

TESIS DOCTORAL



**MECANISMOS DE CITOTOXICIDAD DEL FACTOR DE
NECROSIS TUMORAL $-\alpha$ EN LAS LÍNEAS CELULARES
L929 Y HEPG2**

Autor: Pilar Sánchez-Pobre Bejarano

Director: José Antonio Solís Herruzo

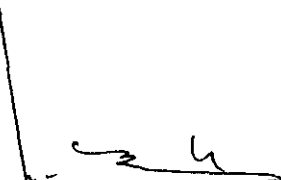
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**Facultad de Medicina
1997**

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

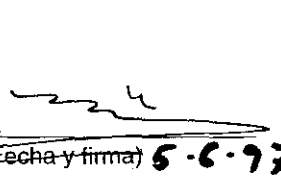
D. José Antonio Solís Herruzo, informa que Dña. Pilar Sánchez-Pobre Bejarano ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado "Mecanismos de citotoxicidad del Factor de Necrosis Tumoral alfa en las líneas celulares L929 y HepG2". Consideramos que este trabajo reúne las características requeridas para ser presentado como trabajo de Tesis Doctoral. Durante su realización la doctorando ha demostrado haber logrado los objetivos propios del tercer ciclo de los estudios de Medicina.

Vº Bº
EL TUTOR (2)


El Director de la Tesis

Fdo.: _____
(Fecha y firma)

DNI


Fdo.: _____
(Fecha y firma) 5-6-97
DNI 334.527.

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

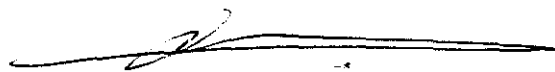
Prof. D. Rafael Enríquez de Salamanca, Director del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la UCM

INFORMO: que una vez examinado el Trabajo presentado por Dña. M. PILAR SANCHEZ-POBRE BEJARANO titulado: "MECANISMOS DE CITOXICIDAD DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA, EN LAS LINEAS CELULARES L929 Y HEPG-2", dirigido por D. José Antonio Solís Herruzo, este Departamento da su conformidad para que dicho trabajo sea leído y defendido en público con vistas a su aprobación como Tesis Doctoral.

Fecha reunión
Consejo Departamento

El Director del Departamento

8 JUN. 1997



Fdo.: Prof. Dr. R. Enríquez de Salamanca
DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA

Fdo.: _____
(Fecha y firma)

6 JUN. 1997

**A José Antonio Sánchez Alcazar,
y Gregorio Castellano Tortajada.**

AGRADECIMIENTOS:

Esta tesis ha sido un duro trabajo para un inexperimentado en la biología básica como yo. He tenido que aprender como el niño que empieza a leer pero en la edad adulta. Por ello debo agradecer mucho las enseñanzas, las explicaciones pacientes en el laboratorio, pero sobre todo el calor humano en los muchísimos momentos de desaliento y desesperanza en la investigación básica, en la que el tiempo invertido no guarda casi nunca relación con los resultados obtenidos, siendo con frecuencia muy ingrata.

Agradezco mucho a José Antonio Solís-Herruzo su introducción en estos temas, sus correcciones y su apoyo. Investigador nato de razonamiento rápido en temas tan áridos, pero capaz de explicar de forma sencilla al que se inicia.

Agradezco muchísimo a José Antonio Sánchez-Alcazar su paciencia y enseñanzas desde como se "siembran las células" hasta como se "pipetea". Pero sobretodo su ánimo, su gran ayuda en la presente tesis y su ejemplo de auténtico investigador y luchador por encontrar el verdadero porqué de las cosas.

Agradezco también mucho al Dr. Enriquez de Salamanca, buen profesor desde los inicios de la carrera, su ánimo y consejos.

Agradezco al Dr. Castellano, al Dr. Morillas, al Dr. Sánchez, y a todos los que me ayudaron del Servicio de Digestivo, su apoyo también para concluir esta tesis, tan alejada del día a día en el terreno clínico.

Agradezco a Javier Marco el apoyo moral para acabar esta tesis, como el amigo siempre disponible.

No puedo olvidar a los compañeros de laboratorio, Inma Garcia, Paz y Eva, con su continuo ánimo y calor humano, así como a Inma Hernandez.

Y el formidable grupo del Centro de Investigación Experimental, con esos momentos fugaces del "café" únicos para continuar con el peso de los experimentos que no salen. Creo que es lo que realmente no olvidaré del Experimental. Elena de México lindo con su enorme alegría contagiosa, Miluchi y Mar, Carmen, Rosa, Begoña, Patricia, el Dr. Gomez-Reino, el Dr. De Pablo, Irene y Montse. El irónico y agudo Dr. Luis Calandre, con él que las conversaciones siempre eran interesantes. El Dr. Arenas y José Antonio Sánchez con sus elucubraciones de investigadores natos. Los demás del departamento de bioquímica, Pilar y Eduardo, sus enseñanzas de la LDH y "el aparatito

que se estropea” , Yolanda, Miguel Angel, Juan Carlos. El Dr. Alcamí y su grupo Juan, Juan II, Mayte, Yolanda, Belén, M^a Antonia, Begoña, escuchando sus interesantes “ puesta al día y coordinación de la investigación ” de los viernes, mientras medía ATP o escuchando su buena música.

Agradezco muchísimo a mi familia la paciencia para dar ánimos durante todo este trabajo.

INDICE

INDICE	1
INTRODUCCION	4
<u>EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF)</u>	4
1. Concepto	4
2. Desarrollo histórico	5
3. Efectos y uso clínico del TNF	6
4. Estructura del TNF	9
5. Determinación genética del TNF	10
6. Inducción de la síntesis de TNF por distintos factores	10
7. Mecanismo de acción del TNF	12
<u>7.1 Receptores del TNF</u>	12
<u>7.2. Internalización del TNF</u>	19
<u>7.3. Mecanismos postreceptor</u>	19
<u>7.4 Mitocondria y producción de radicales libres</u>	24
<u>7.5. TNF y muerte celular: Apoptosis y necrosis</u>	35
<u>7.6. Efectos nucleares del TNF</u>	42
<u>7.7. TNF e inhibidores de la síntesis proteica</u>	48
<u>7.8. TNF y Hepatocitos</u>	49
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	52
<u>HIPOTESIS</u>	52
<u>OBJETIVOS</u>	53
MATERIAL Y METODOS	54
<u>1. MATERIAL</u>	54
<u>2. MODELO BIOLÓGICO</u>	55
<u>3. CULTIVOS CELULARES</u>	55
<u>4. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD</u>	56
<u>5. DETERMINACION DE LA APOPTOSIS MEDIANTE LA FRAGMENTACION DEL DNA : EXTRACCION Y ELECTROFORESIS DEL DNA FRAGMENTADO</u>	57
<u>6. DETERMINACION BIOQUIMICA DEL ATP CELULAR</u>	58
<u>7. DETERMINACION DEL ATP CELULAR MEDIANTE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR ; TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR Y ANÁLISIS DE DATOS</u>	60
<u>8. MEDIDA DEL CONSUMO DE OXÍGENO Y DEL ACOPLAMIENTO DE LA RESPIRACION MITOCONDRIAL</u>	62

<u>9. DETERMINACION DEL ACIDO LACTICO</u>	63
<u>10. ENSAYOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO</u>	63
10.1. <i>Medida de la generación intracelular de radicales libres de oxígeno</i>	64
10.2. <i>Análisis del contenido intracelular de glutatión</i>	65
<u>11. ESTUDIO DE LA REDUCCION DEL CITOCROMO C, MEDIANTE ESPECTROSCOPIA</u>	66
<u>12. ESPECTROSCOPIA RAMAN DE LA MITOCONDRIA COMPLETA</u>	67
<u>13. CONTAJE CELULAR</u>	69
<u>14. TRATAMIENTO ESTADISTICO</u>	69
RESULTADOS	70
<u>1. ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD EN LA LINEA L929 Y HEPG2</u>	70
1.1. <i>Las células L929 son sensibles a los efectos citotóxicos del TNF/AD, TNF y AD.</i>	70
1.2. <i>El TNF, AD y TNF/AD son citotóxicos para las células de la línea HepG2.</i>	71
1.3. <i>Efectos de la Ga y de TNF/Ga sobre la viabilidad celular en la línea HepG2.</i>	72
1.4. <i>El TNF/AD y el TNF/CHX inducen apoptosis en las células L929.</i>	73
1.5. <i>El TNF/AD induce apoptosis en las células HepG2.</i>	73
<u>2. ESTUDIOS SOBRE LAS ALTERACIONES METABOLICAS INDUCIDAS POR EL TNF EN PRESENCIA DE ACTINOMICINA D</u>	74
2.1. <i>Carga energética celular: contenido de ATP</i>	74
2.1.1. <i>El TNF/AD y la AD aumentan las concentraciones de ATP intracelular en la línea celular L929.</i>	74
2.1.2. <i>El TNF/AD y la AD aumentan las concentraciones de ATP intracelular en la línea celular HepG2.</i>	76
2.2. <i>Acumulación de láctico</i>	77
2.2.1. <i>El tratamiento con TNF/AD aumenta los niveles de ácido láctico producido por las células L929.</i>	77
2.2.2. <i>El TNF/AD desciende los niveles celulares de ácido láctico en las células HepG2.</i>	78
2.3. <i>Respiración Mitocondrial</i>	79
2.3.1. <i>Respiración Mitocondrial en células L929 bajo el tratamiento con TNF, AD o TNF/AD.</i>	79
2.3.2. <i>Respiración Mitocondrial en células HepG2 bajo el tratamiento con TNF, AD o TNF/AD.</i>	81
2.4. <i>Consumo de ATP bajo tratamiento con TNF, AD, CHX o TNF/AD y TNF/CHX en células L929</i>	82
2.5. <i>El bloqueo de la respiración mitocondrial impide la acumulación de ATP inducida por el TNF/AD en células L929</i>	83
<u>3. ESTUDIOS DEL STRESS OXIDATIVO</u>	84
3.1. <i>El TNF/CHX reduce el citocromo b y oxida los cc_1 y aa_3, en células L929.</i>	84
3.2. <i>El TNF/AD y el TNF/CHX inducen el estress oxidativo de las células L929.</i>	86
<u>4. EL TNF/AD O EL TNF/CHX LESIONAN LAS MITOCONDRIAS DE LAS CELULAS L929</u>	88
<u>5. MODIFICACION DE LA CITOTOXICIDAD EN PRESENCIA DE INHIBIDORES MITOCONDRIALES</u>	89

- 5.1. *La antimicina A inhibe la citotoxicidad inducida por TNF/AD en las células L929.* 89
- 5.2. *El TTFA inhibe la citotoxicidad inducida por TNF/AD en las células HepG2.*91

DISCUSION	95
1. Citotoxicidad inducida por TNF/AD o TNF/CHX en las líneas celulares L929 y HepG2	.95
2. Cambios metabólicos producidos por el TNF /AD o el TNF/CHX.	97
CONCLUSIONES	113
BIBLIOGRAFIA	115
ANEXO I : FIGURAS.	143
ANEXO II: TABLAS.	144
ANEXO III: IMÁGENES.	145

INTRODUCCION

EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL

ALFA (TNF)

1. Concepto

El factor de necrosis tumoral α (TNF) es una citoquina pleotrópica que posee propiedades reguladoras, inmunitarias, inflamatorias, antitumorales y que actúa en estrecha coordinación con otras citoquinas como la interleuquina-1 y el interferón- γ (Arend WP et al, 1995; Dealtry GB et al, 1987). Además de su función inflamatoria y antitumoral se conoce su influencia en la mitogénesis, diferenciación e inmunorregulación de diferentes tipos celulares, lo que sugiere un importante papel de esta citoquina en condiciones tanto fisiológicas como patológicas. Las citoquinas son polipéptidos o glicoproteínas reguladoras producidas por el sistema inmune. Poseen un amplio espectro de efectos en procesos reparadores e inflamatorios. Su pleitropía se debe a que una citoquina dada puede tener múltiples efectos a nivel del sistema inmune, el desarrollo y la diferenciación celular. Además, sus efectos pueden solaparse por inducir cada una la producción de otras a través de una cascada de efectos. Su acción varía con la concentración. Así, a bajas concentraciones, el TNF

cumple funciones homeostáticas, como la reparación tisular, mientras que a altas provoca daño endotelial, microtrombosis y daño tisular (Jones AL et al, 89)

El TNF es un polipéptido de bajo peso molecular derivado principalmente de los monocitos y macrófagos activados y de los linfocitos T. También puede ser producido por linfocitos B, mastocitos, células natural killer, queratinocitos, y algunas células tumorales (Pass HI et al, 1995). Las células de Kupffer (macrófagos hepáticos), probablemente constituyen la principal población de macrófagos corporal, siendo la principal fuente de síntesis de TNF (Toth CA and Thomas P, 1992).

El TNF se produce en respuesta a estímulos exógenos y endógenos, siendo el más potente la endotoxina bacteriana o lipopolisacárido. Esta actúa a nivel de proteínas de la superficie de los macrófagos, que interactúan induciendo la transcripción del gen del TNF (Pass HI et al, 1995).

2. Desarrollo histórico

El estudio del TNF se inició en 1940, con la detección de su presencia en el suero de ratones tratados con la endotoxina del Bacillus de Calmette-Guerin (BCG), comprobándose su capacidad para producir necrosis hemorrágica en tumores así como la muerte de determinadas líneas celulares tumorales. Además se reconoció su papel como mediador de la caquexia que se produce en animales con infecciones crónicas. Esta propiedad justificó su denominación como "caquectina".

En 1975, Lloyd Old aisló el péptido, de origen macrofágico, responsable de la necrosis hemorrágica que se observa en tumores de ratones tratados con endotoxina.

En 1985, Beutler y colaboradores aislaron la caquectina y comprobaron que su extremo aminoterminal tenía una gran homología con las secuencias del TNF humano. Tras ello llegaron a la conclusión de que ambas proteínas, de 17 Kda, eran la misma molécula (Beutler & Cerami, 1987).

En 1985, varios grupos de investigadores clonaron el gen que codifica esta proteína y observaron su estrecha relación con el gen de linfotoxina o TNF- β . En los años siguientes aparecieron multitud de estudios que contribuyeron a caracterizar los receptores de esta citoquina y a establecer las relaciones existentes entre el TNF y diferentes cuadros patológicos en los que se cree que juega un papel decisivo, como en el shock séptico (Tracey KJ et al, 1986).

3. Efectos y uso clínico del TNF

En un intento de hallar una utilidad práctica a esta citoquina, el interés investigador se centró inicialmente en sus propiedades antitumorales. Sin embargo, dada su elevada toxicidad sistémica, su aplicación terapéutica ha quedado limitada a su administración intratumoral (Sorkin P et al, 1995 y Mavligit GM et al, 1992).

Algunos estudios han abierto nuevas esperanzas a su empleo terapéutico. Se está estudiando la posibilidad de introducir el gen del TNF en las células tumorales diana con el fin de que el TNF se produzca en el mismo lugar en el que tiene que actuar, obviando así sus efectos sistémicos. La correcta valoración de los posibles efectos antitumorales exige considerar que éstos dependen mucho de la línea celular

sobre la que ha de actuar. Por ejemplo, el TNF es producido por las células de la leucemia mieloide crónica y sobre ellas induce su proliferación (Freedman MH et al,1992). Esto justifica que en esta enfermedad se hayan empleado algunos antagonistas del TNF. Por este motivo, en la leucemia mieloide crónica y juvenil se han utilizado antagonistas del TNF, tales como sus receptores solubles, para mantener la remisión de estos pacientes (Estrov Z et al, 1995). En la actualidad la mayoría de los enfermos con progresión tumoral tienen TNF circulante detectable y su efecto sobre la supervivencia y sintomatología parece adverso (Subira ML and Brugarolas A, 1992). Todo ello hace dudar de su utilidad terapéutica actual en el cáncer de forma aislada . Alguna esperanza han abierto estudios en los que se observa un efecto potenciador del TNF sobre los conseguidos con otros citostáticos, por ejemplo los inhibidores de las topoisomerasas del DNA (adriamicina, doxorubicina, etopóxido et..).(Kreuser DE et al, 1995 y Baloch Z et al, 1995). Lo mismo ocurre con su asociación con otras citoquinas tales como el interferón γ (Yang R,Liu Q et al, 1995).

En la actualidad las líneas de investigación y aplicabilidad clínica se dirigen más a contrarrestar sus efectos indeseables en la inflamación, sepsis y enfermedades autoinmunes. Con este fin se han empleado los anticuerpos monoclonales anti-TNF en el tratamiento de la sepsis (Eidelman LA et al, 1995), de la artritis reumatoidea (Arend WP & Dayer JM,1995), de la enfermedad injerto contra huésped (Herve P et al, 1992), y en la enfermedad de Crohn((DullemenHM et al,1995).En esta última, la producción de TNF por la mucosa intestinal está elevada así como también su eliminación por las heces (Braegger CP et al,1992).

Se ha sugerido que el TNF juega también un papel importante en la patogenia de las hepatitis crónicas por virus B y C (Marinos G et al, 1995; Fsheron N et al, 1990), hepatitis alcohólica y hepatitis autoinmune (Maggiore G et al, 1995). En la hepatitis crónica B se ha observado que la producción de TNF está aumentada así como la expresión de los receptores para el TNF del subtipo 75kDa en el parénquima hepático. Además, esos ascensos guardan relación con la actividad inflamatoria y con la respuesta al tratamiento con interferón, pero no con la replicación vírica (Marinos G et al, 1995). Así, niveles elevados del receptor de 75 kD del TNF en suero constituyen un factor predictivo de respuesta al interferón. En algún estudio se ha incluido a los hepatocitos entre las células productoras de TNF, en situaciones como la hepatitis crónica vírica (Gonzalez-Amaro et al, 1994). Su síntesis parece estar inducida por péptidos virales, tales como la proteína X del virus B (Hu KQ et al, 1990) y a su vez el TNF parece que induce la replicación del VHB y VHC (Fsheron N et al, 1990).

El papel del TNF en la hepatitis alcohólica está sustentado sobre el hallazgo de su producción aumentada por los monocitos de estos pacientes (McClain CJ et al, 1989). El TNF se ha implicado también en la patogenia de la lesión hepática observada en la enfermedad injerto contra huésped y en el rechazo agudo y crónico postransplante hepático, en la cirrosis biliar primaria (Larrea E et al, 1994 y Floreani A et al, 1992) y en algunas lesiones provocadas por tóxicos (Czaja et al, 1995). En el estudio que relaciona el TNF con el daño por tetracloruro de carbono, se argumenta una potenciación del daño por el TNF. Así se conoce que muchas toxinas hepáticas inhiben la síntesis de RNA hepático. Como por otra parte provocan daño inflamatorio añadido, este último induciría la producción de TNF local. Este, que por sí sólo no es citotóxico para los hepatocitos normales, sí llega a serlo bajo condiciones metabólicas de inhibición de la síntesis proteica. De este modo la neutralización del TNF protegería

del daño hepático por toxinas.(Czaja M et al,1995). En relación con la CBP, estudios sobre cultivos celulares de epitelio biliar de hígado de ratas han demostrado que el TNF ejercería un efecto de aumento de la permeabilidad de las uniones densas epiteliales , que podrían explicar uno de los mecanismos del daño biliar (Mano Y et al,1996).

Por último, se ha investigado el papel que esta citoquina pueda tener en la patogenia de la esteatosis hepática secundaria al reposo intestinal y en la nutrición parenteral. Los defensores de este papel señalan que los macrófagos peritoneales estimulados por los gérmenes gram negativos del intestino, producirían TNF, el cual a su vez, aumentaría la síntesis hepática de triglicéridos. Según ellos, los anticuerpos anti-TNF podrían reducir la esteatosis hepática (Pappo Y et al,1995).

4. Estructura del TNF

El TNF es una proteína de 157 aminoácidos, de unos 17,3 kDa. Su forma activa la constituye un trímero formado por tres subunidades idénticas de 157 aminoácidos que se asocian para formar un trímero con forma de cono (Tomita et al,1990).

Todas las secuencias de TNF contienen residuos de triptófano, conservados entre especies y también presentes en el TNF β . El cambio de estos residuos por fenilalanina da lugar a una reducción de su actividad. El TNF α humano contiene tres residuos de histidina en posición 15, 73, y 78. La modificación en el residuo 15 da lugar

a la disminución o pérdida de su actividad, lo que indicaría que este aminoácido está en el sitio de unión al receptor del TNF o en una posición muy cercana (Fiers 1991).

Se ha descrito una forma de TNF unida a la membrana nuclear, de 26 KDa. Esta corresponde al producto no procesado de la traducción del RNAm del TNF. Dicha forma unida a membrana, es activa e incluso más potente que la forma secretada. Con ello se apoya la importancia de la acción local del TNF por interacción celular (Nagata S, 1997).

5. Determinación genética del TNF

Los genes del TNF α y del TNF β se localizan en el cromosoma 6, cercano al centrómero. En esta región se localiza también el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Strominger et al, 1986). La yuxtaposición del TNF con el MHC sugiere la posibilidad de interrelación entre los componentes responsables del reconocimiento y los efectores del sistema inmune y pone de manifiesto el papel del locus del TNF en las enfermedades inflamatorias.

6. Inducción de la síntesis de TNF por distintos factores

El control de la producción del TNF se lleva a cabo de forma específica en cada tejido. La síntesis del TNF se ha estudiado preferentemente en la línea monocito-

macrófago, siendo su principal fuente de producción en el hombre las células de Kupffer hepáticas (Toth CA and Thomas P,1992). Pero la expresión y síntesis de TNF por otras células no hematopoyéticas también es importante en situaciones patológicas. Así, se ha demostrado la síntesis de TNF por hepatocitos de pacientes con hepatitis crónica B (Gonzalez-Amaro R et al, 1994) y por las células tumorales de pacientes con leucemia crónica mielocítica juvenil. En éstas, el TNF estimula su proliferación de modo autocrino (Freedman MH et al, 1992).

Existe una gran variedad de estímulos que inducen la síntesis de TNF. En linfocitos, el inductor más estudiado es el lipopolisacárido (LPS). En estas células la regulación a nivel de la transcripción parece ser un mecanismo de control importante. Generalmente existe una transcripción basal de esta citoquina, que se incrementa mucho ante el estímulo de los monocitos por el LPS (Eidelman LA et al, 1995).

En la activación de los monocitos por el LPS están implicadas muchas vías de señal : fofolipasa C (PLC), fofolipasa A2 (PLA2), proteínquinasa C (PKC), flujos de calcio y nucleótidos cíclicos. Entre ellas, parece que la síntesis de TNF precisa al menos de la vía de la PKC y depende del calcio almacenado en la célula(Drysdale et al,1983).

Otro grupo de inductores del TNF son los ésteres de forbol. Parece que la PLA2 tiene un papel clave en su efecto, y en algunos casos, este efecto puede ser mediado por PKC (activando NF κ B, que regula la transcripción del TNF). Entre otros inductores descritos , el mismo TNF es capaz de desencadenar su propia expresión tanto a nivel de RNA como a nivel de proteína. Este efecto parece estar mediado por la PLA2 y por la actividad 5-lípooxigenasa (Spriggs et al 1987;Nitsu et al 1988).

7. Mecanismo de acción del TNF

7.1 Receptores del TNF

El TNF ejerce su acción a través de su unión a receptores celulares específicos. Estos receptores están presentes en todas las células del organismo excepto en los globulos rojos y los linfocitos T no estimulados. (Tracey KJ & Cerami A,1993).

Dependiendo del tipo celular, existen de 100 a 10000 lugares de unión para el TNF en cada célula. Aunque la unión del TNF es esencial, no es suficiente para provocar la lisis celular. Así, en las células resistentes al efecto citotóxico del TNF, la unión e incluso internalización del TNF tiene lugar, a pesar de carecer de efecto citotóxico (Tsujiimoto M et al,1985). Por otra parte, no existe una correlación clara entre el número de receptores y el tipo de respuesta o la magnitud de ésta (Holtman and Wallach1987; Tsujiimoto et al 1986; Fiers 1991).

La expresión del receptor del TNF, así como la sensibilidad celular a dicho factor, probablemente estén moduladas por proteinquinasas A y C (Scheurich, P. et al,1989). En varias líneas celulares se ha demostrado que el Interferon gamma y el AMPc aumentan la expresión de los receptores del TNF (Agarwal, B et al, 1985 y Scheurich P. et al, 1989). Este efecto del AMPc podría ser de gran importancia, ya que muchas hormonas, tales como el glucagón y las catecolaminas, aumentan el AMPc intracelular. Estas hormonas, aumentan en los traumatismos y en la sepsis, por lo que el sinergismo con el TNF podría originar un daño tisular aún mayor.

Se ha descrito en la línea tumoral L929, que los inhibidores mitocondriales o la anaerobiosis provocan un descenso de la unión del TNF a su receptor celular. Ello se correlaciona con una reducción del efecto citotóxico del TNF. La reducción de la unión del TNF a su receptor no es secundaria a un cambio en el número de receptores del TNF ni a una variación de su internalización ni de la degradación del complejo TNF-receptor, sino que es debida a un descenso de la afinidad TNF-receptor. Parece que la causa de tal pérdida de afinidad estaría relacionada con el contenido intracelular de ATP lo que representaría un mecanismo de autoprotección celular (Sánchez-Alcazar JA et al, 1995a).

El TNF es uno de los 10 miembros de ligandos que activan la correspondiente familia de receptores estructuralmente relacionados con el TNF. (Bleutler B and Van Huffel C, 1994a;Bazzoni F and Bleutler B, 1996). Los miembros de esta familia son: los dos receptores del TNF- α , el del TNF- β , el del Fas/APO-1/CD95, el del Factor de crecimiento neural, el CD40, el CD-30, el CD-27, el OX-40 y el 4-1BB. Estos receptores inician la señalización para la proliferación celular y la apoptosis. Las señales que inducen son necesarias para el normal desarrollo y funcionamiento del sistema inmune. Una excesiva señalización de estos receptores conduce a reacciones inflamatorias graves, daño tisular y shock. Mutaciones en los genes correspondientes a estos ligandos o en las de sus receptores provocan anomalías de los linfocitos y de la respuesta inmune con el consiguiente desarrollo de enfermedades autoinmunes (Bazzoni F y Bleutler B, 1996).

Todos los ligandos de la familia TNF parecen estar constituidos por 3 cadenas de polipéptidos. Todos ellos, excepto el TNF- β están constituidos por 3 subunidades

idénticas. Todos, excepto el TNF- α , que es también secretado, son proteínas de transmembrana que actúan a través del contacto célula-célula.

Respecto a los receptores de la familia TNF, parecen ser proteínas transmembrana tipo I constituidas por 2 subunidades idénticas . Se caracterizan por una región rica en cisteína, que se repite de tres a seis veces en el dominio extracelular (Bleutler B & Van Huffel C, 1994b). La región extracelular está bien conservada entre sus miembros, mientras que el dominio intracelular difiere significativamente entre ellos. Varios receptores de esta familia, como el del TNF y el del Fas, contienen una secuencia citoplásmica de 60 residuos, denominada región mortal. Esta es fundamental para la señal apoptótica, tanto en el receptor de 55kD del TNF como en el del Fas. (Nagata S, 1997) .

En la actualidad existen claros indicios de la implicación de los receptores del TNF, o de la familia de receptores tipo TNF y de sus ligandos, en la inmunidad y en la producción de enfermedad. Así, la mutación de genes del receptor Fas conduce, en humanos, al desarrollo de linfadenopatías , esplenomegalía y rasgos de autoinmunidad (Riex-Laucat F et al, 1995). El sistema Fas, receptor-ligando, se considera fundamental en la inmunoregulación. Sería responsable de la apoptosis de las células T autoreactivas y de crear zonas inmunoprivilegiadas, como el ojo, por sobreexpresión de Fas en estos tejidos. Por ello se piensa en un futuro papel que el Fas pueda jugar en la inmunosupresión necesaria en el trasplante de órganos. Así, la sobreexpresión de Fas en el tejido trasplantado induciría apoptosis de los linfocitos responsables del rechazo (Nagata S, 1997).

Se han descrito dos tipos de receptores del TNF, uno de 55kD (TNFR1) y otro de 75kD (TNFR2) con similar afinidad (Tartaglia LA and Goeddel DV, 1992). De forma

experimental se han creado ratones transgénicos con abolición del gen del receptor de 55kD o el de 75kD del TNF. En los ratones con abolición del primero, se observa una resistencia al efecto letal del lipopolisacárido, pero también se aprecia susceptibilidad a la infección por *Listeria Monocytogenes* (Pleffer K et al, 1993). Los ratones con pérdida del receptor 75kD son moderadamente resistentes al efecto letal del TNF y a la necrosis dérmica secundaria a la inyección intradérmica repetida de TNF (Erickson SL et al, 1994).

Parece que ambos receptores del TNF participan en la muerte celular, aunque el TNFR1 es más potente y más frecuentemente responsable de la apoptosis que el TNFR2. El efecto citotóxico del TNF en la mayoría de las líneas celulares, incluidas las L929, se induce a través del receptor de 55kD (TNFR1), mientras que el receptor de 75 kD estaría más relacionado con el efecto sistémico del TNF, aunque también podría inducir apoptosis. Los dos tipos de receptores comparten un 28% de homología en sus dominios extracelulares, pero difieren en los intracelulares (Beyaert R & Fiers W, 1994). El receptor TNFR1 induce dos efectos, la apoptosis y la activación de NFκB y Apo-1 (Osborn et al, 1989; Liu Z et al, 1996). Estos factores median la inducción de otras citoquinas y de genes inmunoreguladores y metaloproteínas.

La señalización del TNF tiene lugar tras unirse a sus receptores. Esta unión provoca la agregación de las unidades de estos receptores, disparando así la respuesta celular.

La unión del TNF a su receptor se sigue de la internalización del complejo TNF-receptor y de la degradación de éste por hidrolasas lisosomales. Pero el mecanismo por el que el TNF media sus efectos celulares parece ser la señalización a través de moléculas que se unen al receptor al ser éste modificado por la unión del ligando (Bazzoni F and Bleutler B, 1996).

Las proteínas citoplasmáticas que se unen al receptor de 55kD (TNFR1) del TNF y al receptor del Fas tienen una alta homología, poseen una región mortal y son importantes en la transmisión de la señal de apoptosis. Parece que esta región mortal es la responsable de la señal apoptótica mediada por los receptores de la familia del TNF (Nagata S, 1997). La proteína FADD (Fas-associated death domain protein), también llamada MORT-1, es el traductor proximal de actividad apoptótica del receptor Fas, con el que forma un heterodímero (Boldin MP et al, 1995). Por otro lado, la proteína TRADD (TNFR1-associated death domain protein) es el traductor proximal de apoptosis mediado por el receptor TNFR1 del TNF, que actuaría de forma similar al FADD. Cada una de estas proteínas contiene una versión de la región mortal encontradas en los propios receptores. Estas regiones permiten la interacción entre el receptor y las moléculas traductoras (Bazzoni F and Bleutler B, 1996).

La región mortal del TNFR1, que se corresponde con el TRADD, es necesario para activar el NF κ B e iniciar la vía apoptótica y (Hsu et al, 1995). Aunque el TRADD comparte homología con el FADD, el primero posee efectos más variados que este último, que sólo señala apoptosis.

Al unirse el TNF a su receptor TNFR1, provoca la trimerización del receptor lo que provoca la transmisión de señal a través de su región mortal citoplásmica. Este, así activado, recluta al TRADD. El TRADD activado por el TNF precisa unirse al FADD para ejecutar la vía apoptótica, con lo que Fas y TNF comparten esta molécula, FADD, para la vía de apoptosis señalizada por el TNFR1.

Se ha identificado recientemente la proteína señalizadora que induce apoptosis desde FADD/MORT1. Se trata de una proteasa de cisteína que pertenece a la familia

de las ICE (interleukin 1 β -converting enzyme) y que se ha denominado caspasa-8 (Alnemri et al, 1996; Boldin et al, 1996).

Estas proteasas de cisteína activarían de forma secuencial una cascada de proteasas que serían responsables de la apoptosis. De hecho se ha visto que los inhibidores de la caspasa 1 y 3 bloquean la apoptosis inducida por TNF o por Fas (Enari et al, 1996).

El TNFR1 induce otra vía apoptótica, a parte de la ya descrita y compartida con el Fas (FADD), que es peor conocida. Esta tiene lugar a través de otra proteína, la proteína interaccionante del receptor (RIP). Esta molécula es reclutada desde el TNFR1 a través de la proteína TRADD . Aunque puede interaccionar también con el receptor de Fas, lo hace principalmente con TRADD. Corresponde a una proteína quinasa de serina/treonina, que posee una región mortal a través del cual interacciona con TRADD y participa en la activación del NF κ B (Hsu et al, 1996a).

La proteína TRADD que media en la apoptosis también es responsable de la activación del NF κ B inducida por el TNF. Esta activación del NF κ B se realiza mediante su interacción con la proteína TRAF2 (Factor-associated TNF receptor) . El TRAF2 pertenece al grupo de proteínas implicadas en la transmisión de señal desde el receptor del TNF, que poseen gran afinidad por el receptor TNFR2 del TNF y que se han denominado "factores asociados al receptor del TNF" (TRAFs) (De Togni P et al, 1994). El factor nuclear, NF κ B, se activa a través de una de estas proteínas TRAF2, directamente desde TNFR2 e indirectamente desde TNFR1, a través de TRADD o RIP. La señal mediada es la de fosforilar I κ B, liberando NF κ B que puede así entrar en el núcleo. El TRAF2 también puede interaccionar con FADD conduciendo a la apoptosis

(Hsu et al, 1996b). A diferencia de Fas, el TNF media no sólo en la apoptosis sino también sobre la activación de NF κ B. Esto último explicaría la diversidad de los efectos del TNF y que la señal inducida por Fas sea de pura apoptosis y por tanto más potente que la del TNF, ya que éste induce simultáneamente la apoptosis y los factores protectores de ésta, a través de la activación de NF κ B (Nagata S, 1997).

En resumen, la unión del TNF al receptor TNFR1 induce un cambio conformacional que lleva a la región mortal del receptor a interactuar con las proteínas TRADD y RIP. El complejo TNFR1-TRADD interactúa a su vez con, al menos, 3 proteínas señalizadoras: RIP, FADD y TRAF2, mientras que la proteína FADD activa el mecanismo de apoptosis, en una vía común con Fas. La proteína RIP también podría hacerlo por otra vía peor conocida. Además RIP y TRAF2 mediarían la activación de NF κ B (Liu et al, 1996; Nagata S, 1997). El receptor TNFR1 también es responsable de la activación de JNK. Ambos, JNK y NF κ B se activarían a través de las proteínas RIP y TRAF2. La inactivación de la inducción de NF κ B por TNF, pero no la de JNK, aumenta la apoptosis. Sin embargo, la activación de NF κ B protege de la apoptosis. Esto último explicaría la diversidad de efectos del TNF, ya que, a diferencia de Fas, el TNF activa simultáneamente la vía apoptótica y la de protección de ésta, a través de la activación del factor de transcripción NF κ B. Probablemente el aumento de la apoptosis por TNF, en presencia de inhibidores de la síntesis proteica, se deba a la anulación de la síntesis de proteínas protectoras inducidas por NF κ B (Liu Z, 1996; Nagata S, 1997). A pesar de todo lo expuesto hay algún trabajo que rechaza el efecto protector de la apoptosis por NF κ B (Cai Z et al, 1997).

7.2. Internalización del TNF

Después de la unión del TNF a su receptor , el complejo es rápidamente internalizado y degradado (Mosselmans R et al, 1988) . No parece que sea necesaria la internalización del TNF para lisar a las células diana. Así, los macrófagos fijados con formaldehído también lisan a las células (Decker T et al, 1987). Aunque los inhibidores de los enzimas lisosomales reducen la citotoxicidad por TNF (Ruff and Gifford, 1981), este último posee efecto tóxico directo, como se ha observado cuando es microinyectado en las células diana (Smith et al, 1990).

7.3. Mecanismos postreceptor

El amplio espectro de actividades del TNF es debido en gran medida a las variadas señales de transducción que siguen a la unión del TNF a su receptor. Entre los procesos que se implican en los mecanismos postreceptor, se han estudiado los que expondremos a continuación. Sin embargo, parece admitida en la actualidad la vía de transmisión de señal descrita en la sección de "Receptores del TNF", en la que la interacción con las proteínas señalizadoras provocaría la activación final de una cascada de proteasas de tipo ICE, en la vía apoptótica, y la activación del factor de transcripción NF κ B y de JNK (Nagata S, 1997; Liu Z et al, 1996). De este modo, muchos de los fenómenos descritos a continuación pueden ser más epifenómenos que la causa real de la muerte celular inducida por el TNF.

7.3.1. Activación de las proteínas G

Las proteínas G son una familia de proteínas heterodímeras que sirven como transmisores de señal, uniendo los receptores extracelulares a sistemas enzimáticos tales como la adenilato ciclasa, la fosfolipasa A (PLA), y la fosfolipasa C (PLC), los cuales a su vez, generan segundos mensajeros intracelulares. Las señales inducidas por las proteínas G están reguladas por el GTP y el GDP, activador e inactivador respectivamente.

La activación de las proteínas G, parece que participa en la toxicidad inducida por el TNF, ya que la *toxina pertussis* inhibe la citotoxicidad inducida por TNF (Imamura K et al, 1988). Sin embargo, la capacidad de la toxina pertussis para inhibir la citotoxicidad por TNF en estadios tempranos no ha podido ser reproducida por otros autores (Kull FC & Besterman JM, 1990).

7.3.2. Adenilato ciclasa/AMPc

El TNF provoca un rápido incremento del AMPc citoplásmico con el subsiguiente aumento de la actividad quinasa AMPc dependiente (Zhang, Y, 1988), aunque no hay relación directa de esto con sus acciones citotóxicas.

7.3.3. Activación de fosfolipasas

1. La fosfolipasa A2 (PLA2)

La PLA2 es una enzima acoplada a distintos receptores de membrana mediante proteínas G (Silk et al, 1989). Además de ser activada directamente por las proteínas G, puede estimularse también por aumentos del intercambio Na^+/H^+

(probablemente por modificación del pH intracelular) y por aumento de los niveles de Ca^{+} (Sweat et al, 1986).

Tras su activación, la PLA2 hidroliza los fosfolípidos de las membranas, liberando ácido araquidónico (AA) y un lisofosfolípido. Este último está determinado por la especificidad de la PLA2, siendo la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina los fosfolípidos metabolizados mayoritariamente por esta enzima. Tanto los ácidos grasos libres como los lisofosfolípidos son capaces de actuar sobre el potencial de membrana mitocondrial, alterando la actividad de las enzimas integrales de esta membrana y el transporte de calcio a través de la misma (Rustembeck y Lenzen, 1989).

El AA puede actuar directamente sobre distintas enzimas, tales como la PKC, y es capaz de incrementar el flujo intracelular de Ca^{+} (Guaragna et al, 1992).

Se ha estudiado ampliamente la implicación de la vía del AA en la transmisión de señal del TNF. Algunos inhibidores de la PLA2, como la dexametasona, reducen la citotoxicidad del TNF sobre las células L929 y en otras líneas celulares tumorales. El hecho de que el TNF induzca la liberación del AA tras dos horas de tratamiento de las células L929 sensibles, pero no en las resistentes, apoya aún más el papel del AA en la citotoxicidad mediada por TNF (Suffys P et al, 1987; Suffys P et al, 1991; Neale ML et al, 1990). No obstante, existen otras líneas celulares resistentes al TNF que también presentan activación de PLA2 (Clark et al, 1988), por lo que no se admite que sea un mecanismo general.

Los metabolitos del AA no están implicados en la citotoxicidad del TNF, ya que los inhibidores de los primeros, no protegen frente al TNF (Suffys P et al, 1987). Permanece sin respuesta la cuestión sobre si la PLA2 está o no implicada en la citotoxicidad por el TNF. Posiblemente los lisofosfolípidos formados por acción de la PLA2 sean los citotóxicos para las células (Beyaert R and Fiers W, 1994). También es

posible que el AA actúe directamente sobre el metabolismo del calcio (Rustenbergh Y & Lenzen S, 1989).

2. La fosfolipasa C (PLC)/Fosfato de inositol/Calcio

La PLC es una enzima encargada de la degradación de los fosfolípidos de las membranas que se ha implicado en numerosas funciones celulares. La PLC activada por la estimulación de los receptores de membrana hidroliza los fosfatidilinositoles (PI-PLC) y la fosfatidilcolina (PC-PLC) de la membrana celular (Martín et al, 1987).

Al estudiar el efecto citotóxico del TNF sobre algunas líneas celulares no se encuentran indicios de que la PI-PLC este activada, ya que no existe liberación de inositoltrifosfato (IP₃). Además los inhibidores de la PLC, como la amikacina o la neomicina, no evitan la citotoxicidad del TNF sobre las células L929 (Matthews D, et al, 1989).

Schultze et al en 1991, demostraron que el TNF podía activar rápidamente una PLC específica de la fosfatidilcolina que llevaba a un incremento de los niveles de diacilglicerol (DAG) y a la activación de proteinkinasa C. Sin embargo, este efecto era sólo transitorio (10 minutos), mientras que la citotoxicidad debida al TNF requiere su presencia durante horas. Además en las células L929, no se ha detectado la activación de esta PLC específica de la fosfatidilcolina (Beyaert R and Fiers W, 1994).

Aunque la participación de los iones Ca²⁺ en la citotoxicidad por el TNF es controvertida (Bellomo et al, 1992), se ha especulado sobre la participación de un inositol trifosfato que induciría la liberación de calcio desde sus compartimentos intracelulares, aumentando las reacciones bioquímicas que conducen a la muerte

celular. Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que varios agentes quelantes del calcio protegen parcialmente frente a la citotoxicidad del TNF sobre las células L929 (Beyaert et al, 1993a).

3. La fosfolipasa D (PLD)

La PLD se activa en presencia de TNF en células L929. Su actividad conduce a la generación de ácido fosfatídico. Tampoco se conoce si éste juega un papel importante en la citotoxicidad por TNF (Beyaert R and Fiers W, 1994).

Por último, se ha propuesto, en líneas celulares linfoides, que el tratamiento con TNF induciría la activación de una esfingomielinasa que conduciría a la producción de ceramida. Sin embargo, en otros estudios sobre células L929, no se ha observado ningún efecto de distintos análogos de ceramida, sobre la citotoxicidad por TNF (Beyaert R, 1994).

La hipótesis que atribuye a la vía de la ceramida, generada por esfingomielinasas, la apoptosis por Fas o por TNF (Spiegel et al, 1996), es puesta en duda ya que tanto la generación de ceramida como la activación de la JNK durante la activación por Fas se inhibe por los inhibidores de la cascada de proteasas ICE (Lenczowski et al, 1997). Así, el aumento de ceramida sería una consecuencia más de la cascada de proteasas ICE pero no la causa de la apoptosis (Nagata S, 1997).

7.3.4. Fosforilación de proteínas

En algunas líneas celulares se produce una rápida fosforilación de proteínas tras el tratamiento con TNF. Así, en las células L929, se ha demostrado la activación de

proteínas quinasas Ser/Thr que alcanzan un nivel máximo tras 10 minutos de incubación con TNF. Entre las proteínas que se fosforilan se encuentran las quinasas erk-1 y erk-2, también conocidas como quinasas MAP2 (Vietor Y et al, 1993). Se cree que estas quinasas juegan un papel importante en la cascada de fosforilaciones iniciada por los factores de crecimiento (Blenis J, 1993). Es posible que su activación sea esencial para provocar la muerte, sin embargo no es lo suficientemente específica como para explicar la citotoxicidad del TNF.

La participación de los mecanismos de fosforilación /defosforilación en la citotoxicidad por TNF se ve ratificada por el sinergismo entre el TNF y la estaurosporina, inhibidor de muchas proteínas quinasas (Beyaert R, 1993b). Además, en distintas líneas celulares, entre las que se incluye la L929, el vanadato, inhibidor de la tirosina fosfatasa, inhibe la citotoxicidad del TNF (Totpal K, 1992).

Estas quinasas son admitidas hoy en día como transmisores de señal de apoptosis por el TNF , ya que el RIP posee actividad quinasa serina/treonina.

7.4 Mitocondria y producción de radicales libres

Existen numerosas evidencias que otorgan a la mitocondria un importante papel en la citotoxicidad por TNF. Matthews et al (1987) fueron los primeros en observar alteraciones mitocondriales en las células sensibles al TNF. Estos autores describían una reducción del número de crestas mitocondriales e hinchazón de estas organelas bajo tratamiento con TNF (Matthews N et al, 1987).

En los últimos años, se han publicado numerosos trabajos que demuestran la alteración del flujo electrónico mitocondrial como consecuencia del tratamiento con TNF (Schultze-Osthoff K et al, 1992; Schultze-Osthoff K et al, 1993; Cossarizza A et al, 1995). Por otra parte, el cultivo de las células L929 durante periodos largos de tiempo en bromuro de etidio o cloranfenicol, selecciona clones que han perdido la funcionalidad de sus mitocondrias y que además carecen de DNA mitocondrial. Estos clones son resistentes a la citotoxicidad por TNF, lo que ratifica el papel de las mitocondrias en los mecanismos de muerte celular (Schultze-Osthoff K et al, 1993). La síntesis de citoquinas, como la IL-6, inducida por el TNF desaparecía en los clones celulares referidos, lo que sugiere que las vías que provocan la citotoxicidad y la inducción genética están al menos parcialmente solapadas. El hecho de que, al menos en algunas líneas celulares, el TNF induzca la síntesis de la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD), proteína mitocondrial que confiere resistencia al TNF, apoya la importancia de las mitocondrias en el mecanismo de muerte celular inducida por el TNF (Wong GHW & Goeddel DV, 1988). Esta protección sugiere la participación de radicales de oxígeno en la citotoxicidad inducida por TNF, sobre todo si tenemos en cuenta que el TNF no es citotóxico en condiciones de anaerobiosis (Matthews N et al, 1987). El incremento de la sensibilidad al TNF por inhibición de la síntesis proteica podría deberse a la inhibición de la síntesis de proteínas tales como la MnSDO y otras proteínas críticas (Larrick and Wright, 1990).

El tratamiento con TNF origina lesiones mitocondriales tempranas. Estas lesiones se detectan horas antes de la muerte celular y antes de que sucedan otros cambios estructurales (Schultze-Osthoff et al, 1992; Schumer W et al, 1970). Así, en células L929, éstos se han descrito tan pronto como a las 2 horas de incubación. Los

cambios más marcados y tempranos consistían en la aparición de unas estructuras en forma de cebollas en el interior de la matriz mitocondrial. Las crestas se hacían más electrodensas y pronunciadas transformándose gradualmente en cuerpos multilamelares. Sin embargo, no se detectaba edematización de las mitocondrias, hasta las 9 horas de incubación. Por otra parte, es de destacar que en las primeras 5 horas no se observaban anomalías en las demás organelas. Shultze-Osthoff et al, 1992, observaron que el tratamiento protector con amital reducía estas lesiones ultraestructurales, mientras que la antimicina las potenciaba. Ambos son agentes inhibidores mitocondriales, aunque a distintos niveles de la cadena respiratoria. Los cambios mitocondriales descritos también se han observado en células tratadas no sólo con TNF, sino también con TNF/AD (Norton WN et al, 1985).

A pesar de lo expuesto, son escasos los trabajos sobre lesión ultraestructural mitocondrial secundarias al tratamiento con TNF/AD. En un modelo de lesión mitocondrial inducido por inhibidores mitocondriales, Laiho y Trump (1974) describían que los cambios estructurales mitocondriales conducían a una conformación condensada. Si la lesión persistía, la mitocondria se hinchaba por expansión de su compartimento interno, produciendo la rotura de la membrana externa. Los mecanismos de estos cambios conformacionales no son bien conocidos. La conformación condensada parece debida al bloqueo de la cadena respiratoria, a la caída de iones (Laiho & Trump, 1974), y al descenso del cociente ATP/ADP (Ord MJ and Smith RA, 1982). La edematización parece secundaria a la pérdida de la permeabilidad normal de la membrana interna y a la entrada ulterior de iones y agua desde el citoplasma a las mitocondrias.

En la apoptosis se han descrito cambios estructurales mitocondriales precoces. Estos cambios se han correlacionado con la alteración del potencial de membrana mitocondrial (Petit P et al, 1995; Cossarizza A et al, 1995). En timocitos inmaduros llevados a la muerte por apoptosis bajo tratamiento con dexametasona, Petit et al observaron una caída del potencial de membrana mitocondrial y lesiones mitocondriales previos a la fragmentación nuclear, propia de la apoptosis. Parece que esta alteración mitocondrial se correlacionaba con la inhibición de la producción oxidativa de ATP. Este hallazgo se ve reforzado por la capacidad del protooncogen Bcl-2 de protegerse de la muerte por apoptosis. Los productos de este protooncogen se localizaban en las mitocondrias y parece que aumentan el potencial de membrana mitocondrial. Así, en las líneas L929, que sobreexpresan Bcl-2, se detectaba un potencial de membrana mitocondrial aumentado que las protege de la muerte por apoptosis provocada por el TNF (Petit P et al, 1995; Hockenbery DG et al, 1990). También se han relacionado los cambios mitocondriales, con la generación de radicales libres de oxígeno (RLO) como mediadores de la señal apoptótica, si bien este tema es controvertido (Slater FGA et al, 1995; Muschel RJ et al, 1995).

A nivel funcional se ha descrito a las mitocondrias como diana del efecto citotóxico del TNF. Así, varios autores han detectado inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial, en células digitonizadas expuestas a TNF. En el estudio de Jia et al (1996) se describía inhibición de los complejos respiratorios I, II y IV. Schultze-Osthoff et al (1992) sin embargo, implicaban al complejo I como el principalmente afectado si bien también se afectaban el II y el III. Pero el complejo implicado varía según los autores, así, para Hennen et al (1992), eran el I y el II, para Lancaster et al (1989) el complejo II y III e incluso para otros, en lugar de inhibición, se detectaba

estimulación (Levrat et al, 1991). La causa de estos resultados divergentes quizás reside en el método utilizado para medir los complejos respiratorios mediante digitonización celular, ya que se somete a las células a condiciones que no son las que ocurren realmente bajo el tratamiento con TNF. Los autores referidos describen que estos efectos inhibidores del TNF ocurren ya a las 3 horas, antes de que tengan lugar los cambios apoptóticos. Por ello, la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial se considera como causa y no como consecuencia de la muerte celular (Schultze.-Osthoff et al, 1992; Hennes et al, 1993). Los citados autores no analizan, sin embargo, el grado de acoplamiento mitocondrial en presencia de tratamientos con TNF o con TNF e inhibidores de la síntesis proteica, ni el estado redox de los citocromos mitocondriales.

Los RLO están implicados en múltiples procesos biológicos. Así han sido implicados en la defensa frente a los microorganismos, como segundos mensajeros en la activación del factor de transcripción nuclear NF-KB, o como causa directa de daño celular a través de lipoperoxidaciones (Schreck R et al, 1991).

La evidencia del papel de los RLO en la citotoxicidad mediada por TNF es fundamentalmente indirecta. En este sentido, se ha demostrado que la sobreexpresión de la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD), la presencia de “limpiadores” de radicales, de quelantes del hierro o de inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial ejerce un papel protector sobre la citotoxicidad por el TNF (Wong GHW and Goeddel DV, 1988; Schultze-Osthoff K et al, 1993 y 1992). Sin embargo, otros agentes “limpiadores” de radicales libres, que deberían proteger de la citotoxicidad por TNF sí ésta se debiera a los RLO, no evitan su citotoxicidad (Suffys et al, 1987; Brekke et al, 1992). En el clásico trabajo de Matthews N et al (1983), la citotoxicidad

del TNF sobre las células L929 no se evitaba en presencia de dimetilsulfóxido (DMSO), vitamina E, tiourea, mercaptoetanol o metimazol. Sin embargo tal citotoxicidad quedaba amortiguada bajo tratamiento con deferoxamina, un quelante del hierro. Sin embargo, estudios más recientes confirman que el pretratamiento con N-acetilcisteína, conocido antioxidante, reducía la muerte por apoptosis debida a la exposición al TNF a través de su acción mitocondrial (Cossarizza A et al, 1995).

La medida directa de la producción de RLO, bajo tratamiento con TNF, muestra resultados contradictorios. Algunos autores detectaban que efectivamente el TNF inducía un incremento de los niveles de RLO (Yamauchi et al, 1989, Hennet et al, 1993; Goossens V et al, 1995), mientras que otros no los detectaban (Beyaert & Fiers, 1994; Meier et al, 1989). En el estudio de Goossens V et al (1995), se describe la producción precoz de RLO, en células L929 incubadas con TNF e inhibidores de la síntesis proteica. Estos RLO se correlacionaban con la citotoxicidad, ya que la adición de "limpiadores" de los RLO, como el hidroxitolueno butilado (BHT) y el hidroxianisol butilado (BHA), evitaban simultáneamente la acumulación de los RLO y la citotoxicidad inducida por ellos. Los RLO detectados parecían proceder de las mitocondrias, ya que los inhibidores del glutatión mitocondrial los incrementaba. La falta de concordancia en los estudios publicados respecto a los RLO y el TNF, se explicaría por su producción a nivel mitocondrial, por lo que con frecuencia sólo inhibiendo el glutatión mitocondrial se hacen detectables. Se ha propuesto la hipótesis de que los RLO provocan un desequilibrio en los grupos tiólicos con la consecuente alteración de la homeostasis del calcio en las mitocondrias (Goossens V et al, 1995). Se ha implicado al stress oxidativo inducido por los RLO en el mecanismo de muerte celular, ya que estos últimos harían más vulnerable a las mitocondrias frente al ataque oxidativo, por consumo de su

sistema antioxidante de glutation. Por otra parte, estos RLO pueden producir la peroxidación de los lípidos de la membrana citoplásmica, incrementando su permeabilidad.

Los RLO han sido implicados, no sólo en la citotoxicidad por TNF, sino también, a través de la activación de NF- κ B, en la expresión de los genes inducidos por TNF (Schultze-Osthoff K et al, 1993).

Se sabe que la mitocondria es una importante fuente de RLO bajo ciertas condiciones. El 1-2 % del oxígeno consumido en el estadio 4 respiratorio, fase de reposo, se utiliza en la formación de radicales libres (Boveris et al,1973). En presencia de ciertas drogas como los inhibidores de la respiración mitocondrial se puede incrementar notablemente la producción de RLO.

Se han identificado como fuentes de RLO dos puntos de la cadena respiratoria. Uno es dependiente de la autooxidación de nucleótidos de flavina, desde la NADH-dehidrogenasa (complejo I); el segundo, y quizás el más importante, depende de la autooxidación de la inestable ubisemiquinona (complejo III) que es un intermediario de las reacciones del ciclo Q (ubiquinona) (Turrens J et al, 1985). En presencia de inhibidores del complejo I y del complejo II se reduce la producción de RLO (Cino M and Del Maestro RF,1989).

En circunstancias normales o patológicas, el primer radical de oxígeno generado en la mitocondria es el radical superóxido, que se convierte en peróxido de hidrógeno (Schultze-Osthoff K,1992). La dismutación de O_2^- y H_2O_2 puede resultar en la producción de moléculas más deletéreas como el radical hidroxil y el oxígeno simple, reacción catalizada por metales de transición como el ion hierro, a través de la reacción de Fenton y la de Haber-Weiss (Halliwell B & Gutteridge JMC, 1990).

Los RLO ejercen su acción nociva mediante peroxidación lipídica, daño proteico y la degradación del DNA. Mientras que el O_2^- y H_2O_2 difunden fuera de la mitocondria y pueden dañar otras organelas, las reacciones del radical hidroxil altamente tóxico y de vida corta, está más controlada. Probablemente los tres radicales son más dañinos a nivel de la membrana interna mitocondrial. Se conoce que la mitocondria tratada con peroxidantes pierde su capacidad para retener calcio (Richter C and Frei B, 1988). El aumento del calcio citoplásmico, activa proteasas y fosfolipasas que pueden estar implicadas en la toxicidad inducida por TNF, como ya se ha expuesto. Los radicales libres pueden también, lesionar directamente la cadena respiratoria mitocondrial (Zhang Y et al, 1990), aunque algunos autores consideran que los RLO serían consecuencia final y no causa de la lesión mitocondrial (Jia BL, 1996).

Se ha responsabilizado a las mitocondrias como la fuente de los RLO generados por el TNF (Stadler et al, 1992; Hennes et al, 1993; Schultze-Osthoff et al, 1992). Así, Hennes et al, correlacionaban la alteración de la cadena respiratoria mitocondrial, bajo tratamiento con TNF, con la generación de anión superóxido. Schultze-Osthoff et al (1992) especulaban que el TNF inhibiría la cadena respiratoria mitocondrial a nivel del complejo III, a partir del cual se generarían los RLO intramitocondriales. Otros autores han implicado al complejo II como fuente de los RLO (Levrat et al, 1991; Hennes et al, 1993), ya que han observado que la línea celular L929 resistente a TNF poseía un complejo II con menor actividad. Por último, para otros autores la resistencia a la citotoxicidad inducida por TNF, que se observa en determinadas líneas celulares, vendría determinada por su menor actividad mitocondrial (Jia BL et al, 1996).

Se sabe que los complejos mitocondriales I y II pueden ser fuente de radicales de oxígeno (Shoji Y et al, 1995). El complejo III también ha sido implicado como fuente de RLO, ya que la acción del mixotiazol previene o reduce la formación de RLO en la situación de isquemia química artificial (Dawson TL et al, 1993)

Se han publicado resultados contradictorios respecto al efecto que los inhibidores mitocondriales ejercen sobre la citotoxicidad inducida por TNF o por la combinación de TNF e inhibidores de la síntesis proteica. Se ha observado que los propios inhibidores mitocondriales tales como la rotenona (Takeshige and Minakami, 1979) y la antimicina (Konstantinov et al, 1987) generarían RLO desde tramos proximales al punto bloqueado. También se ha comprobado la producción de RLO por la acción de desacoplantes de la fosforilación oxidativa (Hennet et al, 1993). Sin embargo Hennet et al (1993) han observado que la antimicina A, la rotenona y el cianuro reducen la producción de anión superóxido en células L929 tratadas con TNF. En contraste, Schultze-Osthoff et al (1992) han comunicado un aumento de la citotoxicidad por TNF en presencia de antimicina A, si bien en tal experimento se administraban los inhibidores mitocondriales previa o simultáneamente al TNF. Se ha comprobado que los inhibidores mitocondriales aumentaban la afinidad de los receptores del TNF y con ello su efecto. Sin embargo, la rotenona y el amital, que inhiben la cadena respiratoria nivel del complejo I, así como el TTFA que lo hace a nivel del complejo II, protegían frente a la citotoxicidad inducida por TNF. Tales resultados se mantenían tras el tratamiento combinado con TNF y AD (Sánchez-Alcazar JA et al, 1995; Shoji Y et al, 1995).

Se ha descrito una relación entre el estado redox del citocromo b_{566} y la formación de RLO (Nohl H and Hegner D 1978; Nohl H and Jordan W 1986). La antimicina es un potente inhibidor del complejo $b-c1$ a un nivel distinto que el ejercido por el mixotiazol. La antimicina provoca un cambio conformacional de este complejo provocando un giro rojo en el pico α y γ del citocromo b_{562} reducido (Von Jagow G y Link TA, 1986) y previene el incremento, ATP-inducido, en el potencial redox del citocromo b_{566} (Dutton PL et al, 1972).

Matthews et al (1983,1987) han observado como las células tratadas con TNF mostraban un descenso tardío en la síntesis de ATP, de forma paralela a las alteraciones mitocondriales. Las relaciones entre apoptosis y contenido energético celular (niveles de ATP) ha sido poco estudiado. En este sentido se ha demostrado que la apoptosis requiere niveles adecuados de ATP para llevarse a cabo, como corresponde a un proceso activo que consume energía. Así, la deplección de ATP previa a distintos estímulos de apoptosis impediría ésta (Stefenalli C et al, 1997; Richter C et al, 1996; Chou CC et al, 1996). Sin embargo, pocos autores han analizado las variaciones precoces en los niveles de ATP durante el estímulo apoptótico por TNF o TNF en presencia de inhibidores de la síntesis proteica. Hennes et al, 1993, describían un descenso en los niveles de ATP desde las 6 horas de tratamiento con TNF en células L929. Este descenso alcanzaba su máximo descenso a tiempos tardíos, 20 horas, en los que ya existía un gran porcentaje de muerte celular. Además se ha descrito una alteración precoz del potencial de membrana mitocondrial en la apoptosis (Hennes et al, 1993; Petit et al, 1995). Otros autores han demostrado también descenso del ATP intracelular en hepatocitos a las 4 horas de tratamiento con TNF. Estas células, normalmente resistentes al TNF, se sensibilizan a éste en

presencia de inhibidores del glutathione. En éstas últimas condiciones, si se evitaba el descenso del ATP, bien estimulando la glucólisis o bien con rojo de rutenio (que evita el ciclo del calcio intramitocondrial), se evitaba la muerte celular (Adamson GM et al, 1992). Pero estos descensos en los niveles de ATP eran eventos tardíos en la citotoxicidad inducida por el TNF o por el TNF en presencia de inhibidores de la síntesis proteica.

Los radicales de Nitrógeno , NO, NO₂, NO₃, son otro tipo de radicales que podrían participar en la citotoxicidad inducida por TNF. Estas moléculas se sintetizan por los macrófagos activados a través de la vía de la L-arginina deaminasa (Albina et al, 1989), siendo citostáticos y citotóxicos para las células tumorales y los microorganismos (Hibbs et al, 1987). La utilización de medio de cultivo libre de L-arginina o la adición de N^G-monometil-L-arginina, un inhibidor específico de la L-arginina desaminasa, inhibía la lisis de las células tumorales por los macrófagos activados (Albina et al, 1989). Se ha demostrado que el TNF induce la síntesis de NO sintetas y la producción de NO en células L929 (Hauschildt S et al, 1992). Sin embargo, es poco probable que los intermediarios reactivos del nitrógeno ejerzan un papel directo sobre la citotoxicidad por TNF, ya que los inhibidores de la producción de NO y los scavenger de NO no resultan protectores de la citotoxicidad inducida por el TNF (Fast DJ et al, 1993).

7.5. TNF y muerte celular: Apoptosis y necrosis

En función de diferencias morfológicas, bioquímicas y moleculares, la forma de muerte celular ha sido etiquetada bien como apoptosis o bien como necrosis.

La apoptosis se considera un proceso activo de suicidio celular que se caracteriza, a diferencia de la necrosis, por una serie de eventos celulares que conducen a la rotura del DNA en múltiples fragmentos de 200 pb (Cossarizza et al, 1995). Las características morfológicas que definen a la apoptosis están bien especificadas. El núcleo y el citoplasma se condensan y se forman fragmentos celulares que reciben el nombre de cuerpos apoptóticos, éstos conservan íntegra la membrana celular y en su interior contienen organelas y fragmentos nucleares. No existe edematización celular ni de las organelas, así como tampoco rotura de la membrana celular, a diferencia de lo observado típicamente en la muerte celular por necrosis. Por otra parte, estos cuerpos apoptóticos se eliminan sin cambios inflamatorios adyacentes, frecuentemente por fagocitosis. Sin embargo, en la muerte por necrosis, la célula, cuya membrana celular se ha roto y cuyo DNA se ha fragmentado aleatoriamente, libera productos tóxicos que desencadenan fenómenos inflamatorios. En la apoptosis la muerte celular ocurre de forma asincrónica entre las distintas células mientras que en la necrosis es sincrónica (Kerr et al, 1987; Gerschenson LE & Rotello RJ, 1992; Steller H, 1995).

La muerte apoptótica de las células durante el desarrollo normal de los vertebrados e invertebrados fue descrita inicialmente por Glucksmann, en 1951, y por Saunders, en 1966. Kerr, en 1965, observó distintos tipos de muerte en hepatocitos

tras ligadura de la vena porta. Inicialmente, observó hepatocitos necróticos, sin embargo, más tarde describió algunas células dispersas con el núcleo condensado y sin rotura lisosómica o inflamación. Posteriormente en 1971, Kerr describió lo que llamó "shrinkage necrosis", fragmentos nucleares con orgánulos citoplásmicos intactos y rodeados de membrana. Por último, y tras demostrarse la existencia de dichos cambios morfológicos en distintos tejidos animales, Kerr y Searle (1972) propusieron la denominación de apoptosis, aunque con frecuencia e incorrectamente se utiliza el término de "muerte celular programada". Dicho término fue acuñado en virtud de que la apoptosis interviene en la muerte programada de las células durante el desarrollo embrionario (Gerschenson LE and Rotello RJ, 1992).

Desde un punto de vista funcional, la apoptosis es una forma de muerte de alguna forma preinscrita en la célula, aunque disparada o desinhibida por la confluencia de numerosos factores: la propia información genética de un tipo celular, los factores ambientales, los factores de crecimiento o las hormonas. Incluso, en determinadas situaciones, pequeñas agresiones del exterior desencadenan también este tipo de muerte. En contraste, la necrosis es la forma típica de muerte celular ante una agresión. En la mayoría de los casos, la apoptosis sería un mecanismo fisiológico utilizado para regular el crecimiento y la diferenciación de los distintos tejidos e, incluso, el control del crecimiento tumoral y de la autoinmunidad. Así, existen evidencias recientes que sugieren que la inapropiada activación de la apoptosis conduciría a determinadas enfermedades como el SIDA y las enfermedades neurodegenerativas. Por otro lado, un fallo en la inducción de apoptosis conduciría al desarrollo tumoral, a las enfermedades autoinmunes y a ciertas patologías originadas por virus (Thompson CB, 1995; Rudin CM and Thompson CB, 1997). El mecanismo

apoptótico está implicado en la involución de los órganos y tejidos ante la retirada del estímulo hormonal adecuado, en la delección de determinados clones de linfocitos , que evitaría el desarrollo de autoinmunidad. La apoptosis ha suscitado un gran interés también en oncología, ya que los tumores pueden generarse por disminución de la muerte celular, originando un desequilibrio entre los procesos de multiplicación y desaparición celular (Gerschenson LE and RJ Rotello, 1992).

Se ha observado que determinados genes protegen de la apoptosis. Así, el protooncogen Bcl-2, cuya expresión está aumentada en la mayoría de los linfomas foliculares (Tsujiimoto et al, 1984), protege de la apoptosis inducida por distintos estímulos (Thompson CB, 1995; Hockenbery DM et al, 1993). La sobreexpresión de este gen en los tumores condiciona un peor pronóstico, tanto en la respuesta a la quimioterapia (Miyashita T and Reed JC,1993) como en el pronóstico global (Castle et al, 1993). Por otra parte se ha propuesto que los RLO podrían causar apoptosis por un mecanismo controlado por la Bcl-2. Así se ha demostrado en algunos experimentos que la Bcl-2 protegía de la apoptosis por RLO; pero en otros estudios se ha observado que la Bcl-2 protegía de la apoptosis en ausencia de mitocondrias y en situación de anaerobiosis (Steller H, 1995).

Todo parece indicar que la apoptosis es un mecanismo de muerte celular con una regulación compleja, que implica factores intrínsecos a la célula y que no precisa de la síntesis proteica "de novo", ya que ocurre en presencia de inhibidores de ésta , e incluso puede ser inducida por estos (Bansal N et I,1991). Factores extracelulares , tales como los de crecimiento, las hormonas etc.. mantendrían el equilibrio entre crecimiento y apoptosis, de forma que la señal intracelular de apoptosis no se llevaría a

cabo (Steller H, 1995 ; Thompson CG, 1995; Gerschenson LE and RJ Rotello, 1992). De esta forma, ante el mismo estímulo y en distintas circunstancias ambientales una célula respondería hacia apoptosis o hacia crecimiento.

La característica más importante de la apoptosis es la participación activa de la célula, poniendo en marcha una cascada de procesos que desembocan en la formación de los cuerpos apoptóticos. Durante la apoptosis se producen numerosos cambios celulares: aumenta el calcio intracelular, se produce peroxidación lipídica, la cromatina se condensa en la periferia nuclear, se activan endonucleasas que actuarán sobre el DNA en las uniones internucleosómicas, el núcleo se fragmenta y finalmente lo hace la célula. Sin embargo , incluso en fases avanzadas de este proceso de muerte celular, la membrana citoplasmática se mantiene íntegra. Inicialmente se creía que las mitocondrias y los lisosomas se mantenían funcionales. Recientemente se ha demostrado que existen lesiones de estas organelas, con disminución precoz del potencial de membrana mitocondrial (Zamzami n et al 1995; Petit XP et al, 1995). De todas las características citadas anteriormente, es probablemente la rotura del DNA en las regiones internucleosómicas, el criterio de identificación más utilizado. Esta rotura origina fragmentos múltiples de 180-200 pb que dan la apariencia en "escalera" al realizar la electroforesis del DNA (Robaye et al, 1991).

El mecanismo intracelular que ejecuta este suicidio celular no está bien definido y es objeto de numerosos estudios por la importante implicación que tendría el control de dicho suicidio en las numerosas patologías derivadas de su disregulación.

Existen numerosos inhibidores e inductores de la apoptosis. Así, se conocen como inhibidores fisiológicos de la apoptosis los factores de crecimiento, el zinc, los

estrógenos. Entre los inhibidores virales estarían los adenovirus E1B, el Epstein Barr, virus BHRF1-LMP-1, etc .. y entre los inhibidores farmacológicos el fenobarbital, los inhibidores de la proteasa de cisteína etc ...(Thompson CB, 1995). Entre los inductores se encuentran los corticoides, la radiación gamma o ultravioleta, agentes quimioterápicos como la bleomicina, la actinomicina D el TNF, así como otros agentes de su familia de ligandos, como el Fas y también varios oncogenes como myc, E-A, represores de tumores como p53 y los RLO.

Se ha descrito al TNF como un inductor de apoptosis en células sensibles como las MCF-7 (Dealtry GB et al, 1987), en las que este efecto se potenciaba con IFN-gamma. En las células resistentes al TNF se ha descrito apoptosis al añadir AD o CHX

El TNF provoca muerte celular por necrosis o apoptosis en función del tipo celular estudiado (Lancaster SM et al, 1988). Así, hay casos como las células F17, fibroblastos de ratón transformados con el gen E1 de adenovirus, en los que el TNF induce una apoptosis clásica. En las células L929, el TNF provoca la muerte por apoptosis sólo a tiempos largos (Schultze-Osthoff W et al, 1992), pero si se añaden inhibidores de la síntesis proteica se acorta el tiempo de muerte, ocurriendo ésta entre 12-24 horas. Parece que las primeras organelas afectadas serían las mitocondrias (Matthews N,1987; Shultze-Osthoff et al, 1992).

La AD y la CHX per sé también provocan muerte por apoptosis en células leucémicas (Bansal N et al,1991).

La exposición a oxidantes, como el peróxido de hidrógeno, o hidroperóxidos lipídicos conduce a la muerte celular por necrosis (Orrenius S et al, 1993). Sin embargo, los RLO a dosis no tan elevadas inducen muerte por apoptosis (Lennon SV

eta I, 1991; Slater AFG et al, 1995). Reforzando estos últimos hallazgos se encuentra el hecho de que los antioxidantes protegen y evitan la apoptosis. Se ha descrito esta protección tanto en la apoptosis inducida por oxidantes como en la apoptosis causada por TNF, por irradiación, etc... (Buttke TM and Sandstrom PA, 1994; Chang DJ et al, 1992; Ramakrishnan N and Catravas GN, 1992). Todo ello sugiere que la oxidación juega un papel en la progresión de la apoptosis inducida en diferentes modelos. Otro hallazgo que apoya esta hipótesis son los estudios con Bcl-2. La sobreexpresión de este protooncogen protegía de la apoptosis inducida por múltiples estímulos, incluido el TNF (Zhong LT et al, 1993). Se ha sugerido que este efecto se conseguía a través de una reducción de la generación de RLO y por la protección de ciertas oxidaciones intracelulares que serían necesarias para la apoptosis (Hockenbery DM et al, 1993). El tratamiento con TNF aumenta la producción de RLO de origen mitocondrial (Shultze-Osthoff K et al, 1992, Hennes T et al, 1993, Gossens et al, 1995). Sin embargo, la mayoría de las células poseen suficiente capacidad antioxidante para evitar el potencial lesivo de estos RLO, excepto células como las L929 pretratadas con inhibidores de la síntesis proteica. También se ha demostrado que la sobreexpresión de MnSOD permite evitar la apoptosis originada por irradiación o quimioterápicos (Wong GHW, 1995), lo que indica que los RLO mitocondriales son importantes en esta forma de muerte. Se especula que los RLO podrían alterar factores de transcripción con la consecuente inducción a la apoptosis o podrían alterar la estructura proteica de ciertos inhibidores de las proteinasas que de esta forma resultarían activadas o desinhibidas (Slater AFG et al, 1995). Mientras que la mayoría de los autores responsabilizan a la mitocondria como la principal fuente de RLO en la citotoxicidad por TNF (Hennes et al, 1993; Shoji Y et al, 1995), otros sugieren que deben existir otras fuentes de RLO (Slater AFG et al, 1995; O'Donnel VB et al, 1995). Algunos autores niegan que el TNF

provoque un aumento de RLO y abogan por el papel de la lipoxigenasa, que produciría radicales del tipo de los hidroperóxidos lipídicos. Así, la protección conseguida con la deferoxamina y con el TTFA frente a la citotoxicidad inducida por TNF, se debería a su acción ejercida sobre los centros activos redox no hémicos de la lipoxigenasa (O'Donnell V et al, 1995).

El tratamiento de la línea celular L929 con TNF en presencia de AD induce la muerte celular que es evidente desde las 6 horas pero fundamentalmente desde las 12 horas (Shoji et al, 1995). Ni la AD ni el TNF solos provocan muerte celular evidente a estos tiempos. En presencia de tratamiento combinado con TNF y AD la muerte celular inducida en la línea L929, es de tipo apoptótico (Shoji Y et al, 1995). En la línea celular HepG2, el tratamiento con TNF en presencia de AD también induce muerte celular de tipo apoptótico (Hill DB et al, 1995). En estas condiciones se ha demostrado también, la generación precoz de RLO de origen mitocondrial, ya que la inhibición de las mitocondrias o la adición de antioxidantes evitan tanto la producción de RLO como la citotoxicidad por TNF (Shoji Y et al, 1995). Esta producción de RLO es precoz respecto a la muerte celular, desde los primeros 60 minutos de tratamiento con TNF (Hennet et al, 1993) . Se ha demostrado también el descenso del glutatión intracelular bajo tratamiento con TNF (Shoji Y et al, 1995).

7.6. Efectos nucleares del TNF

7.6.1. Genes inducidos por TNF

El TNF induce la transcripción de un gran número de genes en diferentes tipos celulares. Así se sabe que induce los genes de la superóxido dismutasa de manganeso, la metalotionina, la 2'-5'oligo A sintetasa, el CD11/CD18, el ICAM 1, el ELAM, el factor tisular, el inhibidor del activador del plasminogéno, la IL-6, la IL-8, la cadena pesada del citocromo P245, la colagenasa, las proteínas de shock caliente, los proto-oncogenes: c-myc, c-fos, c-jun etc... Por otra parte, inhibe el gen de la proteína S, de la proteína C, (Larrick J & Wright SC, 1990) y del gen del colágeno (Hernandez I et al, 1997).

Sin embargo, no queda claro si alguno de los productos de estos genes está implicado en la citotoxicidad del TNF. Quizás esta inducción genética sólo esté implicada en las respuestas positivas del TNF, tales como la diferenciación, o estimulación del crecimiento celular. Así, lo sugiere el hallazgo de que la presencia de inhibidores de la transcripción o la translación no inhibe la lisis celular.

Por otra parte, se ha postulado que la inducción, en determinados tipos celulares, de genes protectores determinaría si un tipo celular es sensible o no a la citotóxicidad por TNF. Así, se sabe que el TNF induce la superóxido dismutasa mitocondrial (Friedl HP et al, 1989) y la cadena pesada de la ferritina (Torti SU et al, 1988), ambas proteínas pueden amortiguar el daño por radicales libres inducidos por el TNF. Este efecto es bloqueado por cicloheximida y actinomicina D, lo que sugiere el requerimiento de la síntesis de nuevas proteínas.

7.6.2. Factores nucleares NF- κ B

El NF κ -B es un factor nuclear inicialmente reconocido en las células B maduras, que específicamente interactúa con el elemento activador del gen de la cadena ligera Kappa de las inmunoglobulinas. En realidad, es un factor citoplásmico de transcripción nuclear que controla la expresión inducible de varios genes involucrados en la respuesta inmune. Los genes diana de NF κ -B son citoquinas, receptores de citoquinas, antígenos MHC y proteínas de fase aguda. La naturaleza del NF κ -B es la de un complejo heterodímero que en su forma clásica posee dos moléculas polipeptídicas: una de 50 kDa (subunidad de unión a DNA) y otro de 65 kDa (subunidad requerida para la inactivación). Esta molécula, y sus proteínas estructuralmente relacionadas, están presentes en otros tipos celulares, y son inducibles por una variedad de estímulos extracelulares. En las células B, la expresión de NF κ -B es constitutiva. En otras células no estimuladas, la mayoría del NF κ -B está en el citoplasma y no puede unirse al DNA por el inhibidor proteico I κ -B. Un estímulo externo puede activar numerosas proteinquinasas e inducir la fosforilación de I- κ -B, produciendo la disociación del complejo, o alterando su conformación. Ello da lugar al desenmascaramiento de la región de unión del señal al DNA y a la translocación del dímero hacia el núcleo (Bauerle and Baltimore, 1988). Recientemente se ha propuesto que los RLO y el estado redox celular estarían involucrados en la activación de (Staal et al, 1990; Shultze-Osthoff K et al, 1993). Así, en algunas líneas celulares el NF κ -B se activa por la administración exógena de peróxidos de hidrógeno. Por otra parte, la activación de NF κ -B por distintos estímulos como TNF, IL1, ésteres de forbol o cicloheximida, se inhibe por tioles antioxidantes o quelantes del hierro.

En la activación de NF κ -B por TNF se distinguen dos estadios. Uno de ellos es la activación rápida (unos minutos después de estimular las células), que es independiente de la síntesis proteica y se consigue por la disociación de la proteína inactivadora (I κ B) del complejo preformado e inactivo NF κ -B-I κ -B. El NF κ -B activo desaparece rápidamente, y el pool de NF κ -B inactivo se agota cuando se inhibe la síntesis proteica. Para mantener constantes los niveles de NF κ -B activo es preciso, por tanto, la síntesis proteica *de novo* y también es necesaria la estimulación continuada de las células con el TNF (Hohmann et al 1991). Sin embargo, muchos de los genes inducibles por TNF no presentan puntos de reconocimiento para NF κ -B. Por tanto, la inducción de la transcripción de genes celulares por esta citoquina requiere la activación de otras proteínas de unión al DNA, al mismo tiempo o como consecuencia de la activación de NF κ -B (Duh et al 1989). El NF κ -B puede intervenir en la expresión de distintos genes, como genes de citoquinas, genes de proteínas plasmáticas de origen hepático y en la estimulación de otros transactivadores como *c-fos* y *c-myc* e incluso en su propia estimulación (Lenardo and Baltimore, 1989).

Está demostrado que el TNF induce el NF κ -B. Sin embargo no está claro si su activación está en relación con la inducción de citotoxicidad y de apoptosis (Beyaert R and Fiers W, 1994). Estudios realizados sobre un subclón de células L929, que ha perdido la cadena respiratoria mitocondrial, han mostrado que en estas condiciones se inhibe la activación de NF κ -B y la inducción secundaria de IL-6 y se protege a estas células frente a la citotoxicidad por TNF. Ello sugiere que las mitocondrias son la fuente de RLO que actúan como segundos mensajeros, tanto de la citotoxicidad como de la inducción genética inducida por el TNF. En la actualidad, sin embargo está más admitido que la citotoxicidad y la activación genética inducidas por el TNF tienen lugar

por vías independientes (Antwerp JV et al, 1996). Los estudios más recientes han demostrado que el NF κ -B, inducido por el TNF, ejerce un efecto protector sobre la apoptosis inducida por el propio TNF, así como por otras señales de apoptosis (radiación ionizante, dauromicina y otros quimioterápicos) (Wang CY et al, 1996; Beg AA et al 1996; Antwerp JV et al 1996;). El TNF determinaría, así, su propio poder apoptótico, al inducir simultáneamente la señal apoptótica e inducir NF κ -B. Sería el equilibrio entre la señalización de apoptosis y la de protección lo que determinaría el efecto final inducido por el TNF. Por ello, la inhibición de NF κ -B, con glucocorticoides (Auphan N et al, 1995) o antioxidantes (Schreck R et al, 1996), desplazaría el equilibrio hacia la apoptosis, como se ha demostrado también en células deficitarias en la activación de NF κ -B (Wang CY et al, 1996). La sensibilización al TNF con los inhibidores de la síntesis proteica se explicaría así por inactivación del efecto final de NF κ -B. Esta doble señalización podría justificar la distinta sensibilidad celular a la citotoxicidad por TNF.

7.6.3. Adenovirus E1 A

En las células NIH-3T3 transfectadas con el adenovirus E1A se induce una mayor susceptibilidad a la lisis por las células "natural killer"(NK) y por los macrófagos activados (Cook et al, 1989). Los anticuerpos contra el TNF bloquean la citolisis por los macrófagos pero no la citolisis por las células NK. Los productos génicos de E1A pueden activar el estimulador de las inmunoglobulinas de cadenas ligeras tipo κ , por la vía del NF- κ B (Shurman et al, 1989), lo que sugiere un posible mecanismo para la inducción de la sensibilidad al TNF. Si la activación del NF- κ B es esencial para

provocar los efectos citotóxicos del TNF, el adenovirus E1A podría activar una quinasa que induzca un aumento de la activación de moléculas semejantes al NF- κ B . Sin embargo esta última posibilidad o hipótesis parece actualmente rechazada (Barinaga M, 1996).

7.6.4. Oncogen BCL2

El oncogen Bcl-2 codifica una proteína localizada en la membrana interna mitocondrial . La transfección de la células L929 con un vector expresando Bcl-2 disminuye la citotoxicidad mediada por el TNF, fenómeno que se atribuye a un aumento del potencial de membrana mitocondrial (Hennet et al, 1993).

El Bcl-2 se localiza en la membrana mitocondrial, retículo endoplásmico y núcleo. Cuando se produce un daño mitocondrial por alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial se produce apoptosis nuclear (Zamzami et al, 1996). Estas alteraciones de la permeabilidad y la apoptosis subsiguiente se evitan con Bcl-2 lo que sugiere que los poros generados en la membrana mitocondrial por miembros de la familia de Bcl-2 podrían tener un papel en la apoptosis (Nagata S, 1997).

El Bcl-2 inhibe la apoptosis por Fas (Rodriguez et al, 1996). La activación de Fas, que activa la misma vía apoptótica que el TNF, provoca daño en la función mitocondrial pero éste puede amortiguarse por inhibidores de la proteasa tipo ICE (Krippner et al, 1996) . Ello sugeriría que el daño mitocondrial en la apoptosis sería un efecto secundario más de la cascada de proteasas ICE. No se sabe cómo el Bcl-2 localizado en la mitocondria puede inhibir esta señal apoptótica.

7.6.5. ADP-ribosilación

Las reacciones de ADP-ribosilación son modificaciones postransduccionales de proteínas en las que la molécula de ADP-ribosa del NAD⁺ se une enzimáticamente a lugares específicos. Se ha observado la presencia de ADP-ribosil transferasas (Thomasin et al 1988 y poli(ADP-ribosa) polimerasa (Kameshita et al 1984) en todas las células eucariotas estudiadas. El enzima poli(ADP-ribosa) polimerasa (ADPRP), de 116-kDa, se encuentra en los núcleos de todas las células eucariotas (Gaal & Pearson, 1985) y presenta una secuencia muy conservada. Cataliza la transferencia dependiente de DNA de ADP-ribosa desde el NAD a proteínas nucleares para formar cadenas de poli (ADP-ribosa) más elongadas y ramificadas. La ADPRP es activada por roturas del DNA. La actividad continuada de la ADPRP agota el NAD y ATP celular, provocando la muerte celular (Skidmore et al 1979).

La participación de la ADP-ribosilación en la citotoxicidad inducida por TNF ha sido propuesta por varios autores (Agarwall et al 1988; Lichtenstein et al 1991) que han observado que los inhibidores de la ADP-ribosilación (Zinc, 3-aminobenzamida) protegen de dicha citotoxicidad. Además, se ha demostrado que la ADP-ribosilación de una proteína de 90 Kda está relacionada con la citotoxicidad inducida por el TNF y precede a la muerte celular (Agarwal and Piesco 1994).

7.6.6. Topoisomerasa II

Las DNA-topoisomerasas son enzimas que relajan la estructura del DNA. Las topoisomerasa tipo I introducen roturas simples en el DNA, mientras que las de tipo II provocan roturas dobles. Ambas forman puentes transitorios con el DNA, de tipo covalente. Algunos autores han observado que los inhibidores de la topoisomerasa II

bloquean la citotoxicidad originada por el TNF (Rose KM , 1988), mientras que otros han descrito el efecto contrario (Alexander et al, 1987). Parece que tal discrepancia depende del tipo de inhibidor de la topoisomerasa así como de la dosis y del tipo celular estudiado , pero el mecanismo permanece desconocido . Se ha detectado un aumento de la actividad de las topoisomerasas en células L929, bajo tratamiento con TNF, pero ello no se relaciona con la citotoxicidad por TNF(Baloch Z et al, 1995).

7.7.TNF e inhibidores de la síntesis proteica

La actinomicina D (AD) es un antibiótico con actividad antitumoral, inicialmente derivado del *streptomices* y utilizado, entre otros, en tumores malignos pediátricos y en el coriocarcinoma. Este fármaco inhibe la síntesis proteica por inhibición de la transcripción de todos los tipos de RNA, a través de la unión a sitios específicos del DNA de doble hélice, intercalándose entre los pares de bases de éste. La respuesta celular a este fármaco es variable. Existen células muy sensibles, como la línea A1-1 de un hibridoma de células T murino, en las que se ha descrito muerte por apoptosis (Cotter TG et al,1992). Se desconoce el por qué unas células son sensibles y otras no. Se ha implicado a la capacidad de difusión intracelular, la fase celular, etc.. (Wu MH & Yung BYM, 1994). Algunos autores han involucrado (Chacon B and Acosta D, 1991) a la producción de radicales libres por quimioterápicos de la familia de la AD, por su capacidad de unir cationes metálicos. Estos podrían colaborar en el efecto citotóxico de estos fármacos pero la AD no presenta esta capacidad. Sin embargo la AD podría también producir RLO a través de la de molécula de AD unida al DNA por el citocromo

p450. No existen publicaciones que hagan referencia al efecto de la AD sobre las tasas de ATP.

La CHX es un inhibidor de la síntesis proteica, si bien tal efecto es debido a la alteración que origina en la translación (Shultze-Osthoff W et al, 1992).

Aunque el TNF es citotóxico por sí mismo, la inhibición, bien de la síntesis proteica (CHX) ó de la transcripción (AD), aumenta esta citotoxicidad, o sensibiliza a células que eran resistentes al TNF aislado (Kull FC et al, 1981). En presencia de dichos inhibidores metabólicos, la dosis letal por TNF se reduce y además la muerte ocurre en un intervalo de tiempo inferior (Ruff MR et al, 1986). Esto parece indicar que en las células resistentes al TNF los mecanismos de defensa conllevan la síntesis de novo de proteínas con acción protectora. Por otra parte, al añadir estos inhibidores se consigue sensibilizar al efecto citotóxico del TNF a células resistentes a éste. Así se observa en hepatocitos murinos (Leist M et al, 1994), cotratados con TNF y AD o TNF y D-Galactosamina (GA) en los que se provoca muerte por apoptosis. También se ha demostrado sensibilización al TNF , en células HepG2 , insensibles al TNF aislado. En tales células el cotratamiento con TNF e inhibidores de la síntesis o de la transcripción proteica, CHX o AD, las sensibiliza al efecto citotóxico del TNF (Hill DB et al, 1995).

Sin embargo, no todas las células resistentes al TNF se sensibilizan a éste con los inhibidores de la síntesis proteica (Reid TR et al, 1989)

7.8. TNF y Hepatocitos

El TNF no posee toxicidad directa sobre hepatocitos *in vivo* (Tiegs G and Wendel A, 1988).

En condiciones normales el hígado es resistente al TNF. Sin embargo se hace susceptible a la lesión por TNF, incluso a pequeñas cantidades de éste, en presencia de inhibidores de la síntesis proteica como la galactosamina (Ga) (Leist M et al, 1994). La galactosamina es un inhibidor específico hepático de la síntesis de uridina y trifosfato de uridina, con la subsiguiente inhibición en la síntesis de RNA (Hishinuma L et al, 1990). El TNF induce la síntesis de proteínas de fase aguda, como la superóxido dismutasa (Wong GHW et al, 1989), que protegen de la lesión por TFN. Quizás la incapacidad para sintetizar estas proteínas en presencia de inhibidores de su síntesis explique la sensibilización al TNF (Alcorn JM et al, 1992).

Los hepatocitos se defienden bien del stress oxidativo por TNF, pero si concurre algún factor que deplecione a los hepatocitos de sistemas antioxidantes, como el tratamiento con tetracloruro de carbono, se potencia el efecto lesivo del TNF (Czaja M et al, 1995)

En el estudio de Adamson GM et al (1992), los hepatocitos aislados de ratón no son sensibles al TNF, aunque éste provoca en ellos una deplección del glutatión reducido intracelular. El tratamiento con un inhibidor de la glutatión reductasa, provoca la sensibilización de estos hepatocitos al TNF. En estos hepatocitos el TNF origina un descenso del contenido de ATP, previo al descenso del glutatión. Todo ello tiende a implicar al stress oxidativo en la citotoxicidad por TNF. Por otra parte, el tratamiento con fructosa evita en parte esta deplección de ATP, lo que sugiere que la homeostasis del calcio mitocondrial podría estar afectado en ello. La deplección de ATP se previene también con antioxidantes, como el manitol y el benzoato, pero la vitamina E no lo consigue. El ascorbato y la BHT tampoco son protectores probablemente por su menor especificidad por los radicales hidroxilo. Además la pobre incorporación celular de estos antioxidantes lipofílicos explicarían su menor eficacia. El hecho de que la

fructosa, que evita el descenso de ATP, impida también la citotoxicidad por TNF induce a pensar que la disminución final del nivel de ATP intracelular juega un papel importante en la citotoxicidad originada por el TNF.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

La citotoxicidad del Factor de Necrosis Tumoral α (TNF) está relacionada con alteraciones funcionales de las mitocondrias, pero se desconocen los mecanismos moleculares que las producen (Matthews, 1983; Lancaster et al, 1989; Shultze-Osthoff K et al, 1992; Shoji et al, 1995).

La hipótesis que pretendemos demostrar, con el presente trabajo, es que las mitocondrias están implicadas, a través de la generación de radicales reactivos de oxígeno, en la muerte celular inducida por el TNF en presencia de inhibidores de la síntesis proteica.

Para demostrar ésta hipótesis se han estudiado los efectos del TNF, en presencia y ausencia de inhibidores de la síntesis proteica, sobre las líneas celulares L929 y HepG2.

OBJETIVOS

1. Determinar la citotoxicidad del TNF sobre las células de las líneas L929 y HepG2 en presencia o no de inhibidores de la síntesis proteica.
2. Conocer las modificaciones que producen esos tratamientos sobre los niveles celulares de ATP, la carga energética celular, el grado de acoplamiento respiratorio mitocondrial, el estado redox de los citocromos mitocondriales y la producción de radicales reactivos de oxígeno.
3. Determinar si esos cambios funcionales mitocondriales están relacionados con la muerte celular provocada por el tratamiento con TNF en células inhibidas metabólicamente.

MATERIAL Y METODOS

1. MATERIAL

El TNF α recombinante humano fue suministrado por Genzyme Co. (Cambridge, MA, EEUU), el medio DMEN 12-709 F por Whitaker, mientras que Sigma Chemical Co (St Louis, MO, EEUU) proporcionó el EDTA, la albúmina, el HEPES, la rotenona, el tencitrifluoroacetona (TTFa), la antimicina A, el ácido succínico, el ácido malónico, la oligomicina, la actinomicina D, la cicloheximida, la digitonina, el adenosín difosfato, el adenosín trifosfato, el tetrametil-p-fenilenediamida (TMDP) y la D-galactosamina. El cianuro potásico fue adquirido a F.E.R.O.S.A. (Barcelona, España), el ácido tricloroacético (TCA) a Panreac (Barcelona, España), la sacarosa, el hidróxido potásico, y el ácido ascórbico a Merck (Darmstadt, Alemania). ICI Biomedicals, Inc. (Costa Mesa, CA, EEUU) proporcionó el suero de ternera fetal, el tampón fosfato (PBS), la L-Glutamina, la penicilina y la streptomina. Las botellas y placas de cultivo se obtuvieron de Nunc (Roskilde, Dinamarca) y de Falcon Division Becton Dickinson Co (Oxnard, CA, EEUU), el medio RPMI-1640 procedía de Biochrom (Berlín, Germany) y el suero de ternera fetal (STF) de Sera-Lab (Sussex, UK).

2. MODELO BIOLÓGICO

El estudio se ha realizado en dos líneas celulares : la línea celular Hep G2, derivada de un hepatocarcinoma humano, la línea celular L929, derivada de un fibrosarcoma de ratón. Ambas líneas celulares se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Rockville, MD).

3. CULTIVOS CELULARES

Las células Hep G2 fueron cultivadas en medio DMEN 12-709F suplementado con un 10% de suero de ternera fetal inactivado por calor, L-Glutamina (2mmol/l), penicilina (100 unidades /ml) y estreptomina (0.1mg/ml) a 37 ° y en una atmósfera al 5% de CO₂.

La línea celular L929, la cultivamos en medio RPMI-1640 suplementado con suero de ternera fetal al 10%, penicilina (100 unidades/ml) y streptomina (0.1mg/ml) a 37° en una incubadora humidificada en CO₂ al 5%.

Para los estudios de citotoxicidad, producción de láctico y medida de ATP/ADP las células las cultivamos en placas de 35 mm de diámetro. En el momento de confluencia (1×10^6 células por placa), el medio lo sustituimos por medio fresco RPMI (L929) o DMEN (HepG2) sin adición de suero. A él añadimos TNF (25 ng/ml), AD (1µg/ml), CHX (0.1mM), TNF/AD o TNF/CHX, o en ausencia de estos tratamientos (control), durante los tiempos indicados en el texto y el pie de las figuras. Los inhibidores mitocondriales los añadimos

simultáneamente a los tratamientos o a las 3 horas de incubación con TNF, AD, CHX, TNF/AD o TNF/CHX, según se especifica en las figuras.

Para las medidas de la respiración celular, cultivamos las células en placas de cultivo de 175 cm². En el momento de la confluencia (40x 10⁶ células por botellas) cultivamos las células en RPMI fresco (L929) o DMEN (HepG2) sin suero y los seguimos describiendo.

4. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

La muerte celular la valoramos determinando la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al medio de cultivo por las células muertas y que se expresa como el porcentaje de LDH liberada respecto a la actividad total presente en las células (Decker and Lohmann-Matthes, 1988).

Las células Hep G2 las sembramos en placas de 35 mm de diámetro, y las cultivamos hasta su confluencia. Posteriormente añadimos 2 ml de DMEN-12-709 F suplementado en ausencia de suero. A lo que añadimos las concentraciones establecidas de TNF α (25 ng/ml) y actinomicina D (1 μ g/dl) o cicloheximida (0.1 mM). En los casos necesarios se añadieron distintas sustancias a las concentraciones que se indican en el texto y en los pies de las figuras. A continuación incubamos las células a 37^o C y 5% de CO₂, retirando 120 μ l al medio de cultivo para el análisis de la liberación de LDH en el medio de cultivo, a los tiempos indicados. La actividad de la LDH total la determinamos lisando las células mediante congelación/ descongelación a -70^oC.

De igual forma se cultivaron y estimularon las células L929, de tal manera que sólo variaba el medio de cultivo que era RPMI-1640.

El ensayo de LDH se realizó utilizando un test comercial (Cromatest, Laboratorios Knickerbocker, S.A.E, Barcelona, España).

5. DETERMINACION DE LA APOPTOSIS MEDIANTE LA FRAGMENTACION DEL DNA : EXTRACCION Y ELECTROFORESIS DEL DNA FRAGMENTADO

El proceso bioquímico mejor definido en la apoptosis es la rotura doble del DNA en las regiones de unión de los nucleosomas. Estos fragmentos, múltiplos de 180-200pb, se detectan fácilmente mediante electroforesis en gel de agarosa ya que la rotura ordenada del DNA, origina la aparición de una serie de bandas en "escalera" típica de este proceso (Petit PX et al,1995).

En la muerte por necrosis también se producen roturas del DNA, pero a diferencia de lo que ocurre durante la apoptosis , las roturas son aleatorias. Esto se traduce en que la electroforesis del DNA muestra la existencia de una banda continua, sin el patrón en bandas característico de la apoptosis.

En nuestro caso, en células no tratadas o tratadas con TNF,AD, CHX, TNF/AD o TNF/CHX, el DNA fraccionado lo extrajimos según se expone a continuación. Recogimos y lavamos 3×10^6 células por placa y el pellet celular resultante lo incubamos, bajo hielo, con 400 μ l de buffer de lisis (Tris 10mM, pH=7.5; EDTA diNa 1mM y Tritón 0.2%) durante 15 minutos y lo

centrifugamos (12000 rpm) durante otros 15 minutos. Recogimos 350 μ l del sobrenadante que incubamos durante 4 horas a 37°C con: NaCl 150 mM, Tris 10 mM, EDTA 40mM, SDS 1% y proteinasa K (200 μ g/ml). Transcurrido ese tiempo, extrajimos el DNA con fenol:cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), lo precipitamos con 150mM NaCl en presencia de etanol absoluto, y lo lavamos con etanol al 70%.

El DNA obtenido lo resuspendimos en agua, lo tratamos con RNasa (50 μ g/ml) y lo sometimos a electroforesis en gel de agarosa al 1% realizada en tampón TBE1x (80 voltios durante 1-2horas). Los fragmentos oligonucleosómicos los visualizamos mediante tinción con bromuro de Etidio (0.5 μ gr/ml).

6. DETERMINACION BIOQUIMICA DEL ATP CELULAR

Para este estudio, recogimos las células tras tripsinización y las centrifugamos a 800 x g durante 10 minutos a 4 °C. Solubilizamos las células con 30 μ l de dodecilsulfato sódico (SDS) (0.1 %) y las precipitamos con 170 μ l de TCA al 10% . Posteriormente centrifugamos las muestras durante 3 minutos a 3000x g , a 4 °C y neutralizamos el sobrenadante con HEPES -KOH pH =7.75 y KOH 4 M.

Para la determinación del ADP y ATP tanto citosólico como mitocondrial, en las células L929, utilizamos una técnica luminométrica descrita por Wulff & Doppen (1985). Medimos las concentraciones de ATP y

ADP en las muestras precipitadas y neutralizadas, empleando un kit comercial (adenosine 5'-triphosphate bioluminescent assay kit), suministrado por Sigma Chemical Co. ST Louis, MO, EEUU. El ADP se convirtió en ATP mediante la reacción con la piruvato quinasa (Hampp, 1985). La luminiscencia se midió en un bioluminómetro equipado con inyector (Lumat LB 9501, Berthold).

Las concentraciones de ATP y ADP en las muestras se expresan en nanomoles/ 10^6 células.

La separación del ATP y del ADP de los compartimentos citosólico y mitocondrial en las células L929, la realizamos mediante fraccionamiento con digitonina (Zuurendonk PF, Tager JM, 1974). Después de los tiempos indicados, las células L929 fueron recogidas tras tripsinización en un medio con hielo que contenía sucrosa (0.25mol/l), MOPS buffer (pH 7.0), EDTA (3 mM) y digitonina (0.2mg/ml). Después de un minuto, centrifugamos la suspensión rápidamente a 3000 g durante un minuto. Para determinar los nucleótidos de adenina, ambos pellet y sobrenadante fueron acidificados con TCA (10%,w/v). Después de retirar las proteínas por centrifugación, el extracto fué neutralizado con KOH 4M y congelado para posteriores análisis. Para confirmar la existencia de una adecuada permeabilización celular sin contaminación mitocondrial (>95% del recuperado), medimos la lactato deshidrogenasa (marcador citosólico) y la citrato sintetasa (marcador mitocondrial) en el sobrenadante (Srere PA, 1969). El índice ATP/ADP se calculó a partir de estos datos.

7. DETERMINACION DEL ATP CELULAR MEDIANTE

RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR : TÉCNICAS DE

ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR Y ANÁLISIS DE DATOS

Los extractos celulares los preparamos en placas de 175 cm² a una densidad de 60×10^6 células L929 o células HepG2. Tratamos las células con TNF, AD, CHX o TNF/AD y TNF/CHX a las concentraciones habituales : TNF 25ng/ml y AD 1µg/ml o CHX 0.1mM. Los experimentos los realizamos por duplicado tanto en las células control como en las tratadas con TNF, AD, CHX, TNF/AD o TNF/CHX. Las células, recogidas tras tripsinización, fueron centrifugadas a 4° C y lavadas 3 veces en un medio libre de fosfato (solución salina de Hanks, tamponada con HEPES pH 7.4, que contiene dextrosa 0.1% w/v). El pellet celular lo tratamos con 5 volúmenes de TCA frío al 10% (w/v), seguido de sonicación en hielo durante 5 minutos . El extracto lo neutralizamos con KOH 4M , la mezcla la centrifugamos 30 minutos a 15000 g (4°C), y el sobrenadante lo evaporamos en un rotavapor y lo congelamos a -80 ° C. Para la medida de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) el homogenado seco lo disolvimos en 0.7 ml de oxido de Deuterium en un tubo de 5mm. El ph lo ajustamos con clorhidro de Deuterium a 7.4.

Los parámetros de RMN fueron los que se detallan a continuación. Los espectros de RMN de Fósforo-31 (³¹P) los obtuvimos en un imán superconductor "Bruker AMX-500 " que opera a 11.8 T y 202.4 Mhz (Bruker GmbH, Kalsruhe , Germany). Cada espectro lo recogimos en las mismas condiciones experimentales que se corresponden a un tiempo de repetición

(pre-retraso) más el tiempo de adquisición de datos de 2 segundos y un ángulo de excitación (flip-angle) de 60 grados. La anchura espectral era de 8196 Hz y tomamos 16k puntos de datos, correspondiendo alrededor de 1 segundo de ventana de adquisición de datos. Acumulamos barridos de 1k por cada espectro de extracto celular con un total de 37 minutos. En este estudio comparamos los mismos metabolitos fosforilados en cada línea celular y como no estábamos interesados en cada uno de ellos no fué necesario obtener resultados cuantitativos, permitiendo una relajación completa. Los cambios bioquímicos del ^{31}P fueron asignados por estandarización del β -ATP a -18.7ppm. Los espectros ^{31}P los analizamos en una estación de datos Aspect X32 (Bruker GmbH, Karlsruhe, Alemania). Los datos fueron completados con ceros hasta 32k puntos, procesados con una anchura de línea de 10 Hz, y posteriormente transformados con una operación de Transformada de Fourier. Los espectros fueron puestos en fase con corrección de orden cero, y no fueron necesarias correcciones de mayor orden. Se midió la intensidad pico y las áreas pico con el ordenador. Las áreas de resonancia bajo γ -, α -, β -ATP fueron determinadas con métodos de integración por ordenador. Las áreas de los picos individuales se determinaron con deconvolución interactiva utilizando el software estándar de Bruker (UXNMR). Los valores de inicio estándar para los picos los definimos manualmente y entonces automáticamente se ajustaron con las líneas de Lorentzian.

8. MEDIDA DEL CONSUMO DE OXÍGENO Y DEL

ACOPLAMIENTO DE LA RESPIRACION MITOCONDRIAL

Las células Hep G2 y las L929 las incubamos en botellas de 175 cm², a una densidad de 40×10^6 células por botella. En el momento de confluencia tratamos las células con TNF, 25 ng/ml, y actinomicina D, 1 µg/ml, durante los tiempos indicados. Posteriormente recogimos las células mediante tripsinización, las centrifugamos 10 minutos (500 g, 4°C) y las resuspendimos en el medio de cultivo propio de cada línea celular pero sin suplementar con suero (1×10^7 células/ml). El consumo de oxígeno lo determinamos utilizando un electrodo de Clark (Yellow Spring Instruments Co. Yellow Springs, OH, EEUU) acoplado a una cámara de polarografía termostaticada (37°C) de 600 µl y en agitación continua. El consumo de oxígeno lo calculamos asumiendo que la concentración media del oxígeno disuelto en un mililitro era de 200 nmol/ml (Oller AR et al 1989). El porcentaje de consumo de oxígeno inicial, observado al añadir las células a la cámara, lo denominamos respiración basal. Para determinar la fracción atribuible a la respiración acoplada a la fosforilación oxidativa, añadimos durante la respiración basal oligomicina (20 µg/ml), que inhibe la FoF1ATPasa. Para determinar la respiración no mitocondrial añadimos KCN (1 mM), un inhibidor de la citocromo c oxidasa. El porcentaje de respiración acoplada se calculó a través del cociente entre las pendientes de la respiración basal y de la respiración tras adición de oligomicina. El porcentaje de consumo de oxígeno lo expresamos como nanomoles de oxígeno/minuto/ 10^6 células.

9. DETERMINACION DEL ACIDO LACTICO

Para este estudio sembramos las células HepG2 y las L929 en placas de 35 mm de diámetro con los medios rutinarios hasta la confluencia celular. A continuación incubamos las células en medio suplementado pero sin suero (libre de ácido láctico), en ausencia de tratamiento (control), en presencia de TNF (25ng/ml) o de TNF con actinomicina D (1µg/ml) (TNF/AD). A los tiempos indicados en las figuras, retiramos alícuotas de 50µl del medio de cultivo para su posterior análisis. La concentración de ácido L-láctico liberado al medio de cultivo la determinamos mediante un preparado comercial (L-lactic acid, Boehringer-Mannheim) según la metodología de Noll (1984). Los resultados los expresamos en nanomoles de ácido láctico/10⁶ células.

10. ENSAYOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para los estudios de citometría de flujo, las células L929 las incubamos en placas de 35 mm de diámetro, en RPMI-1640 con 10% STF, a 37°C y 5% de CO₂. Una vez alcanzada la confluencia (aproximadamente 1 x 10⁶ células) las células L929 fueron tratadas con o sin TNF (25 ng/ml) o TNF/AD (AD 1µg/ml) durante los tiempos indicados en el texto y los pies de las figuras. Posteriormente recogimos las células mediante tripsinización y centrifugación, y las resuspendimos en 1 ml de RPMI-1640. A continuación las tratamos con

las distintas sondas fluorescentes. Además de la sonda fluorescente indicada, tratamos las células con ioduro de propidio (5 µg/ml).

Todos los análisis los realizamos en un citómetro de flujo ELITE (Coulter Electronics, Hialeah, FL, EEUU). Los fluorocromos se excitaron con láser de argón a 488nm. El "Forward-angle light scatter" (FALS) y el "right-angle light scatter" (90LS) los utilizamos para seleccionar las células vivas y muertas.

La fluorescencia la recogimos a través de un "blocking-filter" de 488nm, un filtro "long-pass dichroic" de 550 nm y un filtro "band-pass" (para la rodamina 123, fluoresceína diacetato y el fluo-3) o un filtro "long-pass" de 575nm (para el ioduro de propidio y naranja de mercurio).

Los histogramas los representamos linealmente (FALS, 90 LS) o logarítmicamente (4-décadas, 1024 canales) (LIGFL y LIRFL).

10.1. Medida de la generación intracelular de radicales libres de oxígeno

Las esterasas endógenas hidrolizan el diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) a 2',7'-diclorofluoresceína que no puede atravesar la membrana celular, quedando atrapado en el interior de las células. Esta molécula reacciona con los hidroperóxidos formando la 2',7'-diclorofluoresceína de alta fluorescencia. Esta reacción es la base de experimentos sensibles a la producción de hidroperóxidos intracelulares (Kane DJ, 1993). Las células las cultivamos en 6 placas de 35 mm de diámetro. En el momento de confluencia (1×10^6 células /placa) las tratamos durante 6 horas con TNF (25 ng/ml), AD (1 µg/ml), CHX (0.1mM) o tratamiento combinado de ambos TNF/AD o TNF/CHX, en presencia de DCF (1 µg/ml). Al término de la

incubación, lavamos las células y las resuspendimos en medio RPMI para analizarlas mediante citometría de flujo (excitación: 488nm; detección de fluorescencia entre 515 y 565 nm). La fluorescencia de la DCF era exclusivamente analizada en células viables, detectadas por su morfología a través de la citometría: FSC (forward scatter ó dispersión de la luz hacia delante, que se correlaciona con el tamaño) versus SSC (side scatter ó dispersión de la luz lateral, que se correlaciona con la rugosidad).

10.2. Análisis del contenido intracelular de glutation

Los niveles de tioles no proteicos intracelulares los determinamos mediante citometría de flujo como se describe por O'Connor et al ,1988. Las células L929 se cultivaron en RPMI -1640 en placas de 35 mm de diámetro. En el momento de la confluencia celular (1×10^6 células/placa), las células se incubaron con medio RPMI-1640 en ausencia (control) o presencia de TNF/AD o TNF/CHX durante los tiempos indicados en las figuras y el texto. Las células fueron tripsinizadas, suspendidas en PBS frío y centrifugadas durante 5 minutos a 800 x g. El pellet celular lo suspendimos en una solución de naranja de mercurio/acetona (50 μ mol/l) y lo incubamos bajo hielo durante 5 minutos. Después, la suspensión se centrifugó 5 minutos a 800 x g, y el pellet se resuspendió en PBS frío. La suspensión de células teñidas se analizó en un citómetro de flujo Epics Elite (Coulter Electronics, Inc, Hialeah, FL).

11. ESTUDIO DE LA REDUCCION DEL CITOCROMO C, **MEDIANTE ESPECTROSCOPIA**

Los citocromos de la cadena respiratoria mitocondrial tienen grupos prostéticos porfirínicos que participan en reacciones de oxidoreducción cíclicas, captando y liberando electrones. Las formas reducidas tienen espectros de absorción característicos, lo que ha permitido el estudio del flujo electrónico mitocondrial, y la secuenciación de los respectivos citocromos (Chance B, 1957). Los espectros absolutos de células o mitocondrias aisladas son de poca utilidad debido a la absorción no específica y a la luz dispersada por las preparaciones. Por esta razón, los espectros de los citocromos se estudian utilizando la técnica de espectroscopia diferencial, en la que la luz de una determinada longitud de onda se divide entre dos cubetas que contienen suspensiones idénticas (células o mitocondrias), excepto en que a una de las cubetas se le realiza una reducción diferencial de los citocromos. La espectroscopia diferencial a temperatura ambiente puede distinguir claramente tres tipos de citocromos: *aa3*, *b* y *cc1*, cuyas características espectrales han sido extensamente estudiadas (Lemberg and Barret, 1973).

Las células L929 confluentes en botellas de 175 cm² las incubamos en RPMI-1640 durante 2, 3, 4 y 7 horas, en ausencia (control) y presencia de TNF, 25 ng/ml y cicloheximida 0.1mM (TNF/CHX). A continuación recogimos las células por tripsinización y las resuspendimos en 2.5ml de PBS/albúmina (0.1%) a una concentración de 30×10^6 células /ml.

Las células control las colocamos en la cubeta de referencia y las células tratadas con TNF/CHX en la cubeta de muestras de un

espectrofotómetro de doble longitud de onda Aminco DW2000 (SLM.AMINCO, Urbana, IL.). El espectro diferencial de ambas muestras se realizó en agitación continua y aerobiosis a temperatura ambiente, con una velocidad de barrido de 2 nm/segundo, un ancho de rendija de 2nm y un paso de luz de 1 cm.

Estos estudios los realizamos tratando a las células con TNF y CHX , pero no con AD ya que ésta última tiene una amplia banda de absorción en la región Soret del espectro que dificulta la interpretación de los picos de absorción de los citocromos (Sanchez Alcazar JA,1995).

12. ESPECTROSCOPIA RAMAN DE LA MITOCONDRIA

COMPLETA

El aislamiento de las mitocondrias desde las células control y células tratadas con 25 ng/ml de TNF 1 µg/ml de AD lo realizamos según lo descrito por Rickwood D et al (1987). Cuando un compuesto es excitado con una luz laser cuya frecuencia está próxima o entre una banda electrónica de absorción, las intensidades de bandas Raman se incrementan mucho. Esto es lo que se denomina "efecto scattering de la resonancia Raman", que es debido al acoplamiento de la transición electrónica y vibracional. En la espectroscopia de resonancia Raman, las bandas debidas a los modos vibracionales de los cromóforos o grupos adyacentes de átomos son selectivamente aumentados, y el número de bandas de resonancia Raman es menor que el número de bandas en el espectro de no-resonancia Raman. La línea de excitación laser

de 514.5 nm está en el rango de la banda de absorción de los citocromos, que esta centrado cerca de 530nm (De Paula et al,1990 y Adar. F et al,1974). Por lo tanto la banda más intensa de los citocromos *a*, *b* y *c* se realza. La vibración lipídica δ -CH₂ a 1459 cm⁻¹ es visible gracias al abundante contenido de grupos CH₂ pertenecientes a los lípidos de las membranas mitocondriales.

Las medidas del espectro Raman las realizamos a temperatura ambiente, utilizando una línea de excitación de 514.5 nm de laser Ar⁺ (Spectra Physics model 164) y un espectrómetro Raman Jobin -Yvon U-1000 equipado con un fotomultiplicador y un detector contador de fotones. La potencia del laser era de 50mAW. Las señales se enviaban a un ordenador para su almacenamiento, procesamiento y manejo de datos. El espectro se obtenía de la media de al menos cinco barridos de 3 cm⁻¹ de resolución. Las muestras de las mitocondrias las introducimos en tubos capilares sellados de 1 mm de diámetro interno a una concentración final de 10 mg/ml. A esta alta concentración proteica, el oxígeno no puede difundir en las muestras de los capilares sellados, manteniendo así, las muestras en anaerobiosis. La radiación incidente era directamente perpendicular al eje axial del capilar.

Para interpretar el espectro de resonancia Raman de los citocromos en las mitocondrias completas, utilizamos bandas producidas por citocromos purificados. La intensa banda localizada a 1315 cm⁻¹ en el espectro mitocondrial, correspondía a la forma reducida del citocromo *c* y *a*. El mismo significado tenía la banda que aparecía a 1173 cm⁻¹ y los picos a 1592 cm⁻¹ y 1515 cm⁻¹. El último correspondía a la forma reducida del citocromo *c* y el anterior al citocromo *a* reducido. Por el contrario, las formas oxidadas del citocromo *c* y *a* respectivamente , provocaban bandas en el rango 1630-1689 cm⁻¹. Por otra

parte, la forma reducida del citocromo *b* era visible a través de las bandas a 1621, 1539, 1492, 1363, 1338 y 1305 cm^{-1} (Adar F & Erecinska M, 1974; Kitagawa T et al 1975; Kitagawa T et al, 1977 y Strekas TC and Spiro TG, 1972).

13. CONTAJE CELULAR

El recuento celular lo realizamos con las diluciones apropiadas, en una cámara de Neubauer.

14. TRATAMIENTO ESTADISTICO

Todos los resultados los expresamos como media o media \pm SD. Para el análisis de la significancia de los distintos grupos utilizamos el test de la *t* de Student no pareada, aceptando como significativas las diferencias con $p < 0.05$ (Colton, 1979).

RESULTADOS

1. ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD EN LA LINEA L929 Y

HEPG2

1.1. Las células L929 son sensibles a los efectos citotóxicos del TNF/AD, TNF y AD.

En estos experimentos estudiamos la actividad citotóxica del TNF sobre las células L929 metabólicamente inhibidas por AD o CHX durante 24 horas. La Figura 1 muestra que las células murinas L929 son susceptibles a la acción citotóxica del TNF . Sin embargo, esta sensibilidad se incrementa significativamente en presencia de AD o CHX. En presencia únicamente de TNF (25ng/ml) la muerte celular es mínima en las primeras 24 horas y alcanza sólo significación estadística tras tiempos largos de tratamiento. Así, sólo a las 72 horas la muerte celular es del 65%. Sin embargo, en presencia de 1µg/ml de AD o 0.1mmol/l de CHX , el TNF (25 ng/ml) incrementa la muerte celular desde un 5% a un 100% en 24 horas (figura 1). El tratamiento aislado con CHX o AD también ejerce cierto efecto citotóxico sobre las L929, pero la muerte celular comienza más tarde (12 ± 1 hora) y es mucho menor que con el tratamiento combinado (figura 1).

1.2. El TNF, AD y TNF/AD son citotóxicos para las células de la línea HepG2.

Las células HepG2 incubadas con TNF o AD durante 24 horas no presentan reducción significativa de su viabilidad respecto a las células control (Figura 2). Sin embargo, la coincubación con TNF/AD provoca muerte celular que se inicia a las 8 horas (19% frente a 7% del control, $p < 0.001$). Esto es evidente a las 12 horas (31% frente al 11% del control, $p < 0.001$) y marcado a las 24 horas (67% frente al 17% del control, $p < 0.001$).

El tratamiento aislado con AD también es citotóxico para la células HepG2, pero mucho menos que el tratamiento combinado. Además la muerte celular comienza más tarde, siendo significativa sólo a partir de las 24 horas (25% frente el 17% del control, $p < 0.01$).

El TNF, en ausencia de cotratamiento con inhibidores de la síntesis proteica (AD), no es citotóxico para las células de la línea HepG2. Ni siquiera tras 48 horas de tratamiento (Figura 3), se observa mortalidad superior en las células tratadas con TNF respecto a las células control (20% y 18% repectivamente).

Los resultados obtenidos incubando las células en presencia de suero fetal al 10% no se diferenciaban significativamente de los hallados en células cultivadas sin suero fetal. Así, en presencia de suero, la muerte celular a las 24 horas de las células tratadas con TNF/AD fué del 70%, frente a una mortalidad del control del 11% ($p < 0.001$) (Figura 4). La única diferencia , sin alcanzar la

significación estadística, fué que la mortalidad basal a las 24 horas fué menor en presencia de suero que en su ausencia (11% frente a 17%, $p < 0.05$).

1.3. Efectos de la Ga y de TNF/Ga sobre la viabilidad celular en la línea HepG2.

Con el fin de inhibir la síntesis proteica hemos empleado también la galactosamina (Ga) en las células HepG2. Esta sustancia inhibe selectivamente la síntesis de proteínas en las células hepáticas. Lo hemos empleado en distintas concentraciones y en presencia o ausencia de TNF (Figura 5). La muerte celular en presencia de TNF/Ga era inferior a la provocada por el TNF en presencia de AD (40-45% con TNF/GA frente a 70% con TNF/AD, $p < 0.01$). Sólo con altas concentraciones de Ga, 25 ó 35mM, se alcanzaba un porcentaje de muerte celular significativamente superior al del control (13% a las 24 horas, $p < 0.05$). Sin embargo con estas últimas concentraciones la Ga parecía citotóxica de forma aislada. Así, con Ga 25 ó 35 mM la muerte celular, a las 24 horas de incubación, era del 24% y 30% respectivamente. Estos porcentajes, aunque eran superiores al del control, no alcanzaban la significación estadística. Concentraciones inferiores (5, 10, 15 mM) y similares a las utilizadas en otros estudios (Leist M et al, 1994), no sensibilizaban al TNF (muerte celular del 14%, 15,7% y 15,9% respectivamente frente al 11% del control a las 24 horas) (Figura 6).

1.4 El TNF/AD y el TNF/CHX inducen apoptosis en las células L929.

Durante la muerte por apoptosis se produce la doble rotura del DNA en las regiones de unión de los nucleosomas . Estos fragmentos, múltiplos de 180-200pb, se detectan fácilmente mediante electroforesis en gel de agarosa ya que la rotura ordenada del DNA, origina la aparición de una serie de bandas en "escalera" típica de este proceso. En la muerte por necrosis también se producen roturas del DNA, pero a diferencia de lo que ocurre durante la apoptosis , las roturas son aleatorias. Esto se traduce en la aparición de un "smear" al realizar la electroforesis del DNA extraído.

En los estudios realizados en células L929 incubadas durante 24 horas con TNF/AD o TNF/CHX se demuestra el aspecto típico de fragmentos de DNA en escalera, propio de la apoptosis. Este se inicia a las 8 horas pero es evidente a las 12 y 24 horas. El tratamiento con AD o CHX aislado también induce un patrón apoptótico, pero a tiempos más tardíos, a partir de las 24 horas. El TNF sólo, no induce cambios apoptóticos , ni siquiera a tiempos largos (Imagen 1).

1.5. El TNF/AD induce apoptosis en las células HepG2.

Las células HepG2 también presentan fragmentación del DNA en "escalera" durante el tratamiento con TNF/AD o TNF/CHX . Este patrón se inicia a las 8 horas de exposición al TNF/AD y es evidente a las 12 y 24 horas (Imagen 2). El tratamiento aislado con AD también provoca este mismo patrón de apoptosis pero lo hace más tardíamente. Se vislumbra a las 12 horas, pero

sólo es patente a las 24 horas. La CHX aislada no provoca apoptosis, pero sí la combinación TNF/CHX durante 12 horas.

2. ESTUDIOS SOBRE LAS ALTERACIONES METABOLICAS **INDUCIDAS POR EL TNF EN PRESENCIA DE ACTINOMICINA D**

2.1. Carga energética celular: contenido de ATP

2.1.1. El TNF/AD y la AD aumentan las concentraciones de ATP intracelular en la línea celular L929.

El TNF /AD o TNF/CHX inducen un incremento bifásico del contenido intracelular de ATP durante las primeras 6 horas de tratamiento (Figura 7). Después de 3 horas de incubación con TNF/AD o TNF/CHX , la concentración del ATP intracelular aumenta el 58.3% y 46.8%, respectivamente ($p < 0.001$ en ambos casos), sobre el nivel basal. A las 4 horas , esta concentración desciende a los niveles basales. Sin embargo , 2 horas más tarde , el contenido de ATP celular se incrementa de nuevo un 22.1% y un 26.7% respectivamente ($p < 0.001$ en ambos casos). Estos incrementos tempranos van seguidos de un descenso progresivo de la concentración intracelular de ATP que se extiende hasta las 24 horas , momento en que el contenido intracelular de ATP es indetectable (figura 7). Este último descenso coincide en el tiempo con la liberación de LDH, la cual comienza a las 5-6

horas de incubación y se incrementa constantemente hasta las 24 horas. El tratamiento de las células L929 con AD o CHX , pero no con TNF aislado, incrementa también los niveles de ATP intracelular durante las 24 horas. Sin embargo, estas elevaciones son significativamente menos marcadas que las observadas a las 2 y 3 horas de tratamiento con TNF/AD o TNF/CHX. Mientras que el tratamiento bajo estas últimas condiciones conduce a la muerte del 80% de las células tras 12 horas de incubación, el tratamiento con TNF, AD o CHX aislados, no produce muerte celular en esos tiempos (Figura 1). Los efectos del TNF/AD sobre el contenido citosólico y mitocondrial del ATP son similares a los encontrados sobre el ATP celular total. Los niveles de ATP citosólico alcanzan su punto máximo a las 2 horas , y los de ATP mitocondrial una hora más tarde (tabla1). A las 4 horas, ambos contenidos de ATP, citosólico y mitocondrial, descienden al nivel del control. La concentración de ADP no cambia significativamente durante las 4 horas de tratamiento con TNF/AD (tabla1). Por lo tanto, la determinación del cociente ATP/ADP, como medida del cambio energético, muestra que a las 2 horas, la combinación TNF/AD incrementa significativamente este cociente en el compartimento citosólico (control 1.58 ± 0.27 ; TNF/AD, 2.47 ± 0.50 ; $p < 0.01$) y AD, 1.81 ± 0.36 ; TNF/AD, 2.47 ± 0.50 ; $p < 0.05$).

. Valoración por RMN del ATP intracelular en la línea L929.

Los resultados anteriormente comentados, obtenidos mediante un método luminométrico, fueron confirmados por espectroscopia de los extractos celulares con RMN de ^{31}P (Figura 8). Después de 2 horas de incubación con TNF/AD , las áreas de los picos asignados a ATP aumentaron

significativamente sobre los controles (control: $100 \pm 9\%$; TNF/AD $168 \pm 11\%$, $p < 0.001$). Estas elevaciones son también significativamente más marcadas que las inducidas por la AD sola (AD: $143 \pm 10\%$; TNF/AD: $168 \pm 11\%$; $p < 0.01$). La intensidad de los picos atribuidos al ADP no cambian durante el tratamiento con TNF/AD o AD solos (figura 8). El pico Pi muestra un descenso significativo en las células tratadas con TNF/AD o AD.

2.1.2. El TNF/AD y la AD aumentan las concentraciones de ATP intracelular en la línea celular HepG2.

Como se muestra en la figura 9, en células HepG2 incubadas con medio sin suero, el tratamiento con TNF aislado no modifica significativamente los niveles intracelulares de ATP,

Sin embargo, el tratamiento combinado TNF/AD provoca en estas células un aumento bifásico del ATP intracelular que se extiende durante las primeras 6 horas de incubación ($p < 0.001$ de TNF/AD respecto al control). Los picos máximos de incremento ocurren a la hora y a las 4 horas, y es superior el de la primera hora. Entre estos picos los niveles descienden, pero siguen siendo superiores al control ($p < 0.001$). A partir del segundo pico, el nivel de ATP comienza a descender, incluso por debajo del nivel control y es significativamente inferior al control a las 24 horas ($p < 0.001$).

El tratamiento en estas células con AD durante las 24 horas provoca un incremento significativo del ATP intracelular respecto al control ($p < 0.001$). Sin embargo, los niveles de ATP intracelular alcanzados con el tratamiento

combinado con TNF/AD durante los picos iniciales son significativamente superiores a los alcanzados con el tratamiento aislado con AD ($p < 0.01$).

. Determinación de la concentración intracelular de ATP en la línea celular HepG2 mediante RMN:

En la figura 9 detallamos los valores de ATP intracelular medidos mediante RMN de ^{31}P tras una hora de tratamiento. En ella se confirma que se produce un aumento de ATP en las células HepG2 tratadas con TNF/AD ($p < 0.01$). El tratamiento con AD también incrementa el ATP pero esta elevación es significativamente menos marcada que la originada por el tratamiento combinado TNF/AD ($p < 0.05$ entre TNF/AD y AD).

2.2. Acumulación de láctico

2.2.1. El tratamiento con TNF/AD aumenta los niveles de ácido láctico producido por las células L929.

Los efectos de estos tratamientos sobre la glicolisis los estudiamos midiendo el lactato presente en el medio de cultivo. No detectamos cambios significativos en los niveles de lactato durante las primeras 3 horas de incubación que pudieran explicar la acumulación de ATP en estas células. Tras 4 horas, el tratamiento con TNF/AD o con TNF/CHX provoca una significativa acumulación de lactato en el medio (figura 10).

Curiosamente, el tratamiento con TNF/CHX disminuye el lactato a las 24 horas de incubación.

El tratamiento con AD o CHX también incrementa el lactato desde las 4 horas de incubación, pero este aumento es significativamente menor que el producido por el tratamiento combinado con TNF. En ausencia de inhibidores metabólicos, el TNF incrementa moderadamente el lactato durante todo el tiempo que dura la incubación (figura 10).

2.2.2. El TNF/AD desciende los niveles celulares de ácido láctico en las células HepG2.

La figura 11 muestra los niveles de ácido láctico en las células Hep G2. Se observa que la producción de ácido láctico por estas células, cultivadas con un exceso de glucosa (4.5g/l), es muy superior al producido por las células L929. En efecto, mientras que en las células L929 hallamos 2000 y 3500 nmol/10⁶ células a las 8 y las 24 horas, respectivamente, en las HepG2 encontramos 4000 y 12800 nmol/10⁶ células a 8 y 24 horas. Estos hallazgos obligan a pensar que en estas últimas células el metabolismo glucolítico es muy importante.

Las células HepG2 incubadas en presencia de TNF reducen la producción de ácido láctico durante las 2 primeras horas ($p < 0.01$ en la primera hora y $p < 0.001$ en la segunda hora) si bien, posteriormente, esta producción es similar a los controles.

La incubación con AD también reduce significativamente la producción de ácido láctico, en la primera hora ($p < 0.01$) pero no en las restantes horas.

La incubación con TNF/AD también reduce los niveles de ácido láctico durante las dos primeras horas ($p < 0.01$), pero tras ellos se normalizan . Sólo a las 24 horas se sitúa nuevamente por debajo del control ($p < 0.05$). Este descenso a las 24 horas se puede atribuir al menor número de células existentes en ese momento debido a la citotoxicidad del tratamiento TNF/AD (mortalidad del 70% a las 24 horas). La reducción de la acumulación de ácido láctico producida por el TNF/AD en la primera hora es de grado similar al provocado por el o por el TNF.

2.3. Respiración Mitocondrial

2.3.1. Respiración Mitocondrial en células L929 bajo el tratamiento con TNF, AD o TNF/AD.

El tratamiento de las células L929 con TNF/AD o TNF/CHX induce modificaciones cíclicas en el grado de acoplamiento respiratorio mitocondrial.

Con el fin de determinar los efectos de estos tratamientos sobre la respiración basal, acoplamiento respiratorio y respiración no mitocondrial medimos el consumo de oxígeno en células cultivadas en RPMI sin suero en presencia o ausencia de oligomicina o de KCN.

Durante las primeras 8 horas de incubación , la respiración total basal y la respiración no mitocondrial no cambiaron bajo los distintos tratamientos (Figura 12). Sin embargo , se produjeron importantes variaciones en la respiración insensible a oligomicina, lo que informa sobre el grado de

acoplamiento del flujo de electrones y sobre la síntesis de ATP por la ATPasa mitocondrial.

En condiciones basales, las células L929 consumen 1.87 ± 0.20 nmol O_2 /min/ 10^6 células (Figura 12). Alrededor del $20 \pm 2\%$ de la respiración es insensible al cianuro y se debe a reacciones no-mitocondriales. Cuando se añade oligomicina a la cámara de polarografía el consumo de O_2 desciende un $32 \pm 3\%$ y expresa el grado de acoplamiento respiratorio. El restante $48 \pm 3\%$ representa la respiración desacoplada (Figura 12).

El tratamiento con TNF incrementa el acoplamiento respiratorio durante las primeras 3 horas de incubación (figura 13). A las 2 horas, el acoplamiento respiratorio se incrementa desde el $32 \pm 3\%$ de la respiración total de las células control al $47 \pm 3\%$ en las tratadas con TNF ($p < 0.01$) (figura 12).

El tratamiento con AD o CHX induce un pequeño cambio cíclico del acoplamiento respiratorio (figura 13). A las 2 horas, el acoplamiento respiratorio era sólo del $20 \pm 1\%$ y $19 \pm 4\%$, respectivamente, ($p < 0.01$ frente al control) (figura 12).

Finalmente, el tratamiento combinado con TNF/AD o TNF/CHX induce un gran cambio cíclico en el grado de acoplamiento respiratorio. A las 2 horas de incubación, la presencia de TNF incrementa el acoplamiento respecto al existente en las células tratadas con AD o CHX (figura 13). A las 4 horas de incubación, existía un gran desacoplamiento. A las 6 horas, el acoplamiento respiratorio vuelve a los niveles del control. De nuevo, a las 8 horas de incubación, hay un gran descenso del acoplamiento (figura 13). Estos cambios cíclicos en el grado de acoplamiento respiratorio inducidos por el TNF se relacionan estrechamente con los cambios inducidos en los niveles de ATP

intracelular ($r=0.98$, $p<0.01$ para células tratadas con TNF/CHX; $r=0.93$, $p<0.05$ para células tratadas con TNF/AD).

2.3.2. Respiración Mitocondrial en células HepG2 bajo el tratamiento con TNF, AD o TNF/AD.

La medición del consumo de oxígeno en las células HepG2 cultivadas en DMEN sin suero en presencia o ausencia de oligomicina mostró que la respiración basal no varió bajo los distintos tratamientos a lo largo de las dos primeras horas (Figura 14). Sin embargo, se produjeron importantes variaciones en la respiración insensible a oligomicina.

En la figura 15 mostramos el grado de acoplamiento de la respiración mitocondrial tras una hora de tratamiento con TNF,AD y TNF/AD. El acoplamiento de la respiración mitocondrial sufre modificaciones importantes tras dos horas de incubación en las células tratadas con TNF/AD, TNF o AD.

Las células tratadas con AD sufren un desacoplamiento progresivo durante las dos primeras horas ya que el grado de acoplamiento es sólo del 27% y 30% a la primera y segunda hora, respectivamente, mientras que en las células controles es del 42 y 52% ($p<0.05$ en ambas horas) (Figuras 15,16 y 17).

En las células tratadas con TNF el grado de acoplamiento aumenta a la primera hora, ya que alcanza el 61% ($p<0.05$). A la segunda hora este acoplamiento es similar al de las células controles (Figuras 16 y 17).

Las células tratadas con TNF/AD mantienen un acoplamiento a la primera hora en torno al 43% , similar al del control ; pero teniendo en cuenta el efecto desacoplante de la AD, el efecto real sería de un aumento desde el

27%, que les correspondería por el efecto de la AD al 43%, que mantienen de forma global ($p < 0.05$ entre TNF/AD y AD) (Figura 15). Este efecto desaparece a las dos horas, momento en el que grado de acoplamiento en las células tratadas con TNF/AD se mantiene similar al provocado por la AD a esa misma hora (30% AD y 35% TNF/AD) (Figura 16).

Estos resultados indican que el aumento de ATP observado tras una hora de tratamiento con TNF/AD, no se debe a un aumento de la respiración global, sino a un incremento del grado de acoplamiento respiratorio mitocondrial, es decir, a la eficacia de la respiración mitocondrial para la síntesis de ATP .

Por otro lado, nuestro estudio descarta que ese aumento de ATP se deba a un incremento de la glucólisis, ya que el lactato no aumenta en ese momento ni con posterioridad.

2.4. Consumo de ATP bajo tratamiento con TNF, AD , CHX o TNF/AD y TNF/CHX en células L929

Con el fin de conocer las causas de las elevaciones del acoplamiento respiratorio durante las tres primeras horas de incubación con TN, se investigó si el tratamiento con esta citoquina consume ATP y si éste es capaz de modular el grado de acoplamiento respiratorio en un corto periodo de tiempo, sin cambiar significativamente el porcentaje de respiración global. Para responder a esta cuestión, nosotros evitamos la síntesis "de novo" de ATP mitocondrial tratando las células con oligomicina. En estas condiciones

medimos el efecto del TNF, en ausencia y presencia de AD o de CHX, sobre el contenido celular de ATP. En todas estas condiciones determinamos también la producción de ácido láctico para detectar cualquier cambio en el porcentaje de glucólisis. En la figura 18 mostramos que la AD aumenta el contenido celular de ATP, lo que sugiere que su consumo se reduce bajo este tratamiento. Este comportamiento es lógico ya que la inhibición de la síntesis proteica ahorraría ATP. Un efecto similar se obtiene cuando la inhibición de la síntesis proteica se realiza con CHX. Por el contrario, el tratamiento con TNF reduce significativamente el contenido intracelular de ATP en comparación con las células control y con las células tratadas con AD o CHX solo. Este descenso es más significativo si se compara con las células controles que si se hace con las tratadas con AD o CHX. Este efecto del TNF sobre el consumo de ATP sugiere que esta citoquina incrementa el consumo de ATP en otros procesos distintos al de la transcripción o al de la síntesis proteica (Figura 18).

Tampoco la deplección de ATP provocada por el TNF en ausencia o presencia de AD y CHX, en las células inhibidas con oligomicina, se debe a cambios en el porcentaje de la glucólisis, ya que no detectamos cambios significativos en los niveles de lactato (Figura 10).

2.5. El bloqueo de la respiración mitocondrial impide la acumulación de ATP inducida por el TNF/AD en células L929

Los experimentos previos sugieren que el incremento de ATP intracelular inducido por TNF/AD o TNF/CHX procede de la respiración

mitocondrial. Para reafirmar este hallazgo estudiamos en las células L929 tratadas con TNF/AD el efecto de los inhibidores mitocondriales sobre los niveles de ATP intracelular. Los inhibidores mitocondriales se añadieron a las células al mismo tiempo que el TNF y AD, ya que estudios previos (Sánchez Alcazar JA et al, 1995) han demostrado que la adición de esos inhibidores antes del TNF provoca una reducción de la unión de esta citocina a sus receptores celulares específicos. Como era de esperar, la incubación de estas células con cualquier inhibidor mitocondrial durante 3 horas provoca un descenso significativo de los niveles intracelulares de ATP (Figura 19). Estos resultados indican que la acumulación de ATP en células expuestas a TNF/AD depende de la respiración mitocondrial.

3. ESTUDIOS DEL STRESS OXIDATIVO

3.1. El TNFCHX reduce el citocromo b y oxida los cc_1 y aa_3 , en células L929.

Con la intención de analizar el efecto del TNF sobre el estado redox de los citocromos mitocondriales realizamos espectros de absorción diferencial entre las células control y las células tratadas con 25ng/ml de TNF y 0.1mM CHX. En estos estudios no utilizamos la AD, ya que este inhibidor metabólico tiene una amplia banda de absorción en la región de Soret, que interfiere con el análisis espectral de los citocromos (Sánchez Alcazar JA, 1995). La figura 20 muestra los espectros diferenciales típicos entre las células control y las

tratadas con TNF/CHX durante diferentes periodos de tiempo. Tras dos horas de incubación, se observan dos pequeños picos situados a 428 nm y 438nm y dos valles localizados a 550 y 605nm. Estos cambios en el espectro son más prominentes a las 3 horas. Así, el espectro diferencial muestra dos grandes picos a 428 y 438nm y dos profundos valles a 420 y 445nm de la región de Soret. También se observa un prominente pico a 558-560nm y dos valles a 550 y 605nm en la región del espectro. Estos resultados indican que el citocromo *b* se reduce gradualmente reducido durante este tiempo, mientras que el citocromo *cc*₁ y el citocromo *aa*₃ son oxidados progresivamente.

A las 4 y 7 horas, se observan también la reducción del citocromo *b* y la oxidación de los citocromos *cc*₁ y *aa*₃ (Figura 20). Sin embargo, existe una desaparición gradual del pico a 428nm, debido probablemente al predominio del pico a 438nm.

El espectro diferencial entre las células control y las tratadas con CHX también muestra un incremento de la reducción del citocromo *b* (Fig 21) sin embargo, el tratamiento combinado con TNF/CHX provoca una reducción aún mayor de este citocromo (Fig 21).

El espectro Raman de las mitocondrias controles muestra la presencia de formas reducidas de los citocromos *c* y *a*. En estas células son claramente reconocibles las bandas situadas en 1315 cm⁻¹ y 1173 cm⁻¹ y los picos en 1592 y 1515 cm⁻¹ (Fig. 22A). Las concentraciones de las formas reducidas de estos citocromos descienden marcadamente en las mitocondrias de las células tratadas con TNF/AD durante 7 horas. En ese momento el espectro Raman muestra un incremento llamativo incremento de las bandas, que caen en el rango entre 1630-1680cm⁻¹ (Fig. 22A), lo que se atribuye a formas oxidadas

del citocromo *c* y *a*. Incluso la banda próxima a 1585 cm^{-1} se debilita (Fig. 22A), lo que sugiere un incremento de la concentración de la forma oxidada del citocromo *c*, y el pico cerca de 1357 cm^{-1} indica que la forma oxidada de los citocromos *a* y *c* se incrementan bajo tratamiento con TNF. Por otra parte, el espectro Raman de las formas reducidas de los citocromos muestra que las únicas bandas visibles de la mitocondria de las células tratadas con TNF/AD son aquellas causadas por el citocromo *b* reducido a 1621, 1539, 1492, 1363, 1338, y 1305 cm^{-1} (Fig. 22A): Mientras que la banda a 1363 cm^{-1} es generada por las formas reducidas de los citocromos *a*, *b* y *c*, la fuerte banda que aparece a esta frecuencia, acompañada por la práctica desaparición de la banda 1315 cm^{-1} , bajo tratamiento con TNF es atribuible a un incremento de la concentración de la forma reducida del citocromo *b*.

3.2. El TNF/AD y el TNF/CHX inducen el estrés oxidativo de las células L929.

Para medir la generación intracelular de las especies reactivas del oxígeno (ROS) utilizamos la sonda fluorescente diacetato de diclorofluoresceína. Como se muestra en la figura 23, las células tratadas con TNF/AD o TNF/CHX durante 6 horas muestran un incremento de la fluorescencia y por tanto un incremento de los ROS.

Utilizando varios inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial, investigamos la implicación de distintos segmentos de dicha cadena en la generación de ROS. Los inhibidores fueron añadidos a las 3 horas de la incubación con TNF/AD o TNF/CHX, una vez que el citocromo *b* ha sido ya

reducido. La inhibición con antimicina A, que específicamente bloquea el citocromo *b*, ocasiona un marcado descenso de la producción de ROS (Fig. 24A y 24B). A diferencia de esto, la generación de ROS no se modifica cuando la cadena respiratoria mitocondrial se bloquea a nivel del complejo I con rotenona, a nivel de la succinato dehidrogenasa con malonato, a nivel del complejo IV con KCN o a nivel del complejo *b-c1* con mixotiazol. Esta observación sugiere que el citocromo *b* puede estar específicamente implicado en la formación de ROS.

Para investigar el estado de las defensas antioxidantes bajo el tratamiento con TNF/AD o TNF/CHX, analizamos los niveles de glutathion. La incubación de las células durante 8 horas con TNF/AD o TNF/CHX provoca un descenso de la fluorescencia de las células teñidas con naranja de mercurio, lo que indica que se produce un descenso de la concentración de glutathion. Tras el tratamiento con TNF/AD, se identifican claramente dos poblaciones celulares: una de gran fluorescencia, constituida por células en las que la concentración de glutathion es normal, y otra con baja fluorescencia, formada por células que están deplecionadas de glutathion (Fig. 25). Por otro lado, el tratamiento con TNF/CHX consigue una única población de células deplecionadas de glutathion.

Ahondando en este tema tratamos a las células con concentraciones crecientes de α -tocoferol, un conocido antioxidante lipofílico. Estos tratamientos descienden la citotoxicidad inducida por el TNF/AD entre las 4 y 12 horas (Fig 26).

El espectro Raman de las mitocondrias de las células tratadas con TNF/AD muestra un incremento marcado en la banda situada cerca de 840

cm⁻¹ (Fig.22B). Aunque existe poca información sobre el espectro Raman de las mitocondrias peroxidadas, el v-O-O stretching motion de los peróxidos, aparece usualmente en el rango 900-800cm⁻¹. Así, la aparición de la banda gruesa descrita previamente a 840cm⁻¹ sugiere la formación de peróxidos en las mitocondrias de las células tratadas con TNF/AD durante 7 horas.

4. EL TNF/AD O EL TNF/CHX LESIONAN LAS MITOCONDRIAS DE LAS CELULAS L929

Las células L929 incubadas en RPMI 1640 muestran una relativa densidad electrónica citoplásmica debida a su contenido rico en ribosomas y polirribosomas (Imagen 3A). Las mitocondrias muestran su típica configuración (Klingenberg M and Schollmeyer P, 1960) con espacios regulares, crestas orientadas y matriz homogénea.

La incubación de las células L929 con TNF/CHX o TNF/AD induce cambios significativos en el aspecto mitocondrial. A 3 horas de incubación con TNF/AD o TNF/CHX, las mitocondrias aparecen con un aumento difuso de la densidad electrónica, que era particularmente marcado en las células tratadas con TNF/CHX (Imagen 3B). A las 6 y 7 horas, las mitocondrias muestran una configuración condensada típica: espacios entre las crestas aumentados; volumen de la matriz reducido y su densidad aumentada. Algunas mitocondrias pierden su membrana externa (Imagen 3C y 3D) y otras muestran crestas redondeadas, condensadas y retorcidas (Imagen 3E). La mayoría de

las células tratadas con TNF/AD o TNF/CHX durante 8 horas muestran un aspecto hinchado, redondeado y con roturas en su membrana externa. Poseen también crestas fragmentadas y matriz clara (Imagen 3F).

5. MODIFICACION DE LA CITOTOXICIDAD EN PRESENCIA DE INHIBIDORES MITOCONDRIALES

5.1. La antimicina A inhibe la citotoxicidad inducida por TNF/AD en las células L929.

La tabla 2 muestra la cinética de la muerte causada por el TNF/AD a lo largo de 12 horas y los cambios inducidos en esta cinética por el bloqueo de la cadena respiratoria a distintos niveles. Los inhibidores se añadieron a las tres horas de incubación con TNF/AD. Sólo la antimicina A (30µg/ml), un inhibidor del complejo b-c1 que específicamente se une al citocromo b, reduce la citotoxicidad por TNF/AD. Así, la reducción es del 40% al 10% a las 9 horas y del 80% al 27% a las 12 horas de tratamiento. La protección celular inducida por antimicina A es dosis-dependiente y alcanza su máximo a la concentración de 30µg/ml (Fig. 27A). Después de 24 horas de incubación, las células supervivientes descienden, lo que puede explicarse por el efecto tóxico directo del tratamiento prolongado con antimicina A (Fig. 27B). Otros inhibidores del complejo *b-c1* (mixotiazol 2µM, HQNO 50 µM), así como bloqueantes del complejo I (rotenona 1 µM), de la succinato dehidrogenasa (malonato 10mM), de la citocromo c oxidasa (KCN 1mM, sodium azide, 0.5mM), y de la ATPasa

(1.2µg/ml de oligomicina), o agentes desacoplantes (dinitrofenol 50 µM) no protegieron a las células del efecto citotóxico del TNF/AD (Tabla 2).

Realizamos experimentos añadiendo los inhibidores mitocondriales junto con el TNF/AD. La mayoría de los inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial son citotóxicos para la células L929, particularmente a las 24 horas de incubación. Para evitar que el exceso de citotoxicidad a las 24 horas por los inhibidores mitocondriales impidiera observar su efecto protector sobre la muerte celular inducida por TNF/AD, estos estudios deben realizarse a tiempos más cortos. Por este motivo focalizamos los experimentos de citotoxicidad en presencia de inhibidores mitocondriales a las 8 horas de incubación.

A pesar de la citotoxicidad de los inhibidores mitocondriales a las 8 horas, éstos reducen la citotoxicidad del TNF/AD (Figura 28). La rotenona, inhibidora del complejo I de la cadena respiratoria (NADH deshidrogenasa), reduce la mortalidad a las 8 horas producida por el TNF/AD (13% de citotoxicidad frente al 37% en ausencia de rotenona), mientras que la citotoxicidad propia de la rotenona a ese tiempo es sólo del 5%.

La antimicina A, inhibidora del citocromo b-c1 del complejo III de la cadena respiratoria, también disminuye la citotoxicidad debida al TNF/AD a las 8 horas, pasando del 37% al 22% en presencia de la antimicina A. A las 8 horas la citotoxicidad propia de la antimicina A es del 9%.

La oligomicina, inhibidora de la ATP-asa mitocondrial, reduce la citotoxicidad del TNF/AD a las 8 horas desde el 37% al 15%. La citotoxicidad propia de la oligomicina en ese momento es del 10%. Por tanto, la reducción

de citotoxicidad es más significativa si consideramos la propia citotoxicidad del inhibidor.

El TTFA, inhibidor del complejo II mitocondrial, también reduce la citotoxicidad por TNF/AD. Así, a las 8 horas de incubación con TNF/AD, en presencia de TTFA, la citotoxicidad es sólo del 7% frente al 37% obtenido en su ausencia.

5.2. El TTFA inhibe la citotoxicidad inducida por TNF/AD en las células HepG2.

En las células HepG2 los inhibidores mitocondriales son ligeramente citotóxicos a partir de las 12-24 horas. Sin embargo, no previenen la citotoxicidad del TNF/AD con la única excepción del TTFA, inhibidor del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial (Figuras 29-34).

La rotenona no reduce la citotoxicidad por TNF/AD ni a corto (8 horas), ni a largo plazo (24 horas) (Figura 29). Así, a las 8 horas la muerte celular que es del 17% en presencia de TNF/AD a penas varía al añadir rotenona (19%). Los porcentajes de muerte celular a las 24 horas de incubación se sitúan en el 70% y 66.5% (NS) en las condiciones descritas. La citotoxicidad propia de la rotenona es del 20% a las 24 horas, valor que no difiere respecto a los controles (16%).

La modificación de la concentración de rotenona añadida a las células no las protege de la muerte (Figura 30), ni siquiera a dosis altas (0.48 μ M). Tampoco la citotoxicidad por rotenona aislada varía significativamente ante

concentraciones más altas, bajo concentraciones de $0.24\mu\text{M}$ y $0.48\mu\text{M}$ los porcentajes de muerte celular a las 24 horas son similares : 20,4% y 21.7% respectivamente (Figura 30). La utilización de concentraciones más elevadas de rotenona ($24\mu\text{M}$), es muy tóxica para las células, efecto en parte posiblemente debido a la presencia de un mayor volumen de disolvente alcohólico. La citotoxicidad por TNF/AD en presencia de rotenona ($24\mu\text{M}$) es del 40% a las 8 horas de incubación, frente al 17% en ausencia de tal inhibidor.

La antimicina A no sólo no protege del tratamiento con TNF/AD, sino que tiende a aumentar la citotoxicidad (Figura 29). La muerte celular a las 8 horas de incubación con TNF/AD se incrementa desde el 17% al 21,6% (NS) en presencia de antimicina. A las 24 horas de incubación la citotoxicidad del TNF/AD, que es del 70%, se sitúa en el 80% en presencia de antimicina A ($p>0.05$). A estos tiempos de incubación, la antimicina A es solo ligeramente citotóxica (10% y 23% de muerte celular a las 8 y 24 horas respectivamente, frente al 8% y 16% de los controles; $p<0.05$). Concentraciones mayores de antimicina A tampoco protegen de la muerte celular inducida por TNF/AD (Figura 31). Tras 8 horas de incubación, la antimicina A aislada, a concentración de $10\mu\text{g/ml}$ no incrementa la citotoxicidad per se (12% versus 10% de los controles). A tiempos más prolongados, 24 horas de incubación, la citotoxicidad basal por antimicina A ($10\mu\text{g/ml}$) es sólo ligeramente superior a la observada ante una concentración menor ($5\mu\text{g/ml}$) (32.6% versus 23% respectivamente; $p<0.05$). A pesar de lo referido anteriormente, la antimicina A a mayor concentración ($10\mu\text{g/ml}$) no protege de la citotoxicidad inducida por TNF/AD ni a las 8 ni a las 24 horas de incubación, ya que los porcentajes de

muerte celular son del 25% y 21.6% a las 8 horas de incubación en presencia de concentraciones de antimicina A de 10 y 15 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Al cabo de 24 horas de incubación la muerte celular se sitúa en el 87% y 80% (NS) ante las concentraciones de antimicina A referidas.

La oligomicina tampoco reduce, sino que aumenta, la citotoxicidad por TNF/AD a las 24 horas (Figura 32). La mortalidad celular a las 24 horas de incubación con TNF/AD se incrementa desde el 70,3% hasta el 90% en presencia de oligomicina ($p < 0.01$), siendo la toxicidad basal por oligomicina ligeramente superior a la de los controles (20% versus 15%;NS). A tiempos cortos (8 horas de incubación), este inhibidor tampoco consigue proteger de la citotoxicidad por TNF/AD que sólo se reduce desde el 15% al 11% en presencia de oligomicina (NS). A este tiempo de incubación la oligomicina no es citotóxica (mortalidad celular del 7% versus 6,8% de los controles, NS).

El Mixotiazol (Mixo), inhibidor del complejo III de la cadena mitocondrial a nivel del complejo *b-c1* , tampoco protege de la citotoxicidad inducida por TNF/AD (Figura 33). La citotoxicidad por TNF/AD en presencia de Mixo, a las 8 horas, es del 16% frente al 13% en su ausencia (NS). Tras 24 horas de incubación y en presencia de Mixo la citotoxicidad aumenta desde el 69% al 81% , pero sin alcanzar significación estadística. La toxicidad basal de Mixo es leve (6% y 19% de muerte celular a las 8 horas versus 7,6% y 15% en los controles, respectivamente;NS).

El TTFA, inhibidor de la cadena respiratoria mitocondrial a nivel del complejo II (succinato deshidrogenasa), es el único inhibidor de la cadena respiratoria que protege de la citotoxicidad inducida por TNF/AD en las células HepG2 (Figura 34). En presencia del TTFA la citotoxicidad por TNF/AD a las 24 horas desciende desde el 70,3% al 45% ($p < 0.01$). Esta protección se manifiesta tempranamente (12 horas) con una reducción de la muerte que se sitúa en el 15% mientras que en ausencia del TTFA es del 30% ($p < 0.05$). La toxicidad basal del TTFA es leve con una mortalidad celular del 10% y 22% frente al 8 y 15% de control a las 12 y 24 horas de incubación respectivamente (diferencias no significativas).

DISCUSION

1. Citotoxicidad inducida por TNF/AD o TNF/CHX en las líneas celulares L929 y HepG2 .

La citotoxicidad por el TNF ha sido ampliamente estudiada, pero no se conoce con exactitud el mecanismo de este proceso (Beyaert & Fiers, 1994; Nagata S, 1997). En la línea celular L929 el TNF por si mismo sólo es citotóxico tras tiempos largos de incubación (48-72 horas) . Así, se ha descrito apoptosis en la línea celular L929 bajo tratamiento con TNF (Schmid DS et al, 1987). Esta citotoxicidad aumenta extraordinariamente en presencia de inhibidores de la síntesis o de la transcripción proteica, como la cicloheximida o la actinomicina D, respectivamente (Schultze-Osthoff W et al, 1992). En la línea celular HepG2, el TNF no es citotóxico ni siquiera tras tiempos largos de actuación. Su citotoxicidad se pone sólo de manifiesto tras sensibilizar a estas células tumorales, mediante la adición simultánea de TNF con inhibidores de la síntesis proteica (AD o CHX). Este hecho ha sido ya referido por otros autores, quienes argumentaron que la pérdida de factores protectores de naturaleza proteica, cuya síntesis era inducida por el propio TNF, actuaba como sensibilizante de las células a los efectos tóxicos del TNF (Wallach,1984;Hill DB et al, 1995; Shoji Y et al, 1995;Friedl et al, 1989).

Estos inhibidores de la síntesis proteica, son escasamente citotóxicos cuando las células son expuestas durante 12-24 horas. La citotoxicidad de estos agentes es de menor intensidad y más tardía que la provocada por el

TNF/AD o TNF/CHX. Así, la citotoxicidad de estos tratamientos combinados sólo se explica por sinergismo entre la acción del TNF y la de los inhibidores de la síntesis proteica.

La citotoxicidad ejercida por el TNF/AD y su forma de expresión (apoptosis o necrosis) dependen del tipo celular estudiado, de la concentración del TNF y de las características del medio (Nagata S, 1997; Lancaster SM et al, 1988; Grooten et al, 1993).

En distintos trabajos, se ha hallado que la muerte celular inducida por el TNF se produce en las células L929, tanto por apoptosis como por necrosis. Sin embargo, durante el cotratamiento con TNF/AD o TNF/CHX, la muerte se produce por apoptosis (Grooten et al, 1993; Shoji Y et al, 1995). Este es el tipo de muerte hallado en nuestro trabajo, tanto en las células L929 como en las HepG2. En relación con los efectos del TNF sobre estos últimos existen pocos datos publicados (Hill DB et al, 1995).

Otro inhibidor de la síntesis proteica específico de las células hepáticas, la galactosamina (Ga), ha sido empleado por algunos como sensibilizadora del efecto citotóxico del TNF (Gatner F et al, 1995). Sin embargo, nosotros no hemos podido comprobar este efecto sobre las células HepG2. Esta discrepancia probablemente sea debida a que la dosis de galactosamina requerida para sensibilizar a los efectos del TNF sea "per sé" citotóxica para esas células.

2. Cambios metabólicos producidos por el TNF /AD o el TNF/CHX.

Se han propuesto un gran número de vías intracelulares que probablemente son activadas por el TNF. No se conoce sin embargo cuál es el mecanismo por el que se produce la apoptosis en este modelo de muerte celular por TNF/AD o TNF/CHX, a pesar de ser siendo un tema de actualidad, que es objeto de múltiples estudios.

Un cambio que se produce durante la muerte celular es la depleción del ATP celular (Hennet et al, 1993), si bien, no se han estudiado los cambios bioenergéticos (ATP,ADP) que se producen durante las horas que preceden a la muerte celular, ni su posible implicación con las posteriores lesiones celulares.

En el presente estudio hemos analizado los cambios bioenergéticos celulares tempranos, que se producen durante el tratamiento con TNF/AD o con TNF/CHX. Encontramos que estos tratamientos producen un importante incremento del contenido celular de ATP, tanto en las células L929 como en las HepG2 (Figuras 7,8 y 9). Este hecho ocurre durante las horas que preceden a la muerte celular, por lo que interpretamos que se trata de fenómenos relacionados con la causa de muerte y no con consecuencias de ésta. El aumento de ATP intracelular, tanto mitocondrial como citosólico, ocurre sin incremento paralelo de ADP, lo que se traduce en un ascenso del cociente ATP/ADP. Este cociente juega un papel central en el metabolismo celular (Atkinson DE, 1977). El incremento de ATP, tiene lugar de una forma cíclica. Es decir, aparecen dos picos separados con descensos de los niveles de ATP

hasta los valores basales. En las células L929, los picos se registran a las 3 y 6 horas de tratamiento, respectivamente, mientras que en las HepG2 se registran más precozmente, tras 1 y 4 horas de tratamiento. Estas variaciones del contenido de ATP, no se observan en las células bajo tratamiento aislado con TNF. En las tratadas con AD o CHX sí se producen aumentos de ATP intracelular, si bien, estos cambios son significativamente menores que los producidos por la combinación TNF/AD o TNF/CHX.

El aumento en el contenido intracelular de ATP, puede deberse a un aumento de su síntesis o a un descenso de su consumo por las distintas actividades celulares que requieren energía. En nuestros experimentos se demuestra que el aumento de ATP observado bajo tratamiento con TNF/AD o TNF/CHX se debe a un incremento en la síntesis de ATP. Para demostrar esta afirmación, cuantificamos el contenido de ATP en células donde su síntesis había sido previamente inhibida con oligomicina. En estas condiciones experimentales, el descenso de las concentraciones de ATP reflejaría el consumo celular de ATP. Los resultados expuestos en la figura 18 confirman que el TNF aumenta mucho el consumo de ATP, ya que los niveles de éste descienden muy por debajo de los controles. Tal consumo de ATP no sería debido sólo a su utilización en la síntesis proteica, ya que continuamos detectando niveles bajos de ATP al añadir inhibidores de la síntesis proteica tales como la AD y la CHX. Es decir, el TNF induciría incremento en el consumo de ATP, probablemente utilizado en diversos procesos celulares, no todos ellos relacionados con la síntesis proteica. Se podría especular que el TNF debe consumir gran cantidad de energía en la transducción de señal

desde el receptor de membrana que media sus efectos. Se ha descrito como el TNF activa numerosas proteasas de cisteína al unirse a su receptor (Nagata S, 1997). Esta activación enzimática podría ser responsable, en parte, de el mayor gasto energético observado en presencia de TNF.

Por tanto, a la vista de nuestros resultados, donde se demuestra que no existe un descenso del consumo de ATP (incubación con oligomicina+TNF) sino un aumento del mismo (incubación con oligomicina+TNF aislado o TNF/AD o TNF/CHX), podemos concluir que el aumento registrado en nuestros cultivos de los niveles de ATP es debido a un aumento en su síntesis.

La ausencia de aumento de ATP en las células expuestas a TNF en ausencia de AD o CHX, podría deberse al gran consumo de ATP que induce el TNF tal y como hemos demostrado. Este elevado consumo impide que detectemos niveles aumentados de ATP en presencia de TNF aislado (Figura 18).

El aumento de ATP observado en presencia de AD o CHX sin TNF se explicaría por la acumulación de ATP secundario a la inhibición de procesos que consumen gran cantidad de energía, como la transcripción genética o la síntesis proteica. Es un hecho bien conocido que, tanto la síntesis proteica como la transcripción genética, son procesos de alto consumo energético (Muller M et al, 1986). Por tanto, el ahorro energético se obtiene al inhibir la síntesis proteica, con estos agentes. Así se confirma en los estudios en los que se inhibe la síntesis *de novo* de ATP en presencia de oligomicina. En estas condiciones, se puede apreciar una acumulación de ATP en presencia de AD o CHX, respecto al control (Figura 18).

Han sido escasamente estudiadas las modificaciones en el contenido bioenergético celular bajo tratamiento con TNF. Hennet et al (1993) describieron, en la línea L929, un descenso del contenido de ATP a las 6 horas de incubación con TNF que alcanzó su nivel más bajo a las 20 horas. En la línea HepG2, Adamson et al (1992), describieron una caída del ATP celular a las 4 horas de tratamiento con TNF y observaron que al evitar este descenso se protegía a las células sensibilizadas al TNF. En realidad estos autores no analizaron el contenido energético celular a tiempos tempranos, a diferencia de nuestro estudio, por lo que obtuvieron sólo una visión muy parcial del proceso apoptótico. Probablemente lo que ellos detectaron era el descenso final de ATP celular que precede a la muerte celular. De hecho, en nuestro estudio se observa también un descenso progresivo de los niveles de ATP a partir de las 6 horas en la línea L929 y las 4 horas en la HepG2. Se ha descrito recientemente que la apoptosis, como proceso activo, precisa de niveles adecuados de ATP. Por tanto, la deplección de ATP evitaría la apoptosis inducida por diferentes estímulos (Stefenalli C et al, 1997; Chou CC et al, 1996). Así, este descenso tardío de ATP, observado tanto por nosotros como por los autores referidos (Hennet et al, 1993 y Adamson et al, 1992), sería una circunstancia probablemente debida a la situación terminal de una célula que se está muriendo. El inicio del proceso apoptótico tendría lugar durante las primeras horas de tratamiento con TNF/AD o TNF/CHX tras provocar alteraciones energéticas que lesionarían la mitocondria y la incapacitaría para sintetizar ATP. Esta deplección de ATP secundaria a la lesión mitocondrial sería expresión de la muerte celular. Otra hipótesis, tal y como se explica a continuación, atribuiría a la disfunción mitocondrial el origen de intermediarios

reactivos de oxígeno (RLO) que serían los efectores últimos de la destrucción celular.

Volviendo a las fases precoces del proceso apoptótico donde existen niveles elevados de ATP debidos, tal y como hemos demostrado, a un aumento de su síntesis y no a una reducción en su consumo, procedemos a analizar el origen de este ATP.

La síntesis del ATP tiene lugar en el citoplasma celular mediante la glucólisis y en la mitocondria mediante la fosforilación oxidativa. De ambas, la última representa su fuente principal. El aumento en la síntesis de ATP puede por tanto proceder tanto de un aumento de la glucólisis como de una respiración activa o más eficaz. En nuestro estudio descartamos el origen glucolítico del aumento de ATP, ya que la acumulación de ácido láctico no se modifica durante las primeras horas de tratamiento (Figura 10). Es más, en la línea HepG2 los niveles de ácido láctico descienden respecto al control (Figura 11). Este último fenómeno podría explicarse por un mecanismo de "feed-back" en el que los niveles elevados de ATP inhibirían su síntesis por vía glucolítica.

Descartado el origen glucolítico procedimos a valorar el papel de la mitocondria en el aumento del ATP. Así, al inhibir el transporte electrónico mitocondrial con antimicina, rotenona o KCN, o la síntesis de ATP con oligomicina, no observamos que se produjera acumulación de ATP. Estos resultados confirman, por tanto, el origen mitocondrial del aumento de ATP.

Por otro lado, analizamos la respiración celular y mitocondrial cuantificando el consumo de oxígeno en células completas suspendidas en RPMI y sometidas a tratamiento con TNF/AD o TNF/CHX. Estos estudios

mostraron que las células L929 o HpG2 tratadas con TNF, TNF/AD o TNF/CHX no sufrían modificaciones en la respiración celular global ni mitocondrial (Figuras 12 y 14).

Utilizando metodología diferente, algunos autores (Shultze-Osthoff , 1992; Hennes T et al, 1993; Lancaster JR et al, 1989; Jia BL et al, 1996) describieron sin embargo, una inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial bajo el tratamiento con TNF o TNF/AD . Esta discrepancia con nuestros resultados podría deberse al hecho de que mientras en nuestros estudios empleamos células completas suspendidas en RPMI, estos autores utilizaron células digitonizadas y resuspendidas en un medio respiratorio artificial con concentraciones máximas de sustratos. Sin embargo estas no son las condiciones reales de las células sometidas a los efectos del TNF/AD, sino que se trata de unas condiciones muy artificiales.

Llegados a este punto hay que plantearse cómo es posible que una mitocondria, cuya respiración basal no está aumentada, sea capaz de generar picos de ascenso de ATP.

Es conocido que la fosforilación oxidativa puede variar su porcentaje de acoplamiento, y por tanto su eficacia en la síntesis de ATP, en función de la demanda del mismo y del estado redox celular, sin que ello suponga grandes variaciones en el consumo celular de oxígeno (Brand MD et al, 1994).

En nuestros experimentos (Figuras 13,15,16 y 17) observamos que el tratamiento de ambas líneas celulares con TNF aumenta el porcentaje de la respiración mitocondrial acoplada durante las primeras horas de incubación. Observamos también que la incubación de nuestras células con AD o CHX

produce un descenso en el grado de acoplamiento mitocondrial. Este descenso podría explicarse por el efecto que los inhibidores de la transcripción o de la síntesis proteica, como son la AD o la CHX, tienen sobre el consumo de ATP. Generarían un ahorro en el consumo del mismo, lo que se reflejaría en una acumulación de ATP, la cual que mediante un mecanismo de "feed-back" inhibiría su propia síntesis. Esta inhibición se efectuaría mediante modificaciones en el grado de acoplamiento de la cadena respiratoria mitocondrial.

Al incubar nuestras células en presencia de TNF/AD o TNF/CHX, podríamos esperar un descenso del acoplamiento respiratorio, debido a la inhibición de la síntesis proteica inducida por la AD o CHX. Observamos, sin embargo, que el porcentaje de acoplamiento respiratorio es igual al obtenido para los controles. Estos resultados nos llevan a concluir que el TNF debe ser capaz de incrementar el acoplamiento respiratorio compensando así el efecto desacoplante de la AD o CHX.

Sí referimos estos resultados a los tiempos en que tienen lugar, observamos que el grado de acoplamiento aumenta a las 3 y 6 horas de incubación en presencia de TNF/AD o TNF/CHX en la línea L929 y a la hora en la línea HepG2 (Figuras 13, 15, 16 y 17). Recordemos que detectábamos cambios cíclicos en los niveles de ATP en presencia de TNF/AD o TNF/CHX, con un aumento a las 3 y 6 horas en la línea L929, y a la hora y a las 4 horas en la HepG2. Es evidente que el aumento del acoplamiento coincide en el tiempo con el aumento de ATP, detectado en ambas líneas celulares en presencia de TNF/AD o TNF/CHX. Si como hemos demostrado, el incremento de ATP tiene un origen mitocondrial, puede concluirse que son las

modificaciones en el grado de acoplamiento de la cadena respiratoria, las responsables de los picos de ATP observados en nuestro modelo de muerte por TNF/AD o TNF/CHX.

El cociente ATP/ADP juega un papel fundamental en el metabolismo, actuando como nexo de unión entre los procesos productores de energía y los procesos que la utilizan en la célula (Atkinson, 1968; 1977). La velocidad de estos procesos puede ser controlada por el cociente ATP/ADP directamente, al ser estos nucleótidos substratos y productos de muchas reacciones. Además, estudios *in vitro* han demostrado que los nucleótidos de adenina en general, y el ratio ATP/ADP en particular, pueden regular muchas actividades enzimáticas, actuando como efectores alostéricos o llevando a cabo la fosforilación de ciertas enzimas (Atkinson, 1977). La respiración mitocondrial y la síntesis de ATP son las principales vías metabólicas para la obtención de la energía y su regulación ha sido extensamente estudiada en las últimas décadas (Brand and Murphy, 1987; Brown, 1992). Aunque no existe un claro consenso acerca de cuál es el controlador principal del flujo electrónico mitocondrial, sí está suficientemente demostrado que el cociente ATP/ADP citoplasmático (Erecinska and Wilson, 1978), o el cociente ATP/ADP mitocondrial (Wanders et al, 1981), desempeñan un papel fundamental. Además, diversos estudios *in vitro* han demostrado que la respiración está en función del cociente ATP/ADP en el medio de suspensión (Davis and Davis-Van Thienen, 1978; Kunz et al, 1981, Target et al, 1983). Finalmente Kadenbach (1986) propuso que la síntesis de ATP y la respiración estarían

controladas por la regulación alostérica de enzimas clave, y sugirió que uno de estos efectores es el ATP.

Probablemente el pico precoz tan marcado de ATP, induciría una caída posterior del acoplamiento, lo que explicaría el descenso del ATP después cada pico. Estos ciclos consistentes por un lado en acumulación de ATP/inhibición del flujo electrónico y por otro lado en inhibición de la síntesis de ATP/desinhibición del flujo constituyen un enfoque novedoso, para comprender la citotoxicidad precoz del TNF/AD y de gran importancia para comprender las alteraciones metabólicas observadas en nuestro trabajo.

A continuación nos propusimos analizar sí estos cambios en el contenido celular de ATP podrían modificar el estado redox de los citocromos mitocondriales. Esta hipótesis es interesante, ya que estos citocromos podrían ser fuente de radicales libres. Estos últimos se han relacionado con la muerte celular por apoptosis (Shoji Y et al, 1995). Así, observamos que el tratamiento con TNF/AD o TNF/CHX, de la línea L929, provocaba una reducción del citocromo *b* y una oxidación de los citocromos *cc1* y *aa3*. Estos efectos eran evidentes en los espectros diferenciales obtenidos por espectroscopia de absorción y por Raman desde las 3 horas de tratamiento. Es decir, coincidía en el tiempo con la generación del pico de ATP.

Los efectos del ATP sobre el grado de reducción de los citocromos mitocondriales han sido descritos extensamente (Klingenberg & Schollmeyer, 1969; Chance B, 1961a; 1961b; 1961c; Chance B and Hollunger, 1961a; 1961b; 1961c; Chance B et al, 1966). En los estudios referidos se describe que la adición de ATP a mitocondrias aisladas induce un flujo reverso de

electrones, con oxidación de los citocromos *cc1* y *aa3* y reducción del citocromo *b* y de los piridin nucleótidos. Así, el citocromo *b* sería el punto de la cadena respiratoria donde los electrones quedarían retenidos. El citocromo *b* es la unidad catalítica central del complejo III (complejo ubiquinol-citocromo *c* reductasa o complejo *bc1*) de la cadena respiratoria (Esposti et al, 1993) y contiene dos hemos distintos que se definen como *b-562* y *b-566*, según sus propiedades espectroscópicas. Los estudios de Chance y de los miembros de la Fundación Jonhson mostraron que algunos citocromos, concretamente el *b-566*, cambiaban su potencial redox medio al energizar las mitocondrias con ATP (Wilson & Dutton, 1970).

En nuestro trabajo, la reducción del citocromo *b* observada a las 3 horas de tratamiento, se caracteriza por la existencia en la zona Soret del espectro de dos picos a 428 y 438nm respectivamente. A medida que avanzaba la incubación, el pico a 428 nm iba desapareciendo y se hacía más relevante el pico a 438 nm.

El citocromo *b* reducido a temperatura ambiente absorbe a 428-430nm en la región Soret del espectro (Sato et al, 1971), aunque no hemos encontrado caracterizaciones del pico a 438nm, pues en los modelos de energización se estudió fundamentalmente la región α del espectro. En la zona α del espectro la reducción del citocromo *b* en las células tratadas con TNF/CHX se manifestaba por un pico a 558nm, con un aumento de la zona de 560-566nm. La adición de ATP a mitocondrias anaeróbicas o inhibidas temporalmente induce la reducción del citocromo *b-566* con un hombro en 558nm (Sato et al, 1971), aunque Wikstrom (1971) observó que el ATP induce la reducción tanto del citocromo *b-566* como del citocromo *b-562*.

En nuestro estudio se confirma una reducción del citocromo b, siendo más patente en el pico a 558nm. La reducción del citocromo b, podría ser el origen de radicales libres pues se ha descrito que la producción de éstos en las mitocondrias puede estar mediada por el estado redox del citocromo b-566 (Loschen et al, 1973; Nohl and Hegner, 1978; Nohl & Jordan, 1986a; 1986b). De este modo, el aumento de ATP inducido por el tratamiento con TNF/AD podría ser el inductor de la reducción del citocromo y, por tanto, el causante primario de la producción de RLO.

Esta hipótesis la confirmamos, mediante citometría de flujo con la sonda fluorescente diacetato de diclorofluoresceína, al demostrar que el tratamiento con TNF/AD o TNF/CHX genera RLO (Figura 23). Con este método detectamos RLO a las 6 horas de incubación, es decir, antes de la muerte celular. La producción de RLO la confirmamos también al observar que los niveles de glutatión descienden en las células L929 tratadas con TNF/AD o TNF/CHX (Figura 25). El origen de estos RLO está en las mitocondrias, como lo demuestra el hecho de que en presencia de antimicina A, un inhibidor de la cadena respiratoria mitocondrial a nivel del complejo III, decrecen los niveles de RLO (Figura 24). Por tanto es el citocromo b reducido, bajo el efecto del aumento de ATP, el origen de estos RLO, ya que sólo la antimicina A, inhibidor específico de este citocromo, evita la producción de RLO (Figura 24). Otros inhibidores de la cadena respiratoria, como la rotenona (inhibidor del complejo Y) o el mixotiazol (que inhibe a otro nivel el complejo III), no consiguen reducir los niveles de RLO.

Otros autores han implicado también a los RLO generados por las mitocondrias en el mecanismo de muerte celular por el TNF (Goosens V et al, 1995, Hennet et al, 1993). Unos han implicado al complejo II (Hennet et al, 1993; Levrat et al, 1991), mientras que otros autores (Schultze-Osthoff et al ,1992) al igual que nosotros, señalan al complejo III como la fuente de origen de estos RLO. Sin embargo, en ninguno de estos estudios se ha analizado el estado redox de los citocromos.

En concordancia con estos resultados hemos observado que la antimicina A es capaz de reducir la citotoxicidad del TNF/AD de forma dependiente de la dosis (Tabla 2 y figura 27 y 28). Así, cuando la antimicina A es añadida a las 3 horas de incubación con TNF/AD, cuando el citocromo b ya está reducido, es capaz de evitar la citotoxicidad por TNF/AD. Este efecto no se logra con ningún otro bloqueante mitocondrial. Su especificidad por el citocromo b como punto de acción, apoya la hipótesis de que es éste el punto de origen de los RLO y, secundariamente, de la citotoxicidad inducida por TNF/AD. El papel de los RLO en la citotoxicidad inducida por el TNF/AD es reforzado dada la protección celular obtenida al añadir alfatocoferol, conocido antioxidante lipofílico, a las células (Figura 26). En nuestros estudios con inhibidores mitocondriales distintos de la antimicina A añadidos a las células antes de someterlas al tratamiento con TNF/AD, es decir, antes de que el citocromo b se altere, mostramos que si conseguimos la protección celular frente al TNF/AD (Figura 28). Este es el caso del TTFA, la rotenona y la oligomicina, con lo que probablemente la protección se deba a un bloqueo de

la respiración que impide el aumento del ATP y la reducción subsiguiente del citocromo b.

En la línea celular HepG2, sin embargo, no se observa, en general, protección celular bajo el tratamiento con inhibidores mitocondriales (Figura 29-33) (Figura 34), lo que sería atribuible a que en distintas líneas celulares varía el punto de la cadena respiratoria origen de los RLO. Hay que señalar, además, que el aumento de ATP es muy precoz. Sería, por tanto, preciso realizar nuevos estudios sobre el estado redox de los citocromos en esta línea con el fin de aclarar este comportamiento diferente.

Por último, confirmamos que la mitocondria es la organela que más temprana e intensamente se afecta bajo el tratamiento con TNF/AD o TNF/CHX. Es decir, los cambios metabólicos inducidos se ven expresados a nivel ultraestructural en su sustrato orgánico, la mitocondria. Las mitocondrias de las células L929, sometidas al TNF/AD o TNF/CHX, sufren una serie de cambios estructurales que desembocan en la muerte celular y que suponen: densificaciones difusas, condensaciones retorcidas de las crestas e hinchazón mitocondrial.

Las densificaciones difusas mitocondriales, observadas a las 3 horas de incubación, pueden deberse a la acumulación de calcio dentro de las mitocondrias dependiente del potencial de membrana (Gunter and Pfeiffer, 1990). Recientemente, se han demostrado cambios precoces del potencial de membrana mitocondrial durante la apoptosis (Petit P et al, 1995). Están descritos, igualmente, cambios estructurales mitocondriales en presencia de

TNF que preceden a la muerte celular (Matthews et al, 1983; 1987; Shultze-Osthoff et al, 1992; Schumer W et al, 1979) o con TNF/AD (Norton WN et al, 1985). Estos cambios son similares a los que han sido descritos durante la muerte por apoptosis inducida por otros agentes de otros orígenes (Petit P et al, 1995). No se conoce bien la relación precisa existente entre los cambios morfológicos y los funcionales de las mitocondrias. En general se considera que la fase de condensación ocurre antes del "punto sin retorno", mientras que la hinchazón mitocondrial parece corresponder a la fase final de muerte celular.

En las mitocondrias aisladas, la condensación mitocondrial se asocia con estados respiratorios en los que disminuye el cociente ATP/ADP. El aspecto ortodoxo, que se observa en las células controles, se asocia a estados respiratorios en los que el cociente ATP/ADP es alto (Munn, 1974). Las formas ortodoxas y condensadas pueden inducirse "in vivo" mediante técnicas de microinyección, variando el cociente ATP/ADP (Ord & Smith, 1982, Smith and Ord, 1983). Así, la forma condensada se describe en el bloqueo de la respiración mitocondrial y en la caída del cociente ATP/ADP (Laiho KU & Trump BF, 1975; Ord MJ and Smith RA, 1982). Las transiciones de la forma ortodoxa a la condensada han sido explicadas por dos teorías. La teoría mecanoquímica, relaciona estos cambios estructurales con modificaciones conformacionales activas de proteínas de la membrana interna mitocondrial durante los diferentes estados respiratorios (Hackenbrock, 1966;1968;Gree et al, 1968). La teoría osmótica, lo explica como resultado de los movimientos iónicos y de agua en la mitocondria, que inducen la concentración matricial (Deamer et al, 1967).

En nuestro trabajo, las células L929 tratadas con TNF/AD o TNF/CHX presentan formas condensadas mitocondriales a partir de las 6 horas y su número aumenta gradualmente a partir de ese momento. Ello coincide con la caída progresiva del ATP celular, lo que sugiere que su génesis se debe a la disminución del cociente ATP/ADP, tal y como se ha descrito en otros modelos de muerte celular (Laiho & Trump, 1975). La condensación mitocondrial revela la presencia de mitocondrias con la membrana externa fragmentada, apareciendo la condensación de la membrana interna mitocondrial libre en el citoplasma celular (Figura 3C, 3D). Los mecanismos que producen estas roturas mitocondriales irreversibles son desconocidas. Una posible hipótesis sería que dichas alteraciones se producirían por cambios osmóticos drásticos por la contracción repentina de la matriz mitocondrial, al estimularse la respiración. Otra hipótesis podría ser que las alteraciones se establecerían por otro tipo de mecanismos, como los radicales libres, y la contracción mitocondrial sólo las haría patentes.

A tiempos tardíos (8 horas) las mitocondrias presentan la típica configuración hinchada de los procesos necróticos.

Esta desestructuración mitocondrial incapacitaría a las mitocondrias tanto para generar ATP como para regular los movimientos iónicos, lo que conduciría a la pérdida del control del calcio intracelular. Estos eventos constituirían la vía final que conduce a la muerte celular.

Podemos resumir por tanto que la citotoxicidad por TNF, en presencia de inhibidores metabólicos, se iniciaría a través de la transducción de señal desde su receptor. Tras los pasos iniciales bien conocidos, se inducirían otros

peor conocidos que generarían un aumento temprano de la carga bioenergética celular. Este proceso tiene lugar precozmente, a la hora en las células HepG2 y a las 3 horas en las L929. Es decir, mucho antes de que ocurra la muerte celular, que se inicia entre las 8-12 horas. El aumento de ATP procedería de las mitocondrias en las que se habría producido un aumento del grado de acoplamiento de la cadena respiratoria. Este enorme incremento de ATP conduciría a cambios cíclicos en el acoplamiento y consecuentemente en el contenido intracelular de ATP.

El aumento inicial de ATP provocaría la reducción del citocromo b y éste, a su vez, sería la fuente productora de los RLO. Estos RLO lesionarían la propia mitocondria, justificando los cambios ultraestructurales observados en ellas, y por disfunción de ésta, conducirían más tarde a la muerte por apoptosis. Así, el tratamiento con antimicina A, bloqueante específico del citocromo b, es capaz de evitar la producción de RLO por dicho citocromo y evita la citotoxicidad secundaria. Apoyando este papel protagonista de los RLO en la inducción del daño celular final, se encuentra el efecto protector del alfa-tocoferol, conocido antioxidante. Sin embargo, el resto de los inhibidores mitocondriales son capaces de evitar la citotoxicidad, sólo si se añaden simultáneamente con el TNF/AD, quizás por inhibir la reducción del citocromo b. Una vez que el citocromo b ha quedado reducido, es decir, a las 3 horas, sólo la antimicina A es capaz de evitar la generación de RLO y la citotoxicidad generada por ellos. En las células HepG2 se confirman estos cambios bioenergéticos provocados por el aumento del acoplamiento respiratorio, si bien estos efectos se hallan más precozmente.

CONCLUSIONES

1. El TNF no es citotóxico para las células HepG2, pero sí para las L929 cuando el tiempo de actuación es prolongado. Sin embargo, la inhibición de la síntesis proteica con actinomicina D (AD) o con cicloheximida (CHX) produce una marcada sensibilización de ambas líneas celulares al TNF. En este caso la muerte celular se produce por apoptosis.

2. El tratamiento con TNF de células con síntesis proteica inhibida origina aumentos cíclicos de la carga energética celular, que se producen por aumentar los niveles celulares de ATP a la una y cuatro horas en las células HepG2 y a las 3 y 6 horas en las L929.

3. El aumento del ATP celular inducido por el TNF/AD o TNF/CHX se debe a un mayor acoplamiento respiratorio y a un mayor rendimiento de la respiración mitocondrial. El estudio de los efectos del TNF sobre ésta indica que el grado de acoplamiento varía cíclicamente y de forma paralela al que se produce en los niveles de ATP.

4. El tratamiento con el TNF/AD (o TNF/CHX) induce la reducción del citocromo b, a la vez que provoca un aumento de los radicales libres de oxígeno (RLO). Ambos fenómenos parecen estar relacionados con la muerte celular, ya que el bloqueo del citocromo b con antimicina A puede evitar la muerte celular inducida por el TNF/AD.

5. En las primeras horas que siguen al tratamiento con TNF/AD o TNF/CHX se producen cambios en las mitocondrias consistentes en aumentos de la densidad electrónica, condensación y retorcimiento de las crestas, seguido progresivamente, de hinchazón mitocondrial, rotura de la membrana externa y desaparición de las mitocondrias.

Conclusión final

El TNF, en células inhibidas metabólicamente con actinomicina D o cicloheximida, provoca un acoplamiento de la respiración mitocondrial, que conduce a un aumento del ATP mitocondrial. Este aumento bloquearía el paso de electrones a través del citocromo b y determinaría su desvío hacia la formación de radicales libres del oxígeno. Sugerimos que estos radicales son los responsables de las lesiones mitocondriales y en último extremo de la muerte celular.

BIBLIOGRAFIA

- Adamson GM, Billings RE. TNF induced oxidative stress in isolated mouse hepatocytes. Arch Biochem Biophys 1992;294:223-229.
- Adar F and Erecinska M. Resonance Raman spectra of the *b*- and *c*-type cytochromes of succinate-cytochrome *c* reductase. Arch Biochem Biophys 1974;165 : 570-580.
- .Agarwal BB, Essalu TE, Hass P E: Characterization of receptors for human tumor necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. Nature (London) 1985; 318: 665-668.
- .Agarwall BB and Piesco NP. Poly ADP-ribosilation of a 90-Kda protein is involved in TNF-mediated cytotoxicity. J Immunol 1994;153:473-481.
- .Agarwall J, Drysdale BE, Shin HS. TNF-mediated cytotoxicity involves ADP-ribosilation. J Immunol 1988;140:4187-4192.
- Albina JE, Caldwell MD, Henry WL and Mills CD. Regulation of macrophage functions by L-arginine. J Exp Med 1989;169:1021-1029.
- Alcorn JM, Fierer J, Chojkier M. The acute phase response protects mice from D-Galactosamine sensitization to endotoxin and TNF. Hepatology 1992;15:122-129.
- Alexander R, Nelson W and Coffey D. Synergistic enhancement by tumor necrosis factor of in vitro cytotoxicity from chemotherapeutic drugs targeted at DNA topoisomerase II. Cancer Res. 1987;47:2403-2406.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW and Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. Cell 1996;87:171.

- Allen RC, Armitage RJ, Conley ME et al. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Science* 1993;259: 990-993.
- Antwerp DJ, Seamus JM, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF- α -induced apoptosis by NF κ -B. *Science* 1996;274:787.
- Arend WP, Dayer JM. Inhibition of the production and effects of IL1 and TNF α in rheumatoid arthritis. *Arthritis-Rheum* 1995;38:151-160).
- Atkinson DE. Cellular Energy metabolism and its regulation. Academic Press, 1977.
- Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids : inhibition by NF κ B activity through induction of I κ B synthesis. *Science* 1995;13:232-243.
- Baloch Z, Cohen S, Fresa K, Cofman FD. Modulation of topoisomerase activities by TNF. *Cell-Immunol* 1995;160: 98-103).
- Baluerle PA and Baltimore D. I κ -B: a specific inhibitor of the NF κ -B transcription factor. *Science* 1988;242:540-546.
- Bansal N, Houle A, Melnykovich G. Apoptosis : mode of cell death induced in T cell leukemia lines by dexamethasone and other agents. *FASEB* 1991;5:211-216.
- Barinaga M. A life-death balance within the cell. *Science* 1996;274:724.
- Bazzoni F and Bleutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 1996; 27:1717-1725.
- Beg AA and Baltimore D. An essential role for NF κ -B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science* 1996;274:782.

- Belka C, Wiegman K, Adam D, Holland R, Neulon M, Herrman F, Krouke M, Brach MA. (TNF) activates c-raf-1 kinase via the p55 TNF receptor engaging neutral sphingomyelinase. *EMBO* 1995;14:1156-1165.
- Bellomo G, Perotti M, Taddei F, Finardi G, Nicotera P and Orrenius S. Tumor necrosis factor alpha induces apoptosis in mammary adenocarcinoma cells by an increase in intranuclear free Ca²⁺ concentration and DNA fragmentation. *Cancer Res* 1992 ; 52: 1342-1346.
- Berberich Y, Shu G, Siebelt F, Woodgett JR, Kyriakis JM, Clark EA. Cross-linking CD40 of B cells preferentially induces stress-activated protein kinases rather than mitogen-activated protein kinases. *EMBO* 1996;15:92-101.
- Berridge MJ and Irvine RF. Inositol phosphates and cell signaling. *Nature* 1989;341:197-205.
- Berridge MJ. Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu Rev Biochem* 1987;56:159-193.
- Beutler B and Cerami. Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *N Engl J Med* 1987;316:379.
- Beyaert R and Fiers W. Molecular mechanism of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. What we do understand and what we do not. *FEBS Letters* 1994;340:9-16.
- Beyaert R, Heyninck K, De Valck D, Boeyckens F, Van Roy F, Fiers W. Enhancement of tumor necrosis factor cytotoxicity by lithium chloride is associated with increased inositol phosphate accumulation. *J Immunol* 1993; 51:291-300. (a).
- Beyaert R, Vanhaesebroeck B, Heyninck K, Boone F, De Valck D, Schultze-Osthoff K, Haegeman G, Van Roy F, Fiers W. Sensitization of tumor cells to tumor necrosis factor action by the protein kinase inhibitor staurosporine. *Cancer Res* 1993;53:2623-2630. (b).

- Beyaert R, Vanhaesebroeck B, Suffys P, Van Roy F and Fiers W. Lithium chloride potentiates tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:9494-9498.
- Billah MM, Lapetina EG and Cuatrecasas P. Phospholipase A2 activity specific for phosphatidic acid. *J.Biol.Chem* 1981;256:5399-5403.
- Blenis J. Signal transduction via the MAP kinase: proceed at your own RSK. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:5889-5892.
- Bleutler B and Van Huffel C. An evolutionary and functional approach to the TNF receptor/ligand family. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 730:118-133. (a).
- Bleutler B and Van Huffel C. Unraveling function in the TNF ligand and receptor families. *Science* 1994;264:667-668. (b).
- Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV and Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1 and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 1996;85:803-815.
- Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* 1995;270:7795-7798.
- Boveris A and Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973;134:707-716.
- Braegger CP, Nicholls S, Murch SH, Stephens S, MacDonald TT. TNF α in stool as a marker of intestinal inflammation. *Lancet* 1992;339:89-91.
- Brand MD, Chien LF, Ainscow EK, Rolfe DFS and Porter RK. The causes and functions of mitochondrial proton leak. *Biophys Acta* 1994;1187:132-139.

- Brekke OL, Shalaby MF, Sundan A, Espevik T, Bjerve KS. Butylated hydroxyanisole specifically inhibits tumor necrosis factor-induced cytotoxicity and growth enhancement. *Cytokine* 1992;4(4): 269-280.
- Brenner DA, O'Hara M, Angel P, Chojkier M and Karin M. Prolonged activation of jun and collagenase genes by TNF. *Nature* 1989;337:661-663.
- Buttke TM and Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 1994;15:7-10.
- Cai Z, Korner M, Tarantino N, Chovaibs S. IKappaB alpha overexpression in human breast carcinoma MCF7 cells inhibits nuclear factor-kappa B activation but no TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1997; Jan 3.
- Castle VP, Heidelberg KP, Bromberg J, Ou X, Dole M, Nuñez G. Expression of the apoptosis-suppressing protein Bcl-2 in neuroblastoma is associated with unfavorable histology and N-myc amplification. *Am J Pathol* 1993;143:1543.
- Cino M and Del Maestro RF. Generation of hydrogen peroxide by brain mitochondria: the effect of reoxygenation following postdecapitative ischemia. *Arch Biochim Biophys* 1989;269: 623-638.
- Clark MA, Chen MJ, Crooke ST and Bomalaski JS. Tumor necrosis factor (cachectin) induces phospholipase A2 activity and synthesis of a phospholipase A2-activating protein in endothelial cells. *Biochem J* 1988; 250:125-132.
- Clark MA, Chen MJ, Crooke ST and Bomalaski JS. Tumor necrosis factor (cachectin) induces phospholipase A2 activity and synthesis of a phospholipase A2-activating protein in endothelial cells. *Biochem J* 1988;250:125-132.
- Colton T. En : "Estadística en Medicina". Salvat Editores, S.A. Barcelona. España , 1979.

- Cossarizza A, Franceschi C, Monti D, Stefano S, Bellesia E, Rivabene R, Biondo L, Rainaldi G, Tinari A, Malorni W. Protective effect of N-Acetylcysteine in Tumor Necrosis Factor- α -Induced Apoptosis in U936 Cells: The role of Mitochondria. *Exp Cell Res* 1995; 220: 232-240.
- Cotter TG, Glynn JM, Echeverri F, Cruen DR. The induction of apoptosis by chemotherapeutic agents occurs in all phases of the cell cycle. *Anticancer Res* 1990;12:773.
- Czaja M, Xu J and Alt E. Prevention of carbon tetrachloride-induced rat liver injury by soluble TNF receptor. *Gastroenterology* 1995;108: 1849-1854.
- Chacon B and Acosta D. Mitochondrial regulation of superoxide by Ca^{2+} . an alternate mechanism for the cardiotoxicity of doxorubicin. *Toxicol Appl Pharmacool* 1991;107:117-128.
- Chance B. Techniques for the assay of the respiratory enzymes. *Methods in Enzymology IV*: 1957 ; 273-329.
- Chance B. Energy-linked cytochrome oxidation in mitochondria. *Nature* 1961;189:719-725.(a).
- Chance B. The interaction of energy and electron transfer reactions in mitochondria . II. General properties of adenosine triphosphate-linked oxidation of cytochrome and reduction of pyridine nucleotide. *J Biol Chem* 1961;236:1544-1554.(b).
- Chance B. The interaction of energy and electron transfer reactions in mitochondria. V. The energy transfer pathway. *J Biol Chem* 1961;236:1569-1576.(c).
- Chance B, Lees H and Schoener B. High and low energy states of cytochromes. I. In submitochondrial particles. *J Biol Chem* 1966;241: 4574-4576.
- Chance B and Hollunger G. The interaction of energy and electron transfer reactions in mitochondria. I. General properties and nature of the products of

succinate-linked reduction of pyridine nucleotide. *J Biol Chem* 1961;236:1534-1543.(a).

- Chance B and Hollunger G. The interaction of energy and electron transfer reactions in mitochondria. III. Substrate requirements for pyridine nucleotide reduction in mitochondria. *J Biol Chem* 1961;236:1555-1561.(b).
- Chance B and Hollunger G. The interaction of energy and electron transfer reactions in mitochondria. IV. The pathway of electron transfer. *J Biol Chem* 1961;236:1562-1568.(c) .
- Chang DJ, Ringold GM and Heller RA. Cell killing and induction of manganese superoxide dismutase by tumor necrosis factor- α is mediated by lipoxygenase metabolites of arachidonic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;188:538-546.
- Chau LY and Tai HH. Monoglyceride and diglyceride lipases from human platelet microsomes. *Biochim Biophys Acta* 1988;963:436-444.
- Chou CC, Lam CY, Yung BY. Intracellular ATP is required for actinomycin D-induced apoptotic cell death in HeLa cells . *Cancer Lett* 1995;96: 181-187.
- Cook JL, May DL, Wilson BA, Hoskin B, Chen MJ, Shalloway D, Walker TA. Role of tumor necrosis factor- α in E1A oncogene-induced susceptibility of neoplastic cells to lysis by natural killer cells and activated macrophages. *J Immunol* 1989;142:4527-4534.
- Dawson TL, Gores G, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JL : Mitochondria as a source of reactive oxygen species during reductive stress in rat hepatocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 1993;264 (33) :C961-967.
- De Paula JC, Peiffer WE, Ingle RT, Centeno JA, Ferguson-Miller S and Babcock GT. Hemes a and a_3 environments of plant cytochrome c oxidase. *Biochemistry* 1990;29:8702-8706.

- De Togni P, Goellner J, Rudler NH, et al. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science* 1994;264:703-707.
- Dealtry GB, Naylor MS, Fiers W, Balkwill FR. DNA fragmentation and cytotoxicity caused by TNF is enhanced by interferon- γ . *Eur J Immunol* 1987;17:689-693.
- Decker T, Lohman-Matthes ML, Gifford GE. Cell-associated tumor necrosis factor (TNF) as a killing mechanism of activated cytotoxic macrophages. *J Immunol* 1987;138:957-962.
- DiDonato JA, Mercurio F, Rosette C, Wu-li J, Suyang H, Ghosh S and Karin M. Mapping of the inducible I κ B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol* 1996;16:1295-1304.
- Drysdale B, Zacharchuk Cm and Shin HS. Mechanism of macrophage-mediated cytotoxicity : production of a soluble cytotoxic factor. *J Immunol* 1983;131:2362-2367.
- Duh E, Maury WJ, Folks TM, Fauci AS and Rabson AB. Tumor necrosis factor α activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF-kappa B sites in the long terminal repeat. *Proc Ntl Acad Sci. USA* 1989;86:5974-5978.
- Dullemeier HM, Deventer SJH, Hommes DW, Bijl HA, Jansen J, Tytgat GN, Woody J. Treatment of Crohn's disease with anti-TNF chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology* 1995;109:129-135.
- Dutton PL, Erecinnska M, Sato N, Mukai Y, Pring M and Wilson DF. Reactions of b-citocromes with ATP and antimycin a in pigeon heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1972;267:15-24.
- Dybukt JM, Ankarcona M, Burkitt M, Sjöholm A, Strom K, Orrenius S and Nicotera P. Different prooxidants levels stimulate growth, trigger apoptosis or produce

necrosis of: insulin-secreting RINm5F cells. The role of intracellular polyamines. *J Biol Chem* 1994;269:30553-30560.

- Eidelman LA; PizovR, Sprung CI. New therapeutic approaches in sepsis a critical review. *Intensive Care Med* 1995;21:S269-S272.
- Enari M, Talanian RV, Wong WW and Nagata S. Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis . *Nature* 1996;380:723-726.
- Erickson SL, de Sauvage FJ, Kikly K, et al. Decreased sensitivity to TNF but normal T-cell development in TNF receptor -2- deficiency mice. *Nature* 1994;372:560-563.
- Estrov Z, Kurzrock R, Talpaz M. Cytokines and their antagonist in myeloid disorders. *Sem Hematol* 1995;32:220-231.
- Fast. DJ, Lynch RC and Leu RW. Cyclosporin A inhibit nitric oxide production by L929 cells in response to tumor necrosis factor and gamma-interferon. *J Interferon Res.* 1993;13:235-240.
- Fehsel K, Kolb-Bachofen V and Kolb H. Analysis of TNF -induced DNA strand breaks at the single cell level. *Am J Pathol* 1991;139:251.
- Fiers W. Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett* 1991;285:199-212.
- Floreani A, Venturi C, Fabris P, De Lazzari F, Naccarato R, Chiaramonte M. Circulating TNF- α in PBC and HCV-related chronic active hepatitis. *Hepatology* 1992;16:190A.
- Freedman MH, Cohen A, Grunberger T ,et al . Central role of TNF and GM-CSF in the pathogenesis of juvenile chronic myelogenous leukemia. *Br J Hematol* 1992;80:40-48.

- Friedl HP, Till GO, Ryan US and Ward PA. Mediator-induced activation of xanthine oxidase in endothelial cells. *FASEB J* 1989;2:2512-2518.
- Fsheron N, Lau JYN, Danniels HH, goka J, Eddleston ALWF, Alexander GJM, et al. TNF to treat chronic hepatitis B virus infection . *Lancet* 1990;336:321-322.
- Gaal JC and Pearson CK. Eukaryotic nuclear ADP-ribosylation reactions. *Biochem J* 1985;230:1-18.
- Gerschenson LE, Rotello RJ. Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB-J* 1992;6:2450-2455.
- Glucksmann A. Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev* 1951;26:59-86.
- Gonzalez-Amaro R, Garcia-Monzón C, Garcia-Buey L, Moreno-Otero R, Alonso JL, Yague E et al :Induction of TNF- α production by human hepatocytes in chronic viral hepatitis. *J Exp Med* 1994;179:841-848.
- Goossens V, Grooten J, De Vos Kurt, Fiers W. Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci.(Cell Biol)* 1995; 92: 8115-8119.
- Goossens V, Grooten J, Fiers W. The oxidative metabolism of glutamine. *J Biol Chem* 1996;271:192-196.
- Grooten J, Goosens V, Vanhaesebroeck B, Fiers W. Cell membrane permeabilisation and cellular collapse, followed by loss of dehydrogenase activity: early events in tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. *Cytokine* 1993;5:546-555.
- Guaragna RM, Trugo L and Borojevic R. Phospholipid modifications during conversion of hepatic myofibroblast into lipocytes (Ito-cells). *Biochim Biophys Acta* 1992;1128:237-243.
- Halliwell B and Gutteridge JMC. *Methods Enzymol* 1990;186:1-85.

- Halliwell B and Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine , Clarendon Press, Oxford. 1994.
- Hauschildt S, Scheipers P, Bessler WG and Mulsch A. Induction of nitric oxide synthase in L929 cells by tumor-necrosis factor alpha is prevented by inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase. *Biochem* 1992;288:255-260.
- Hennes T, Bertoni G, Richter C and Peterhans E. Expression of Bcl-2 protein enhances the survival of mouse fibrosarcoma cells in TNF-mediated cytotoxicity. *Cancer Res* 1993;53:1456-1460.
- Hennes T, Richter C, Peterhans E. Tumor necrosis factor induces superoxide anion generation in mitochondria of L929 cells. *Biochem J* 1993;289:587-592.
- Hennes T, Richter C, Peterhans E. Tumor necrosis factor- α induces superoxide anion generation in mitochondrial of L929 cells. *Biochem J* 1993;289: 587-592.
- Hernandez I, Rey J, De la Torre MP, Sánchez-Alcazar JA, Garcia I, Santiago E, Muñoz-Yague MT, Solís-Herruzo JA. Tumor necrosis factor- α inhibits collagen- α (I) gene expression in rat hepatic stellate cells through a G-protein. *Gastroenterology* 1997, in Press.
- Hibbs JB, Taintor RR and Vaaurin Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 1987;235:473-476.
- Hill DB, Schmidt J, Shedlofsky SI, Cohen DA, McClain JC. In vitro TNF cytotoxicity in HepG2 liver cells. *Hepatology* 1995; 21: 1114-1119.
- Hishinuma I, Nagakawa J, Hirota K, Miyamoto K, Tsukidate K, Yamanaka T, Katayama K, Yamatsu I. Involvement of TNF in development of hepatic injury in galactosaamine-sensitized mice. *Hepatology* 1990;12:1187-1191.

- Hockenbery DG, Nunez C, Milliman RD, Schreiber and Korsmeyer SJ. Bcl2 is an inner mitochondrial protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990;348:334-336.81.
- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL and Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993;75:241-251.
- Hohmann HP, Remy R, Scheidereit C and Van Loon APM. Maintenance of NF-kappa B activity is dependent on protein synthesis and the continuous presence of external stimuli. *Mol Cell Biol* 1991;11:259-266.
- Holtmann H and Wallach D. Down regulation of the receptors for TNF by IL-1 and 4 β -phorbol-12-myristate-13-acetate. *J Immunol* 1987;139:1161-1167.
- Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwall V and Goeddel D. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex . *Immunity* 1996;4:387-396. (a)
- Hsu H, Shu HB, Pan MG and Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 1996;84:299-308. (b).
- Hsu H, Xiong J and Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kB activation. *Cell* 1995;81:495-504.
- Hu KQ, Vierling JM, Siddiqui A. Trans-activation of HLA-DR gene by hepatitis B virus X gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7140-7144.
- Imamura K, Sherman ML, Spriggs D and Kufe D. Effect of tumor necrosis factor on GTP binding and GTP-ase in HL-60 and L929 cells. *J Biol Chem* 1988;263:10247-10253.
- Jaatela M, Saksela K and Saksela E. Heat shock protects WEHI-164 target cells from the cytotoxicity by tumor necrosis factor alpha and beta. *Eur J Immunol* 1989;19:1413-1417.

- Jia L, Kelsey SM, Grahn MF, Jiang XR, Newland AC. Increased activity and sensitivity to tumor necrosis factor alpha-mediated inhibition is associated with increased cytotoxicity in drug-resistant leukemic cell lines. *Blood* 1996;87:2401-2410.
- Jones AL, and Selby P. Tumor necrosis factor: clinical relevance. *Cancer Surv* 1989;8:817-836.
- Kameshita Y, Matzuda Z, Tuniguchi T, Shizuta Y. Poly(ADP-ribose) synthetase: separation and identification of three proteolytic fragments as the substrate-binding domain, DNA-binding domain and the automodification domain. *J Biol Chem* 1984;250:4770-4776.
- Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, Hahn H, Gralla EB, Selverstone J, Ord T, Bredesen DE. Bcl-2 inhibition of neuronal death: Decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 1993; 262:1274-1277.
- Karin M. the regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1995;270:16483-16486.
- Kaufmann SHE. Heat shock proteins and the immune response. *Immunol Today* 1990;11:129-132.
- Kerr JFR and Searle J. A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal cell carcinomas that contain numerous mitotic figures. *J Pathol* 1972;107:41-44.
- Kerr JFR. A histochemical study of hypertrophy and ischemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J Pathol Bacteriol* 1965;90:419-435.
- Kerr JFR and Searle J. A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal cell carcinomas that contain numerous mitotic figures. *J Pathol* 1972;107:41-44.

- Kitagawa T, Kyogoku Y and Orii Y. Resonance Raman spectra of the heme *a* derivatives. Evidence for the reaction of peripheral formyl group with HCN and NaHSO₃. Arch Biochem Biophys 1977;181:228-235.
- Kitagawa T, Kyogoku Y, Ilzuka T, Ikeda-Saito, M. and Yamanaka T. Resonance Raman scattering from hemoproteins. Effects of ligands upon the Raman spectra of various *c*-type cytochromes. J Biochem 1975;78:719-728.
- Klingenberg M and Schollmeyer P. Zur Reversibilitat der oxydativen phosphorylieung. Adenosintriphosphat-abhangige Atmungskontrolle und Reduktion von Diphosphopyridinnucleotid in Mitochondrien. Biochem. Z. 1960; 333:335-350.
- Kolesnick R and Golde DW. The sphingomyelin pathway in TNF and Li-1 signaling. Cell 1994;77:325-328.
- Konstantinov AA, Peskin AV, Popova EY, Khomutov GB and Ruuge EK. Superoxide generation by the respiratory chain of tumor mitochondria. Biophys Acta 1987;897:1-10.
- Kreuser ED, Wadler S, Thiel E. Biochemical modulation of cytotoxic drugs by cytoquines:molecular mechanism in experimental oncology. Recent-Results-Cancer-Res 1995;139:371-82.
- Krippener A, Matsuno-Yagui A, Gottlieb R and Babior B. Loss of function of cytocrome c in Jurkatt cells undergoing Fas-mediated apoptosis. J Biol Chem 1996;271:21629-21636.
- Kull FC and Bersterman JM. Drug-induced alterations of tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity:discrimination of early versus late stage action. J Cell Bichem 1990;42:1-9.
- Kull FC, and Cuatrecasas P. Possible requierement of internalitation in the mechanism of in vitor cytotoxicity in tumor necrosis serum. Cancer Res 1981;41(12 Pt 1):4885-4890.

- Laiho KU and Trump BF. Studies on the pathogenesis of cell injury. Effects of inhibitors of metabolism and membrane function on the mitochondria of Erlich ascites tumor cells. *Lab Invest* 1975;32:163-182.
- Lancaster JR Jr, Laster JM. and Gooding L.R. Inhibition of target cell mitochondrial electron transfer by tumor necrosis factor. *Febs Lett* 1989; 248:169-174.
- Larrea E, Garcia N, Qian C, Civeira MP, Prieto J. Enhanced expression of TNF- α in patients with primary biliary cirrhosis. *Int Hep Com* 1994;2:6-13.
- Larrick JW and Wright SC. Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor- α . *FASEB J* 1990;4:3215-3222.
- Larrick J W, and Wright SC. Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor alpha. *The FASEB Journal*. 1990,vol 4: 3215-3223.
- Laster SM, Wood JG, Gooding L.R. Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis. *J Immunol* 1988;141:2629-2634.
- Leist M, Gantner F, Bohlinger Y, German PG, Tiegs G and Wendel A. Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF α requires transcriptional arrest. *J Immunol* 1994;153:1778-1788.
- Lemberg R and Barret J. En "Cytochromes". Academic Press. London 1973.
- Lenardo MJ and Baltimore D. NF-kappa B : a pleotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell* 1989;58:227-229.
- Lenczowski JM, Dominguez L, Eder A, King LB, Zacharchuk CM and Ashwell JD. Lack of a role for Jun kinase and APO-1 in Fas-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1997;17:170-181.

- Lennon SV, Martin SJ and Cotter TG. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif* 1991;24:203-204.
- Levrat C and Louisot P. Increase of mitochondrial PLA₂-released fatty acids is an early event in tumor necrosis factor treated WEHI-164 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;221:531-538.
- Linchestein A, Gera JF, Andrews J, Berenson J and Ware CF. Inhibitors of ADP-ribose polymerase decrease the resistance of HER2/neuexpressing cancer cells to the cytotoxic effects of TNF. *J Immunol* 1991;146:2052-2058.
- Liu Z, Hsu H, Goeddel DV and Karin M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF- κ B activation prevent cell death. *Cell* 1996; 87: 565-576.
- Lynn WS, Mathews D, Cloyd M, Wallwork JC, Thompson A, Sachs CJR . Intracellular Ca²⁺ and cytotoxicity. *Arch Environ Health*. 1989;44:323-330.
- Maggiore G, Benedetti F, Massa M, Pignatti P, Martini A. Circulating levels of IL-6, IL-8, and TNF in children with autoimmune hepatitis. *J-Pediatr-Gastroenterol-Nutr*. 1995;20:23-7.
- Mano Y, Ishii M, Okamoto H, Igarashi T, Kobayashi K, Toyota T. Effect of TNF- α on intrahepatic bile duct epithelial cells of rat liver. *Hepatology* 1996;23:1602-1607.
- Marinos G, Naoumov NV, Rossol S, Torre F, Wong PY, Gallati H, Portman B, Williams R. Tumor necrosis factor receptors in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 1995 ; 108:1453-63.
- Martin TW, Wysolmerski RB and Lagunoff D. Phosphatidylcholine metabolism in endothelial cells: evidence for phospholipase A and a novel Ca²⁺-independent phospholipase C. *Biochem Biophys Acta* 1987;917:296-307.

- Matthews N, Neale ML, Jackson SK, Stark JM. Tumor cell killing by tumor necrosis factor: inhibition by anaerobic conditions, free-radical scavenger and inhibitor of arachidonate metabolism. *Immunology* 1987;62:153-155.
- Matthews N. Anti-tumor cytotoxine produced by human monocytes: studies on its mode of action. *Br J Cancer* 1983;48:405-413.
- Mauco G, Fauvel J, Chap H and Douste-Blaqy7 L. Studies on enzymes related to diacylglycerol production in activated platelets.II.Subcellular distribution, enzymatic properties and positional specificity of diacylglycerol-and monoacylglycerol-lipases. *Biochim Biophys Acta* 1984;796:169-177.
- Mavligit GM, Zukiwski AA, Charnsangavej C, Carrasco CH, Wallace S, Gutterman JU. Regional biologic therapy. Hepatic arterial infusion of recombinant human TNF in patients with liver metastases. *Cancer* 1992;69:557-61.
- McClain CJ, Cohen DA. Increased TNF production by monocytes in alcoholic hepatitis. *Hepatology* 1989;9:349-351.
- Meier B, Radeke HH, Selle S, Younes M and Resh K. Human fibroblast release reactive oxygen species in interleukin-1 or tumor necrosis factor α . *Biochem J* 1989;263:539-545.
- Minden A Lin A, McMahon M, Lange-Carter C, Derijard B, Davis RJ, Johnson GL, Karin M. Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinase by Raf-1 and MEKK. *Science* 1994;266:1719-1723.
- Miyashita T and Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line . *Blood* 1993 ; 81(1):151-7.
- Mohri M, Spriggs DR & Kufe D. Effects of lipopolysaccharide on phospholipase A2 activity and tumor necrosis factor expression in HL-60 cells. *J Immunol* 1990;144:2678-2682.

- Mosselmans R, Hepburn A, Dumont JE, Fiers W and Galand P. Endocytic pathway of recombinant murine tumor necrosis factor in L929 cells. *J Immunol* 1988;141:3096-3100.
- Muller M, Siems W, Buttgerit F, Dumdey R and Rapaport SM. Quantification of ATP-producing and consuming processes of Ehrlich ascites tumor cells. *Eur J Biochem* 1986;161(3):701-705.
- Muschel RJ, Bernhard J, Garza L, Gillies McKenna and Cameron JK. Induction of apoptosis at different oxygen tensions: Evidence that oxygen radicals do not mediate apoptotic signaling. *Cancer Res* 1995;55:995-998.
- Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355-365.
- Narabayashi H, Takeshige K, Minakami S: Alteration of inner-membrane components and damage to electron-transfer activities of bovine heart submitochondrial particles induced NADH-dependent lipid peroxidation. *Biochem J* 1982;202:97.
- Neale ML, Fiera RA, and Matthews N. Tumour cells which develop resistance to cytotoxicity by tumour necrosis factor have a different glycoform of a 105-Kda glycoprotein and lose the capacity to invade and metastasize. *Int J Cancer* 1990;45:203-208.
- Nitsu Y, Watanabe N, Neda H, Yamauchi N, Maeda M, Sone H and Kuriyama H. Induction of synthesis of tumor necrosis factor in human and murine cell lines by exogenous recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Res* 1988;48:5407-5410.
- Nohl H and Hegner D. Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo?. *Eur J Biochem* 1978;82:563-567.
- Nohl H and Jordan W. The mitochondrial site of superoxide formation. *Bioch Biophys Res Comm* 1986; 138:533-539.

- Noll F. "Methods of enzymatic analysis". (Bergmeyer, H.U.Ed.)3 rd Ed. Vol VI. Verlag chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel. 1984 pp 582-588.
- Norton WN, Mattie DR and Kearns CL. The cytopathologic effects of specific aromatic hydrocarbons. *Am J Pathol* 1985;118:387-397.
- O'Connor J.E., Kimler B.F, Morgan M.C. and Tempas K.J. A flow cytometric assay for intracellular nonprotein thiols using mercury orange. *Cytometry* 1988;9:529-532.
- O'Donnel VB, Spycher S and Azzi A. Involvement of oxidants and oxidant-generating enzyme(s) in TNF-mediated apoptosis. Role for lipoxigenase pathway but not mitochondrial respiratory chain. *Biochem J* 1995;310:133-141.
- Obeid LM, Linardic CM, Karolak La and Hannun YA. Programmed cell death induced by ceramide. *Science* 1993;259:1769-1771.
- Oller AR, Buser CW, Tyo MA, Thilly WG. Growth of mammalian cells at high oxygen concentrations. *J.Cell.Sci* 1989;94:43-49.
- Ord MJ and Smith RA. Correlation of mitochondrial form and function in vivo: microinjection of substrate and nucleotides. *Cell Tissue Res* 1982;27:129-137.
- Orrenius S. Free Radicals In: From Basic Science to Medicine (Poli G, Albano E and Dianzani ME, Eds. Birkhauser Verlag Basel 1993, pp 47-64.
- Osborn L, Kunkel S, Nabel GJ. TNF and IL-1 stimulate the immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kB. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2336-2340.
- Pappo Y, Bercovier H, Berry E, Gallilly R, Feigin E, Freund H. Antitumor necrosis factor antibodies reduce hepatic steatosis during parenteral nutrition and bowel rest in the rat. *J Parent Enteral Nutrition* 1995;19:80-82.

- Pass HI, Mew D, Pass HA, Temeck BK. The macrophage, TNF, and other cytokines. *Chest Surg Clin North Am* 1995;5:73-90.
- Petit PX, Lecoecur H, Zorn E, Dauguet C, Mignotte B, Gougeon ML. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexametasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol* 1995;130(1): 157-167.
- Pleffer K, Matsuyama T, Kunding TM, et al. Mice deficient for the TNF receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 1993;73:457-467.
- Raingeaud J et al. Proinflammatory cytokine and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and Treonine. *J Biol Chem* 1995;270:7420-7426.
- Ramakrishnan M and Catravas GN. N- (2-mercaptoethyl) -1, 3-propanediamine (WR-1065) protects thymocytes from programmed cell death. *J Immunol* 1992;148:1817-1821.
- Reid TR, Torti FM, Ringold M. Evidence for two mechanism by which TNF kills cells. *J Biol Chem* 1989;264:4583.
- Rickwood D, Wilson MT, Darley-Usmar VM. In: Isolation and characteristic of intact mitochondria . In: *Mitochondria: A practical approach*. Darley-Usmar VM, Rickwood D and Wilson MT (eds). Oxford:IRL Press 1987,pp1-16.
- Richter C and Frei B. Ca²⁺ release from mitochondria induced by prooxidants. *Free Radical Biol. Med* 1988;4:365-367.
- Richter C, Schweizer M, Cossarizza A and Franceschi C. Control of apoptosis by the cellular ATP level. *FEBS Lett* 1996; 378 : 107-110.

- Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivrot C et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 1995;268:1347-1349.
- Robaye B, Mosselman R, Fiers W, Dumont J, Galand P. TNF induces apoptosis (programed cell death) in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol* 1991;138:447-453.
- Rodriguez Y, Matsuura K, Khatib K, Reed JC, Nagata S and Vassalli P. A bcl-2 transgene expressed in hepatocytes protects mice from fulminant liver destruction but not from rapid death induced by anti-Fas antibody injection. *J Exp Med* 1996,183:1031-1036.
- Rose KM. DNA topoisomerases as target for chemotherapy. *FASEB J* 1988;2: 2474-2478.
- Rubin BY, Smith LJ, Hellermann GR; Lunn M, Richardson NK and Anderson SL. Correlation between the anticellular and DNA fragmentating activities of TNF. *Cancer Res* 1988; 48:6006-6010.
- Rudin CM, Thompson CB. Apoptosis and disease-regulation and clinical relevance of programmed cell death. *An Rev Med* 1997;48:267-281.
- Ruff Mr and Gifford GE. TNF. In: Pick, E (Eds), *Lymphokina Vol 6*. New York:Academic Press 1986, pp 459-555.
- Rustenberg Y and Lenzen S. Regulation of transmembrane ion transport by reaction products of phospholipase A2. Effect of arachidonate acid and other fatty acids on mitochondrial Ca²⁺ transport. *Biochim. Biophys. Acta*1989;982:150-155.
- Sánchez-Alcazar JA, Hernandez Y, De la Torre P, Garcia Y, Santiago E, Muñoz-Yague T and Solís Herruzo JA. Down-regulation of tumor necrosis factor receptors by blockade of mitochondrial respiration. *J Biol Chem* 1995; 270:23944-23950.(a).

- Sánchez Alcazar JA. Mecanismos citotóxicos del factor de necrosis tumoral alfa. Tesis Doctoral 1995.(b).
- Saunders JW. Death in embryonic systems. *Science* 1966;154:604-612.
- Scheurich, P. et al. Antagonistic control of tumor necrosis factor receptor by protein kinases A and C: enhancement of TNF receptor synthesis by protein kinase A and transmodulation of receptors protein kinase C *J Exp Med* 1989. 170: 947-957.
- Schreck R, Rieber P and Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF.KB transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991;10:2247-2258.
- Schultze -Osthoff K, Krammer PH and Droge W. Divergent signalling via AP-1/Fas and the TNF receptor , two homologous molecules involved in physiological cell death. *EMBO* 1994;19:4587-4596.
- Schultze-Osthoff K, Bakkers AC; Vanhaesebroeck B, Beyaert R, Jacobs WA, Fiers W. Cytotoxic Activity of Tumor Necrosis Factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J Biol Chem* 1992; 267(8): 5317-5323.
- Shultze-Osthoff K, Beyaert R, Vandevoorde V, Haaegeman G, Fiers W. Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF. *The EMBO J* 1993;12(8): 3104-3104.
- Shoji Y, Uedono Y, Ishikura H, Takeyama N, Tanaka T. DNA damage induced by tumor necrosis factor-alpha in L929 cells is mediated by mitochondrial oxygen radical formation. *Immunology* 1995;84:543-548.
- Shurman L, Sen R, Bergman Y. Adenovirus E1A products activate the Ig k-chain enhancer in fibroblast. A possible involvement of the NF-kB binding site. *J Immunol* 1989;143: 3806-3812.

- Silk ST, Clejan S and Witkom K. Evidence of GTP-binding protein regulation of phospholipase A2 activity in isolated human platelet membranes. *J Biol Chem* 1989;264:21466-21469.
- Skidmore CJ, Davies MI, Goodwin PM, Halldorsson H, Lewis P, Shall J and Ziaee AA. The involvement of poly(ADP-ribose)polymerase in the degradation of NAD caused by γ -radiation and N-methyl-N-nitrosourea. *Eur J Biochem* 1979;101:135-145.
- Slater AFG, Stefan C, Nobel Y, Orrenius S. The role of intracellular oxidants in apoptosis. *Biochem Biophys Acta* 1995;1271:59-62.
- Smith MR, Munger WE, Kung Hf, Takacs L, Durum SK. Direct evidence for an intracellular role for tumor necrosis factor α . Microinjection of tumor necrosis factor kills target cells. *J Immunol* 1990;144:162-169.
- Sorkin P, Abu-Abid S, Lev D, et al. Systemic leakage and side effects of TNF administered via isolated limb perfusion can be manipulated by flow rate adjustment. *Arch Surg* 1995;130:1079-84.
- Spriggs DR, Imamura K, Rodriguez C, Horiguchi J and Kufe DW. Induction of TNF expression and resistance in human breast tumor cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:6563-6566.
- Srere PA. Citrate synthase. *Methods Enzymol* 1969;13:3-11.
- Staal FJ, Roederer M, Herzenberg LA. Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor kappa B and transcription of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9943-9947.
- Stadler J, Bentz BG, Harbrecht BG, Di Silvio M, Curran RD, Billiar TR, Hoffman RA; Simmons RL. Tumor necrosis factor alpha inhibits hepatocyte Mitochondrial Respiration. *Ann Surg* 1992;216: 539-546.

- Stefanelli C, Bonavita G, Stanic Y, Farrugia G, Falcieri E, Robuffo Y, Piganti C, Rossoni C, Guarnieri C, Caldarera CM. ATP depletion inhibits glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis. *Biochem J* 1997; 322: 909-917.
- Steller H. Mechanism and genes of cellular suicide. *Science* 1995;267:1445-1449.
- Streckas, T.C. and Spiro, T.G. Cytochrome *c*: resonance Raman spectra. *Biochim Biophys Acta* 1972;278:188-192.
- Strominger JL. Human major histocompatibility complex genes: class I antigens and tumor necrosis factors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;51 pt 1:63-66.
- Subira ML and Brugarolas A. Biotherapy of cancer. *Rev Clin Esp* 1992;191 (2):102-108.
- Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993;75:1169-1178.
- Suffys P, Beyaert R, De Vanhaesebroeck B, Van Roy F and Fiers W. Tumor-necrosis-factor-mediated cytotoxicity is correlated with phospholipase A2 activity but not with arachidonic acid released per se. *Eur J Biochem* 1991;195:465-475.
- Suffys P, Beyaert R, Van Roy F, Fiers W. Reduced tumor necrosis factor-induced cytotoxicity by inhibitors of the arachidonic acid metabolism. *Bioch Biophys Res Commun* 1987;149:735-743.
- Sweat JD, Connolly TM, Cragoe EJJ and Limbird LE. Evidence that Na⁺/H⁺ exchange regulates receptor-mediated phospholipase A2 activation in human platelets. *J Biol Chem* 1986;261:8667-8673.
- Takeshiga K, and Minakami S. NADH and NADPH dependent formation of superoxide anion by bovine heart submitochondrial peptides and NADH ubiquinone reductase preparation. *Biochem J* 1979;180:129-135.

- Tartaglia LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. *Immunol Today* 1992;13:151-153.
- Thomassin H, de Sa CM, Mainez C, Mandel P. Cytoplasmic poly (ADP-ribose) polymerase and poly (ADP-ribose) glycohydrolase in AEV-transformed chicken erythroblast. *Mol Biol Rep* 1988;13:35-44.
- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267: 1456-1462.
- Tiegs G and Wendel A. Leukotriene-mediated liver injury. *Biochem Pharmacol* 1988;37:2569-2573.
- Tomita K, Shirai H and Hakoshima T. X-Ray structural studies of tumor necrosis factor. In :*Tumor Necrosis Factor: Structure, Mechanism of Action, Role in Disease and Therapy*. Basel 1990;38-42.
- Torti SV, Kwak EL, Miller SC, Miller LL, Ringold GM, Myambo KB, Young AP, Torti FP. The molecular cloning and characterization of murine ferritin heavy chain, a tumor necrosis factor-inducible gene. *J Biol Chem* 1988;263:12638-12644.
- Toth CA and Thomas P. Liver endocytosis and Kupffer cells. *Hepatology* 1992;16:255-266.
- Totpal K, Agarwal S, and Agarwal BB. Phosphatase inhibitors modulate the growth-regulatory effects of human tumor necrosis factor on tumor and normal cells. *Cancer Res* 1992;52:2557-2562.
- Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human caequetin. *Science* 1986;234:470-4.
- Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor : An update of its biology. *Crit Care Med* 1993;21:5415- 5422.

- Tsujimoto M, Yip YK, Vilack J. TNF :specific binding and internalizacion in sensitive and resistant cells. Proc Natl Acad Sci 1985;82:7626-7630.
- Tsujimoto M, Yip YK and Vilcek J. Interferon γ enhances expression of cellular receptors for TNF. J Immunol 1986;136:2441-2444.
- Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. Arch. Biochem Biophys 1985;237:408-414.
- VanArsdale TL and Ware CF. TNF receptor signal transduction :ligand-dependent stimulation of serine protein kinase activity associated with (CD120a) TNFR60. J Immunol 1994;153: 3043-3050.
- Verheij M, Bose R, Liu XH et al. Requiriment for ceramide -initiated SAPK/JNK signaling in stress-induced apoptosis. Nature 1996;380:75-79.
- Verweij J, Hartigh J, Pinedo HM. Antitumor antibiotics. In: Cancer Chemotherapy . Chabner BA, Collins JM. Ed. 1990. pp382-384.
- Vietor Y, Schwenger P, Li W, Schleissinger J, Vilcek J. Tumor necrosis factor-induced activation and increased tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in human fibroblast. J Biol Chem 1993;268:18994-18999.
- Villalobo A, Lehninger AL. Inhibition of oxidative phosphorylation in ascitis tumor mitochondrial and cells by intramitochondrial Ca^{2+} . J Biol Chem 1980;255:2457.
- Voelkel-Johnson C, Thorne TE, Laster SM. Susceptibility to TNF in presence of inhibitors of transcription or translation is dependent on the activity of cytosolic phospholipase A2 in human melanoma tumor cells. J Immunol 1996;156:201-207.
- Von Jagow G, and Link TA. Use of specific inhibitors on the mitochondrial bc1 complex. Meth Enzymol 1986;126:253-271.

- Wallach D, Preparations of lymphotoxin induce resistance to their own cytotoxic effect. *J Immunol* 1984;132 :2464-9.
- Wang-CY, Mayo-MW, Baldwin-AS Jr. TNF-and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 1996;274: 784.-787.
- Wiegmann K, Shultze S, Machleidt T, Witte D, Kronke M. Functional dichotomy of neural and acidic sphingomyelinases in TNF signaling. *Cell* 1994;78:1005-1015.
- Wong GH. Protective roles of cytokines against radiation: induction of mitochondrial MnSOD. *Biochem Biophys Acta* 1995;1271:205-209.
- Wong GHW and Goeddel DV. Induction of manganese superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science* 1988;242:941-945.
- Wong GHW, Elwell JH, Oberly LW, Goeddel DV. Manganese superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of TNF. *Hepatology* 1989;58:923-931.
- Wu MH and Yung BYM. Cell cycle phase-dependent cytotoxicity of AD in HeLa cells. *Eur J Pharmacol* 1994;270:203-212.
- Wulff K, Doppen W. Luminometric Method. In: "Methods of enzymatic analysis". Third Ed. Vol 7. H. U. Bergmeyer, Editor. Verlag-chemie. Weinheim. 1985. pp: 357-364.
- Yamauchi N, Kuriyama H, Watanabe N, Neda H, Maeda M, and Niitsu Y. Intracellular hydroxyl radical production induced by recombinant human tumor necrosis factor and its implication in the killing of tumor cells in vitro. *Cancer Res* 1989;49:1671-1675.
- Yang R, Liu Q, Rescorla FJ, Grosfeld JL. Experimental liver cancer: improved response after hepatic artery ligation and infusion of TNF α and INF- γ . *Surgery* 95;118:768-72).

- Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Zanin C, Vayssier JL, Petit PX and Kroemer G. J. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *Exp Med* 1995;181:1661-1672.
- Zamzami N, Susin SA; Marchetti P, Hirsch T, Gómez-Monterey Y, Castedo M and Kroemer G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 1996; 183:1533-1544.
- Zhang YH, Marcillat O, Giulivi C, Ernster I y Davies KJA. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J Biol Chem* 1990;265:16330-16336.
- Zhang YH, Liu JX, Yip YK, Vilcek K. Enhancement of cAMP levels and protein kinase activity by TNF and IL-1 in human fibroblast: role in the induction of IL-6. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85: 6802-6806.
- Zhong LT, Sarafian T, Kane DJ, Charles AC, Mah SSP, Edwards RH, Bredesen DE. Bcl- inhibits death of central neural cells induced by multiple agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 1993;90:4533-4537.
- Zuurendonk PF, Tager JM. Rapid separation of particulate components and soluble cytoplasm of isolated rat-liver cells. *Biochim Biophys Acta* 1974; 333:393-399.

ANEXO I : Figuras.

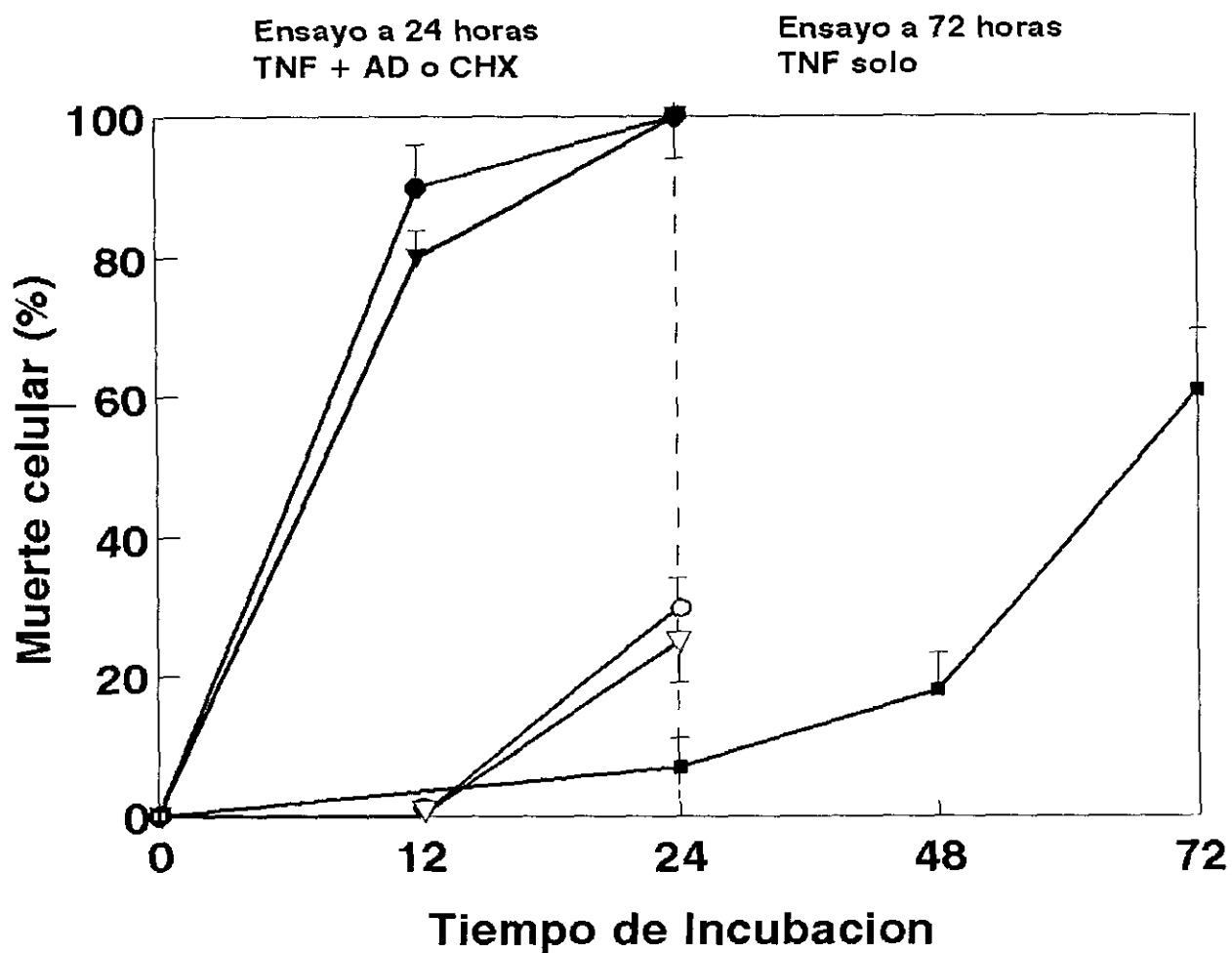


Figura 1. Evolución en el tiempo del efecto citotóxico del TNF,AD, CHX, AD y TNF/CHX sobre las células L929.

Las células L929 fueron cultivadas en medio RPMI 1640 e incubadas con 25ng/ml de TNF aislado durante 72 horas(■) o con 1 µg/ml de AD (◇), 0.1mM CHX (○) y 25ng/ml de TNF en presencia de 1 µg/ml de AD(▼) ó 0.1mM CHX (●) durante 24 horas. La citotoxicidad fué determinada según se describe en "Material y Métodos". Los valores se expresan como media ±SD de tres experimentos independientes.

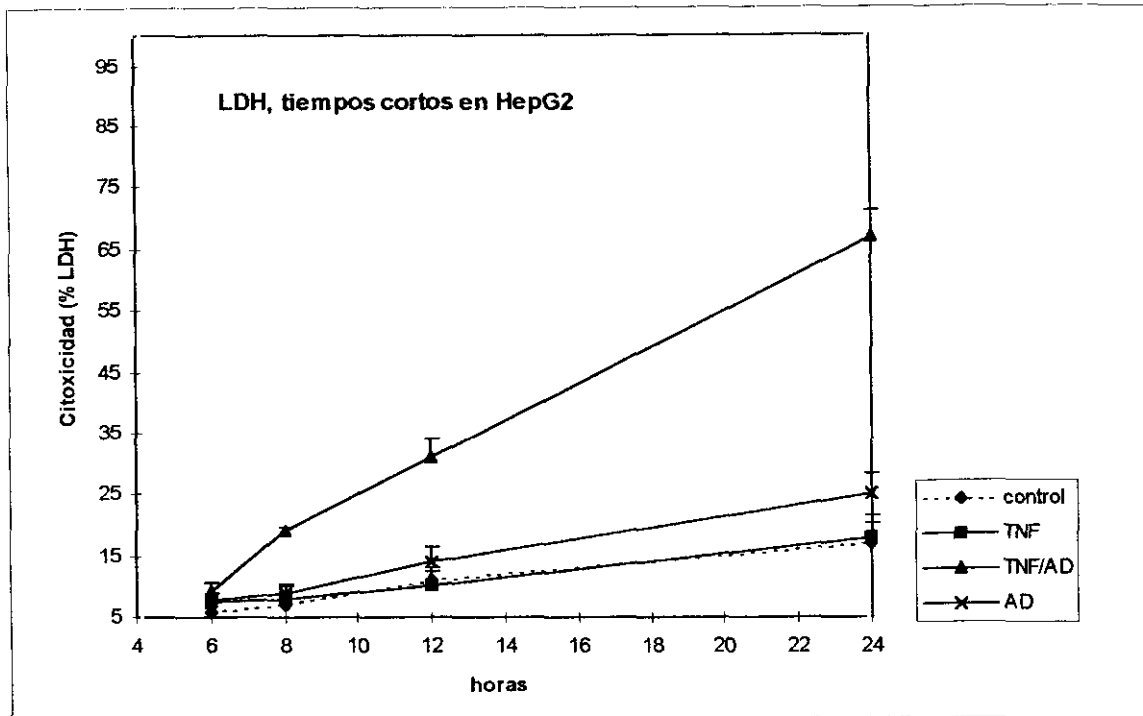


Figura 2. Evolución en el tiempo del efecto citotóxico del TNF, AD y TNF/AD sobre las células HepG2.

Las células HepG2 fueron cultivadas en medio DMEN e incubado con 25ng/ml de TNF aislado (■), 1 µg/ml de AD (-X-), con tratamiento combinado de ambos (▲), o en ausencia de tratamientos: control (◆) durante 24 horas. La citotoxicidad se determinó a las 6-8-12 y 24 horas, según se describe en "Material y Métodos". Los valores se expresan como media ±SD de los valores de seis experimentos independientes.

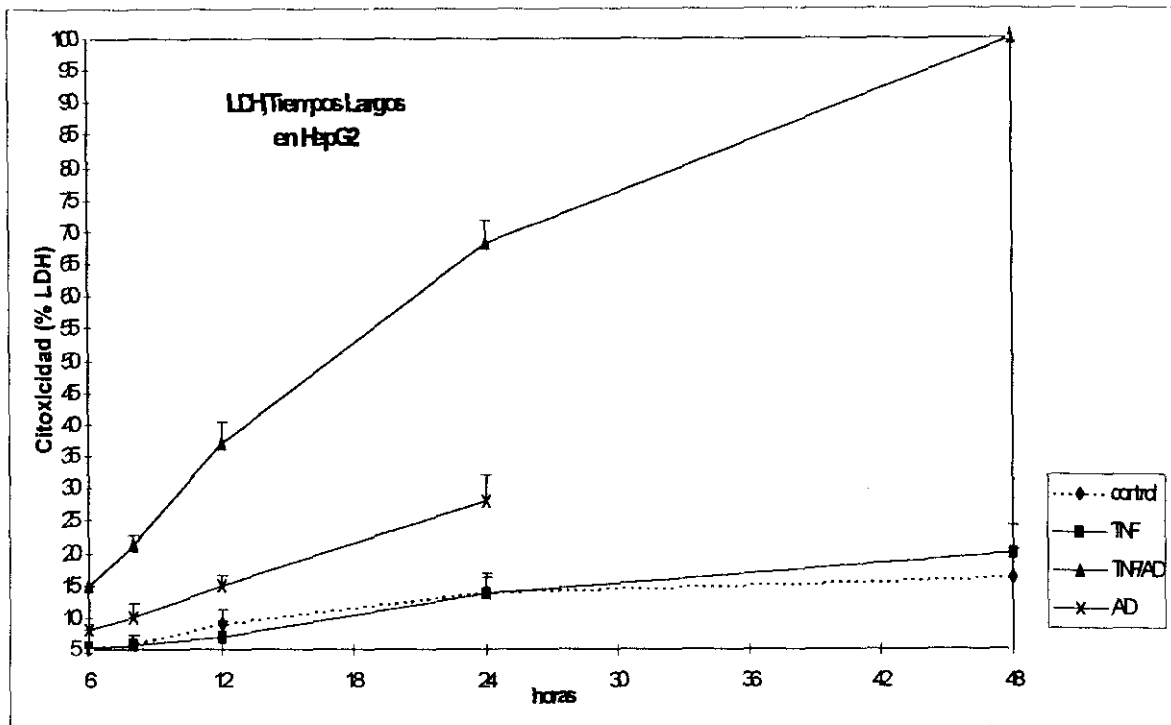


Figura 3. evolución a tiempos largos del efecto citotóxico del TNF, TNF/AD sobre las células HepG2.

Las células HepG2 fueron incubadas en medio DEMN 12-709 F e incubadas en ausencia :control(●); en presencia de 25ng/ml de TNF aislado (■); o con tratamiento combinado TNF25ng/ml y 1µg/ml de Ad (▲) durante 48 horas . La citotoxicidad se determinó a las 24-48 horas según se describe en "Material y Métodos. Los valores se expresan como media \pm SD de los valores de tres experimentos independientes.

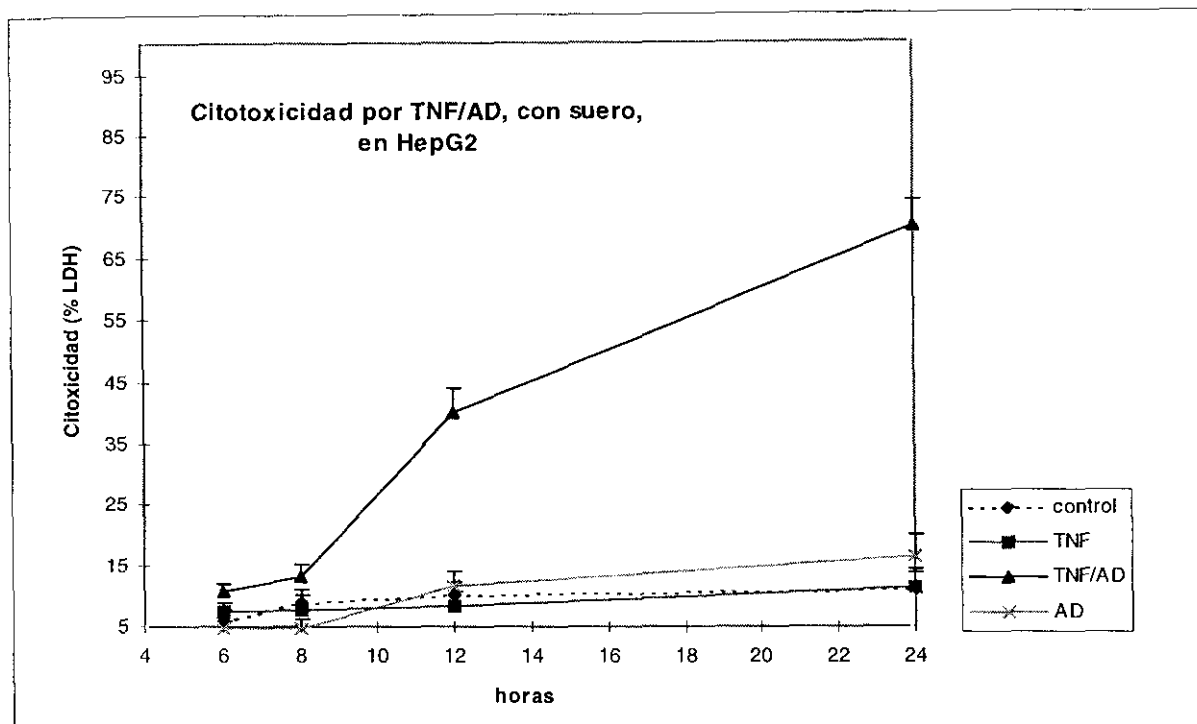


Figura 4. Efecto citotóxico del TNF, TNF/AD y AD sobre las células HepG2 , en presencia de suero.

Las células HepG2 fueron cultivadas e incubadas en medio DEMN 12-709 F con suero al 10% en ausencia (control)(◆) o en presencia de 25ng/ml de TNF aislado (■); o con 1 μg/ml de AD (X); o con tratamiento combinado TNF 25ng/ml y 1μg/ml de AD (▲) durante 24 horas . La citotoxicidad se determinó a las 8,12 y24 horas según se describe en "Material y Métodos". Los valores se expresan como media ±SD de los valores de tres experimentos independientes.

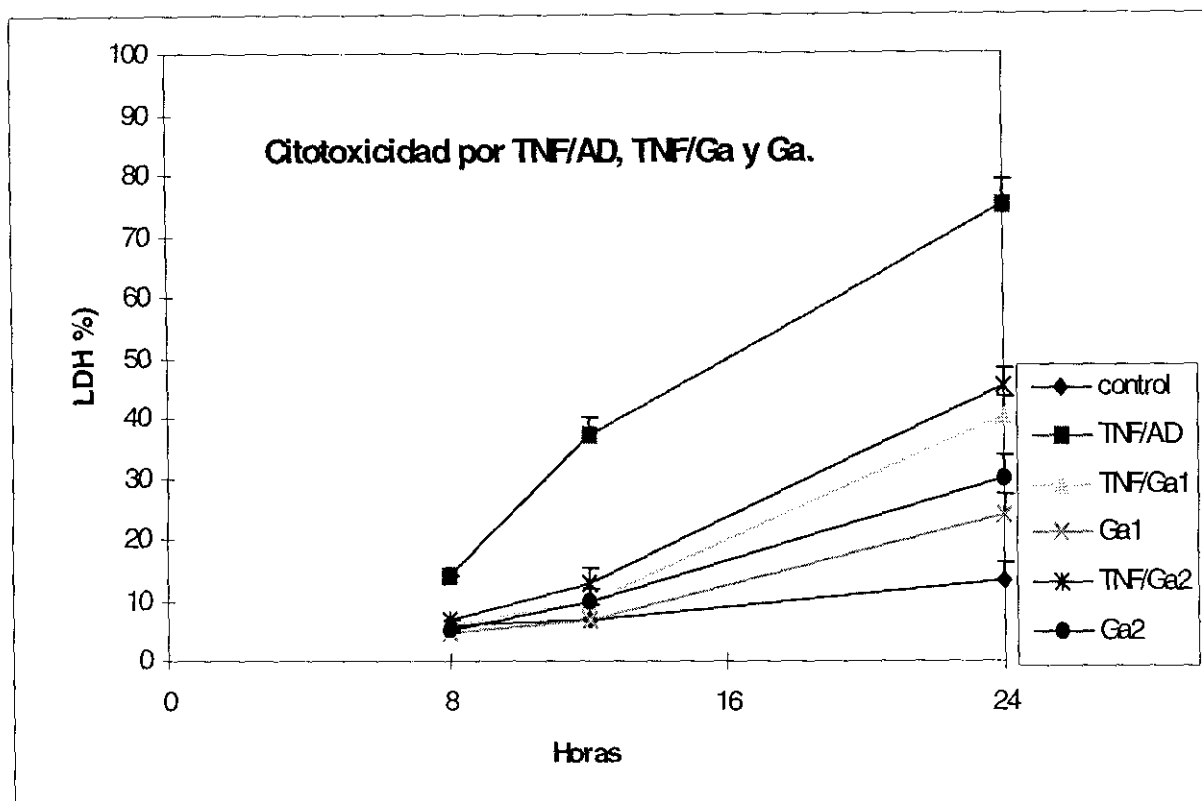


Figura 5. Citotoxicidad por TNF/AD, TNF/Ga y Ga sobre las células HepG2.

Las células HepG2 fueron cultivadas en medio DMEN 12-709 F e incubado con 25ng/ml de TNF con 1 µg/ml de AD (■); con Galactosamina 35mM (●); con 25 ng/ml de TNF simultáneo a Galactosamina 35mM (*); Galactosamina 25mM (▲); Galactosamina 25Mm y 25ng/mlde TNF (*); ó en ausencia de ningún tratamiento, control (◆), durante 24 horas. La citotóxicidad se determinó a las 8,12 y 24 horas, según se describe en "Material y Métodos" . Los valores se expresan como media ±SD de los valores de dos experimentos independientes.

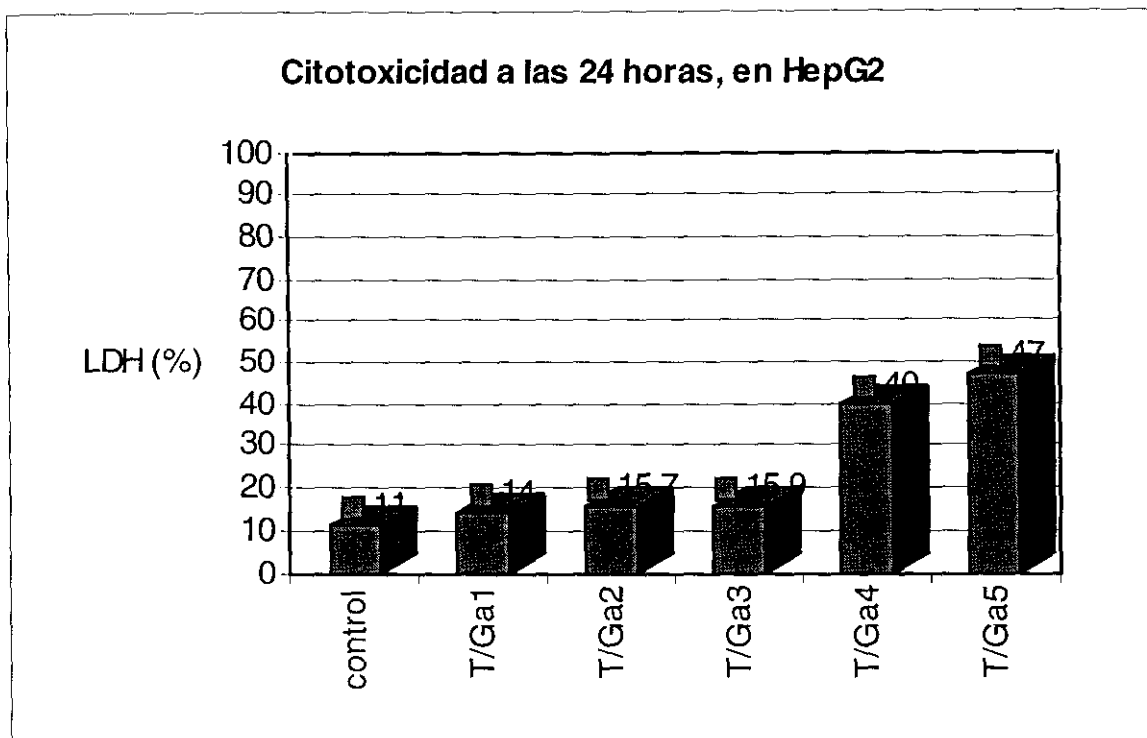


Figura 6. Dosis-Citotoxicidad por TNF/Ga sobre las células HepG2.

Las células HepG2 fueron cultivadas en medio DMEN 12-709 F e incubadas con 25ng/ml de TNF con concentraciones variables de Galactosamina: 5mM (T/Ga1); 10mM (T/Ga2); 15 mM (T/Ga3) ; 25mM 1 µg/ml (T/Ga4) y 35mM (T/Ga5); ó en ausencia de ningún tratamiento, control, durante 24 horas. La citotoxicidad se determinó a las 24 horas, según se describe en "Material y Métodos" . Los valores se expresan como media \pm SD de los valores de dos experimentos independientes.

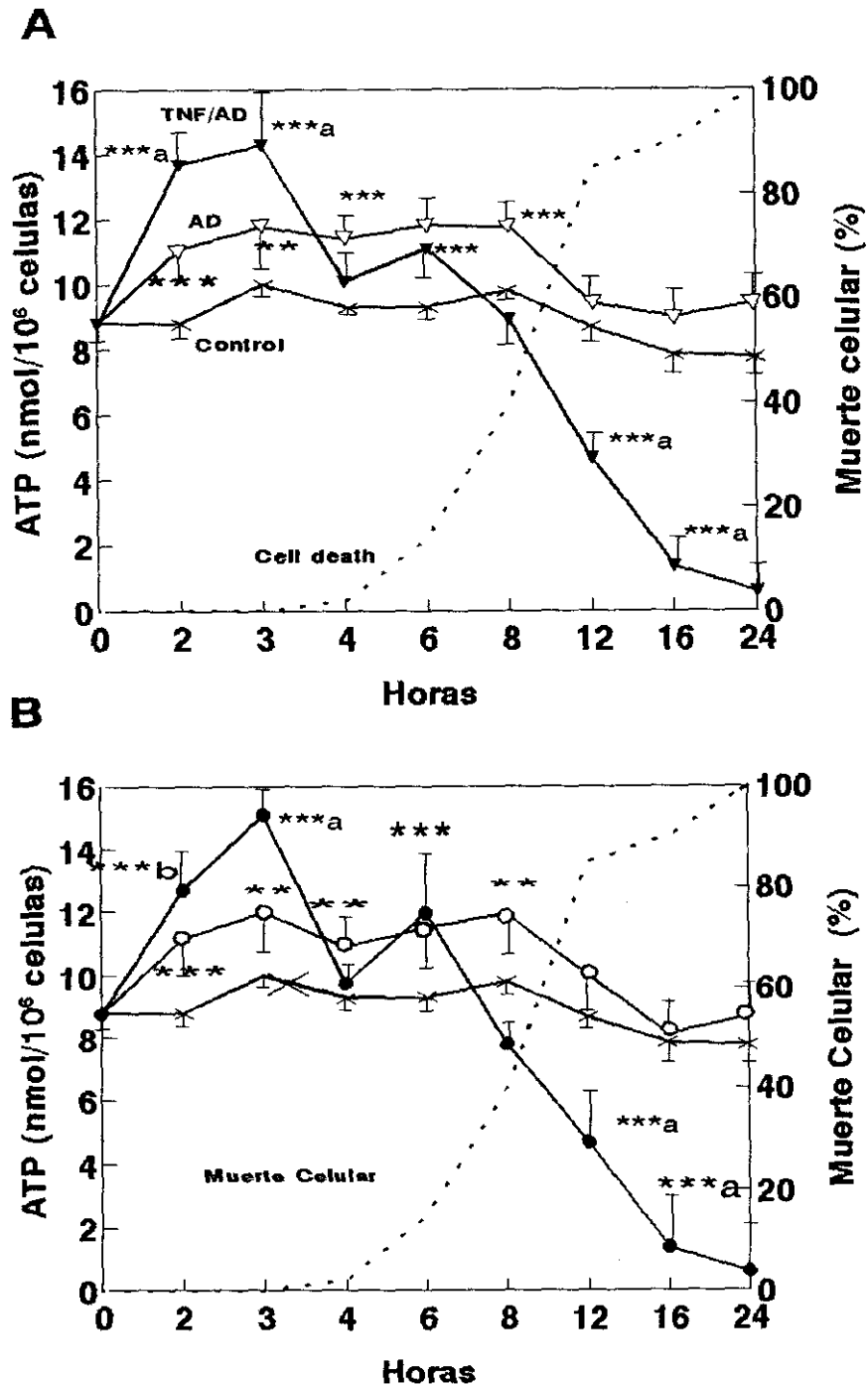


Figura 7. Efecto del TNF/AD y TNF/CHX sobre el contenido de ATP en células L929.

Las células L929 fueron cultivadas en medio RPMI 1640 a 37^a C durante 24 horas en ausencia (control) (X) o presencia de 25ng/ml de TNF (■), 1 µg/ml de AD (◇), y el tratamiento combinado TNF/AD (▼) (Panel A) ó 0.1mM CHX (○) y el tratamiento combinado (●) (Panel B). El contenido de ATP y la citotoxicidad (.....) de TNF/AD y TNF/CHX fueron determinados según se describe en "Material y Métodos". Los valores se expresan como media±SD de ocho experimentos independientes. Los valores de ATP se normalizaron al número de células supervivientes. (**)=P<0.001; (***)=P<0.001 entre las células control y las células experimentadas. (a)=P<0.001; (b)=P<0.01; entre TNF/AD y AD ó TNF/CHX y CHX.

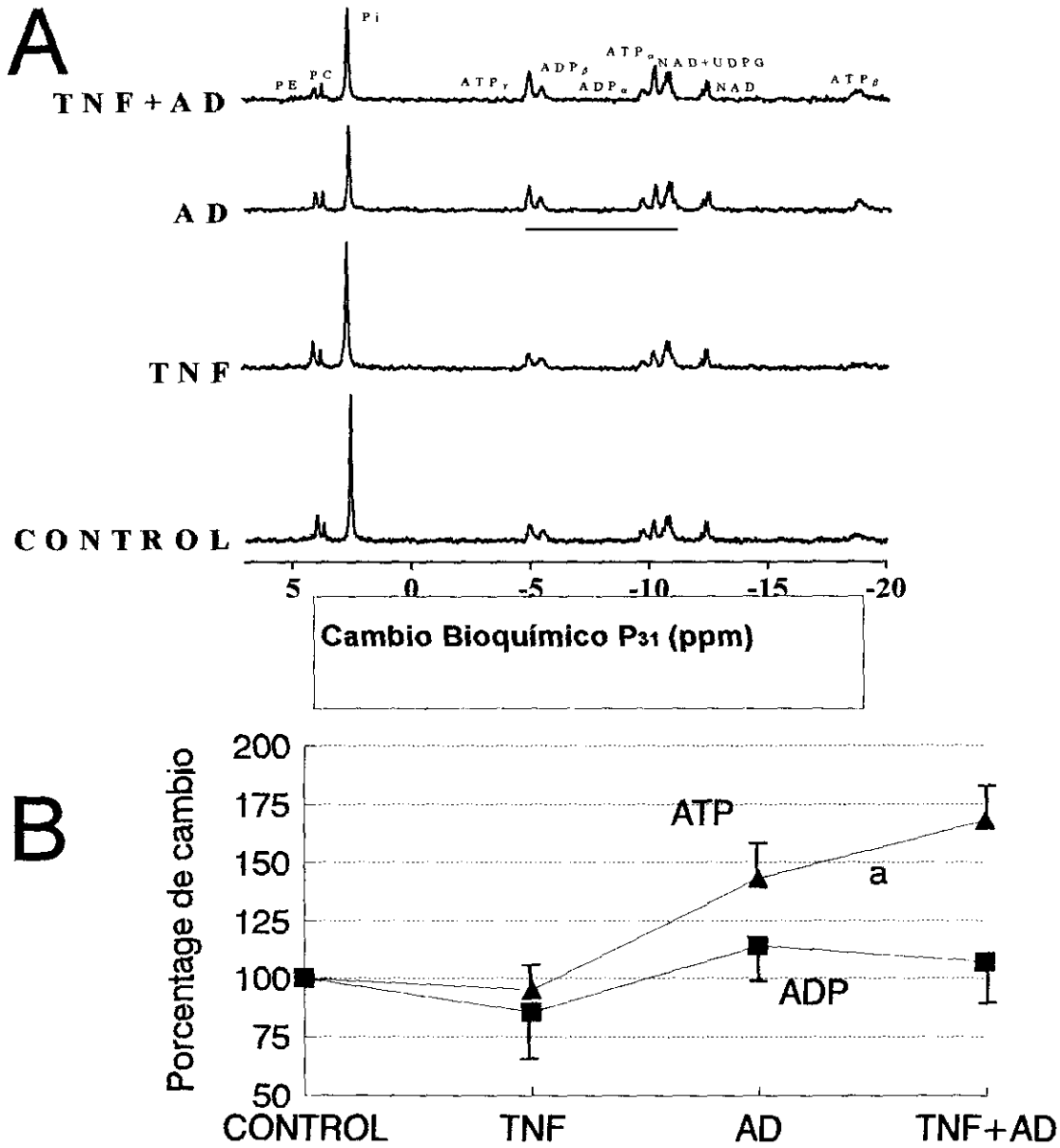


Figura 8. Panel A: Espectro de resonancia magnética nuclear del ^{31}P (202.46 MHz) del extracto TCA de las células control L929, y de las tratadas con TNF (25ng/ml), AD(1 microg/ml) o TNF/AD durante 2 horas.

PE: Fosforiletanolamina; PC: Fosforilcolina; Pi: fosfato inorgánico; NADH+UBPG: dinucleótido de adenina nicotinamida y difosfoglucosido de uridina

Panel B: Porcentaje de cambio inducido por TNF/AD o TNF/CHX sobre los niveles de ATP y AD medidos por espectro de resonancia magnética nuclear de ^{31}P .

Las intensidades y áreas de los picos espectrales de ATP y AD se midieron según se describe en "Material y Métodos". Los datos se expresan como % de cambio medio con desviación estándar. (a)=p menor de 0.01 entre TNF/AD y AD.

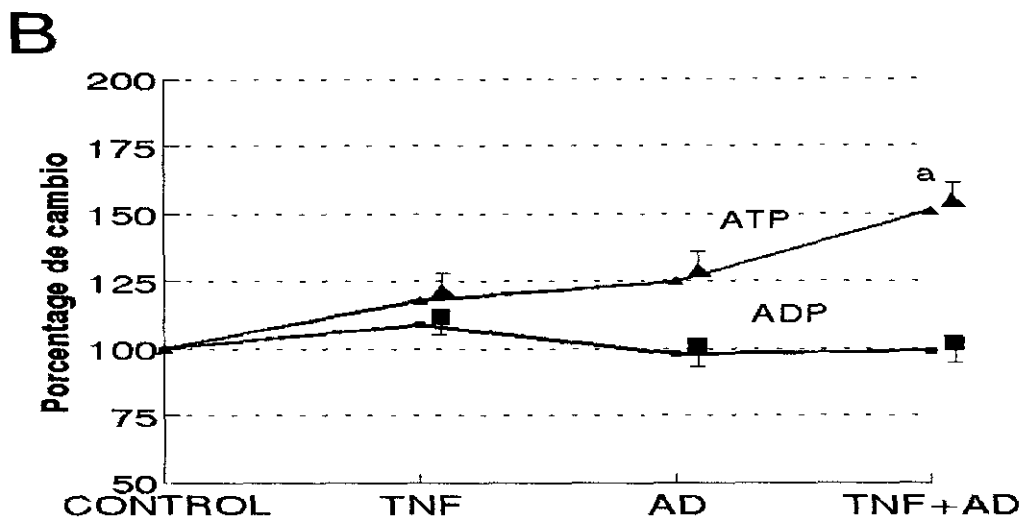
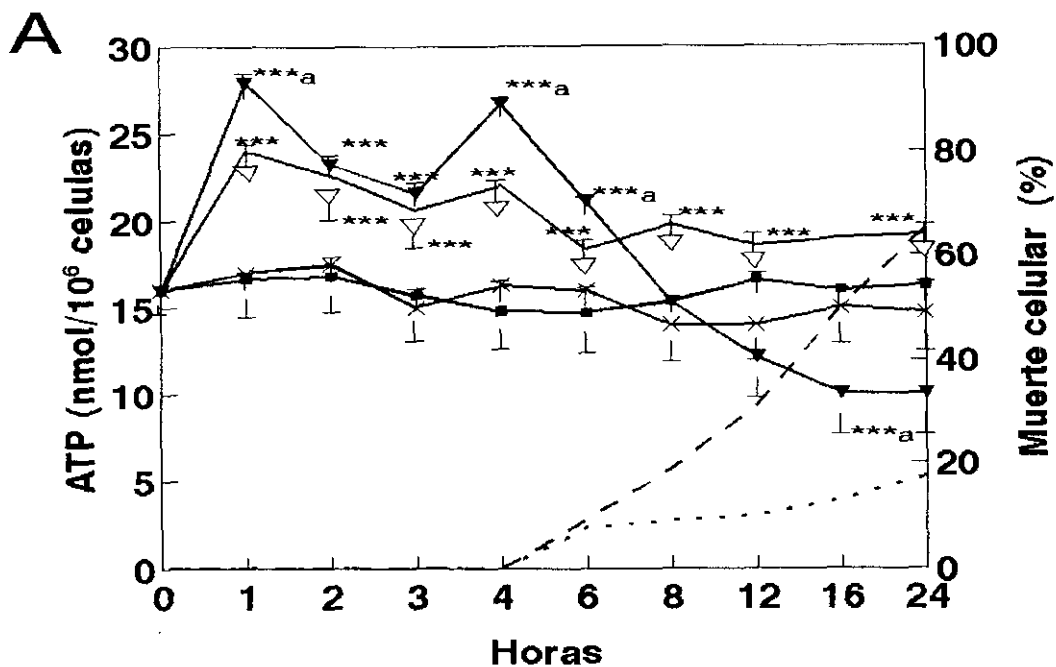


Figura 9. Efecto del TNF,AD y TNF/AD sobre el contenido de ATP en células HepG2.

Panel A. Las células HepG2 fueron cultivadas en medio DEMN 12-709 F a 37° C durante 24 horas en ausencia (control) (X) o presencia de 25ng/ml de TNF (■), 1 µg/ml de AD (◊), y el tratamiento combinado TNF/AD (▼). El contenido de ATP y la citotoxicidad por TNF/AD (—) y AD(...) fueron determinados según se describe en "Material y Métodos". Los valores se expresan como media±SD de tres experimentos independientes. Los valores de ATP se normalizaron al número de células supervivientes. (**)=P<0.01; (***)=P<0.001 entre las células control y las células experimentadas. (a)=P<0.01 entre TNF/AD y AD.

Panel B. Porcentaje de cambio inducido tras 1 hora de tratamiento con TNF, AD o TNF/AD sobre los niveles de ATP y ADP medidos por espectroscopia de P31-RMN, en células HepG2. Las intensidades y las áreas de los picos de todos los picos espectrales de ATP y ADP se midieron como se indica en "Material y Métodos". Los datos se expresan como porcentaje de cambio y representan las medias ±SD de tres experimentos independientes. (a)=P<0.05 entre TNF/AD y AD.

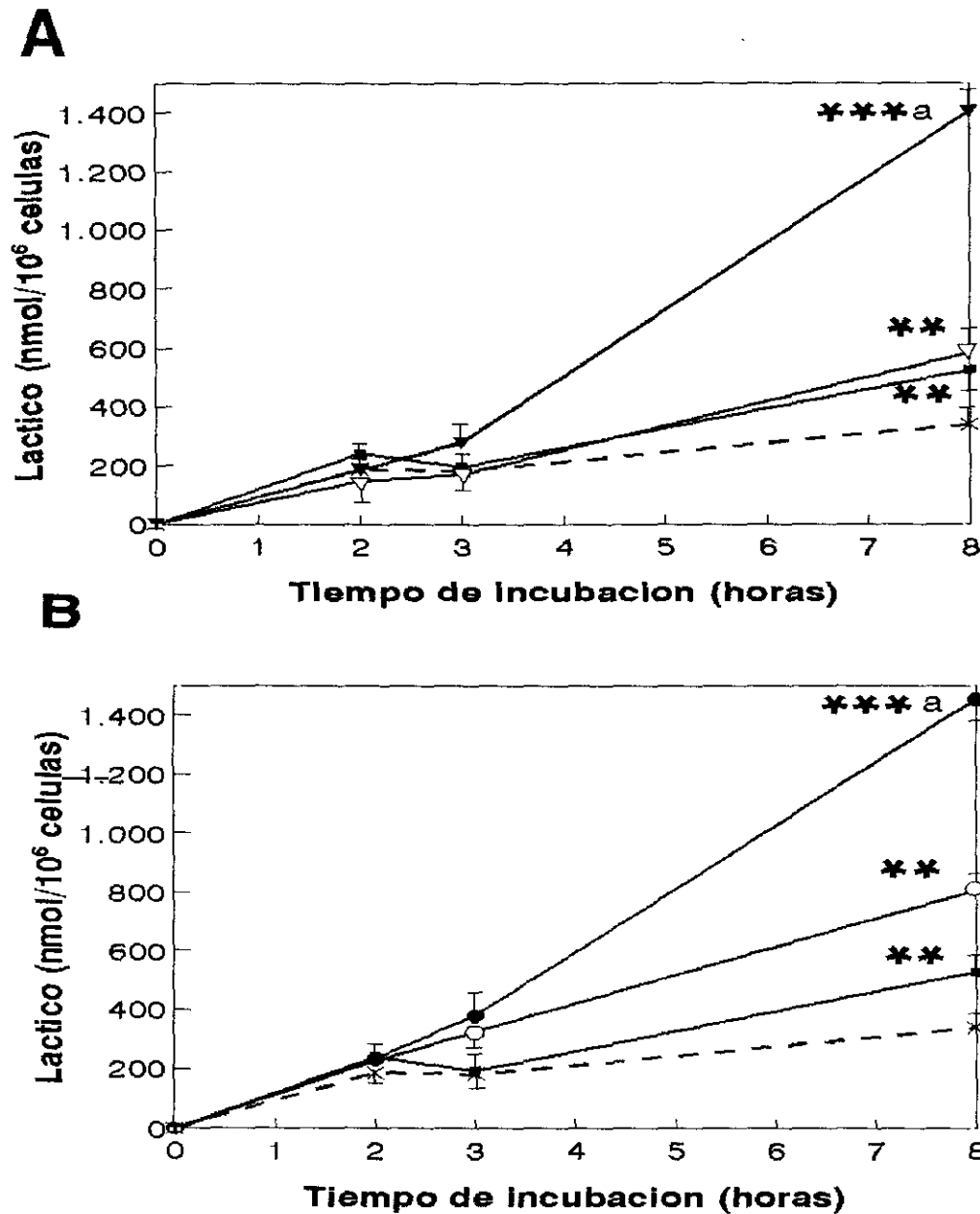


Figura 10. Efecto del TNF,AD, CHX,TNF/AD y TNF/CHX sobre el acúmulo de lactato en células L929.

Las células L929 fueron cultivadas en medio RPMI sin suero a 37^a C durante 8 horas en ausencia (control) (X) o presencia de 25ng/ml de TNF (■), 1 µg/ml de AD (◇), 0.1mM CHX (○) y con tratamiento combinado de ambos : TNF/AD(▼) y TNF/CHX(●). El Lactato se midió como se describe en "Material y Métodos". Los valores se expresan como media±SD de tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como nmol/10⁶ células. (***)=P<0.001; (**)=P<0.01 entre las células control y las células experimentadas. (a)=P<0.01entre TNF/AD y AD ó TNF/CHX y CHX.

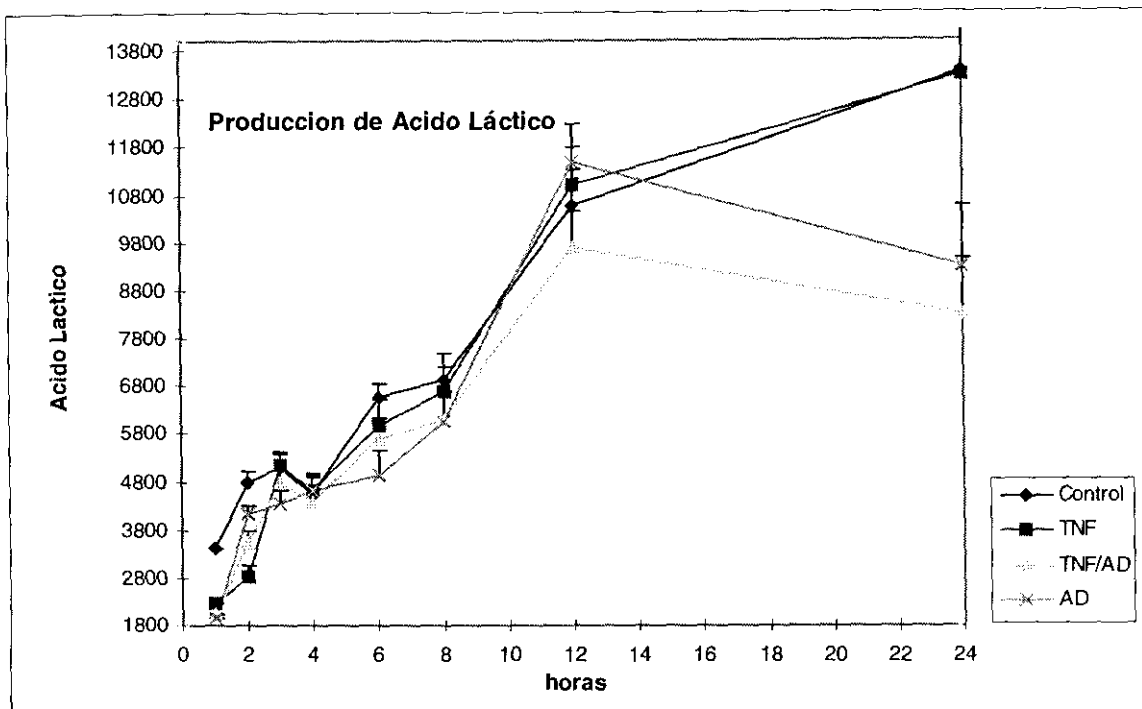


Figura 11. Efecto del tratamiento con TNF, AD o TNF/AD sobre el acúmulo de láctico en células HepG2.

Las células HepG2 fueron cultivadas en medio DMEN e incubadas en ausencia (●) o en presencia de 25ng/ml de TNF aislado (■), 1 μg/ml de AD (-X-), o tratamiento combinado de ambos (▲), durante 24 horas. Los datos se expresan como media±SD de los valores de 3 experimentos independientes. Los resultados se expresan como nmol/10⁶ células.

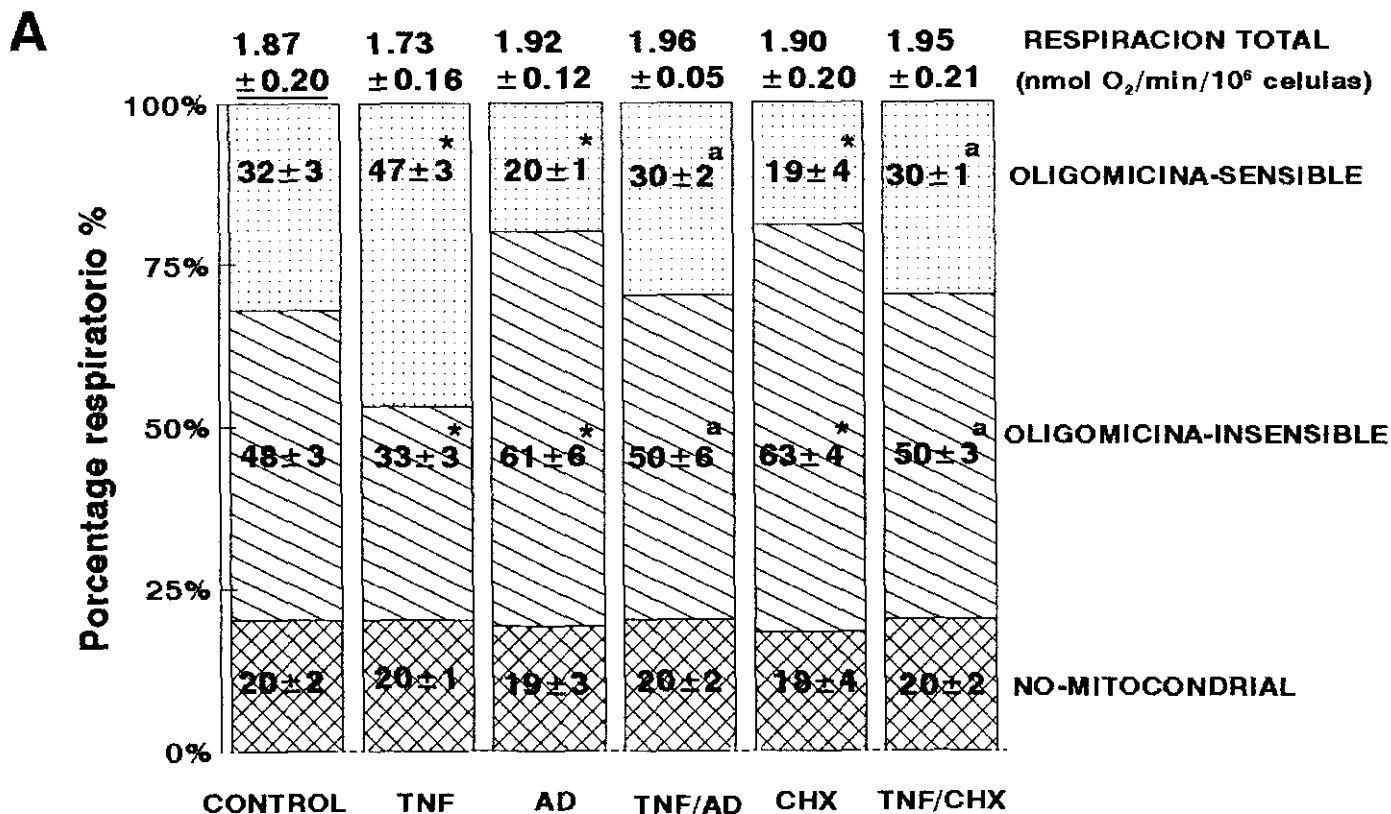


Figura 12. Determinación de la importancia cuantitativa de la respiración no-mitocondrial y la respiración oligomicina-sensible en células L929 tratadas con TNF, AD, CHX, TNF/AD o TNF/CHX.

Las células L929 fueron tratadas durante 2 horas en ausencia (control) o en presencia de 25ng/ml de TNF, 1 µg/ml de AD, CHX 0.1 mM y con los tratamientos combinados de TNF/AD o TNF/CHX. El porcentaje respiratorio en medio RPMI fue medido en ausencia y presencia de oligomicina (20 µg/ml) para prevenir la fosforilación oxidativa y en presencia de KCN (1mM) para prevenir la respiración mitocondrial. Los resultados se expresan como porcentaje de la respiración total (indicado debajo de cada barra). Los valores se expresan como media ±SD de tres experimentos independientes. (*)=p<0.01 entre el control y las células experimentadas;(a)=p<0.01entre TNF/AD y AD ó TNF/CHX y CHX.

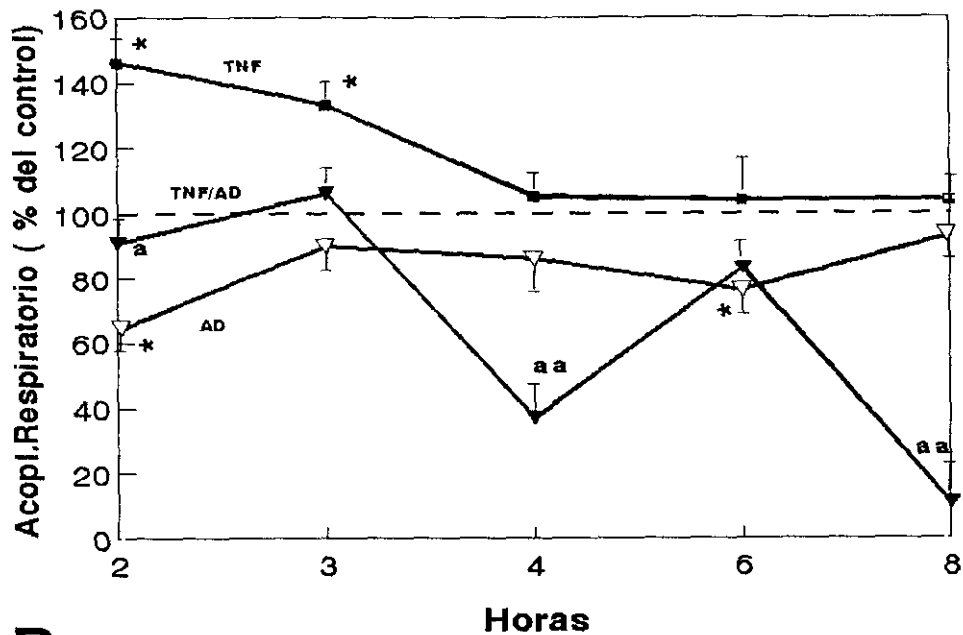
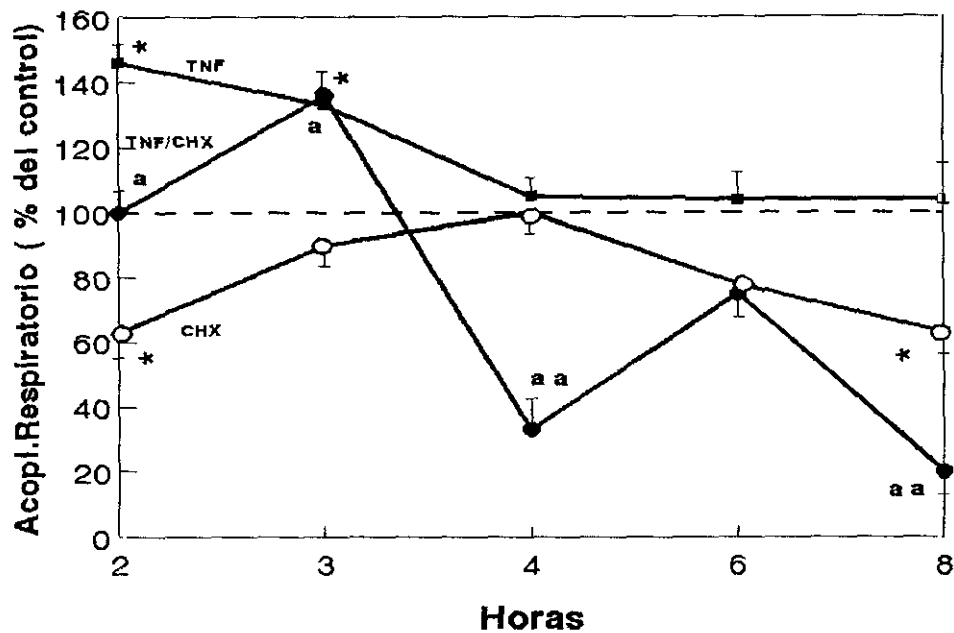
A**B**

Figura 13. Determinación de la importancia cuantitativa de la respiración no-mitocondrial y oligomicina-sensible en células L929 tratadas con TNF, AD, TNF/AD y TNF/CHX.

Las células L929 fueron tratadas durante 2 horas con 25ng/ml de TNF, 1µg/ml de AD, CHX 0.1mM ó tratamiento combinado de TNF/AD ó TNF/CHX. El porcentaje respiratorio, en medio RPMI, fué medido en presencia o ausencia de oligomicina (20µg/ml) para evitar la fosforilación oxidativa, y en presencia de KCN (1mM) para evitar la respiración mitocondrial. Los resultados se expresan como porcentaje de la respiración total (indicado debajo de cada barra). Los valores se muestran como media±SD de tres experimentos independientes. (*) =P<0.01

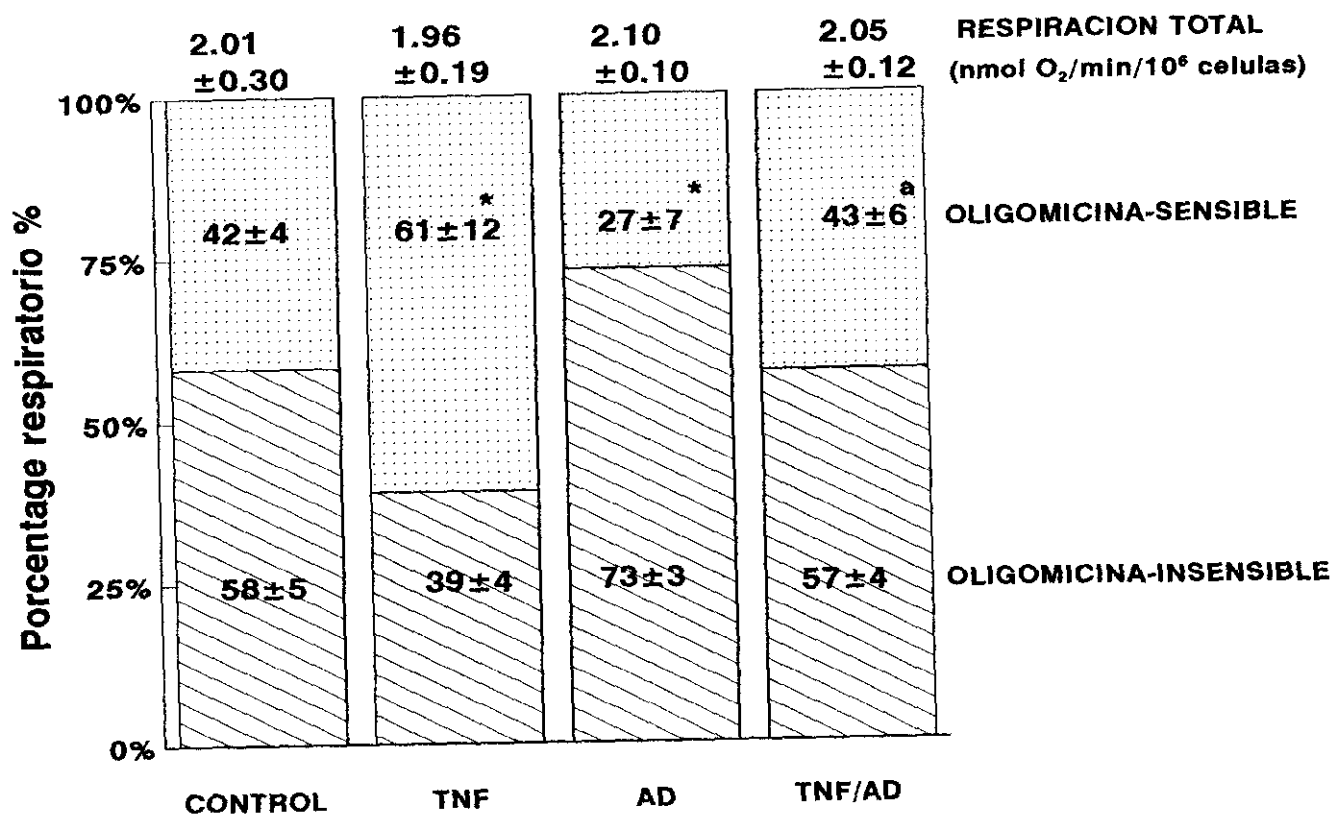


Figura 14. Determinación de la importancia cuantitativa de la respiración oligomicina-sensible en células hepG2 tratadas con TNF,AD o TNF/AD.

Las células HepG2 fueron tratadas durante una hora en ausencia (control) o en presencia de 25ng/ml de TNF, 1 µg/ml de AD y con el tratamiento combinado de TNF/AD. El porcentaje respiratorio en medio DMEN fué medido en ausencia o presencia de oligomicina (20µg/ml) para prevenir la fosforilación oxidativa. Los resultados se expresan como porcentaje de la respiración total (indicado debajo de cada barra). Los valores se expresan como media ±SD de tres experimentos independientes. (*)=p<0.05 entre células control y células experimentadas; (a)=p<0.05 entre TNF/AD y AD.

Acoplamiento Respiratorio a 1 hora

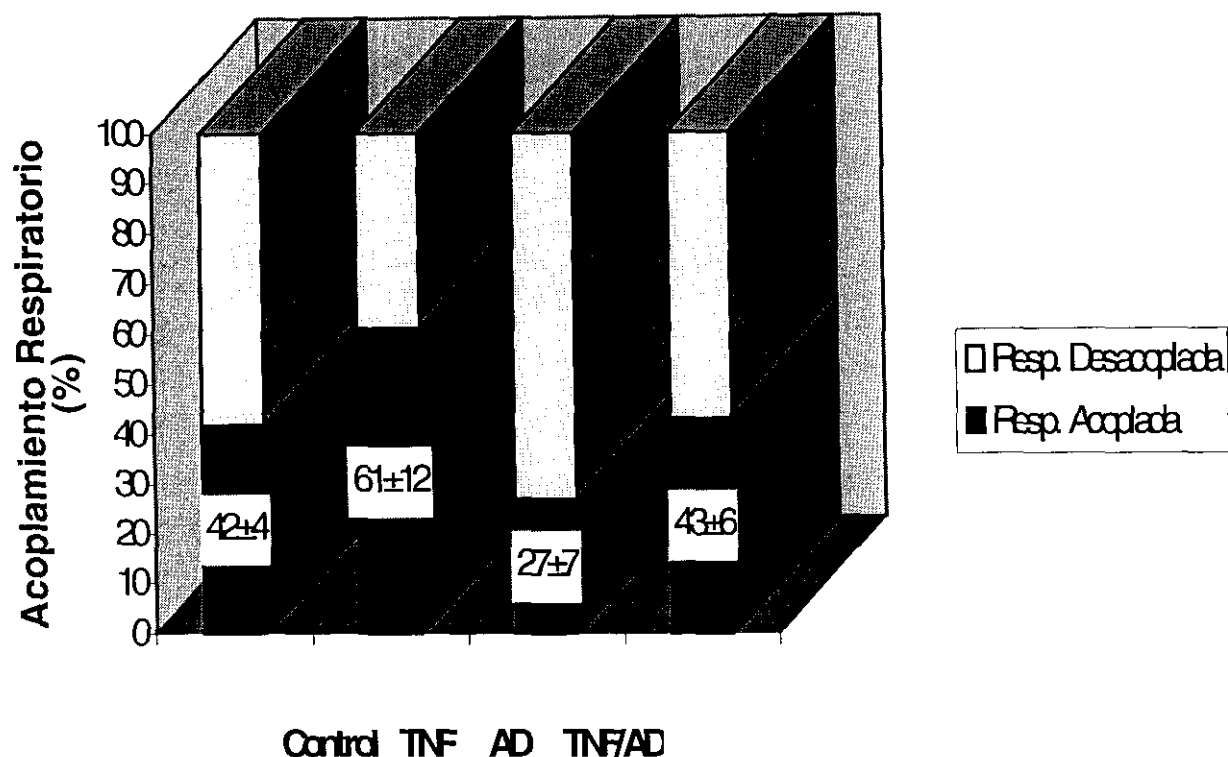


Figura 15. Acoplamiento Respiratorio en las células HepG2 en la 1^a hora de tratamiento con TNF, AD o TNF/AD.

Las células HepG2 fueron cultivadas en DMEN 12-709 F e incubadas durante 1 hora con 25 ng/ml de TNF, 1 µg/ml de AD, tratamiento combinado de ambos o en ausencia de tratamiento (control). El grado de acoplamiento respiratorio se determinó según se describe en "Material y Métodos". Los valores se expresan como porcentaje medio \pm SD de los valores de 4 experimentos independientes.

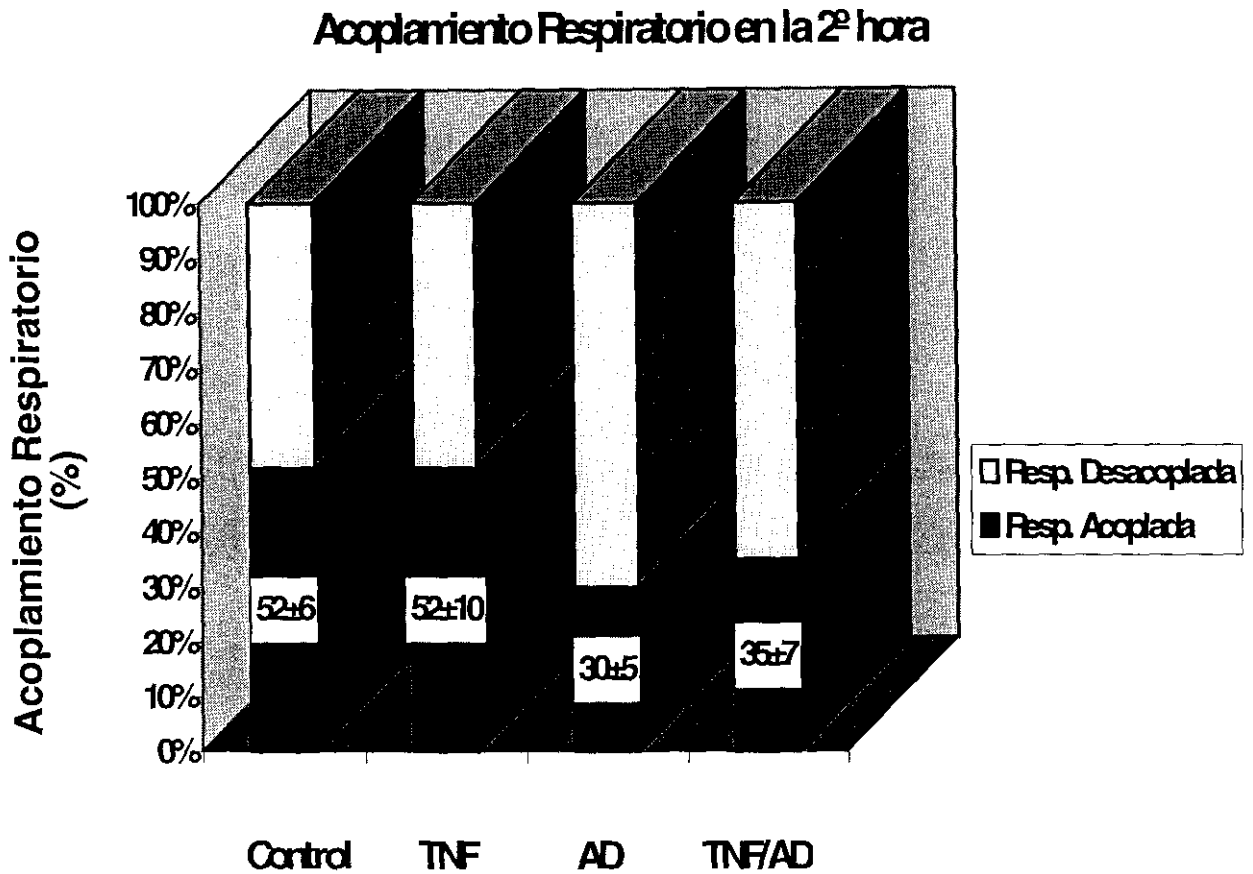


Figura 16. Acoplamiento Respiratorio en las células HepG2 en la 2ª hora de tratamiento con TNF, AD o TNF/AD .

Las células HepG2 fueron cultivadas en DMEN 12-709 F e incubadas durante 2 horas con 25 ng/ml de TNF, 1µg/ml de AD, tratamiento combinado de ambos o en ausencia de tratamiento (control). El grado de acoplamiento respiratorio se determinó según se describe en “Material y Métodos”. Los valores se expresan como porcentaje medio \pm SD de los valores de 3 experimentos independientes.

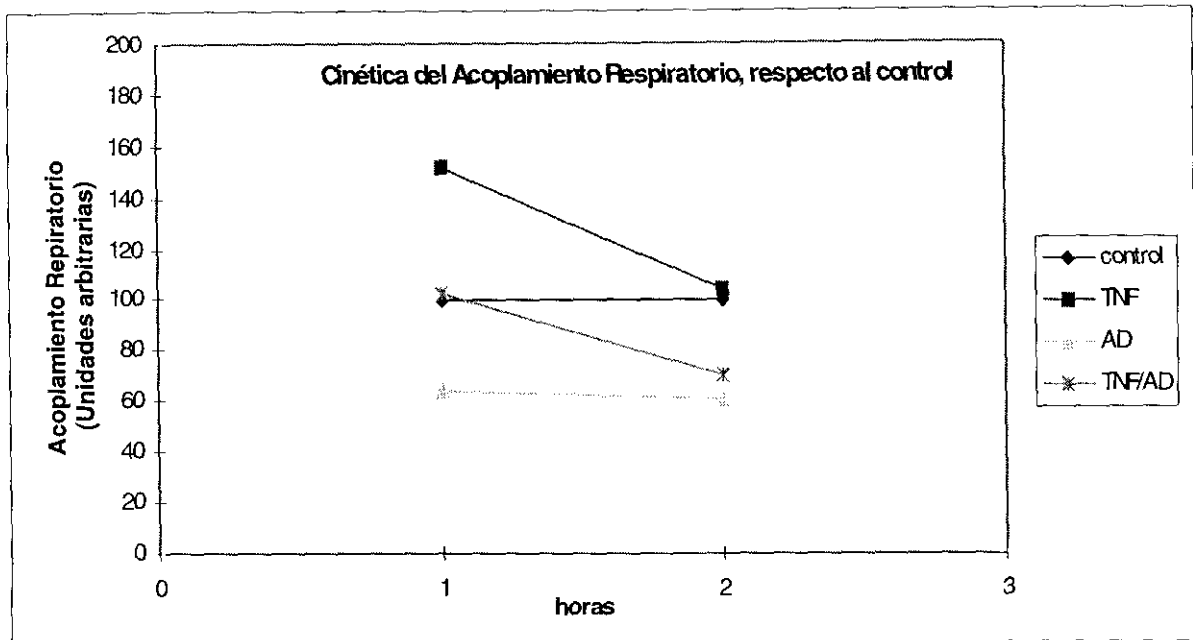


Figura 17. Cinética del Acoplamiento Respiratorio bajo tratamiento con TNF/AD, AD o TNF en células HepG2.

Las células HepG2 fueron cultivadas en medio DMEN 12-709 F e incubadas con 25 ng/ml de TNF (■), 1µg/ml de AD (▲), 25ng/ml de TNF y 1µg/ml de AD(*) o en ausencia de tratamiento: control(◆), durante 1 y 2 horas. Se determinó el grado de Acoplamiento Respiratorio Mitocondrial según se describe en "Material y Métodos", en la 1ª y 2ª horas de tales tratamientos. Los valores se expresan normalizados respecto al grado de acoplamiento de las células control.

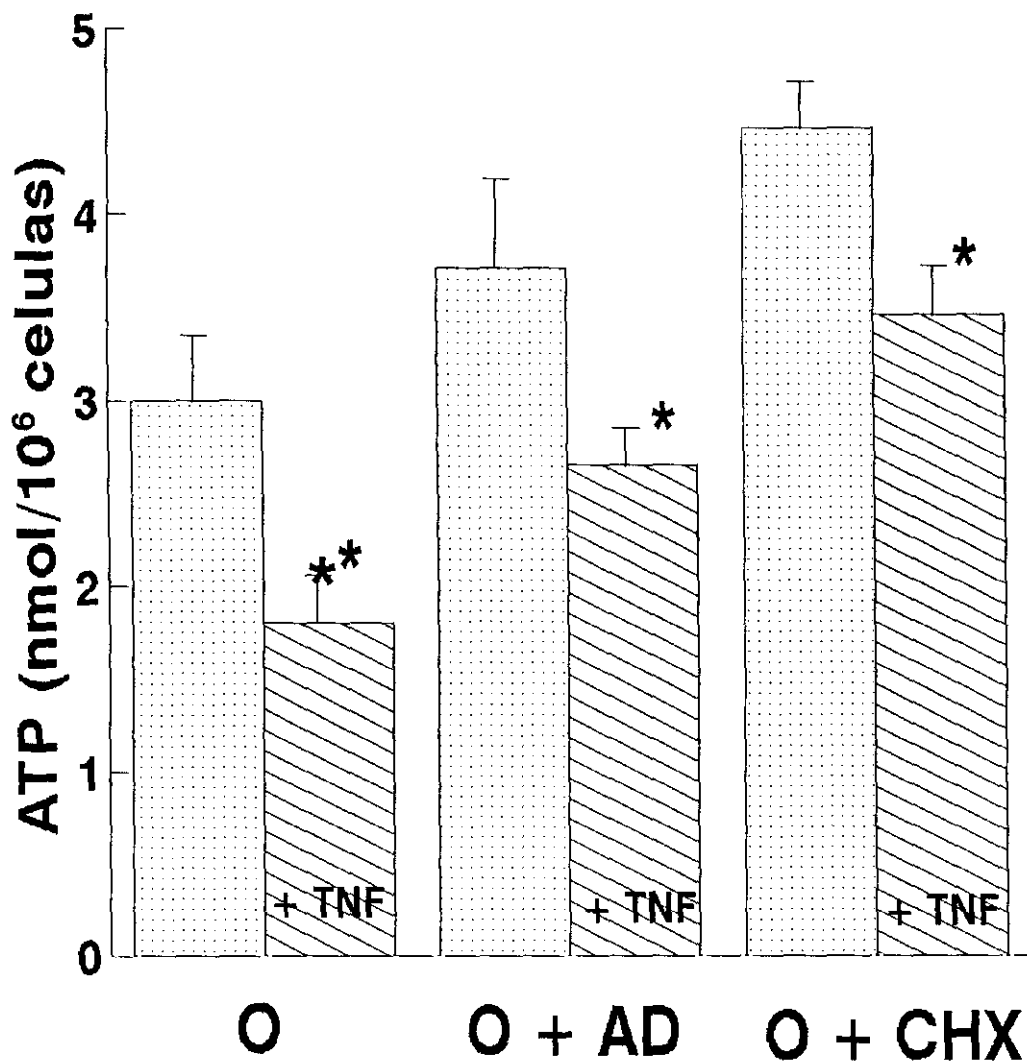


Figura 18. Efecto del TNF sobre el contenido de ATP en células L929 inhibidas con oligomicina.

Las células L929 inhibidas con oligomicina 10 μ g/ml fueron cultivadas en medio RPMI durante 3 horas en presencia de 1 μ g/ml de AD (O+AD) ó con Cicloheximida 0.1mM (O+CHX), con ó sin 25ng/ml de TNF. El contenido de ATP se determinó según se describe en "Material y Métodos". Los valores se expresan como media \pm SD de tres experimentos independientes. (*)=P<0.05; (**)=P<0.001

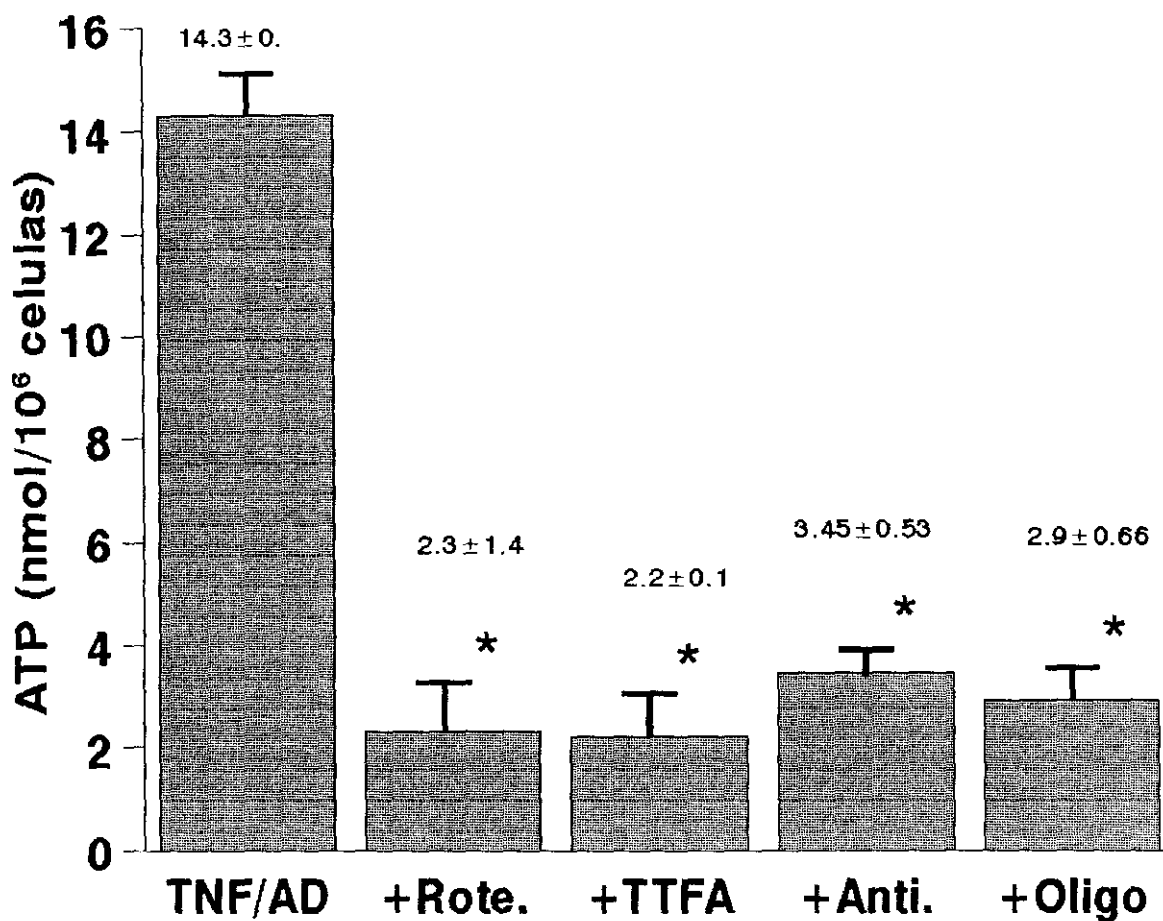


Figura 19. Efecto del bloqueo de la respiración mitocondrial sobre el contenido de ATP en células tratadas con TNF/AD.

Las células L929 fueron tratadas durante 3 horas con 25ng/ml de TNF, y 1µg/ml de AD en ausencia o presencia de una serie de inhibidores de la respiración mitocondria. El contenido de ATP fué determinado como se describe en "Material y Métodos". Los valores se expresan como media±SD de tres experimentos independientes. TNF/AD 0 25ng/ml de TNF y 1µg/ml de AD; Rote=0.24µM rotenona; Anti=5µg/ml antimicina A; Oligo=10µg/ml oligomicina. TTFA=50µM (**)=p<0.001.

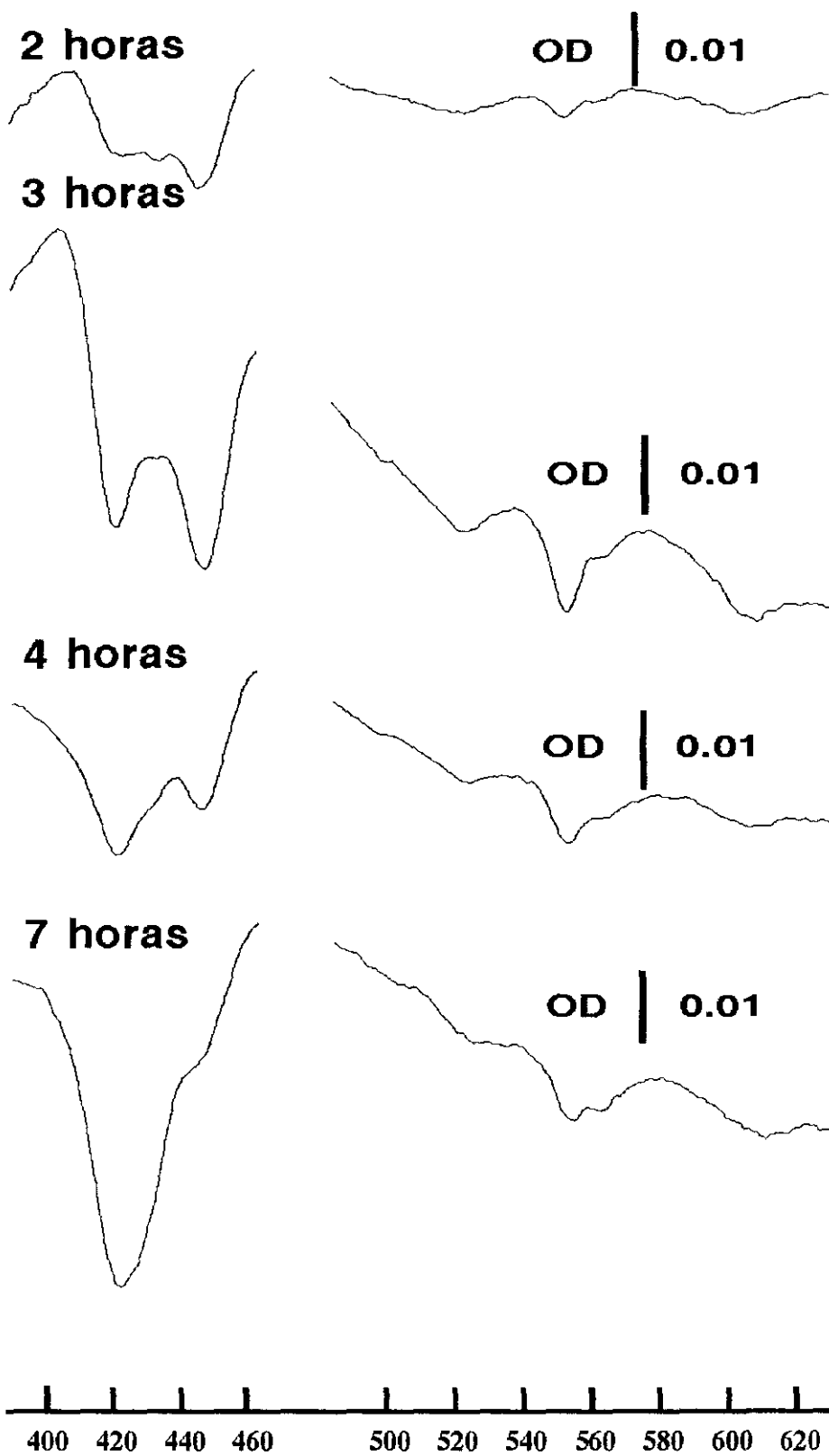


Figura 20. Espectros diferenciales entre células control y células tratadas con TNF/CHX.

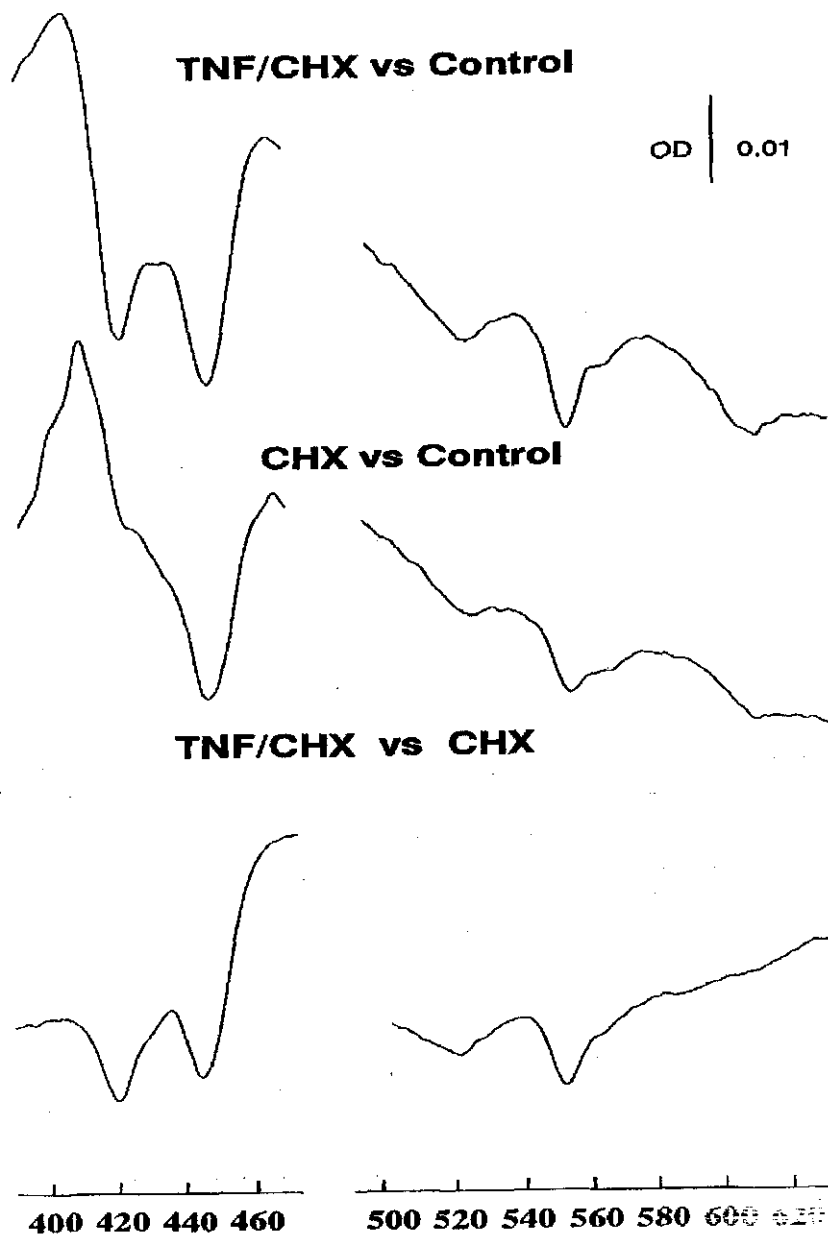


Figura 21. Espectro diferencial entre células L9292 tratadas con CHX y TNF/CHX.

Las células L929 fueron incubadas 3 horas con CHX (0.1 mM) o con TNF (25 ng/ml) y CHX (TNF/CHX). Los espectros diferenciales de ambos se realizaron según se describe en "Material y métodos"

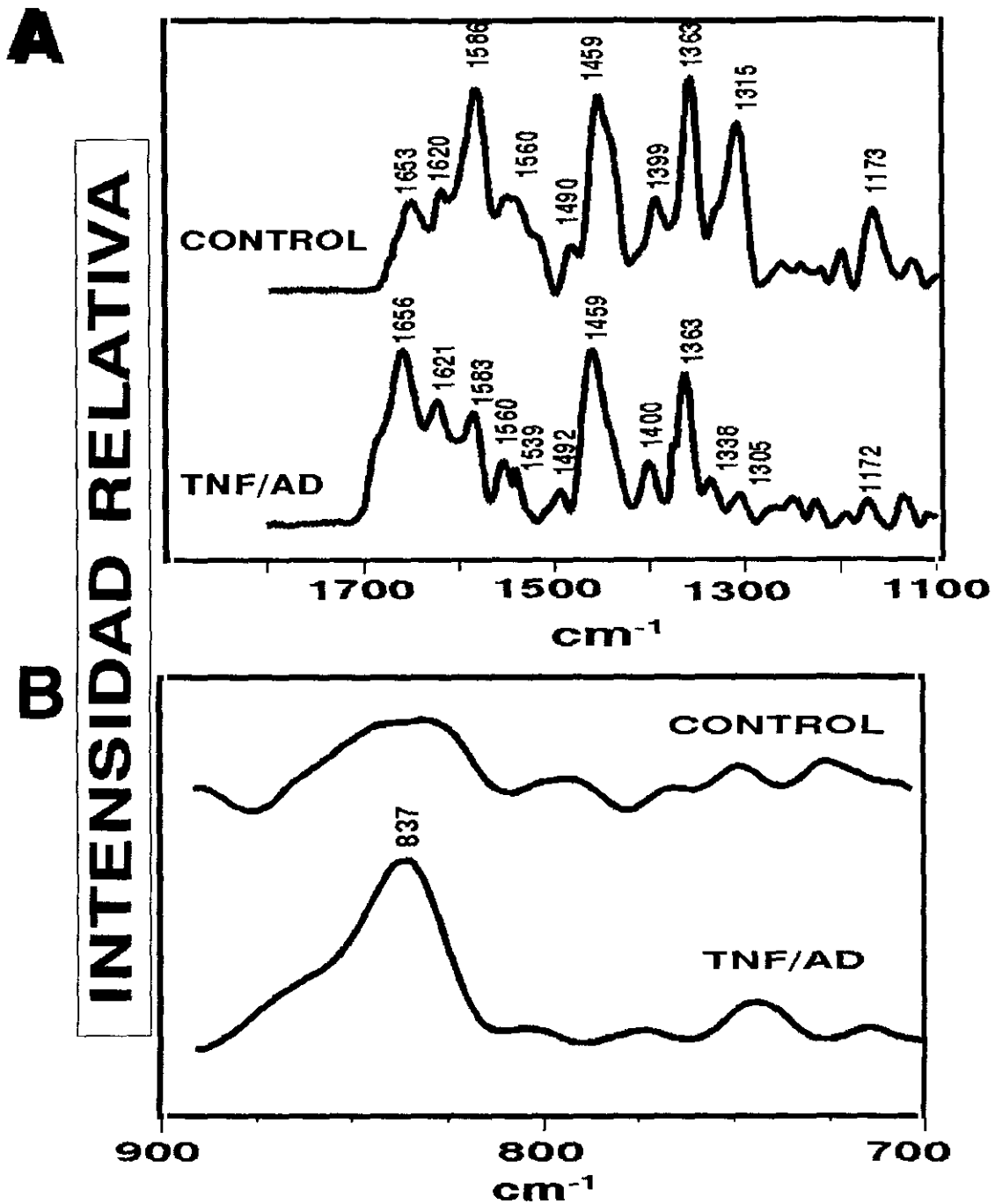


Figura 22. Espectro Raman de la mitocondria anaeróbica completa de células L929 control y células tratadas con TNF/AD.

Las células L929 se cultivaron durante 7 horas con TNF(25ng/ml) y AD (1 $\mu\text{g/ml}$) o en ausencia de tratamiento, células control. Las medidas del espectro Raman se realizaron como se describe en "Material y Métodos". A. Espectro Raman de la región entre 1100 cm^{-1} y 1700 cm^{-1} , donde se localizan las bandas de los citocromos mitocondriales. B. Espectro Raman de las células control y de las tratadas con TNF/AD durante 7 horas tomados de la región entre 700 cm^{-1} y 900 cm^{-1} donde aparecía una intensa banda a 840 cm^{-1} situada en el rango de los peróxidos.

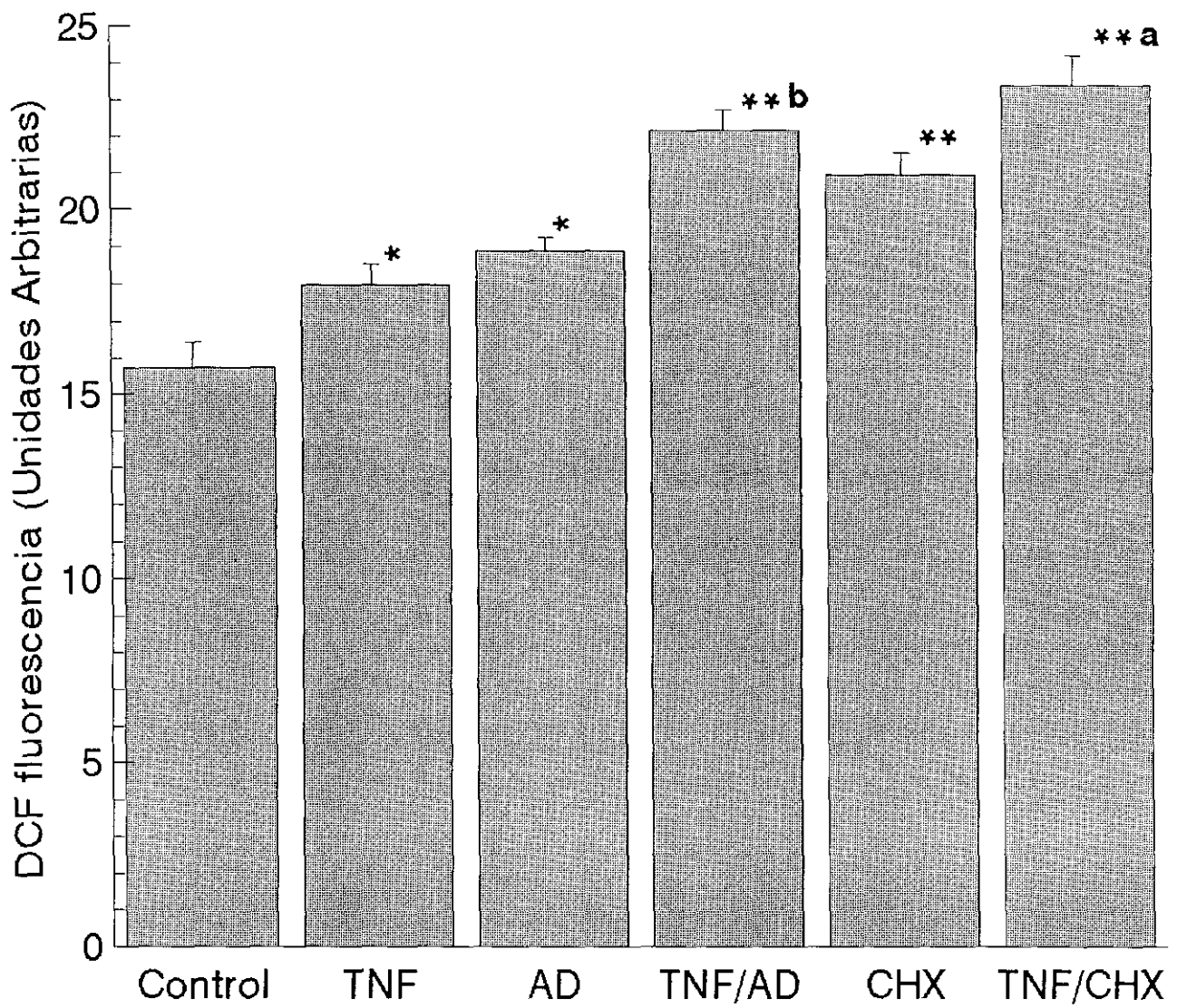


Figura 23. Efecto del tratamiento con TNF, AD, CHX, TNF/AD y TNF/CHX durante 6 horas sobre la producción de hidróperóxidos.

*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, entre TNF/AD o TNF/CHX y células control.
 a= $p < 0.05$, b= $p < 0.01$ entre TNF/AD y AD o TNF/CHX y CHX

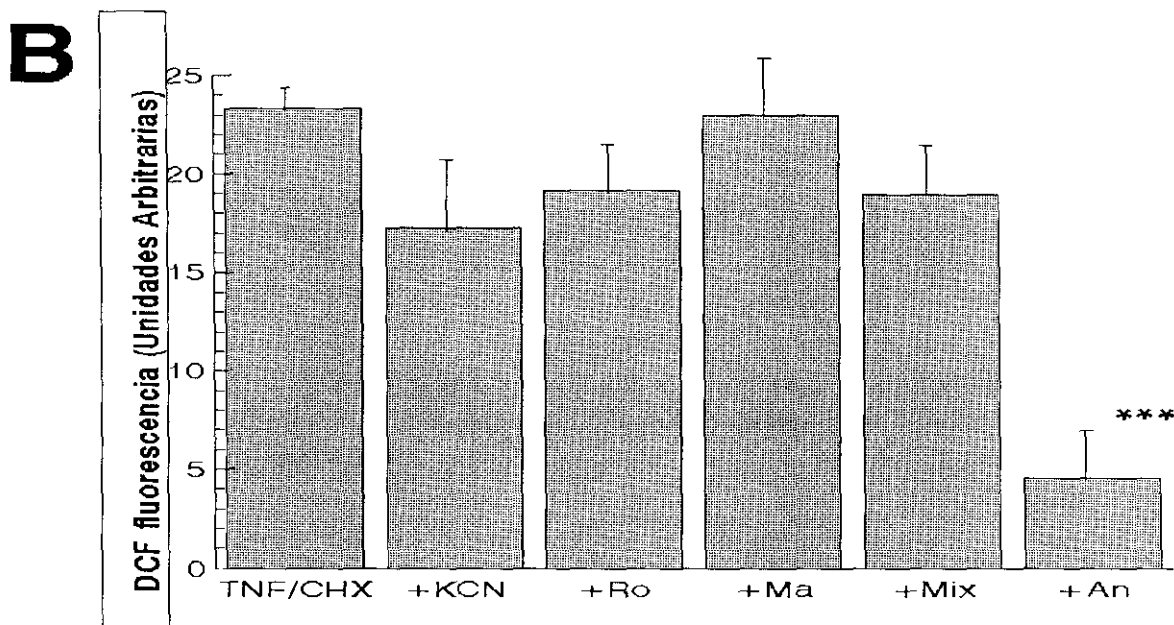
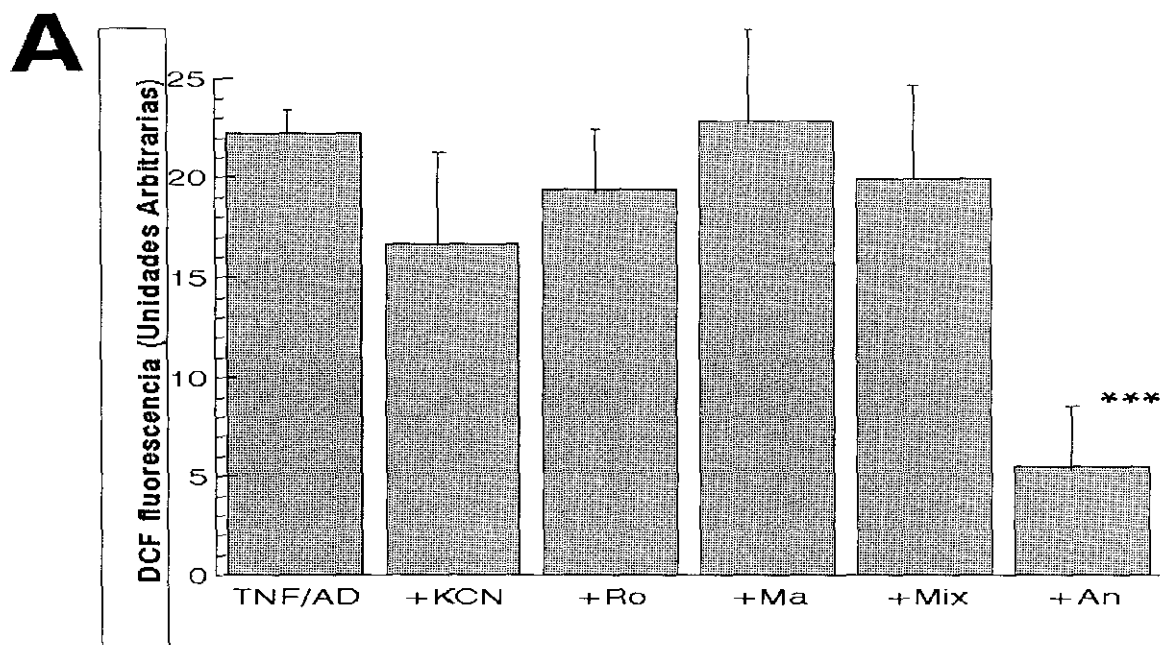


Figura 24. Efecto de los inhibidores mitocondriales sobre la producción de hidroperoxidos en células tratadas con TNF/AD (Panel A) o tratadas con TNF/CHX (Panel B)

KCN (1mM), Rotenona (Ro, 1 μ M), Malonato (Ma, 10mM), Mixotiazol (Mix, 2 μ M), antimicina (An, 30 μ g/ml). Los inhibidores se añadieron a las 3 horas de la incubación con TNF/AD (Panel A) o TNF/CHX (Panel B). Las células se recogieron a las 6 horas de la incubación y la fluorescencia DCF se midió según "Material y Métodos". Los resultados se expresan como media y desviación estándar de 3 experimentos independientes.

***= $p < 0.001$

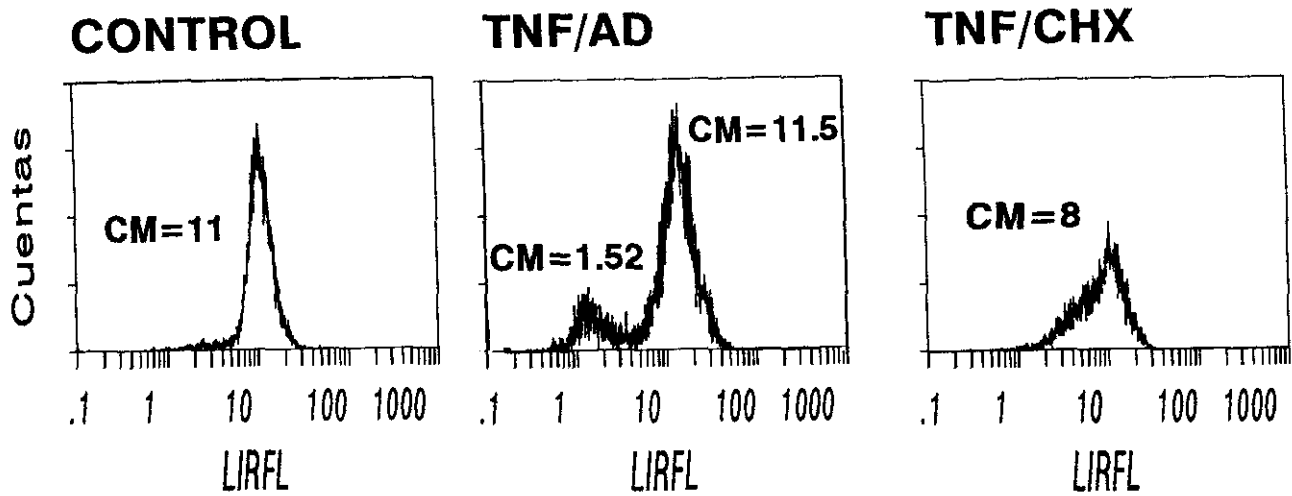


Figura 25. Efecto del TNF/AD sobre la concentración intracelular de Glutation en las células L929.

Citometria de flujo de histograma de parámetro simple de la fluoerescencia roja (escala logarítmica) en células control y céluas tratadas con TNF/AD o TNF/CHX durante 8 horas. Tinción celular con rojo de mercurio según se describe en "Material y Métodos". La fluorescencia media se expresa como CN en escala logarítmica. Se expresan los resultados de uno de los tres experimentos realizados. LIRF=logaritmico integral red fluorescense. CN) channel number.

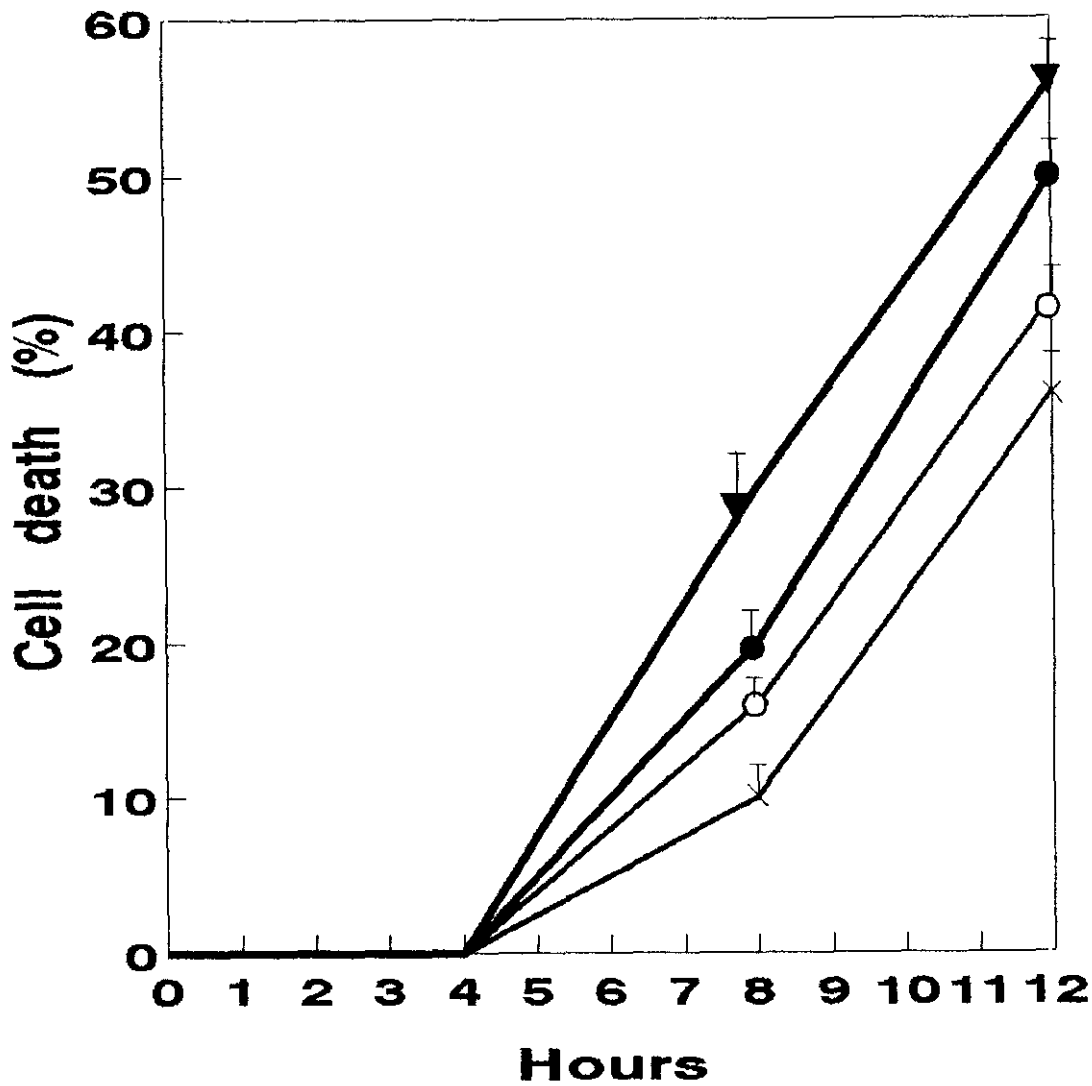


Figura 26. Efecto de las concentraciones crecientes de alfa-tocoferol sobre la citotoxicidad-inducida por TNF/AD en células L929.

Las células L929 cultivadas con TNF/AD a las concentraciones habituales, en ausencia (\blacktriangledown) o presencia de alfa-tocoferol, 6 μ g/ml (\bullet), 13 μ g/ml (\circ), 53 μ g/ml (\times). La muerte celular se expresa como % de la actividad de LDH celular total liberada por las células dañadas (media \pm SD, n=3).

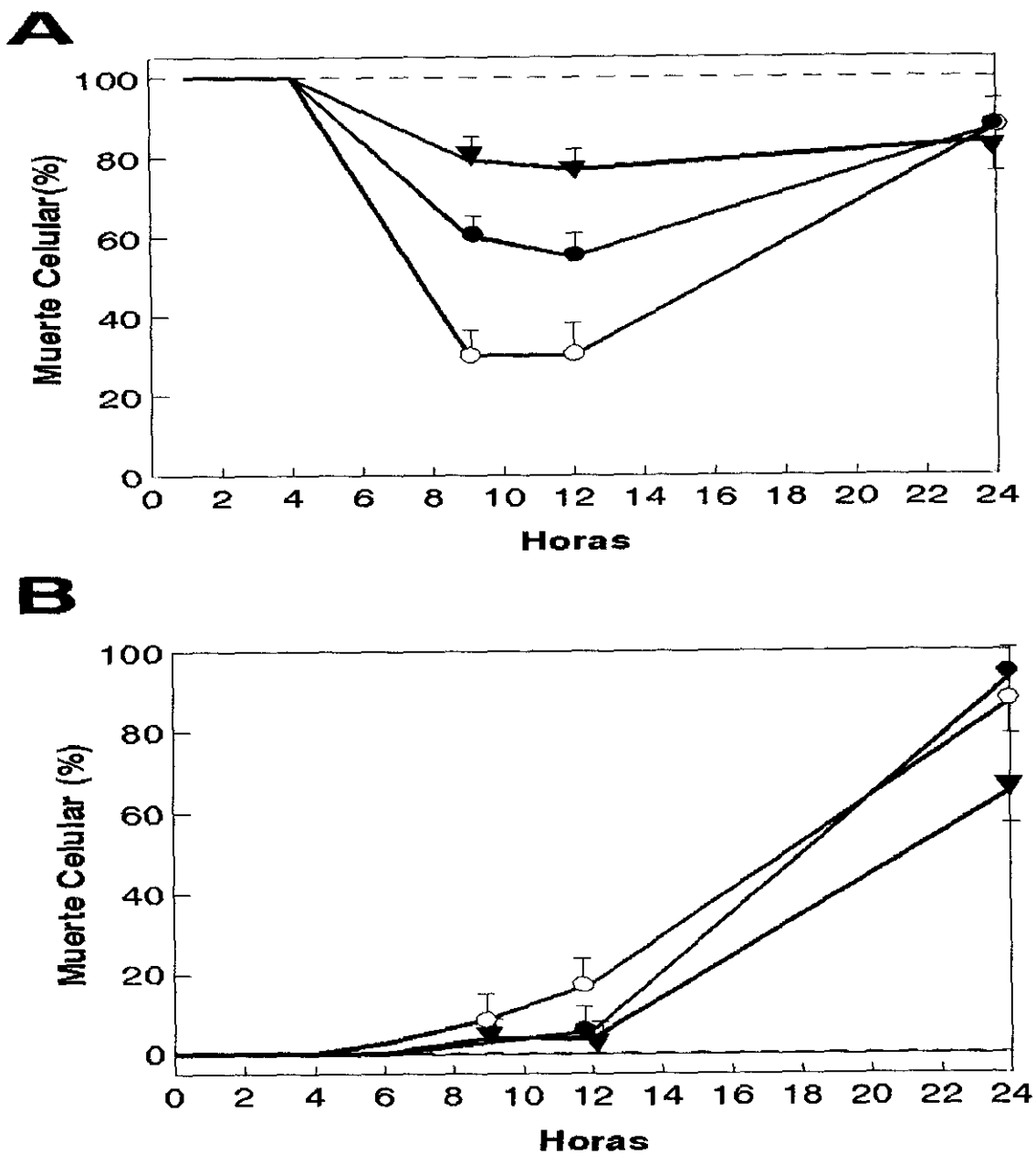


Figura 27. Curva Dosis-Respuesta de la protección inducida por Antimicina A en células L929 bajo TNF-AD.

A. Las células L929 fueron preincubadas con TNF/AD durante 3 horas a la dosis habitual (Tabla 2). Entonces se añadieron concentraciones crecientes de Antimicina A, 10µg/ml (▼), 20µg/ml (●), 30µg/ml (○). La muerte celular se midió a los tiempos indicados utilizando el % de láctico deshidrogenasa liberada desde las células dañadas. Los datos se expresan como porcentaje de muerte celular en cada condición experimental relativa a la citotoxicidad en las células tratadas con TNF/AD (-----).

B. Citotoxicidad de concentraciones crecientes de antimicina A en células control. Los resultados representan el porcentaje de la LDH total celular liberada desde células dañadas. Los datos se expresan como media ±DS de tres experimentos independientes.

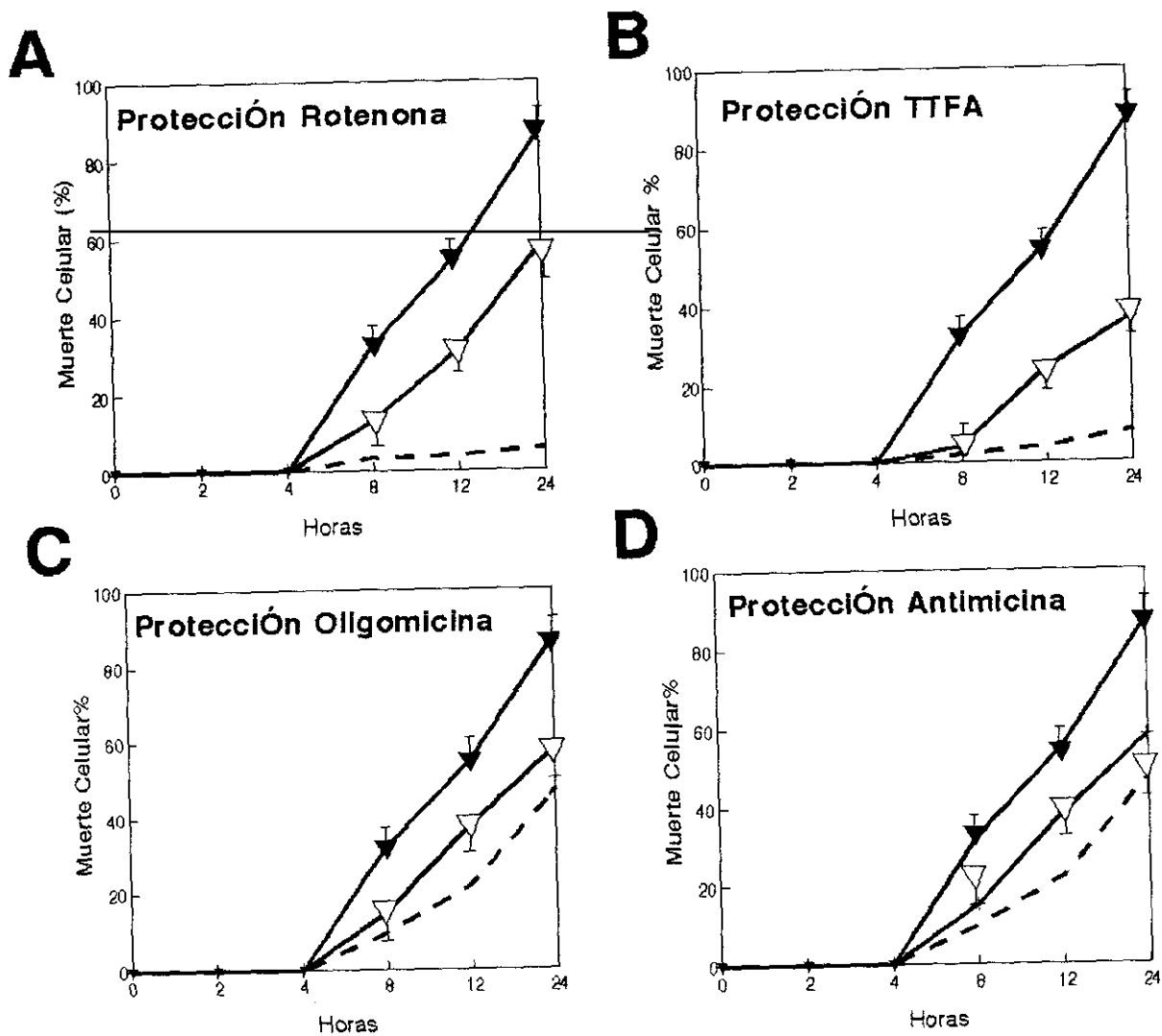


Figura 28. Modificación de la citotoxicidad por TNF/AD en presencia de inhibidores mitocondriales en células L929. Panel A, B y C.

Las células L929 fueron cultivadas con 25ng/ml de TNF y 1 μ g/ml de AD en ausencia (▼) o presencia (◇) de uno de los siguientes inhibidores mitocondriales. Panel A. Rotenona 2 μ M; Panel B. TTFA 50 μ M; Panel C. 10 μ g/ml de Oligomicina; Panel D. 5 μ g/ml de Antimicina A. Panel D. La citotoxicidad se definió como el porcentaje de LDH liberado por las células tratadas con TNF/AD. La citotoxicidad de los inhibidores mitocondriales sobre las células control (----) se muestra en cada caso. Los valores se expresan como media \pm SD de tres experimentos independientes. TNF, AD y los inhibidores se añadieron simultáneamente a las células en el tiempo cero.

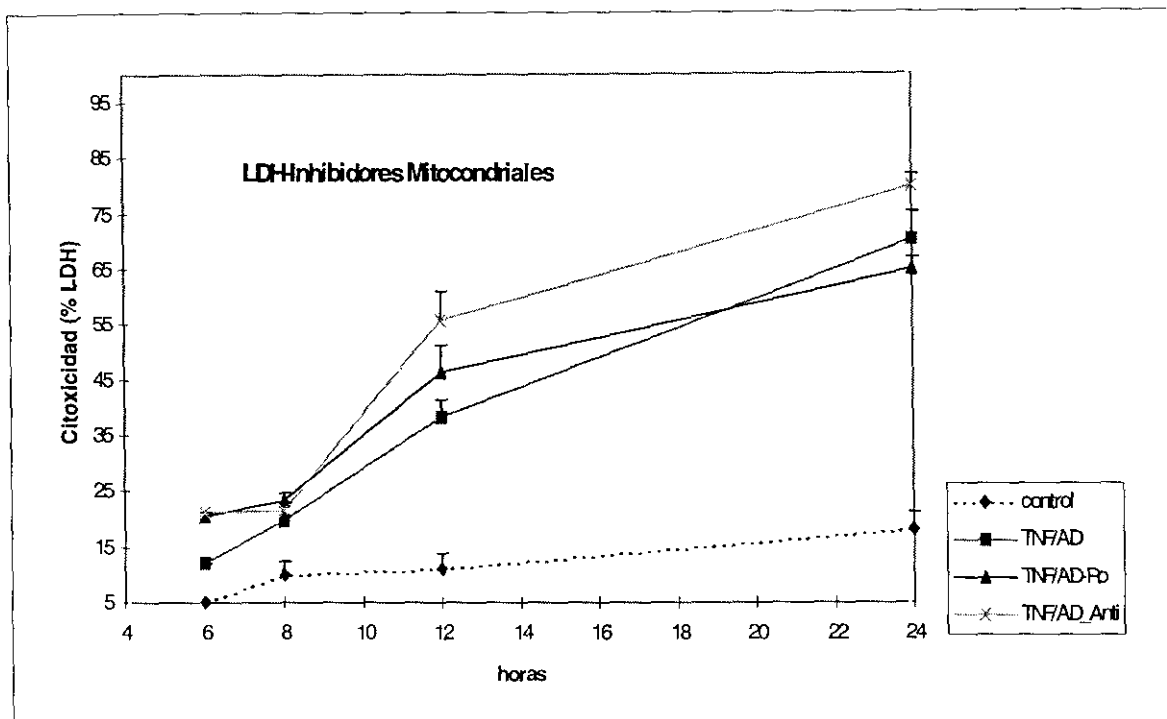


Figura 29. Efecto de los Inhibidores Mitocondriales sobre la citotoxicidad por TNF/AD en células HepG2.

Las células HepG2 fueron cultivadas en medio DMEN-12-709 F e incubadas en presencia de 25ng/ml de TNF con 1µg/ml de AD (■), en presencia de TNF/AD con un inhibidor mitocondrial añadido simultáneamente: antimicina A 5 µg/ml (▲) ó Rotenona 0.24µM (*) y en ausencia de ningún tratamiento: control (●) durante 24 horas. La citotoxicidad se determinó a las 8, 12 y 24 horas, según se describe en "Material y Métodos". Los valores se expresan como media ±SD de los valores de 4 experimentos independientes.

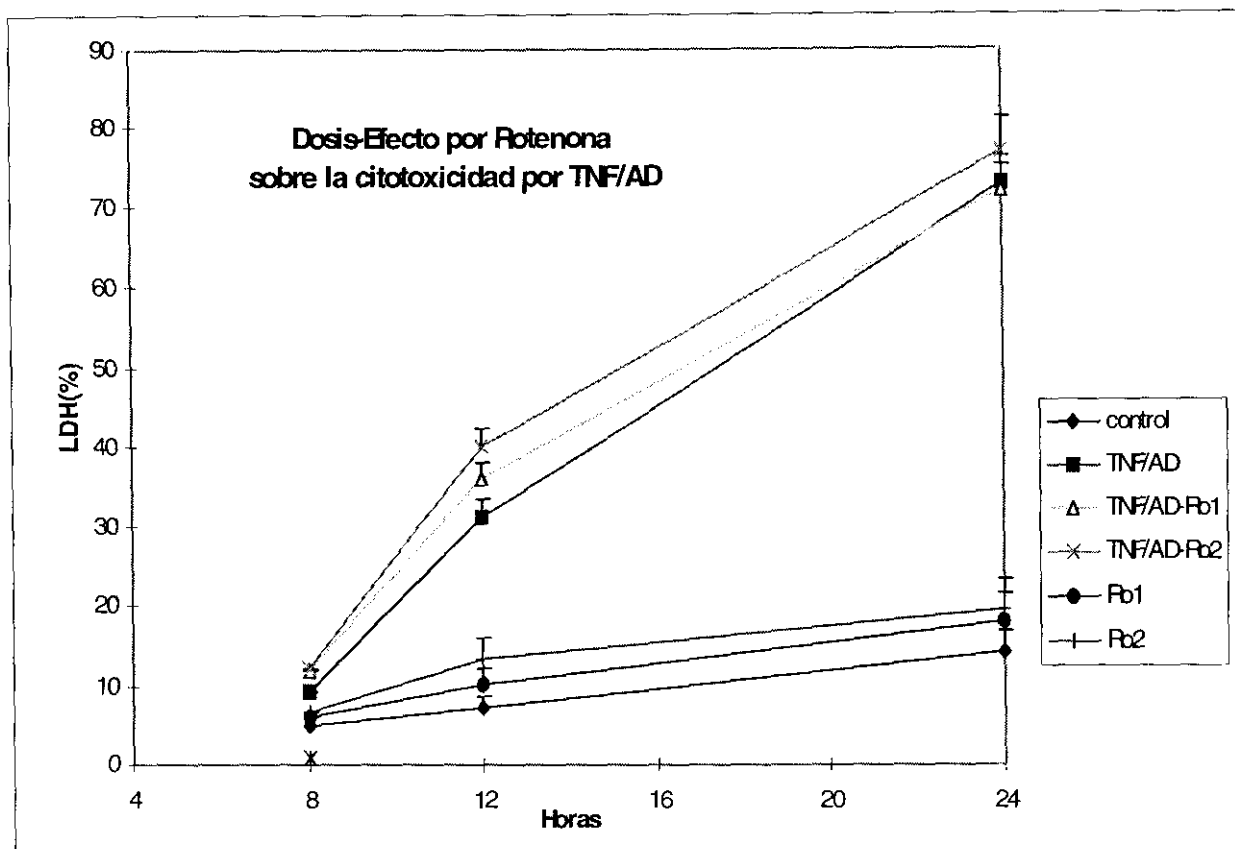


Figura 30 . Relación Dosis/Efecto de la Rotenona sobre la citotoxicidad por TNF/AD en células HepG2 .

Las células HepG2 fueron cultivadas en medio DEMN 12-709F e incubadas en ausencia de tratamiento :control (◆) ; con 25ng/ml de TNF y 1µg/ml de AD(■); asociando a TNF/AD a distintas concentraciones de Rotenona: 0.24mM (▲) ; Rotenona 0.48mM (X), o solo con Rotenona 0.24mM(●); o con Rotenona 0.48mM (+). La citotoxicidad se determinó según se describe en "Material y Métodos". Los valores se expresan como media±SD de los valores de dos experimentos independientes.

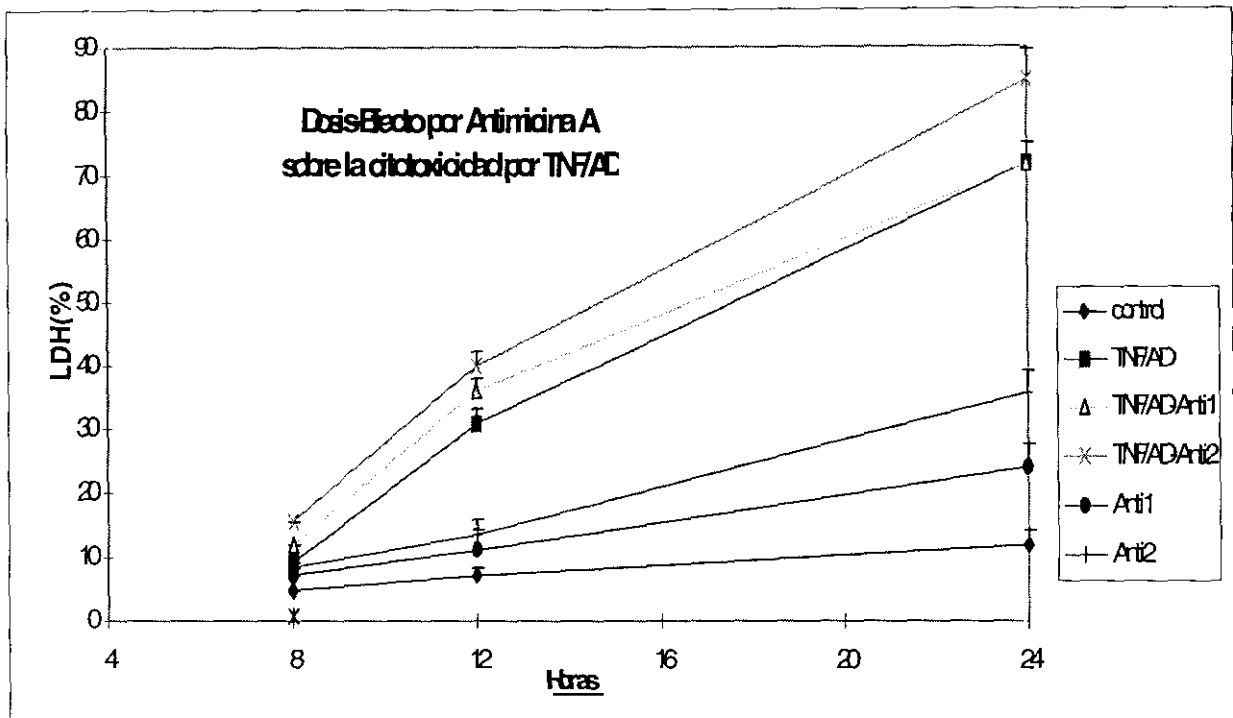


Figura 31. Relación Dosis/Efecto de la Antimicina A sobre la citotoxicidad por TNF/AD en células HepG2 .

Las células HepG2 fueron cultivadas en medio DEMN 12-709F e incubadas en ausencia de tratamiento :control (◆) ; con 25ng/ml de TNF y 1µg/ml de AD(■); asociando a TNF/AD a distintas concentraciones de Antimicina A 5µg/ml (▲) ;Antimicina 10µg/ml (X), o solo con Antimicina 5µg/ml (●); o con Antimicina 10µg/ml (+). La citotoxicidad se determinó según se describe en 'Material y Métodos'. Los valores se expresan como media±SD de los valores de dos experimentos independientes.

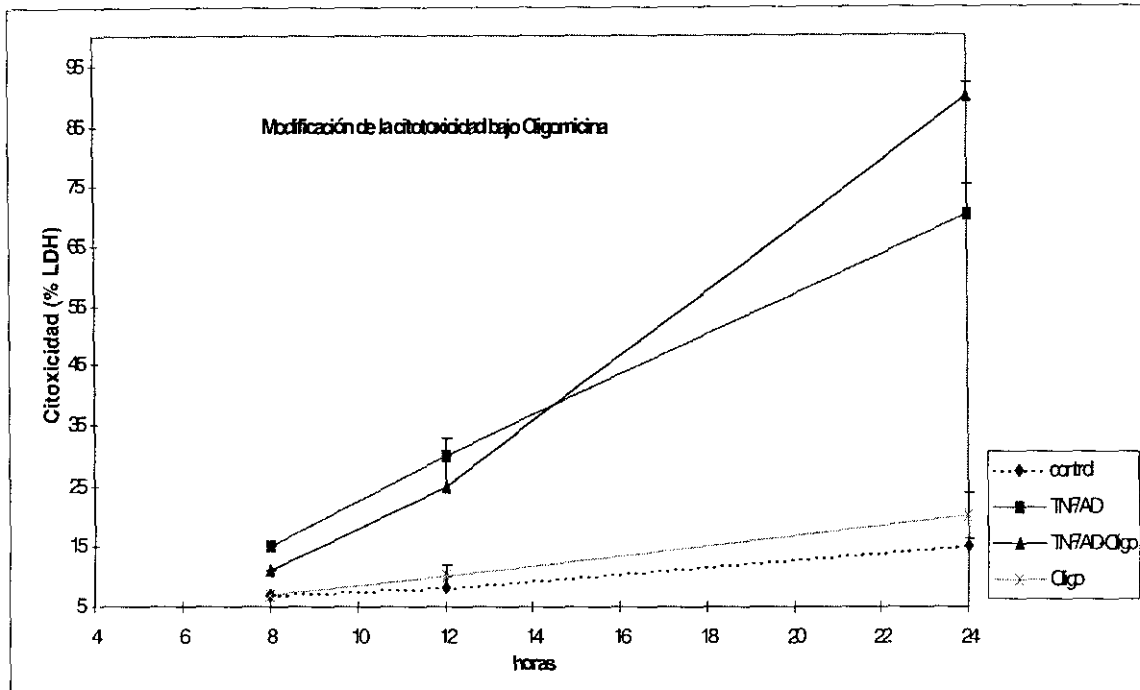


Figura 32. Modificación de la citotoxicidad por TNF/AD bajo tratamiento con Oligomicina.

Las células HepG2 fueron cultivadas en medio DMEN 12-709 F e incubadas en ausencia :control (♦); o presencia de 25ng/ml de TNF y 1 G/ml de AD (■), y añadiendo simultaneamente 10 g/ml de Oligomicina al tratamiento con TNF/AD (▲) ó sola (*). Los tratamientos se mantuvieron durante 24 horas y la citotoxicidad se determinó a las 8, 12 y 24 horas según se describe en "Material y Métodos". Los resultados se expresan como valor medio \pm SD de 3 experimentos independientes.

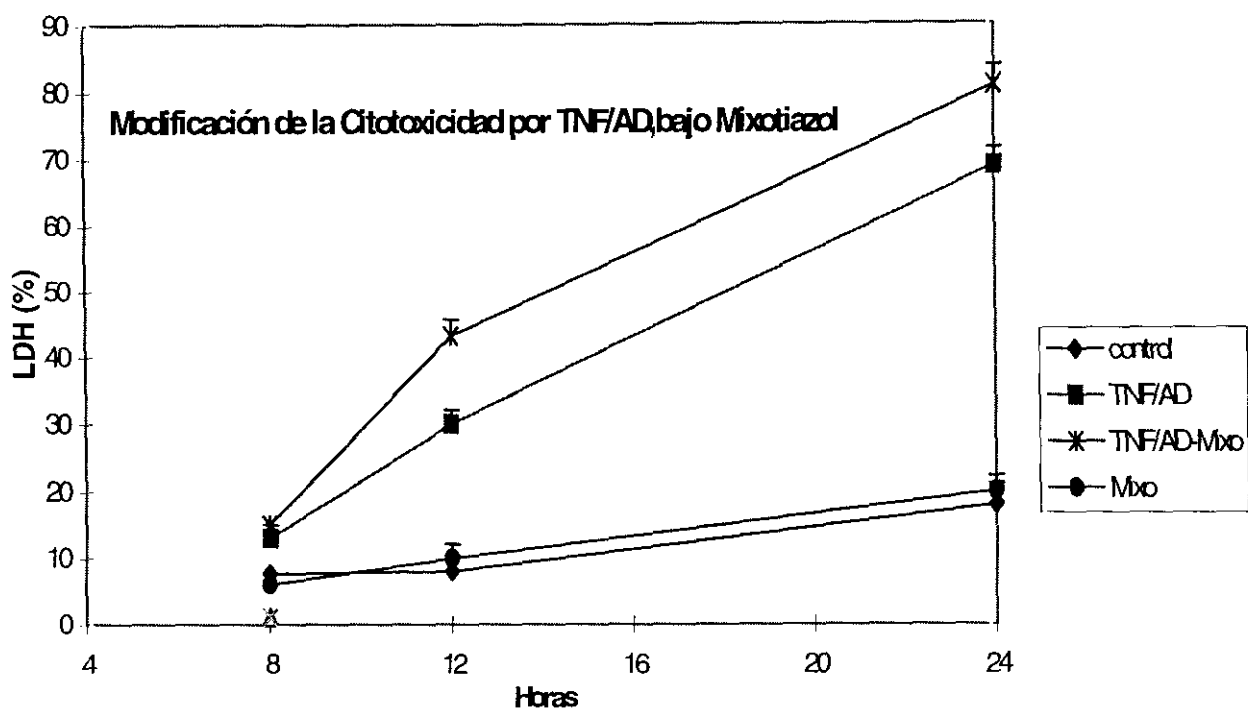


Figura 33 . Modificación de la Citotoxicidad por TNF/AD en células HepG2 bajo tratamiento con Mixotiazol.

Las células HepG2 fueron cultivadas en medio DEMN 12-709F e incubadas con Mixotiazol 2 μ M (●) 25ng/ml de TNF Y 1 μ g/ml de AD(■) asociando a TNF/AD Mixotiazol 2 μ M (*) y en ausencia de tratamiento: control (◆). La citotoxicidad se determinó según se describe en "Material y Métodos". Los valores se expresan como media \pm SD de los valores de tres experimentos independientes.

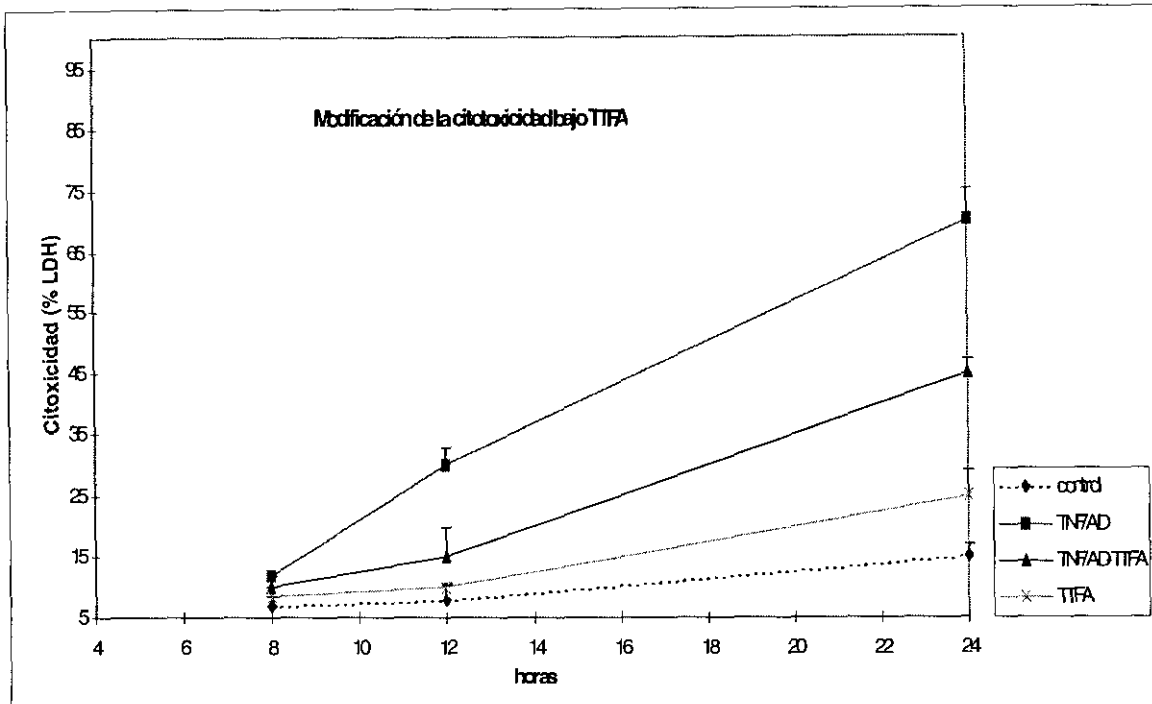


Figura 34. Modificación de la citotoxicidad bajo tratamiento con TTFA.

Las células HepG2 fueron cultivadas en medio DMEN 12-709 F e incubadas en ausencia :control (◆); o presencia de 25ng/ml de TNF y 1μ g/ml de AD (■), y añadiendo simultaneamente TTFA 50μM al tratamiento con TNF/AD (▲) ó TTFA sola (*). Los tratamientos se mantuvieron durante 24 horas y la citotoxicidad se determinó a las 8, 12 y 24 horas según se describe en "Material y Métodos ". Los resultados se expresan como valor medio ±SD de 3 experimentos independientes.

ANEXO II: Tablas.

Tabla 1. Efecto del TNF y AD sobre el ATP y ADP citosólico y mitocondrial, y su porcentaje en las células L929.

ATP (nmol/10 ⁶ células)	2 horas		3 horas		4 horas	
	Citosólico	Mitocondrial	Citosólico	Mitocondrial	Citosólico	Mitocondrial
Control	7.60±0.27	0.50±0.09	8.30±1.00	0.44±0.07	7.36±0.92	0.39±0.05
TNF	7.72±1.50	0.50±0.10	7.86±1.50	0.53±0.13	8.10±0.60	0.52±0.10
AD	10.90±1.80**	0.49±0.09	10.50±3.00*	0.55±0.23	8.93±1.10	0.66±0.15
TNF/AD	13.40±1.70*** ^a	0.64±0.23	9.70±1.80	0.73±0.27*	7.11±1.00	0.42±0.06
ADP (nmol/10 ⁶ células)						
Control	4.78±0.97	0.49±0.16	5.64±0.93	0.40±0.08	5.39±0.93	0.35±0.03
TNF	5.29±0.84	0.43±0.10	4.63±0.86	0.50±0.16	5.28±0.77	0.52±0.01
AD	6.00±0.57	0.44±0.10	5.80±1.00	0.48±0.06	6.41±0.59	0.58±0.24
TNF/AD	5.41±0.89	0.50±0.17	5.44±1.12	0.57±0.13	6.03±0.47	0.46±0.03
ATP/ADP						
Control	1.58±0.27	1.02±0.24	1.47±0.22	1.11±0.15	1.36±0.13	1.11±0.14
TNF	1.45±0.34	1.16±0.24	1.69±0.37	1.06±0.19	1.53±0.26	1.00±0.01
AD	1.81±0.36	1.11±0.07	1.81±0.27	1.14±0.44	1.39±0.14	1.13±0.19
TNF/AD	2.47±0.50*** ^a	1.28±0.14	1.77±0.21	1.28±0.21	1.17±0.16* ^a	0.91±0.20

Las células fueron incubadas con TNF (25 ng/ml) y AD (1 µg/ml) o TNF/AD durante 2, 3 y 4 horas. Después del periodo de incubación indicado, las células fueron recogidas y suspendidas en medio con hielo conteniendo sucrosa, buffer Mops, EDTA y digitonina. Después de 1 minuto, la suspensión fue centrifugada a 3000 g, durante 1 minuto. El contenido de ATP y ADP fue medido en el pellet mitocondrial y en el sobrenadante (fracción citosólica) como se describe en "Material y Métodos". Los valores se expresan como media ± DS de seis experimentos independientes. (***) = P < 0.001; (***) = P < 0.01; (**) = P < 0.05 entre las células control y las experimentadas. (a) = P < 0.05 entre TNF/AD y AD.

Tabla 2. Efecto de los inhibidores mitocondriales sobre la cinética de muerte celular inducida por TNF/AD.

Condiciones Experimentales	6 horas	9 horas	12 horas
TNF/Actinomicina D	10±3	40±10	80±15
INHIBICION DEL COMPLEJO I Rotenona, 1 µM	4±2	36±7	74±8
INHIBICION DE LA SUCCINATO DESHIDROGENASA Malonato, 10 Mm	9±5	38±6	83±12
INHIBICION COMPLEJO b-c₁ Antimicina A, 30 µg/ml Mixotiazol, 2 µM HQNO, 50 µM	5±3 10±4 10±5	10±4 40±4 40±6	27±7 90±7 84±8
INHIBICION DEL COMPLEJO IV KCN, 1 Mm Azida Sódica, 0.5 mM	8±3 9±2	38±7 46±5	85±9 82±10
INHIBICION DE LA ATPase Oligomicina, 1.2 µg/ml	8±3	40±5	91±10
DESACOPLANTE Dinitrofenol, 50 µM	8±4	33±6	66±9

Las células L929 fueron incubadas con TNF (25 ng/ml) y AD (1 µg/ml). A las 3 horas de iniciado el tratamiento se añadieron distintos inhibidores. Los resultados indican el % de muerte celular y se expresan como media±DS de tres experimentos independientes.

ANEXO III: Imágenes.

O2₀ T/A₈ A₈ T/A₄ M T₇₂ C₇₂ T₄₈ C₄₈ T₂₄ T/A₂₄ A₂₄ C₂₄ T/A₁₂ C₁₂

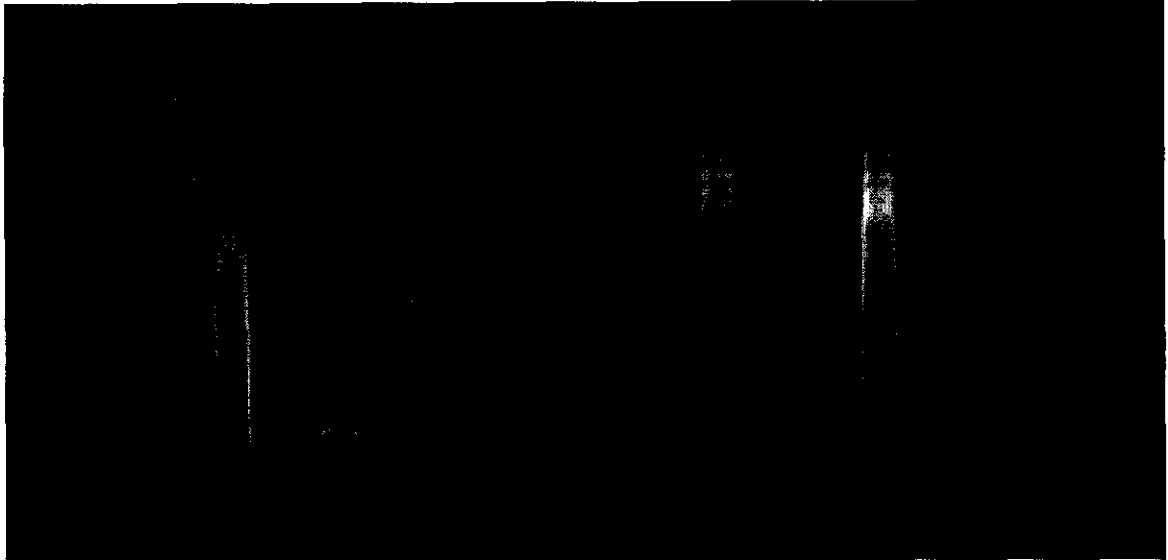
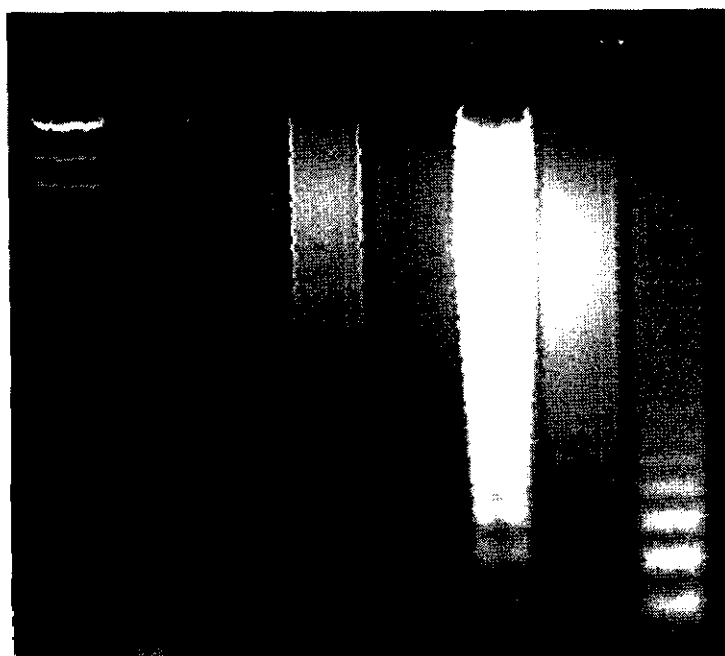


Imagen 1. Apoptosis en L929.

Las células L929 fueron cultivadas en ausencia de tratamiento (C), con TNF(25ng/ml), AD (1microg/ml) o tratamiento combinado TNF/AD, durante 8, 12, 24, 48 y 72 horas según se expresa en los subíndices. Posteriormente se realizó electroforesis sobre gel de agarosa del DNA, en cada caso y se determinó la presencia de patrón de apoptosis, según se describe en “Material y Métodos”.



M C AD₈ T/A₈ AD₁₂ T/A₁₂ AD₂₄ T/AD₂₄

Imagen 2. Apoptosis en HepG2

Se cultivaron las células HepG2 durante 8,12 y 24 horas en ausencia de tratamiento (C), en presencia de TNF (25 ng/ml), AD (1 microg/ml) o tratamiento combinado (TNF/AD). Posteriormente se realizó electroforesis en gel de agarosa del DNA en cada caso, determinando la existencia de patrón de ruptura propio de la apoptosis, según se describe en "Material y Métodos". M=marcador.

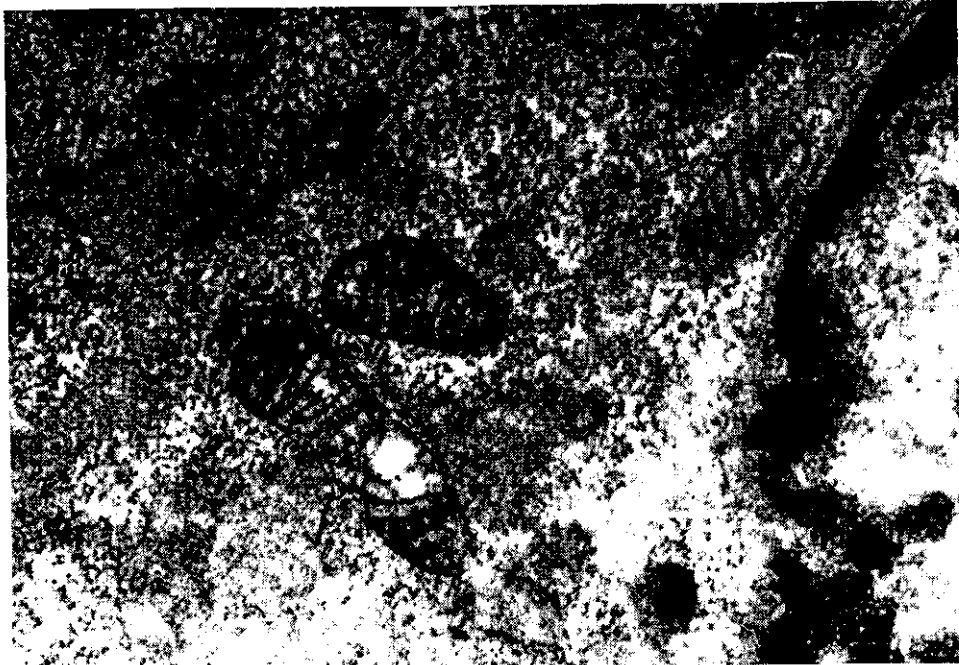


Imagen 3A. Microscopía electrónica de las células L929. Ultraestructura de las células L929 intactas, incubadas en RPMI-1640 (x 23000).

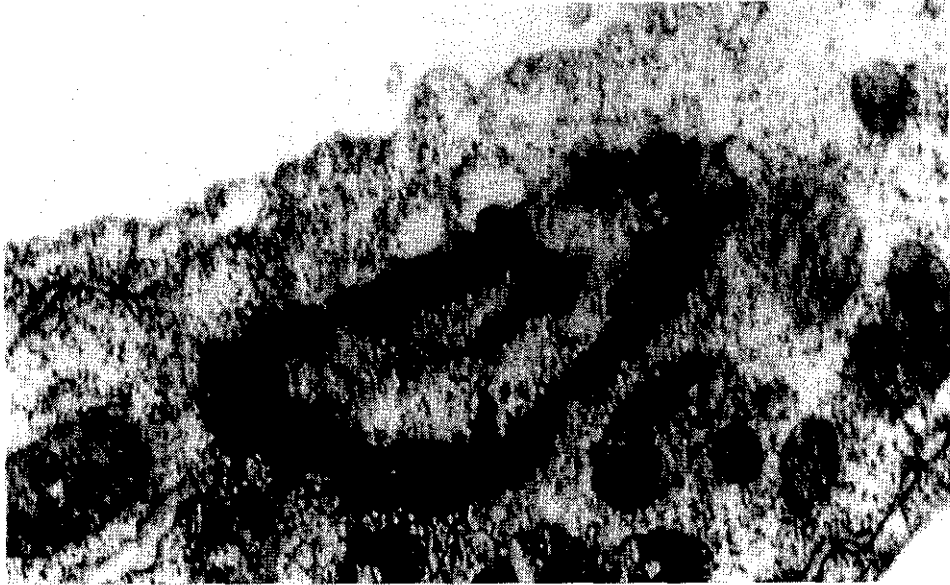


Imagen 3B. Microscopía electrónica de las células L929 tratadas con TNF y cicloheximida durante 3 horas. Ultraestructura de las células L929 incubadas 3 horas con TNF y cicloheximida. Las mitocondrias aparecen con densificaciones difusas (x 23000).



Imagen 3C. Microscopía electrónica de las células L929 tratadas con TNF y cicloheximida durante 6 horas. Mitochondrias de las células L929 incubadas 6 horas en presencia de TNF y cicloheximida. Las mitocondrias aparecen en la configuración condensada (x 23000).



Imagen 3D. Microscopía electrónica de las células L929 tratadas con TNF y cicloheximida durante 6 horas. Detalle de la membrana externa mitocondrial, que en algunos casos está fragmentada y en otros ha desaparecido totalmente (x55000).

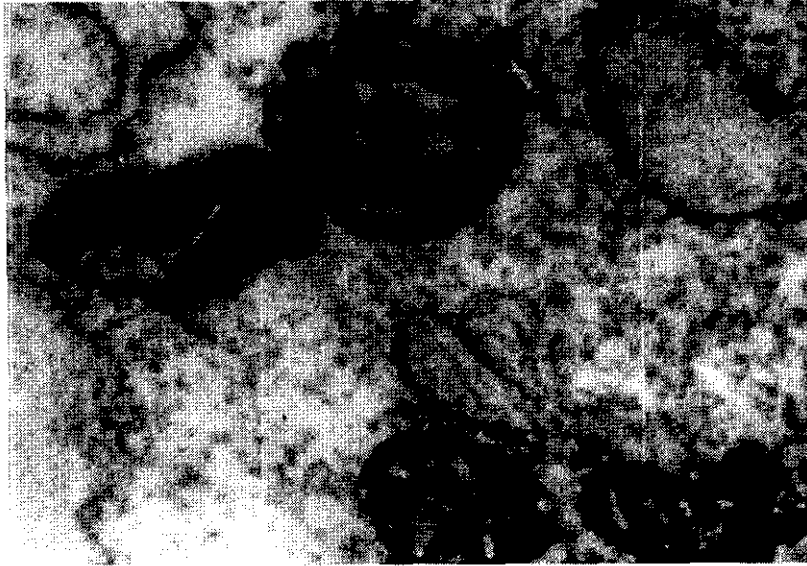


Imagen 3E. Microscopía electrónica de células L929 tratadas con TNF y actinomicina D durante 8 horas. Mitocondrias de células L929 incubadas durante 8 horas con TNF y actinomicina D. Las mitocondrias muestran la conformación condensada retorcida (x 110000).



Imagen 3F. Microscopía electrónica de las células L929 tratadas con TNF y actinomicina D durante 8 horas. Las mitocondrias de las células L929 tratadas con TNF y actinomicina D durante 8 horas aparecen hinchadas con escasas crestas y matriz translúcida (x 55000).