction of apoptosis in thymocytes*. FEBS Lett. 352, 58-62.
- Wong, K., Li, X-B. and Hunckuk, N. (1995).- *N-Acetylsphingosine (C2 ceramide) inhibited neutrophil superoxide formation and calcium influx*. J. Biol. Chem. 270, 3056-3062.
- Wyllie, A.H. (1980).- *Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation*. Nature 284, 555-556.
- Wyllie, A.H. (1988).- *Apoptosis*. ISI Atlas of Science: Immunology 1, 192-196.
- Wymann, M., Tschanner, V., Deranlead, D.A. and Bagglolini, M. (1987).- *Chemiluminescence detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by human neutrophils during the respiratory burst*. Anal. Biochem. 165, 371-378.
- Yao, B., Zhang, Y., Delikat, S., Mathias, S., Basu, S., Kolesnick, R. (1995).- *Ceramide activated protein kinase is a raf kinase*. Nature 378, 307-310.
- Yin, X.M., Oltvai, Z.N. and Kosmeyer, J. (1994).- *BH-1 and BH-2 domain of bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with bax*. Nature 369, 321-323.
- Yoon, Y.S., Kim, J.W., Kang, K.W., Kim, Y.S., Choi, K.H. and Joe, C. (1996).- *Poly (ADP)-ribosilation of histone H1 correlates with internucleosomal DNA fragmentation during apoptosis*. J. Biol. Chem. 271, 9129-9134.

Yousefi, S., Green, D.R., Blaser, K. and Simon H.U. (1994).- *Protein-tyrosin phosphorylation regulates apoptosis in human eosinophils and neutrophils. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 10868-72.*

Zhang, J., Wang, L., Schwartz, J., Bond, R.W. and Bishop, W.R. (1994).- *Phosphorylation of Thr642 is an early event in the processing of newly synthesized protein kinase C  $\beta$ 1 and is essential for its activation. J. Biol. Chem. 269, 19578-19584.*

Zheng, L.M., Zychlinsky, A., Liu, C.C., Ojcius, D.M. and Young, J.D.E. (1991).- *Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death. J. Cell Biol. 112, 279-288.*

Pilar Diaz Manche

Mecanismos de Regulación de la apoptosis  
en el neutrófilo por calcio, quinasas de proteínas y  
metabolitos reactivos del oxígeno

Apto (con laude)

14

Julio

97

A. Galvez

Aurora Galvez

El Doctorado



BIBLIOTECA