



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS QUIMICOBIOLOGICAS

Proteína de choque térmico de 60kDa de *Klebsiella pneumoniae* en la apoptosis

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORADO EN CIENCIAS QUIMICOBIOLOGICAS

PRESENTA

M. en C. YOLANDA ORTEGA ORTEGA

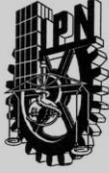
DIRECTORA DE TESIS

DRA. MARÍA LILIA DOMÍNGUEZ LÓPEZ



México D.F.

2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D. F., siendo las 11:00 horas del día 20 del mes de Junio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas para examinar la tesis titulada:

Proteína de choque térmico de 60 kDa de *Klebsiella pneumoniae* en la apoptosis

Presentada por el alumno:

Ortega Ortega Yolanda
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)

Con registro:

B	0	7	1	0	3	5
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Doctorado en Ciencias Quimicobiológicas

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

Dra. María Lilia Domínguez López

Dra. María del Rocío Elizabeth Ortiz Butrón

Dra. Ethel Aranda García Latorre

Dr. Armando Vega López

Dra. Ruth Angélica Lezama Palacios

Dra. Julieta Luna Herrera

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Manuel Jesús Piñón López



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F., el día 20 del mes Junio del año 2011, el (la) que suscribe Yolanda Ortega Ortega alumno (a) del Programa de Doctorado en Ciencias Quimicobiológicas con número de registro B071035, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. María Lilia Domínguez López y ceden los derechos del trabajo intitulado Proteína de choque térmico de 60kDa de *Klebsiella pneumoniae* en la apoptosis, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección ldmguez@yahoo.com.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

M. en C. Yolanda Ortega Ortega
Nombre y firma del alumno

Dra. María Lilia Domínguez López
Nombre y firma del (los) director (es)

Antibodies against recombinant heat shock proteins of 60 kDa from enterobacteria in the sera and synovial fluid of HLA-B27 positive ankylosing spondylitis patients

M.L. Domínguez-López¹, Y. Ortega-Ortega¹, J. C. Manríquez-Raya¹,
R. Burgos-Vargas³, A. Vega-López², E. García-Latorre

¹Departamento de Inmunología and ²Departamento de Ingeniería de Sistemas Ambientales, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional; ³Departamento de Reumatología, Hospital General de México, SSA, Mexico City, Mexico.

Abstract

Objective

To study the association of HLA-B27 with IgG antibodies to different enterobacterial HSP60s in patients with ankylosing spondylitis (AS).

Methods

IgG antibodies to 60 kDa enterobacterial HSPs were determined by ELISA in paired samples of sera and synovial fluid from 21 HLA-B27+ ankylosing spondylitis (AS) patients; and in sera from 32 HLA-B27+ AS patients, 35 HLA-B27+ healthy relatives of AS patients, and 60 HLA-B27- healthy individuals with no family members with AS.

Results

HLA-B27+ patients and healthy individuals showed significantly higher IgG antibody levels to recombinant enterobacterial HSP60s than HLA-B27- healthy controls. The levels of anti-HSP60Sf and anti-HSP60Ec antibodies correlated with disease activity and anti-HSP60Ec antibodies with male gender. No association between enterobacterial HSP60 antibody levels and disease duration was observed. All groups had lower levels of IgG antibodies to rHSP60 from *Streptococcus pyogenes* (rHSP60 Spy). In paired samples of sera and synovial fluid from B27+ patients, IgG antibodies to enterobacterial HSP60s were detected, but in significantly higher levels in sera than in synovial fluid. The anti-rHSP60 Spy IgG response in these samples was lower and similar in the three groups.

Conclusions

A correlation was found between HLA-B27 and the response to recombinant enterobacterial HSP60s. This response could be associated with disease activity and gender in some proteins and the presence of IgG antibodies to these proteins in synovial fluid could be associated with the inflammatory process and initiation of AS.

Key words

Ankylosing spondylitis, heat shock proteins, enterobacteria, synovial fluid, serum, antibodies.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunoquímica I del Departamento de Inmunología, de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. María Lilia Domínguez López, quien pertenece al SNI y es becaria COFAA y EDI del IPN. Este trabajo recibió apoyo de la CGPI-IPN (Proyectos 20070404, 20080983, 20091228 Y 20101054). La alumna recibió beca PIFI durante el período de Febrero a Junio y Agosto a Diciembre de 2007, 2008,2009 y 2010 y beca CONACyT de Agosto de 2007 a Junio de 2011.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	<i>i</i>
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	<i>ii</i>
RESUMEN.....	<i>iv</i>
ABSTRACT.....	<i>v</i>
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. JUSTIFICACIÓN.....	19
III. HIPÓTESIS.....	20
IV. OBJETIVOS.....	20
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
VI. RESULTADOS.....	28
VII. DISCUSIÓN.....	47
VIII. CONCLUSIONES.....	54
IX. REFERENCIAS	55

ABREVIATURAS

Apaf-1	Del inglés <i>apoptotic protease activating factor-1</i>
AIF	Del inglés <i>apoptosis inducing factor</i>
ASK-1	Del inglés <i>apoptosis-signal-regulated kinase</i>
AU	Ácido Ursólico
Bcl-2	Del inglés <i>B cell leukemia/lymphoma 2 genes</i>
CD40	Del inglés <i>cluster of differentiation 40</i>
CD8	Del inglés <i>cluster of differentiation 8</i>
CD4	Del inglés <i>cluster of differentiation 4</i>
CAD	Del inglés <i>Caspase-activated Dnase</i>
CMSP	Células Mononucleares de Sangre Periférica
DIABLO	Del inglés <i>direct IAP binding protein with low pI</i>
DISC	Del inglés <i>death-inducing signaling complex</i>
DXM	Dexametasona
ERK1/2	Del inglés <i>extracellular signal-regulated kinase ½ cinasa N-terminal de c-Jun (JNK)</i> .
Ec	<i>Escherichia coli</i>
FLIP	Del inglés <i>FLICE (caspasa-8)- inhibitory proteins</i>
FADD	Del inglés <i>Fas-associated death domain</i>
HSP	Del inglés <i>heat shock protein</i>
IAP	Del inglés <i>Inhibitors of Apoptosis Proteins</i>
ICAD	Del inglés <i>inhibitor of caspase-3-activated Dnase</i>
IPTG	Del inglés <i>Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside</i>
IP	Ioduro de propidio
kDa	Kilodaltons
Kp	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LB	Medio Luria-Bertani
NGF	Del inglés <i>neuronal grow factor</i>
NF-κB	Del inglés <i>nuclear factor κB</i>
PAGE-SDS-ME	Geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio
PBS	Del inglés <i>Phosphate Buffer Solution</i>
PerCP	Del inglés <i>perinin chlorophyll protein</i>
RIP	Del inglés <i>receptor interacting protein</i>
SpA	Del inglés <i>Spondyloartropahies</i>
Smac	Del inglés <i>second mitochondrial activator of caspases</i>
TNF	Del inglés <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TNFR1	Del inglés <i>Tumor Necrosis Factor Receptor 1</i>
TRAIL	Del inglés <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TUNEL	Del inglés <i>In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein</i>

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1	Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes de interés por PCR.	27
Tabla 2	Inducción de apoptosis con ácido ursólico en fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano, dosis y tiempo respuesta, mediante la técnica pico SubG0.	37
Tabla 3	Efecto anti-apoptótico de la HSP60 de <i>K. pneumoniae</i> sobre la apoptosis inducida con ácido ursólico, contenido de DNA obtenido por la técnica pico SubG0.	40
Figura 1	Mecanismos de activación de las caspasas “vía intrínseca” y vía extrínseca”.	3
Figura 2	Regulación de la vía intrínseca por las HSP.	12
Figura 3	Regulación de la vía extrínseca por las HSP.	14
Figura 4	Caracterización morfológica del cultivo primario de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c.	29
Figura 5	Caracterización fenotípica del cultivo primario de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c.	30
Figura 6	Análisis del porcentaje de células apoptóticas por la técnica de pico SubG0 obtenido en un citómetro de flujo.	32
Figura 7	Porcentaje de células apoptóticas de un cultivo primario de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c.	35
Figura 8	Porcentaje de células apoptóticas de un cultivo primario de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c.	36
Figura 9	Inducción de apoptosis con ácido ursólico en fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c.	38
Figura 10	Porcentaje de células apoptóticas del efecto protector de la HSP60 de <i>K. pneumoniae</i> , sobre la apoptosis inducida con AU en fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c.	41
Figura 11	Efecto anti-apoptótico de la HSP60 de <i>K. pneumoniae</i> , sobre la apoptosis inducida con ácido ursólico en fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c.	42

- Figura 12** Efecto de la HSP60 de *K. pneumoniae* en la expresión de genes anti- 44
apoptóticos (cIAP-1, IAP-2, Bcl-2, Bclx/L y cFLIP) en la apoptosis
inducida con AU en fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c.
- Figura 13** Análisis semicuantitativo del efecto de la HSP60 de *K. pneumoniae* en la 45
expresión de genes anti-apoptóticos (cIAP-1, IAP-2, Bcl-2, Bclx/L y
cFLIP) a las 6h de incubación.
- Figura 14** Análisis semicuantitativo del efecto de la HSP60 de *K. pneumoniae* en la 46
expresión de genes anti-apoptóticos (cIAP-1, IAP-2, Bcl-2, Bclx/L y
cFLIP) a las 24h de incubación.

RESUMEN

Las proteínas de choque térmico (HSP) son macromoléculas altamente conservadas que se inducen en células procariontas y eucariontas en respuesta al estrés fisiológico y ambiental. Se ha reportado que las HSP pueden tener función antiapoptótica. Se ha demostrado que la GroEL de *E. coli* protege de la apoptosis inducida con radiación UV a una línea celular de queratinocitos humanos (HaCaT). Nuestro grupo de trabajo ha reportado respuesta inmune humoral y celular hacia proteínas de choque térmico de 60 kDa (HSP60) enterobacterianas en pacientes con espondiloartropatías y sujetos sanos. Recientemente, hemos observado un efecto protector de estas proteínas en la apoptosis inducida con dexametasona (DXM), ácido ursólico (AU) y H₂O₂, en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de sujetos sanos. Por lo anterior, en este trabajo analizamos el efecto protector de la HSP60 de *K. pneumoniae* (HSP60Kp) en la apoptosis inducida con AU en cultivo primario de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano y evaluamos si este efecto se lleva a cabo a través de la expresión de proteínas anti-apoptóticas como; Bcl-2, Bclx/L, cIAP-1, cIAP-2 y cFLIP. El cultivo primario de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano de 4-6 semanas de edad, se obtuvo por disgregación mecánica-enzimática, se caracterizó morfológica y fenotípicamente con los marcadores positivos para el CD90 (Thy-1), vimetina, ICAM-1 y negativo para el CD14. Los resultados indicaron una pureza del cultivo con un 97.4% de fibroblastos. El análisis de las células apoptóticas se realizó por pico SubG0 en un citómetro de flujo. La inducción de apoptosis en el cultivo primario de fibroblastos sinoviales se realizó en presencia de 15µg de AU, los cultivos se incubaron a 37°C durante 24h. Para evaluar el efecto protector de la proteína enterobacteriana, los fibroblastos sinoviales se incubaron 1h previa a la adición de AU, con 0.1µg, 1µg y 10µg de la HSP60Kp, en todos los ensayos se incluyeron los testigos de las células sin AU y con cada una de las concentraciones probadas de la proteína. El porcentaje de células apoptóticas obtenido con AU (35.55%), disminuyó significativamente a 30.44%, 27.02% y 23.20%, respectivamente cuando los fibroblastos se pre incubaron con la HSP60Kp. Para evaluar si el efecto protector de la HSP60Kp en la apoptosis inducida con AU en el cultivo de fibroblastos se llevó a cabo a través de genes anti-apoptóticos. Se evaluó la expresión del mensajero de los genes Bcl-2, Bclx/L, cIAP-1, cIAP-2 y cFLIP por la técnica de RT-PCR. Los resultados del análisis semicuantitativo mostraron a las 6h de incubación un incremento en la expresión de Bcl-2 cuando a los cultivo celulares se les adicionó por separado, la HSP60Kp, el AU y la HSP60Kp más el AU. La expresión del gen cIAP1 fue similar para el testigo y para el cultivo con la proteína, en los cultivos que contenían el AU la expresión de este gen disminuyó significativamente a más de la mitad, la cual aumentó en forma significativa ($p < 0.05$) cuando las células se incubaron con la proteína y después se les indujo apoptosis con el AU. Resultados similares se observaron con la expresión del gen cIAP2. El gen cFLIP se expresó en forma basal en el testigo de células sin inductor, que fue similar a lo observado con la HSP60Kp, expresión que disminuyó de forma significativa con el AU pero no aumentó con la proteína y con el AU. Los resultados sugieren un efecto protector de la HSP60 de *K. pneumoniae* en la apoptosis inducida con AU en el cultivo de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c. Este efecto parece ser modulado por los genes Bcl-2, cIAP1 y cIAP2.

ABSTRACT

The heat shock proteins (HSP) are highly conserved macromolecules that are induced in prokaryotes and eukaryotes cells in response to physiological and environmental stress. It has been shown that HSP may have antiapoptotic function. It has been shown that the GroEL of *E. coli* protects against UV radiation-induced apoptosis in a human keratinocyte cell line (HaCaT). Our working group has reported humoral and cellular immune response to 60 kDa enterobacterial heat shock protein in spondyloarthropathies patients and healthy subjects. Recently, we observed protective effect of these proteins in apoptosis induced with dexamethasone, ursolic acid (UA) and H₂O₂ in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy subjects. Therefore, in this paper we analyzed the protective effect of HSP60 *K. pneumoniae* (HSP60Kp) in UA-induced apoptosis in primary cultured of synovial fibroblasts from BALB/c healthy mouse and evaluate whether this effect occurs through the expression of anti-apoptotic proteins that; Bcl-2, Bclx / L, cIAP-1, cIAP-2 and cFLIP. The primary culture of synovial fibroblasts from BALB/c mouse of 4-6 weeks old, was obtained by mechanical and enzymatic digestion and was characterized morphologically and phenotypically with positive markers for CD90 (Thy-1), vimetin, ICAM- 1 and negative for CD14. The results indicated a culture with a purity of 97.37% of fibroblasts. Analysis of apoptotic cells was performed by SubG0 peak in the flow cytometer. Induction of apoptosis in primary cultured synovial fibroblasts was made in the presence of 15 µg of AU, the cultures were incubated at 37 °C for 24 h. To evaluate the protective effect of enterobacterial protein, synovial fibroblasts were incubated 1 h before the addition of AU, with 0.1µg, 10 µg 1 µg of HSP60Kp. All assays included control without AU and with each protein tested concentration. The percentage of apoptotic cells obtained with AU (35.55%), decreased significantly to 30.44%, 27.02% and 23.20% respectively when fibroblasts were pre-incubated with the HSP60Kp. To assess whether the protective effect of HSP60Kp in the AU induced apoptosis in fibroblasts culture, was carried out by anti-apoptotic genes, we evaluated the expression of the messenger of the Bcl-2, Bclx/L, cIAP-1, cIAP-2 and cFLIP genes by RT-PCR. The results of the semi-quantitative analysis after 6h of incubation showed a significant increase in the expression of Bcl-2 when HSP60Kp, AU and the AU plus HSP60Kp were added to the cell culture separately. cIAP1 gene expression was similar in the controls without AU and with the protein. In cultures containing AU the expression of this gene decreased significantly, more than half the expression that increased significantly (p <0.05) when the cells were incubated with the protein and after induced apoptosis with the AU. Similar results were observed in the expression of cIAP2 gene. cFLIP gene was expressed at basal level in the control of cells without inductor, similar to that observed with HSP60Kp expression, that decreased significantly with the AU but did not increase with the protein and the AU. These results suggest a protective effect of *K. pneumoniae* HSP60 in the AU induced apoptosis in fibroblasts cultures from BALB/c mouse and this effect may be modulated by the expression of Bcl-2, cIAP1 and cIAP2 genes.

I. INTRODUCCIÓN

La muerte celular fisiológica fue denominada con el término “apoptosis” en 1972 por Kerr y col., que evoca a la caída de las hojas desde los árboles en otoño o bien de los pétalos de las flores y que es ampliamente utilizado en nuestros días (Jordán, 2003). La apoptosis es la forma más común de muerte en las células eucariontas. Es un proceso fisiológico importante en la maduración y desarrollo de los mecanismos efectores del sistema inmune, en el desarrollo de tejido embrionario, mantenimiento de la homeostasis celular y en la renovación tisular (Hengartner, 2000; Gupta, 2000). Sin embargo, cuando se presentan alteraciones de este, conduce a situaciones patológicas como cáncer, sida, enfermedades autoinmunes y del corazón (Jordán, 2003).

Las principales moléculas involucradas en el desencadenamiento de la apoptosis son proteínas denominadas caspasas que pertenecen a la familia de las cisteín proteasas por tener la capacidad de fragmentar residuos de ácido aspártico (Green, 1998). Las caspasas son constitutivas en la mayoría de las células, residen en el citosol y son catalíticamente inactivas en forma de zimógenos o procaspasas. Se encuentran divididas en tres subgrupos: Grupo I (caspasas-1, -4 y -5) son mediadoras de las respuestas pro-inflamatorias, Grupo II (caspasa -3, -6 y -7) son proteasas efectoras, que durante la apoptosis reconocen y fragmentan secuencias específicas del tipo DEXD (aspártico, glutámico, X, aspártico) encontrados en blancos proteolíticos; y el Grupo III (caspasa -8, -9 y -10) las cuales reconocen secuencias EXD (glutámico, X, aspártico) y funcionan principalmente en la catálisis de activación de las caspasas del grupo II (Xanthoudakis y col, 1999).

La secuencia de eventos de la activación de las caspasas puede ser desencadenada por diferentes señales intracelulares (vía intrínseca) o extracelulares (vía extrínseca) (Figura 1) (MacFarlane y Williams, 2004).

La vía intrínseca. Se caracteriza por la despolarización de la membrana mitocondrial por estímulos tales como agentes quimioterapéuticos, radiación UV, moléculas de estrés (especies reactivas de oxígeno y nitrógeno) y factores de crecimiento, lo cual permite la formación de poros y con ello la liberación de

citocromo c al citoplasma que se une a Apaf-1 (factor 1 de activación de la apoptosis), proteína citosólica que existe como un monómero inactivo. Esta unión induce cambios conformacionales en Apaf-1, lo que permite la unión de nucleótidos como dATP/ATP. El nucleótido se une al complejo Apaf-1-citocromo c, formando un oligómero denominado apoptosoma, el cual recluta a procaspasa-9. La unión de procaspasa-9 al apoptosoma forma la caspasa-9 activa, una holoenzima que fragmentará y activará a procaspasa 3 iniciando así la vía de las caspasas que lleva a la fragmentación del DNA, culminando en la formación de cuerpos apoptóticos y su eliminación por fagocitosis (Pandey y col., 2000; Wang, 2001; Li y col., 2004).

La vía extrínseca. Puede iniciarse por diferentes receptores de muerte cuando se unen a su propio ligando. Los receptores que inician el proceso de muerte apoptótica se identificaron en la superficie de los linfocitos T activados. Los receptores TNFR1 (Tumor Necrosis Factor Receptor 1) y CD95/apo-1/Fas son miembros de la familia de receptores TNF que se unen a los ligandos de la familia TNF (Beere, 2004). Cuando el receptor CD95 se une a CD95L o a un anticuerpo monoclonal se inicia una trimerización del receptor y esto permite inmediatamente el reclutamiento de diferentes proteínas que forman un complejo en el citoplasma. CD95 contiene una secuencia de aminoácidos en la región carboxilo terminal llamado dominio de muerte que se une a una secuencia similar del carboxilo terminal de DISC (death-inducing signaling complex) llamado FADD (Fas-associated death domain), este complejo recluta a procaspasa-8 y al complejo de muerte DISC. La procaspasa-8 sufre una ruptura que la activa a caspasa-8, que rompe a la procaspasa-3 generando una caspasa-3 activa, la cual seguirá fragmentando sustratos nucleares y citoplasmáticos resultando en cambios morfológicos y bioquímicos característicos de una célula apoptótica (Newton y Strasser, 2003). La caspasa-8 una vez activada puede además llevar a cabo un rompimiento proteolítico de tBid a Bid, la cual se transloca a la membrana mitocondrial y de esta forma la caspasa-8 es el punto unión para la activación de ambas vías (MacFarlane y Williams, 2004).

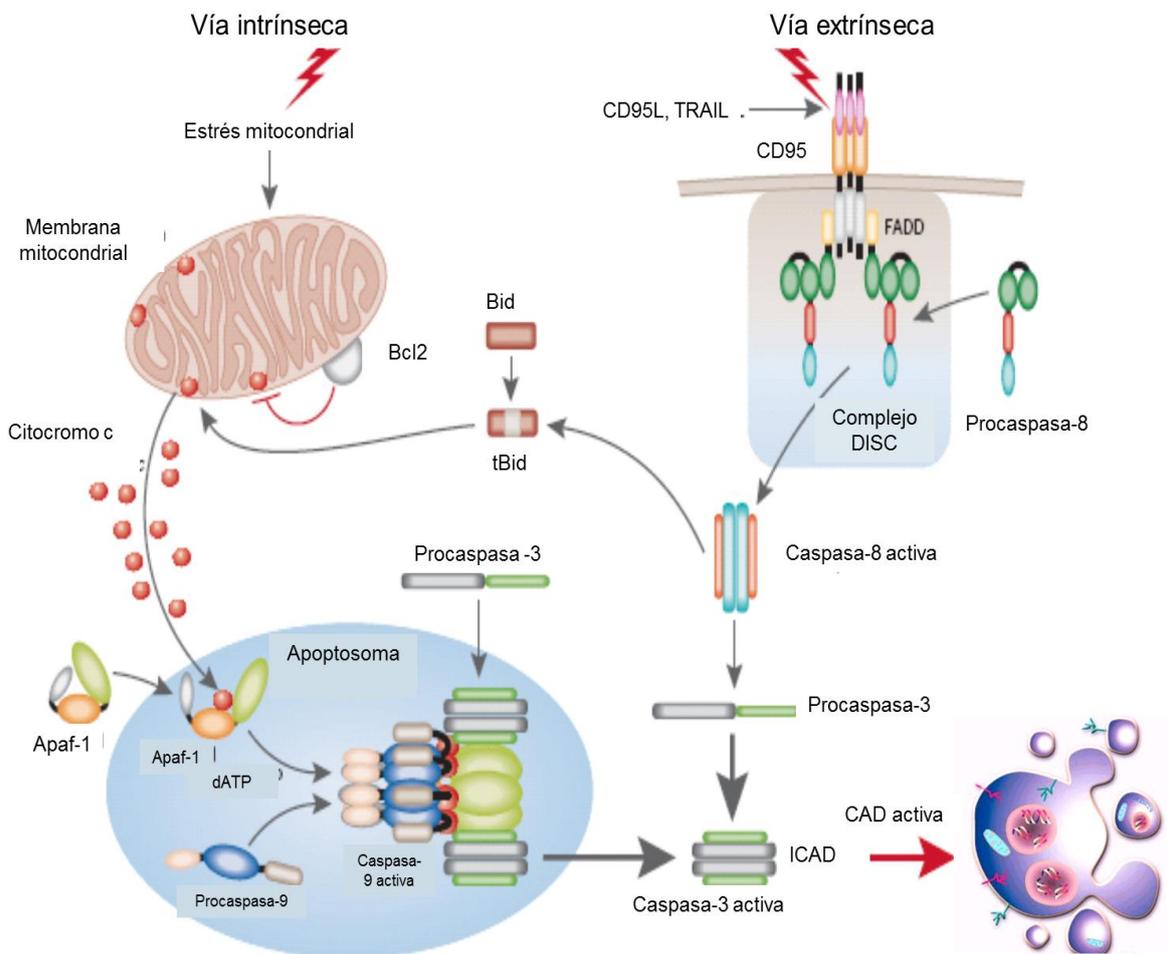


Figura 1. Mecanismos de activación de las caspasas “vía intrínseca” y “vía extrínseca”. (MacFarlane y Williams, 2004).

Mecanismos de regulación de la apoptosis.

Regulación a nivel de activación de las caspasas.

Familia FLIP. La regulación de la apoptosis inducida por receptor (FAS y TNFR1) está a cargo de las proteínas v-FLIP y c-FLIP miembros de la familia FLIP (*FLICE (caspasa-8)- inhibitory proteins*), que por su homología con la procaspasa 8, pueden intervenir en la activación de la misma, al unirse al complejo FAS-FADD, sin formarse el complejo DISC (Sánchez y Vargas, 2003; Thome y Tschopp, 2001).

Familia IAP. Los miembros de la familia IAP (*Inhibitors of Apoptosis Proteins*) como: XIAP, c-IAP1 y c-IAP2, son las principales moléculas encargadas de inhibir la actividad de las caspasas 3, 7 y 9, al unirse directamente a ellas. Al

mismo tiempo las IAPs son reguladas por proteínas como Smac/DIABLO (*second mitochondrial activator of caspases* en humanos y *direct IAP binding protein with low pI* en ratones, respectivamente) las cuales una vez liberadas al citosol mediante un estímulo apoptótico a nivel mitocondria, se unen a las IAPs quedando la caspasa libre para llevar a cabo su función apoptótica, por lo que las proteínas Smac/DIABLO son consideradas moléculas proapoptóticas (Sánchez y Vargas, 2003; Salvesen y Duckett, 2002; Gozani y col, 2002).

Regulación a nivel de citocromo c.

Familia Bcl-2. La liberación del citocromo c está regulada por la familia de proteínas *Bcl-2 (B cell leukemia/lymphoma 2 genes)* (Yang y col, 1997). Las proteínas de la familia bcl-2 que favorecen la apoptosis son Bax, Bak, Bik, Bid y Bad, y se localizan en el citosol o citoesqueleto dando así una prioridad a la señal de muerte. Mientras que las inhibidoras del proceso son Bcl-XL y la propia Bcl-2. Esta última se localiza en la membrana mitocondrial externa, el retículo endoplásmico y en la membrana nuclear, impide la apoptosis disminuyendo la permeabilidad de la membrana mitocondrial así como interaccionando directamente con el resto de las proteínas. En realidad la permeabilidad mitocondrial está determinada por la formación de dímeros entre miembros proapoptóticos y antiapoptóticos de la familia Bcl-2 (Green y Reed, 1998; Gross y col, 1999).

La fase final de la apoptosis ocurre por anclaje de sustratos celulares críticos, por efecto de las caspasas. Así como la activación de la endonucleasa CAD (*Caspase-activated Dnase*), calcio y magnesio dependiente, que rompe en forma selectiva al DNA en sitios localizados entre unidades nucleosómicas y generando fragmentos mono y oligonucleosómicos (complejos de DNA e histonas que constituyen las unidades empaquetadoras de DNA y están compuestas de una doble hélice de DNA enrollada en torno a 4 moléculas de histonas). Durante la apoptosis ICAD (*inhibitor of caspase-3-activated Dnase*) es fragmentado por la caspasa-3, lo que favorece el incremento de su forma activa CAD el cual posee una actividad altamente específica en la fragmentación de DNA nuclear (Kluck y col, 1997; Papa y Skulachev, 1997; Yang y col, 1997).

Las células apoptóticas *in vivo* son reconocidas, captadas y degradadas por células fagocíticas, debido al reconocimiento de cambios en la membrana de la célula apoptótica. La expresión en la superficie de fosfatidilserina y trombospondina, que se desplazan desde la parte interna a la externa de la membrana citoplásmica, facilitan el reconocimiento de las células apoptóticas por los fagocitos y de esta forma las células muertas desaparecen sin dejar cicatriz ni lesionar el parénquima adyacente. Lo que hace que este tipo de muerte se considere como un proceso limpio ya que se lleva a cabo en ausencia de inflamación (Savill, 1997; Savill y col., 2002).

Señalización en la apoptosis. Al igual que muchas funciones en las células, la apoptosis puede ser regulada por señales provenientes de otras células como puede observarse en la vía extrínseca. Además de estas señales extracelulares la apoptosis es regulada por vías de señalización intracelulares como: PI3K/AKT, NF κ B, RAS/RAF/MEK/ERK.

PI3K (*cinasa 3 de fosfatidilinositol*), es una cinasa que juega un papel central en vías de señalización involucradas en la supervivencia, proliferación y motilidad celular.

Los receptores de factores de crecimiento inducen la producción de segundos mensajeros como el fosfatidilinositol 4,5 bifosfato y fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato, los cuales activan a PI3K, ésta a su vez fosforila a AKT. Esta última activa a ciertas proteínas que permiten la sobrevivencia celular. Por ejemplo, la activación de NF κ B inducida por AKT evita la apoptosis celular a través de la transcripción de genes que codifican para proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 o cIAPs. También se ha observado que AKT fosforila a BAD, lo cual impide que intervenga en la formación del poro mitocondrial en la vía intrínseca de la apoptosis.

El NF κ B es un factor de transcripción que regula la expresión de un gran número de genes involucrados en la regulación de procesos como la apoptosis, tumorigénesis e inflamación entre otros. En su forma inactiva el NF κ B se encuentra en el citoplasma unido a su inhibidor I κ B. En respuesta a múltiples estímulos, tales como: citocinas, señales de estrés, infecciones causados por

virus o bacterias, entre otras; I κ B es fosforilado en residuos específicos. Esta modificación es reconocida por complejos de poliubiquitinación que desencadena su degradación a través de la vía del proteosoma. De esta forma el factor NF κ B es liberado, lo cual permite su translocación al núcleo y su fosforilación en la subunidad p65, en donde reconoce una secuencia específica de DNA, activando a sus genes blancos. Los genes que están bajo la regulación de NF κ B se pueden agrupar de acuerdo al proceso celular al cual estén regulando. Se ha reportado un grupo de genes involucrados en la regulación de la inflamación como: TNF α , IL1- β , quimiocinas, COX2, otro grupo importante son los que codifican para proteínas anti-apoptóticas como son: Bcl-2, BclxL, Mcl-1, cIAP1 y cIAP2, survivina y cFLIP (Wymann y col, 2003; Perkins, 2004; Steelman y col, 2004).

Apoptosis y sistema inmune.

La muerte celular programada es muy importante para el desarrollo y funcionamiento del sistema inmune, debido a que interviene en la formación del repertorio de células T y B, en los mecanismos de tolerancia central y periférica, en la eliminación de células T y B autorreactivas, en el establecimiento de la memoria inmunológica y en los mecanismos citolíticos de células asesinas naturales y linfocitos T citotóxicos. En los mecanismos de defensa especialmente en infecciones virales, las células infectadas sufren apoptosis inducida por linfocitos a fin de evitar la replicación viral y por lo tanto la propagación de la infección (Osborne, 1996, Hengartner, 2000; Gupta, 2000; Onishi y Kizaki, 1994).

La apoptosis es una función biológica muy importante en la patogenia de varias enfermedades asociadas a inhibición de apoptosis, como en el cáncer (linfoma no Hodgkin folicular, carcinoma, tumores hormona-dependientes), enfermedades autoinmunitarias (lupus eritematoso sistémico, glomerulonefritis autoinmunitaria) e infecciones virales (Herpesvirus, Poxvirus, Adenovirus); y enfermedades asociadas con el aumento de apoptosis tales como SIDA (*Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida*), enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral

amiotrófica, retinitis pigmentosa, degeneración cerebelosa), síndromes mielodisplásicos (anemia aplásica) y daño isquémico (infarto al miocardio, apoplejía, daño por reperfusión) (Caer, 1994).

La susceptibilidad de los linfocitos T a la apoptosis es también controlada por homólogos de la familia Bcl-2. La sobreexpresión del Bcl-2 y el empalme homólogo de Bcl-x_L aumenta la supervivencia de las células T que son inducidas bajo apoptosis. En forma opuesta Bax, proteína de 21 kDa, homodímeros o heterodímeros con Bcl-2 o Bcl-x_L y promueve su efecto apoptótico (Oltvai y col, 1993; Hunter y Parlow, 1996).

Entre los factores que pueden inducir apoptosis en células maduras se encuentran los glucocorticoides, las radiaciones gamma, la estimulación del complejo TCR/CD3 por anticuerpos monoclonales, superantígenos y la estimulación de los receptores CD2, Fas/Apo-1 y TNF (Osborne y Schwartz 1994). Así como moléculas obtenidas de productos naturales como el ácido ursólico (Lauthier y col, 2000)

El ácido ursólico es un triterpenoide pentacíclico de ácidos carboxílicos, se aisló por primera vez en 1923, a partir de la superficie de la capa de cera de la manzana, hojas de *Arctostaphylos uva-ursi* y del cerezo silvestre negro. Se encuentra naturalmente en una gran variedad de alimentos vegetarianos, hierbas y plantas en forma de agliconas o como glucósidos, es el principal componente del recubrimiento protector ceroso de las manzanas, peras, ciruela pasa y otras frutas. El ácido ursólico tiene amplias características farmacológicas, tales como, antiviral, antibacteriano, antiaterosclerótico antiinflamatorio, antiartrítico, hepatoprotector, antiulceroso, inmunomodulador, antioxidante, citotóxico, hipolipemiante, antitumoral, antiproliferativo y anticancerígeno y es considerado como el agente preventivo para el cáncer (Harmand y col, 2005; Ikeda y col, 2007; Manu y kuttan, 2008; Sando, 2009; Shan y col, 2009). Puede provocar diversos cambios morfológicos en las células así como pérdida de la asimetría de la membrana, la fragmentación del ADN y condensación nuclear, lo que indica que la apoptosis es el mecanismo por el cual el ácido ursólico induce muerte celular (Lauthier y col, 2000).

El ácido ursólico puede integrarse a la membrana celular e intervenir en sus propiedades físicas, función y afectar múltiples vías de señalización de la célula para inducir apoptosis. Puede unirse a los receptores de glucocorticoides de las células *Daudi* (células B Burkitt humanas) debido a que presenta una estructura química similar al glucocorticoide DXM (dexametasona). También el ácido ursólico se une a la región hidrofóbica de la interface dimérica de TGF de macrófagos peritoneales de ratón y se ha reportado que agregados de ácido ursólico, son reconocidos por el CD36 que se encuentra en la superficie celular de estos macrófagos. El CD36 se identificó originalmente como la glicoproteína IV de las plaquetas, es una proteína integral de membrana que tiene múltiples ligandos, incluyendo oxLDL, células apoptóticas, y ácidos grasos de cadena larga, y se expresa en monocitos/macrófagos, plaquetas, y ciertos tipos de células endoteliales microvasculares (Lauthier y col, 2000; Ikeda y col, 2007).

Proteínas de choque térmico (HSP).

Las HSP son un grupo de proteínas altamente conservadas en estructura y función, se encuentran en una amplia variedad de organismos que van desde especies bacterianas hasta los mamíferos. Las HSP son expresadas constitutivamente en todas las células y sus niveles incrementan rápidamente en respuesta a diferentes tipos de estrés, ambiental, patológico o fisiológico, lo que ayuda a la célula a resistir el daño causado por el estrés al que fue expuesto. A las HSP por su efecto citoprotector se les ha dado el nombre de moléculas chaperonas debido a que en condiciones normales y de estrés llevan a cabo diferentes funciones como; asistir en la degradación de proteínas en el proteosoma, en el ensamble de complejos multiproteicos, facilitan la translocación en el citosol de proteínas recién sintetizadas y mejoran el plegamiento de péptidos durante la traducción de la proteína (Van Molle y col, 2002; Simon y col, 1995; Li y Hahn, 1990; Gusev y col, 2002). Estas proteínas se han clasificado de acuerdo a su tamaño (kilodaltons) en familias de alto peso molecular y bajo peso molecular. El primer grupo incluye a las proteínas de las familias HSP90, HSP70 y HSP60. Estas proteínas son chaperonas dependientes de ATP (*adenosina-5'-trifosfato*) y requieren de co-chaperonas para modular su conformación y unión al ATP. Las HSP de bajo peso molecular

son un grupo de proteínas que varían en tamaño de 15 a 30kDa, presentan secuencia homóloga y propiedades bioquímicas similares como la fosforilación y oligomerización. La HSP27 es probablemente el miembro de esta familia más estudiado, es una chaperona independiente de ATP cuya principal función es proteger la agregación de proteínas. La HSP27 es expresada en muchos tipos de células y tejidos en específico en estados de desarrollo y diferenciación. En células cancerígenas, la expresión basal de la HSP27 es anormalmente alta lo cual se asocia con la resistencia a terapias anti-cáncer (Lanneau y col, 2008).

La HSP60 de mamíferos se encuentra principalmente dentro de la matriz mitocondrial, aunque también puede ser detectada en sitios fuera de la mitocondria como el citosol. La HSP60 es una proteína que se expresa constitutivamente y en situaciones de estrés se incrementa ligeramente, principalmente cuando el estrés es por calor. La HSP60 participa en el plegamiento de proteínas mitocondriales y facilita la degradación proteolítica del plegamiento y desnaturalización de proteínas en una manera dependiente de ATP. La actividad chaperona de la HSP60 es regulada por la co-chaperona HSP10, la cual se une a la HSP60 y regula su unión al sustrato y la actividad de la ATPasa. En presencia de ADP dos moléculas de HSP10 se unen a una molécula de HSP60. Las HSP60 y la HSP10 no siempre actúan como una sola unidad funcional y solo proteínas recién importadas hacia la mitocondria son severamente afectadas por la inactivación de la HSP10 (Bukau y Horwich, 1998).

La familia de la HSP70 constituye la clase de proteínas mejor conservadas y estudiadas que tienen un peso molecular que va de 66 a 78 kDa. Se encuentran principalmente en el citoplasma (HSP70 o también llamada HSP72). Pueden localizarse constitutivamente en la mitocondria (mtHSP70) y en el retículo endoplásmico (GRP78/Bip). En condiciones normales la proteína HSP70 funciona como una chaperona molecular dependiente de ATP, para asistir en el plegamiento de nuevos polipéptidos sintetizados, el ensamble de complejos multiproteicos y el transporte de proteínas a través de la membrana. Las proteínas como la HSP40, CHIP, HOP, HIP, BAG y BAG-3 son co-

chaperonas de la HSP70. Diferentes estímulos como drogas anti-cáncer, inducen rápidamente la síntesis de la proteína HSP70 (Lanneau y col, 2008).

Los principales miembros de la familia de la HSP90 son la HSP90 α y la HSP90 β . Son proteínas dependientes de la unión al ATP para mejorar su actividad como chaperonas. Estas dos isoformas son esenciales para la viabilidad de las células eucariontes. Se encuentran constitutivamente en el citoplasma (1 al 2%) y su nivel de expresión puede ser estimulado cuando la célula se expone a algún tipo de estrés. La HSP90 se ha asociado con proteínas de señalización incluyendo factores de transcripción ligando independiente tal como MyoD, tirosina cinasa como vSrc y la cinasa treonina/serina como Raf-1. La estabilidad de estas proteínas es mejorada por la HSP90. Entre las co-chaperonas de la HSP90 están las Cdc37, p23, Aha1, PP5, HOP y CHIP (Lanneau y col, 2008).

Proteínas de choque térmico (HSP) y su función anti-apoptótica.

Se ha demostrado que las HSP intracelulares pueden tener función anti-apoptótica que puede ser atribuida aunque, no siempre a su actividad como chaperona (Beere y Green, 2001; Parcellier y col, 2003). La sobreexpresión de estas proteínas como la HSP27, HSP70 o HSP90 inhiben la apoptosis en diferentes modelos celulares y bajo diferentes tipos de estrés como pueden ser; especies reactivas del oxígeno, daño al DNA, exposición a fármacos, luz UV y la unión al ligando de receptor de muerte. Las HSP pueden inhibir la vía intrínseca y la vía extrínseca de la apoptosis, a tres niveles importantes; (i) río arriba de la mitocondria modulando mecanismos de señalización (ii) a nivel de mitocondria controlando la liberación de moléculas apoptóticas (iii) y a nivel de citoplasma bloqueando alguna señal de sobrevivencia en la fase tardía de la apoptosis. Estas observaciones, se han enfocado en la inhibición de la maduración proteolítica y/o actividad de caspasas. Por lo tanto, la inhibición de activación de caspasas por las HSP podría indicar la regulación negativa de uno o más puntos sin la señalización múltiple en la cascada apoptótica (Mao y col, 2003; Beere y col, 2000; Garrido y col, 1999; Mosser y col, 2000).

Las HSP en la vía intrínseca.

El papel que juegan las HSP intracelulares en el crecimiento celular y la apoptosis ha sido de gran interés. Las HSP90 y su co-chaperona HSP27 pueden prevenir la translocación de Bid a la mitocondria, lo cual se ha relacionado con su capacidad para estabilizar el citoesqueleto. También se ha observado que ambas pueden mantener la fosforilación de Akt para que éste a su vez lleve a cabo la fosforilación de Bad y ésta pueda ser reconocida y secuestrada por las proteínas 14-3-3, lo que previene su heterodimerización con Bcl-2 y con Bcl_{xL}, fosforilación e inactivación de factores de transcripción, que tienen como blanco los genes de FasL y Bim (Figura 2). Por otro lado promueven la fosforilación de I κ B lo que permite la activación de la vía NF- κ B, el cual se trasloca al núcleo, donde promueve la transcripción de genes anti-apoptóticos como; c-IAP1, c-IAP2. La unión directa de la HSP27 con el citocromo c también impide la unión de este con Apaf-1, inhibiendo así la formación del apoptosoma y la unión de la proteína, También junto con Smac/DIABLO favorece que la proteína anti-apoptótica XIAP ejerza su efecto inhibitor de apoptosis sobre la caspasa 3. Se ha observado también que la HSP90 puede evitar la oligomerización del apoptosoma y la HSP70 inhibe la translocación de la procaspasa 9 hacia el apoptosoma, evitando así su activación (Beere, 2005).

La HSP70 y su cochaperona HSP40 previene la translocación de Bax (molécula proapoptótica) hacia la membrana de la mitocondria evitando de esta forma su permeabilización e inhibiendo la liberación de citocromo c (Li y col, 2004; Beere, 2005; Lanneau y col, 2008). El AIF (*apoptosis inducing factor*), normalmente reside en el espacio intermembranal de la mitocondria, pero cuando la célula recibe el estímulo apoptótico se transloca hacia el citosol y al núcleo donde participa en la muerte independiente de la actividad de caspasas. Sin embargo, esto es inhibido cuando la HSP70 se une directamente a AIF, lo cual se ha atribuido a su capacidad para mantener la integridad de la membrana lisosomal y de esta manera prevenir la liberación de catepsina hacia el citosol (Ravagnan y col, 2001).

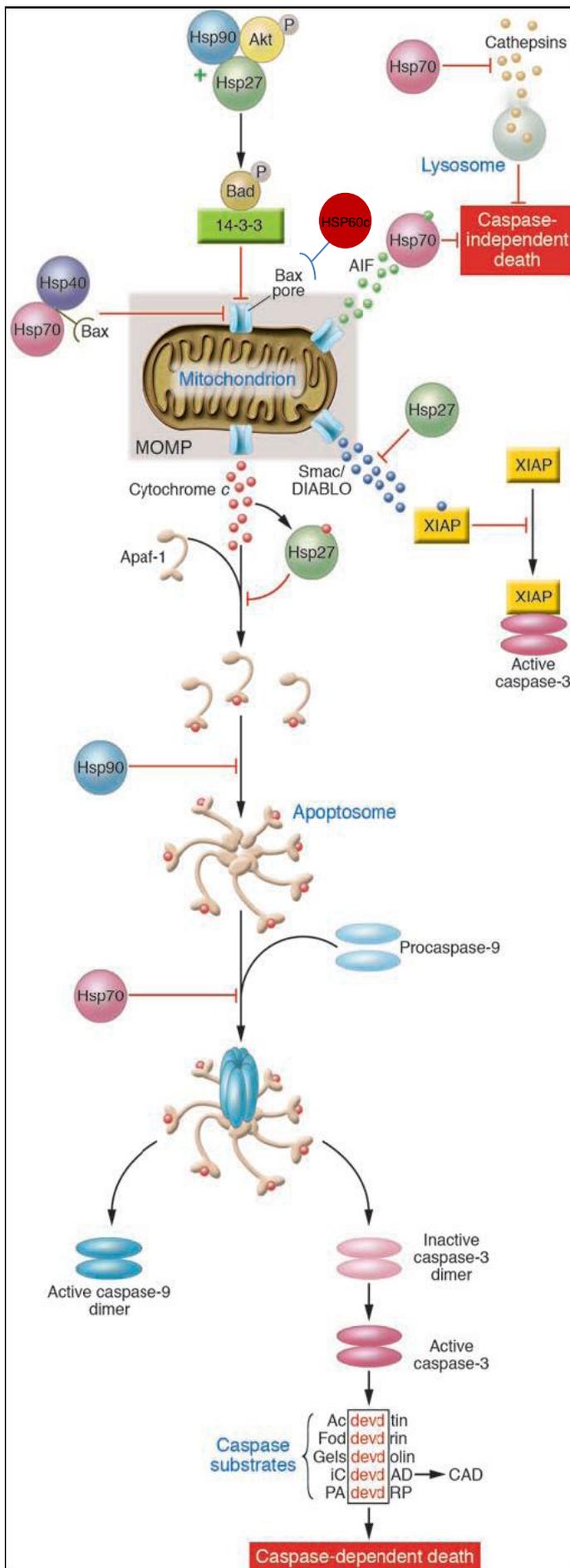


Figura 2. Regulación de la vía intrínseca por las HSP. Las HSP regulan varios aspectos de la vía intrínseca de la apoptosis incluyendo mediadores directos (Bax) e indirectos (Akt) previniendo la permeabilización de la membrana mitocondrial y por consiguiente la formación del apoptosoma. La muerte celular independiente de las caspasas puede también ser afectada por la supresión mediada por las HSP (Beere, 2005).

Las HSP en la vía extrínseca.

La vía extrínseca de la apoptosis puede ser iniciada por uno de varios receptores de muerte en la superficie celular cuando se unen a su ligando apropiado. Se ha demostrado que las HSP como chaperonas pueden modular eventos de señales de transducción apóptótica vía Fas, TNF (*tumor necrosis factor*), JNK, de caspasas y TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) (Figura 3). La inducción de apoptosis mediada por Fas es regulada por varias HSP incluyendo la HSP27 y la HSP70, estas proteínas parecen suprimir la apoptosis por unión e inhibición de DAXX y ASK-1 (*apoptosis-signal-regulated kinase*), respectivamente, impidiendo la fosforilación de JNK y ésta a su vez la no fosforilación de proteínas pro-apoptóticas como Bax, Bad, Bim entre otras y de esta manera evitan su translocación hacia la membrana mitocondrial e impiden la formación de poros y por lo tanto, la salida de citocromo c (Charette y col, 2000; Park y col, 2002).

La HSP70 parece participar suprimiendo la activación de JNK mediante su defosforilación, sugiriendo un mecanismo independiente de su actividad como chaperona (Mosser y col, 2000). La HSP90 también puede participar en la modulación de la señalización por el receptor TNF cuando se une a su ligando TNFR-1, el receptor recluta a la proteína RIP (*receptor interacting protein*) y promueve la activación de NF- κ B y JNK. La HSP90 interactúa con RIP, resultando en su estabilización para evitar su degradación y aumentar la señal para inducir la actividad de NF- κ B vía TNF e incrementar la supervivencia de la célula. Otra ruta por la cual actúa la HSP90 y su cochaperona Cdc37 es a nivel de su unión con el complejo IKK (*multisubunit I κ B Kinase (IKK) complex*), donde una vez unido a él, I κ B puede ser fosforilado para su ubiquitinación y de esta manera, NF κ B ser liberado y translocarse al núcleo para llevarse a cabo la inducción de transcripción de genes que codifican para proteínas antiapoptóticas. La HSP90 y su cochaperona la HSP27 pueden evitar la defosforilación de Akt y así ayudar a mantener su estabilidad y actividad, lo que lleva a mejorar la supervivencia celular vía NF κ B (Lewis y col, 2000).

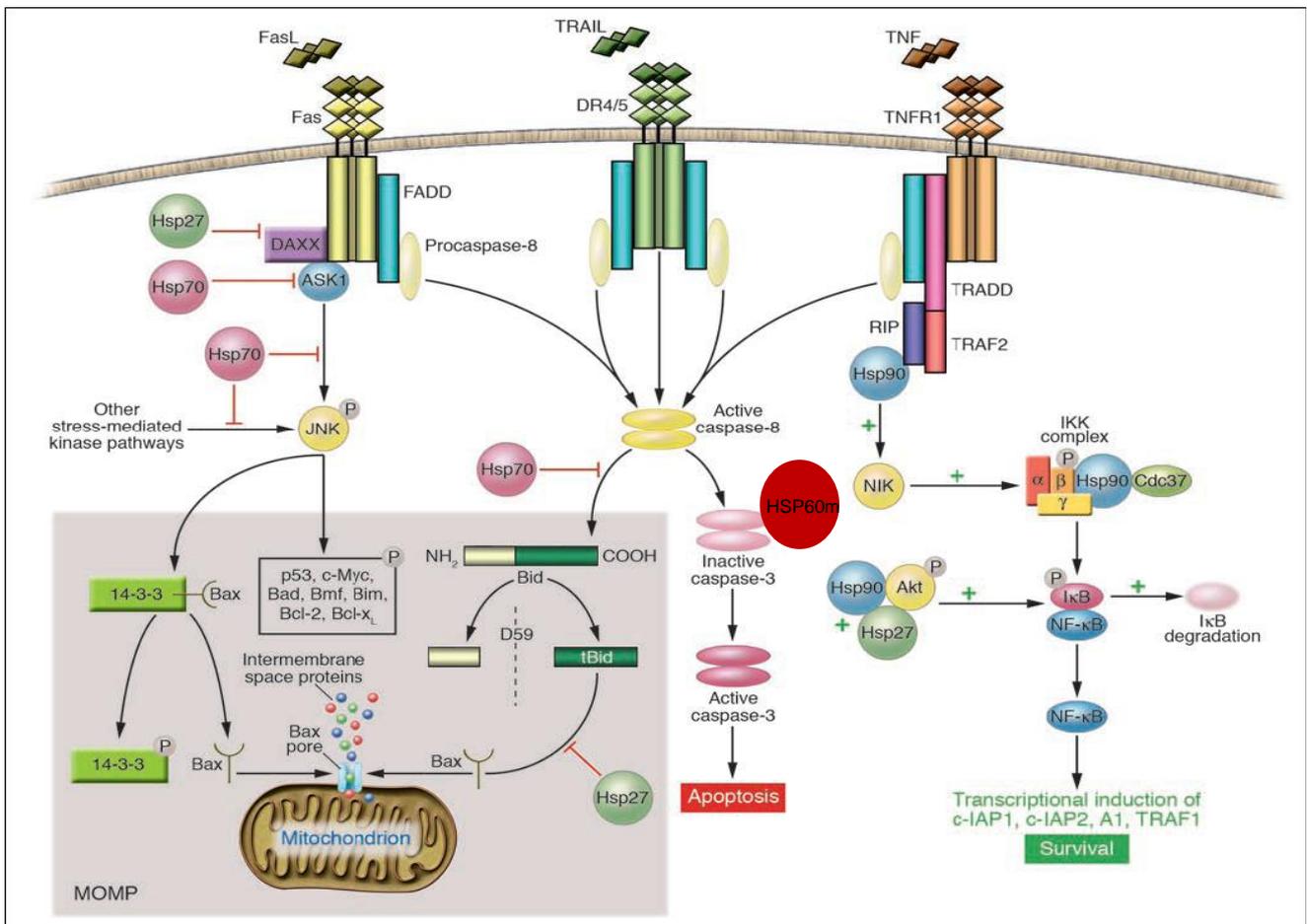


Figura 3. Regulación de la vía extrínseca por las HSP. Las HSP regulan múltiples puntos de la vía extrínseca mediada por la unión de receptores de muerte a su ligando adecuado. Esos puntos incluyen la generación de señales vía TNF para la activación de NF-κB y la supresión de la activación de proteínas pro-apoptóticas (Beere, 2005).

La HSP60 kDa y su participación la apoptosis.

La participación de la HSP60 kDa en la apoptosis ha sido muy controversial, esta proteína se ha observado que en condiciones fisiológicas esta proteína se encuentra en células de mamíferos del 75 al 80% en la mitocondria y del 15 al 20% es citosólica (Itoh y col, 1995). Sin embargo, bajo ciertas condiciones de estrés, como las infecciones, su expresión se observa en la membrana celular (Belles y col, 1999). En la apoptosis se ha observado que la forma citosólica y mitocondrial de esta proteína pueden tener efecto anti-apoptótico así como pro-apoptótico (Sarkar y col, 2006). La HSP60 y su co-chaperona HSP10kDa previenen la muerte de miocitos cardiacos neonatales mediante el

mantenimiento de la integridad y función de la membrana mitocondrial (Lin y col, 2001). La HSP60 citosólica tiene un efecto principalmente anti-apoptótico ya que se une a Bax y Bak en miocitos cardíacos previniendo así que se desencadene la apoptosis (Kirchhoff y col, 2002). Sin embargo, la HSP60 mitocondrial unida a procaspasa-3 mejora su sensibilidad a las proteasas y esto la hace más susceptible a la acción del citocromo c y dATP (Samali y col, 1999; Xanthoudakis y col, 1999; Arya y col, 2007).

Origen, características y función de los fibroblastos de membrana sinovial.

Una articulación es el medio de contacto que hace a la unión entre dos huesos próximos. Las funciones más importantes de las articulaciones son las de constituir puntos de unión del esqueleto y producir movimientos mecánicos, proporcionándole elasticidad y plasticidad al cuerpo, además de ser lugares de crecimiento.

Fisiológicamente, el cuerpo humano tiene diferentes tipos de articulaciones, que se clasifican de acuerdo a su movilidad como la sinartrosis (no móvil), sínfisis (con movimiento monoaxial) y diartrosis (mayor amplitud o complejidad de movimiento); y a su estructura como fibrosas (huesos de cráneo, tibia, peroné), cartilaginosas (sínfisis del pubis) y sinovial (codo, dedos, rodilla)

El tejido sinovial está compuesto de dos capas de tejido anatómicamente distintas: una capa superficial (intima o unión sinovial) y una capa inferior (subintima). La capa íntima está en contacto directo con la cavidad intra-articular, presenta un grosor de 20 a 40µm, con una profundidad que puede estar constituida de una a tres células, libremente organizadas, zona no vascular y sin soporte de membrana basal. La capa subíntima se encuentra organizada en forma libre y consiste en una malla de tejido conectivo con células y vasos sanguíneos (Firestein, 1997; Mor y col, 2005).

En la capa íntima y subíntima del tejido sinovial, predominan dos tipos de células: los macrófagos o células tipo A y los fibroblastos o células tipo B (sinoviocitos). Los fibroblastos son las células más abundantes (representando el 80% de las células totales) y se han clasificado en células de la capa íntima

y subíntima. Son células alargadas con una prominente maquinaria secretora, que incluye el retículo endoplásmico, ribosomas regulares y un desarrollado aparato de Golgi, el núcleo es pálido, y presenta varios nucléolos. Los fibroblastos carecen de antígenos HLA clase II, no tienen función fagocítica y son CD68 negativos (Mor y col, 2005). En la actualidad, no se han identificado marcadores específicos de fibroblastos sinoviales, sin embargo, la vimentina, prolyl-5-hydroxylasa y Thy-1 son ampliamente utilizados para este fin (Ladner y col, 2007).

Los fibroblastos participan en forma importante en la homeostasis de la articulación normal. En la capa íntima los fibroblastos secretan dentro de la cavidad articular y el cartílago adyacente proteínas nutritivas del plasma y altos niveles de la cadena larga polimérica de hialuronato, la cual tiene propiedades de lubricación e inmunomoduladoras. Los fibroblastos también producen la glicoproteína lubricina, así como un activador de plasminógeno. La lubricina contribuye a mantener la viscosidad de la cavidad articular y el activador de plasminógeno puede prevenir las adhesiones fibrosas, promoviendo de esta manera un movimiento normal de la articulación (Mor y col, 2005; Brommer y col, 1992; Ladner y col, 2007).

Los fibroblastos de la capa íntima expresan en su superficie ligandos involucrados en la unión con otras células y a la matriz extracelular. Estos incluyen al CD44 y VCAM-1 tal como ICAM-1 y $\alpha 1$ integrinas. El VCAM-1 se une a integrinas sobre células mononucleares y no así sobre leucocitos polimorfonucleares. De esta manera los fibroblastos pueden detener el tráfico de células mononucleares en la sinovia y permiten el paso de los neutrófilos al espacio articular. Los fibroblastos se han relacionado en el mantenimiento de la cápsula articular, estas células secretan múltiples componentes del tejido conectivo incluyendo fibronectina y colágeno tipo IV y VI, laminina, proteoglicanos, condroitina y fibrillina (Iwanaga y col, 2000).

Fibroblastos sinoviales y su participación en enfermedades reumáticas.

Los fibroblastos sinoviales (sinoviocitos) participan en forma crucial en la inflamación y la destrucción de la articulación en los pacientes con AR, responden a varias citocinas pro-inflamatorias incluyendo IL-1 y TNF α . Además muestran características de células inflamatorias que están involucradas en varios aspectos de la patofisiología reumatoide. Estas células sintetizan y secretan citocinas pro-inflamatorias como la IL-6 y algunas quimiocinas como la IL-8 y la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP)-1, las cuales median funciones inflamatorias importantes de los sinoviocitos. La IL-6 juega un papel relevante en la expansión y activación de células T, diferenciación de células B, regulación de los genes de las proteínas de fase aguda y regulación de la producción de quimiocinas (Wong y col, 2003). La IL8 y la MCP-1 son los mediadores clave que se han relacionado con el reclutamiento de neutrófilos, monocitos y linfocitos, por lo que se ha asociado con la infiltración de células inflamatorias (Juarranz y col, 2004). En modelos animales de artritis y en pacientes con AR, se ha reportado, que al bloquear las citocinas pro-inflamatorias o sus receptores, se observa una importante mejoría en el proceso inflamatorio y reducción de la destrucción del hueso (Nakahara y Nishimoto, 2006). Por lo tanto, la inhibición de estos mediadores de la inflamación producidos por los fibroblastos de la sinovia, podrían ser un blanco efectivo en el tratamiento de la artritis reumatoide.

La interacción entre diversos componentes bacterianos y las células epiteliales del huésped son la fase inicial de algunas enfermedades infecciosas. Bajo condiciones de estrés las HSP llegan a constituir el 20% de las proteínas totales bacterianas. Las HSP de 60kDa son altamente conservadas entre todas las especies y se les ha denominado "antígeno común". Algunos trabajos se han enfocado al estudio sobre la interacción de las HSP bacterianas con el sistema inmune del huésped y se han relacionado a enfermedades autoinmunes. Además, se ha reportado que HSP exógenas pueden unirse y entrar a las células del huésped. Una de las funciones atribuidas a las HSP es la protección de la célula al estrés por supresión de la cascada de señalización de la cinasa N-terminal de c-Jun (JNK). Es decir, las HSP inhiben la actividad

de JNK al incrementar la desfosforilación de JNK. La actividad de p38 se ha asociado con fosforilación de la HSP27 lo que permite la disociación en grandes monómeros, necesarios para la protección contra el estrés oxidativo. Las HSP pueden también tener efecto protector a través de la modulación de la actividad de caspasas. La procaspasa-3 se localiza en la mitocondria formando un complejo con la HSP60 y la HSP10. La inducción de apoptosis permite la disociación del complejo y la activación de la procaspasa-3. Zhang y col en el 2004 demostraron que proteínas exógenas, particularmente la GroEL de *Escherichia coli* protegió de la muerte por apoptosis a una línea de queratinocitos humanos (HaCaT) tratados con radiación UV. Estos autores sugieren que el mecanismo de protección es la inhibición de la activación de la caspasa 3 por unión a la HSP (Zhang y col, 2004). De forma similar, nuestro grupo de investigación ha observado efecto protector de las HSP60 de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* en la apoptosis inducida con dexametasona (DXM) en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con espondiloartropatías y de sujetos sanos. Además, se observó que el efecto protector requiere de la interiorización de la proteína por parte de la célula (Trujillo-Vizuet, 2005; Ortega-Ortega, 2007).

II. JUSTIFICACIÓN

Los antecedentes presentados, nos permiten visualizar la importancia de las proteínas de choque térmico como moléculas con función anti-apoptótica e inmunomoduladora en procesos inflamatorios crónicos. Nuestra línea de investigación se ha enfocado al estudio de la participación de las HSPs enterobacterianas y su efecto anti-apoptótico en células mononucleares de sangre periférica (CMSP), lo anterior surgió por los reportes previos de nuestro grupo de investigación, donde reportamos respuesta inmune humoral y celular hacia las HSPs enterobacterianas, en pacientes con espondiloartopatías (SpA) y sujetos sanos. Estos reportes, nos permitieron realizar los primeros ensayos sobre la función anti-apoptótica de las HSPs de 60 kDa de; *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*. En todos los casos, las tres proteínas protegieron de la apoptosis inducida con dexametasona a CMSP de sujetos sanos. Dentro de estos estudios, también observamos que el efecto anti-apoptótico requiere de la interiorización de las proteínas por parte de la célula. No obstante, hasta el momento no están claros los mecanismos o las vías de señalización a través de los cuales las HSP inhiben la apoptosis. Por todo lo anterior, es importante analizar el efecto de la HSP60 de *Klebsiella pneumoniae* en la apoptosis inducida con ácido ursólico en un cultivo primario de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano y además, determinar la expresión de las proteínas relacionadas con la inhibición de la apoptosis (Bcl-2, c-IAP1, c-IAP2, c-FLIP y Bcl-x_L).

III. HIPÓTESIS

La proteína de choque térmico de 60 kDa de *Klebsiella pneumoniae* (HSP60Kp) tiene efecto anti-apoptótico en fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto anti-apoptótico de la HSP60Kp en cultivo primario de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano.

OBJETIVOS PARTICULARES

- *Cultivo primario de fibroblastos sinoviales*
 - Obtener y caracterizar un cultivo primario de fibroblastos de sinoviales de ratón BALB/c sano.
 - Caracterizar morfológica y fenotípicamente el cultivo primario de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano.

- *Estudio del efecto anti-apoptótico*
 - Evaluar la inducción de muerte por apoptosis inducida con ácido ursólico en cultivo primario de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano.
 - Evaluar el efecto de la HSP60Kp en la apoptosis inducida con ácido ursólico en cultivo primario de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano.
 - Analizar el efecto de la HSP60Kp en la expresión de genes anti-apoptóticos (Bcl-2, c-IAP1, c-IAP2, c-FLIP y Bcl-xL) en cultivo primario de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención y mantenimiento del cultivo primario de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano.

El cultivo primario de fibroblastos de ratón sano se obtuvo mediante la disección de la cavidad articular de las rodillas de las patas traseras de ratones BALB/c sanos de 4 semanas de edad. Para esto, cada ratón se anestesió y desinfectó con alcohol y se les retiró la piel que cubre toda la pierna, posteriormente se realizó el corte lo más próximo a la cavidad articular, el tejido obtenido de cada rodilla se mantuvo en una caja Petrie estéril (*NUNC*) con medio D-MEM sin suplementar penicilina 100 U/mL y gentamicina 50 µg/mL (*Sigma*) para evitar de esta manera su deshidratación mientras se finalizaba con la disección de los demás ratones. El aislamiento de las células, se llevó a cabo por disgregación mecánica/enzimática, los cortes de tejido se colocaron en un matraz estéril que contenía un agitador magnético y la mezcla enzimática dispasa (*Gibco*)/colagenasa IV (*Sigma*) (1mg/ml), penicilina 100 U/mL y gentamicina 50 µg/mL, la disgregación y digestión se realizó durante 20 min, posteriormente el contenido del matraz se colocó en un tubo cónico estéril de 50 mL (*Sarstedt*) se centrifugó a 626 x g durante 5 min y las células aisladas se pasaron por una membrana *Cell Strainer* de 70µm (*Becton Dickinson*) y se colocaron en una caja estéril (*NUNC*) con 5mL de suero fetal bovino inactivado por calor, penicilina 100 U/mL y gentamicina 50 µg/mL y se dejaron incubar a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 24 h. Al día siguiente se lavaron las células con PBS (regulador salina fosfatos 0.15 M pH 7.4) estéril para eliminar las células no adheridas y se les colocó medio D-MEM suplementado al 10% con suero fetal bovino inactivado por calor, L-glutamina 1mM, penicilina 100 U/mL, gentamicina 50 µg/mL y se mantuvieron con lavados diarios durante una semana. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80% se les hizo el pase correspondiente y se mantuvieron en botellas de cultivo de 75cm² (*Sarstedt*) con medio D-MEM suplementado.

Caracterización del cultivo primario de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano.

Morfología. La caracterización morfológica de los fibroblastos sinoviales se realizó mediante su observación en un microscopio invertido de campo claro (Nikon).

Fenotipificación. La caracterización fenotípica se llevó a cabo mediante el marcaje positivo para el receptor CD90 (Thy-1), para vimetina un componente de los filamentos intermedios del citoesqueleto e ICAM-1 una molécula de adhesión intercelular, así como la expresión negativa para el receptor CD14. Para ésto, las células se desprendieron con 1mL de regulador de disociación celular (*Gibco*), se colocaron en tubos de poliestireno de 13X75mm (*Falcon Becton Dickinson*) y se lavaron con 2 mL de PBA (PBS con 0.1% de ASB y 0.1% de NaN_3) centrifugándose a 978 x g durante 5 min. Posteriormente, las células se tiñeron con el anticuerpo correspondiente. Para la tinción extracelular se colocaron 3 μL del anticuerpo primario anti-CD14, anti-Thy-1, anti-ICAM1 y se dejaron en incubación a 28°C durante 30 min. Una vez terminada la incubación las células se lavaron con 2mL de PBA y se les colocaron 3 μL del anticuerpo secundario anti-rat-IgG-FITC y se mantuvieron en incubación durante otros 30 min más a 28°C y posteriormente se lavaron con PBA. Para la tinción intracelular a las células se les adicionaron 500 μL de saponina al 0.1% y se dejaron incubar durante 10 min a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 para su permeabilización, posteriormente las células se lavaron con 2 mL de PBA y se le colocaron 3 μL del anticuerpo anti-vimetina-FITC, se dejaron incubar a 28°C durante 30 min, se lavaron con PBA nuevamente y finalmente todas las células de ambas tinciones intra y extracelulares se fijaron en una solución de paraformaldehído al 0.5%. El análisis celular se realizó en un citómetro de flujo (*Becton-Dickinson*) adquiriéndose 10,000 eventos.

Inducción de apoptosis con ácido ursólico en cultivo primario de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano.

El cultivo primario de fibroblastos sinoviales se dejó crecer en botellas de 25cm² (NUNC) con medio D-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, L-glutamina 1mM, penicilina 100 U/mL y gentamicina 50 µg/mL a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 80%. Posteriormente, para llevar a cabo la inducción de muerte por apoptosis con el ácido ursólico (*Sigma*), a las células se les adicionaron las diferentes concentraciones del inductor que fueron de 2.5, 5.0, 10, 15, 20 y 25µg (ensayo dosis-respuesta) y se dejaron incubar a 37°C con 5% de CO₂ durante 4, 8, 12 y 24 horas (ensayo tiempo-respuesta) para determinar la concentración óptima del inductor y el tiempo de incubación necesario donde el porcentaje de células apoptóticas fuera estadísticamente significativo con respecto a sus testigos. Las células se tiñeron por la técnica de pico SubG0. El análisis del porcentaje de células apoptóticas se realizó en base al contenido de DNA en un citómetro de flujo (*Becton Dickinson*) donde se adquirieron 20000 eventos para cada ensayo.

Evaluación del efecto anti-apoptótico de la HSP60 kDa de *K. pneumoniae* en la apoptosis inducida con ácido ursólico en cultivo primario de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano.

El cultivo de fibroblastos sinoviales se dejó crecer en botellas de 25cm² (NUNC) con medio D-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, L-glutamina 1mM, penicilina 100 U/mL y gentamicina 50 µg/mL a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 80%. Para evaluar el efecto protector de la HSP60Kp sobre la apoptosis inducida con el AU (15 µg, incubándose 24h a 37°C) en los fibroblastos sinoviales, las células se incubaron por separado con las diferentes concentraciones de la proteína (0.1µg, 1.0µg y 10µg) a 37°C 1h previo a la inducción de apoptosis con el AU. El cultivo celular y sus testigos correspondientes se incubaron durante 24h más a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Las células se tiñeron con la técnica de pico Sub G0. El

análisis del porcentaje de células apoptóticas se realizó con base en el contenido de DNA en un citómetro de flujo.

Análisis de células apoptóticas por la técnica de Pico SubG0.

Las células en apoptosis inducida con AU en presencia y ausencia de la HSP60Kp y sus testigos correspondientes se desprendieron con 1mL de tripsina 0.05%. Se colocaron en tuedbos de poliestireno y se les adicionó medio D-MEM suplementado al 10% con suero fetal bovino, se centrifugaron a 978 x g durante 5 min, las células se lavaron con 2 mL de PBA a 978 x g durante 5min y se fijaron con 500 µL de etanol frío al 70% incubándose durante 1 h a 4°C. Posteriormente, se eliminó el etanol por centrifugación y las células se lavarón con 2 mL de PBA frío a 978 x g durante 5min. Se incubaron 1.30 min a temperatura ambiente con 500µL de PBA y 250µL de regulador de permeabilización (NaH₂PO₄ 0.2M y H₃C₆H₅O₇ 0.1M), el sobrenadante se eliminó por centrifugación a 978 x g durante 5 min, y las células se resuspendieron en 500 µL de regulador de resuspensión (10 mL PBS, 200 µL de ioduro de propidio (IP) de una solución *stock* de 1mg/mL, y 0.73 mg de RNAsa A). El análisis del porcentaje de células apoptóticas se realizó con base en el contenido de DNA en un citómetro de flujo (*Becton Dickinson*) donde se adquirieron 20,000 eventos para cada ensayo.

Análisis del efecto de la HSP60 de *K. pneumoniae* en la expresión de genes anti-apoptóticos (Bcl-2, cIAP1, c-IAP2, c-FLIP y Bcl-xL) por la técnica de RT-PCR.

El RNA total de las células (1x10⁶ células/mL) con o sin inducción de apoptosis y en presencia o no de la HSP60Kp se obtuvo con el reactivo TriZol (*Invitrogen*) como lo indica el fabricante. Brevemente los tubos con 800 µL de Trizol se les adicionaron 180 µL de cloroformo (*JT Baker*), se centrifugaron a 12000 rpm 5min para separar le fase acuosa, posteriormente se les adicionaron 300 µL de isopropanol (*JT Baker*) para precipitar el RNA total, se eliminó el isopropanol por centrifugación a 13680 x g durante 5 min y el RNA total se lavó con etanol absoluto anhidro al 70%, se volvió a centrifugar, se eliminó el etanol y se dejó secar el RNA. El RNA total obtenido por este método se hidrató en 15 µL agua

tratada con DEPC al 0.1% y se midió la concentración de RNA total por espectrofotometría a una longitud de onda de 260nm.

Transcripción Reversa (RT). El cDNA se sintetizó en un volumen de 20 μL con 3-5 μg de RNA total tratado con DNAsa, a éstos se les agregó 1 μL de oligo dT12-18 (0.5 μg) (*Applied Biosystems, Invitrogen*) y se desnaturalizó a 75 °C por 10 minutos. Al finalizar este tiempo las muestras se mantuvieron en hielo y se les adicionó a cada muestra 4 μL del regulador 5X para la RT, 2 μL de ditioneitol (DTT) 0.1 M, 1 μL de dNTPs 10 μM . Se dejaron 2 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se le agregaron 2 U de la enzima SuperScript II a cada muestra. Se permitió el acoplamiento de la enzima al complejo poliT-RNA manteniendo las muestras a temperatura ambiente por 2 min. La mezcla de reacción se incubó a 42 °C por una hora y posteriormente, la enzima se desnaturalizó mediante tratamiento térmico a 65°C por 5 min.

PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). Para la amplificación de los genes de interés, se trabajó con un volumen total de 25 μL de reacción de PCR la cual contenía 2.5 μL de regulador 10X (KCl a 50 mM y Tris-HCl a 10mM a pH 9.3), 0.5 μL de MgCl_2 50 mM, 0.5 μL de dNTPs 10 mM, 0.5 μL de cada oligonucleótido en sentido y antisentido (10pM) (Tabla 1), 1.0 μL de cDNA molde obtenido de la reacción de la RT antes descrita y 1 U de enzima TaqDNA-polimerasa (*Invitrogen*). La reacción se realizó en el termociclador Techne a 93°C por 4 min seguido de 35 ciclos a 92°C, 30 s, 55°C, 45 s, 72°C, 45 s. Finalmente, la reacción se mantuvo a 72°C por 5 min y después a 4°C. Para observar los productos amplificados por PCR se efectuó un corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 2% a 80V. El gel se tiñó con bromuro de etidio (*Sigma*) y se observó bajo la luz UV en un transiluminador (*Alpha Innotech Corporation*) y la imagen se analizó con el software de análisis LabWorsTM ver. 4.5 de la marca UVP.

Análisis semicuantitativo de la expresión de genes. Los productos amplificados por la PCR se observaron en un transiluminador con luz UV, y la imagen se capturó en un analizador de imágenes con el software de análisis Alphamager 1220 V5.5. Se marcó el área de cada banda y se cuantificó su intensidad en

píxeles por unidad de área. Para obtener la intensidad del gen problema, a la intensidad de la expresión del gen correspondiente se le restó la luminosidad de fondo (ésta se cuantificó en regiones con áreas equivalentes a las abarcadas por el gen de interés, donde no existía banda alguna). Con los resultados anteriores se determinó la intensidad de la banda ajustada del gen, la cual corresponde a la relación de la intensidad de expresión del gen problema entre la intensidad ajustada de la expresión del gen constitutivo (GADPH) al tiempo correspondiente. Posteriormente, los valores obtenidos de la relación anterior, se dividieron entre la intensidad de banda al tiempo 0 horas con el fin de normalizar los resultados.

$$\text{Expresión relativa} = \frac{\text{Intensidad de expresión ajustada del gen}}{\text{Intensidad de la expresión ajustada al tiempo 0 horas}}$$

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron con la prueba de t de Student y U de *Mann-Whitney*, en el programa GraphPad Prism Software, con 95% de intervalo de confianza.

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes de interés por PCR.

Gen (Genbank)	Secuencia	Tamaño (pb)
GADPH	(R)5'-GTCATACCAGGAAATGAGCTTGAC-3' (F) 5'-GGTCATCCATGACAACCTTTGG-3'	458
c-IAP1	(R) 5'-GCTCAGAATCAAAGGCCAAG-3' (F) 5'-CACCAGGCTCCTACTGAAGC-3'	217
c-IAP2	(R) 5'-CACACCTTGGAACCACTTGG-3' (F) 5'-CCATCTAGTGTTCCAGTTCAGC-3'	165
Bclx/L	(R) 5'-TTCGGGATGGAGTAAACTGG-3' (F) 5'-TGGATCCAAGGCTCTAGGTG-3'	157
Bcl-2	(R) 5'-CTGGCATCTTCTCCTTCCAG-3' (F) 5'-GACGGTAGCGACGAGAGAAG-3'	183
c-FLIP	(R) 5'-ACAGAGTGAGGCGGTTTGAC-3' (F) 5'-CCTTGGCTATCTTGCCTCTG-3'	204

VI. RESULTADOS

Caracterización del cultivo primario de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano.

Para llevar a cabo la caracterización morfológica del cultivo primario de los fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c, se procedió a observar las células al microscopio invertido de campo claro, las cuales presentaron morfología típica de fibroblastos, de forma alargada y delgadas con un núcleo central (Figura 4). Para la caracterización de los fibroblastos se realizó la fenotipificación de las células con cuatro anticuerpos diferentes. Anti-Thy-1 para el receptor CD90 o Thy-1, donde se observó una intensidad media de fluorescencia (IMF) de 632.86, con porcentaje de células positivas del 63.79%, datos significativos al comparar con el control de células sin marca, las cuales presentaron una IMF de 275.90, con un porcentaje de autofluorescencia de 2.10% (Figura 5, panel A). Anti-vimentina para fenotipificar la vimentina, un componente de los filamentos intermedios del citoesqueleto, los resultados mostraron una IMF de 662.78, con un porcentaje de células positivas de 48.42%, datos significativos al comparar con el control de autofluorescencia que presentó una IMF de 431.80, con un porcentaje de células de 0.34% (Figura 5, panel B). Para la molécula de adhesión ICAM-1, se empleó el anticuerpo anti-ICAM-1, para esta molécula la IMF fue de 481.42, con un porcentaje de células positivas de 67.21%, datos significativos al comparar con el control de autofluorescencia con una IMF de 271.78 y un porcentaje de células positivas de 3.53% (Figura 5, panel C). Para evaluar la pureza del cultivo, se empleó el anti-CD14, donde se obtuvo una IMF de 286.80 y un porcentaje de células positivas del 2.63%, con un pureza de fibroblastos del 97.37% (Figura 5, panel D).

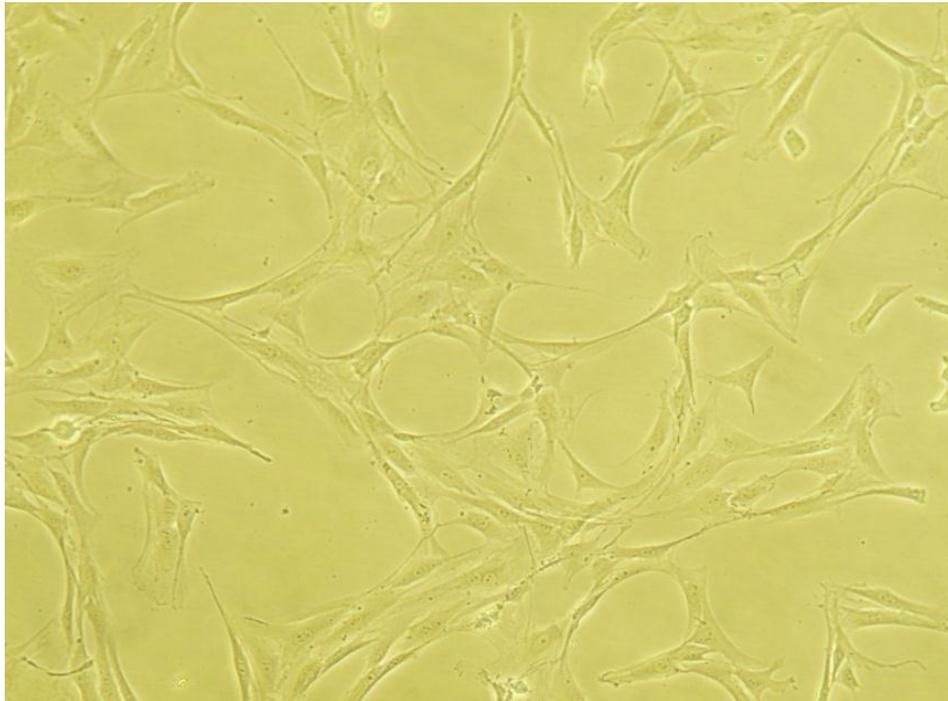
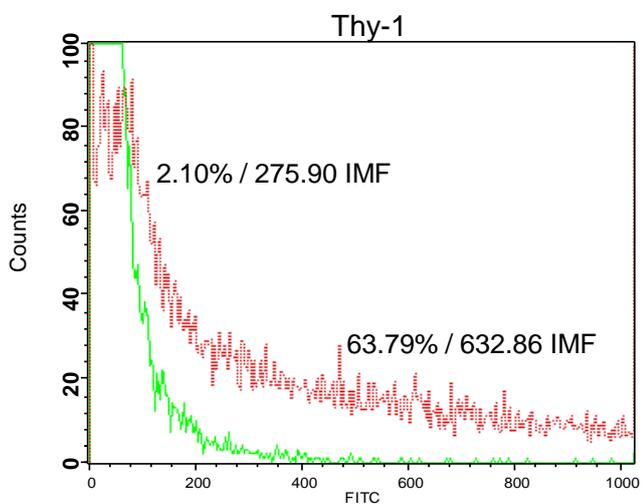
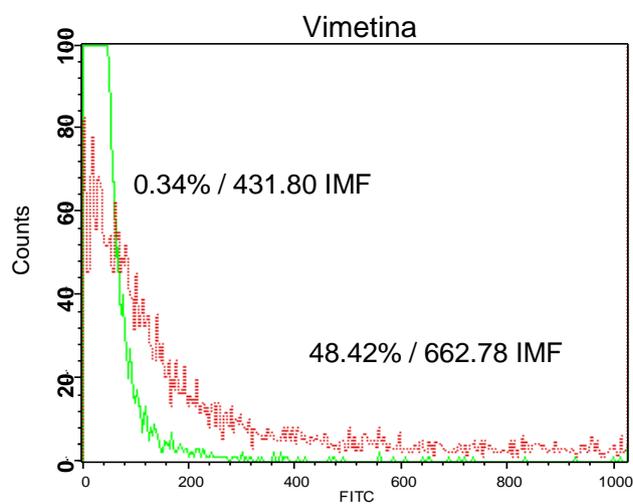


Figura 4. Caracterización morfológica del cultivo primario de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c. Imagen de fibroblastos sinoviales vista en un microscopio invertido de campo claro (400X).

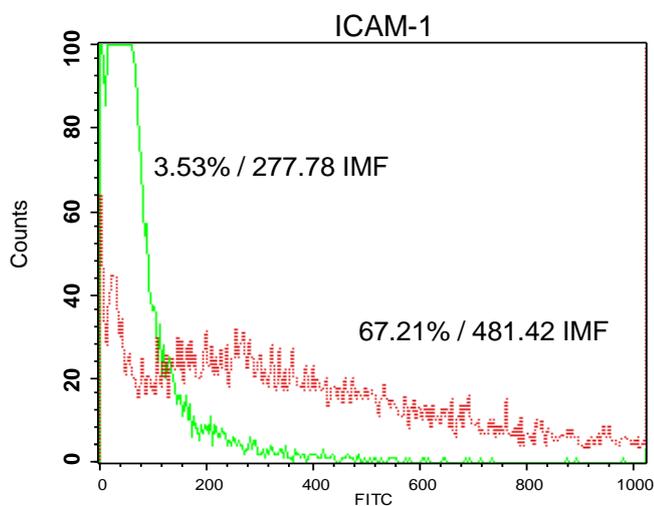
(A)



(B)



(C)



(D)

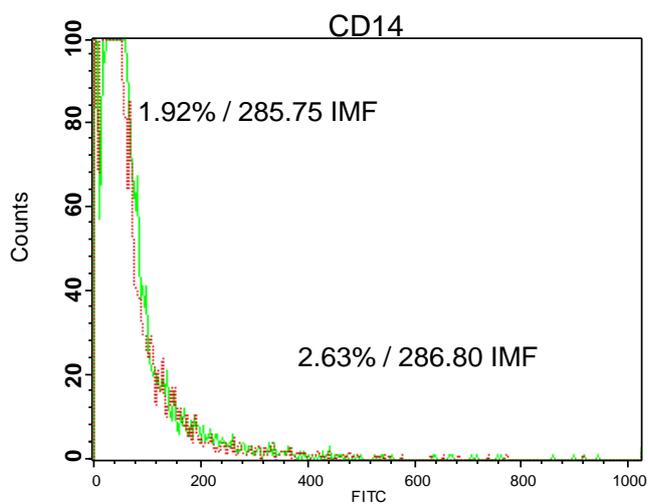


Figura 5. Caracterización fenotípica del cultivo primario de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c. Los histogramas muestran la sobreposición del porcentaje de células positivas y la intensidad media de fluorescencia para los marcadores CD90+ o Thy-1 (Panel A), Vimetina (Panel B), ICAM-1 (Panel C) y CD14+ (Panel D). Los datos se adquirieron y se analizaron en un citómetro de flujo.

Análisis de células apoptóticas por la técnica pico SubG0.

Los resultados de la inducción de apoptosis inducida con AU en el cultivo de fibroblastos sinoviales, analizados por la técnica pico SubG0 obtenidos en un citómetro de flujo, se muestran en la Figura 6. En la primera gráfica de puntos (Figura 6, panel A) se muestra la región que se realiza para seleccionar a las células en las diferentes fases del ciclo celular, donde el eje de las X representa la amplitud de la señal y el eje de las Y el área bajo la curva de la señal amplificada. De esta región se analizó el contenido de DNA en un histograma, para cada célula (FL2-A) en sus diferentes fases del ciclo celular; así las células en fase G0/G1 presentan un contenido de DNA=2N, cuando entran en división e inician la síntesis de material genético la cantidad es mayor (fase S), mientras que las células en mitosis tienen el doble de DNA justo antes de separarse en dos células hijas (fase G2/M), con un contenido de DNA igual a 4N. Las células apoptóticas en las que hay degradación de la cromatina, presentan un contenido de DNA menor a 2N permitiendo ser cuantificadas por la aparición de un pico por debajo de la región G0/G1, llamado pico SubG0. Un resultado representativo de las células sin ningún estímulo, se muestra en la Figura 6, panel B, donde se puede observar el valor medio del porcentaje de células apoptóticas (3.25%), localizado en la región del pico SubG0 en el histograma señalado. Porcentaje que se incrementa de forma significativa (30.05%) cuando a las células se les adiciona el inductor de apoptosis (AU). Figura 6, panel C.

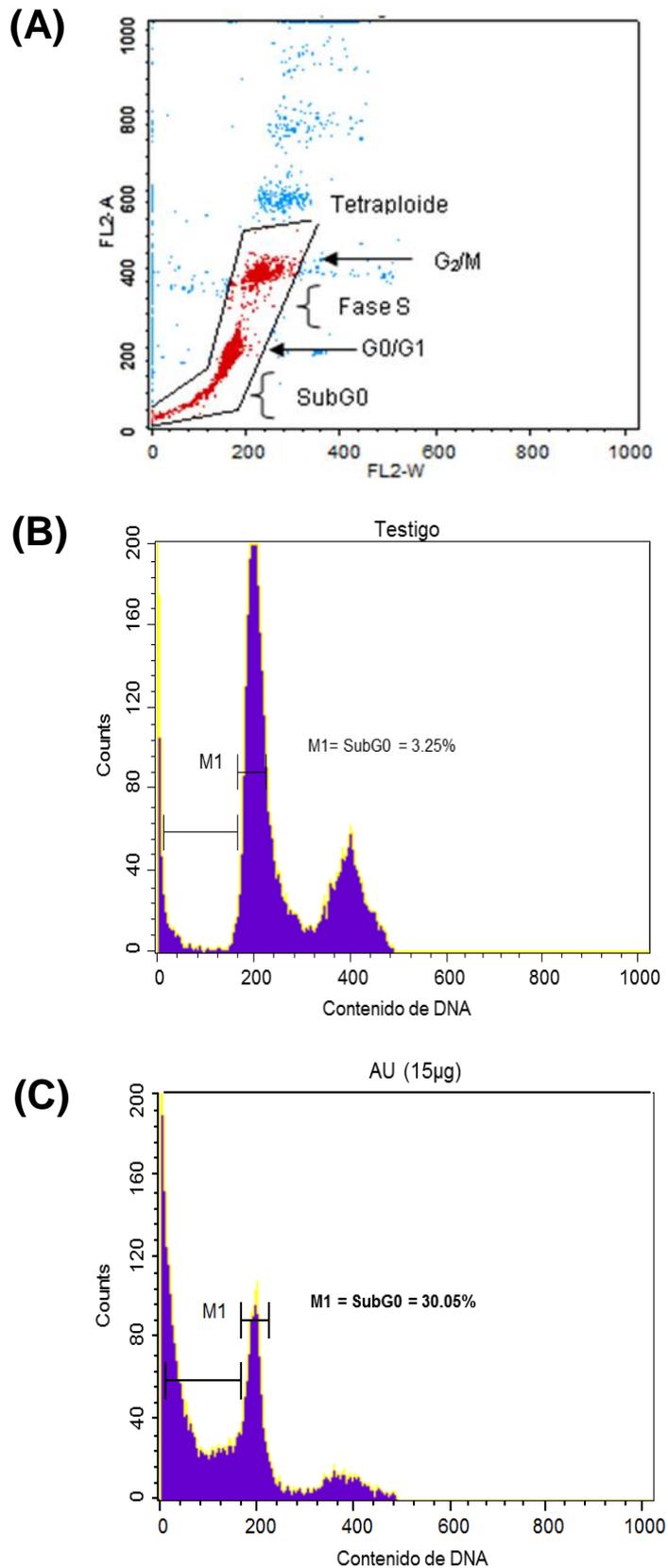


Figura 6. Análisis del porcentaje de células apoptóticas por la técnica de pico SubG0 obtenido en un citómetro de flujo. (A) Gráfica de puntos donde se muestra la región donde se selecciona a las células en las diferentes fases del ciclo celular. **(B)** Análisis del contenido de DNA de los fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano sin inductor. **(C)** Inducción de apoptosis con AU en los fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano, análisis del contenido de DNA.

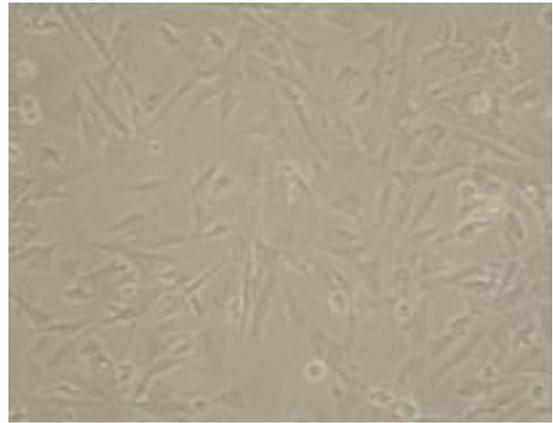
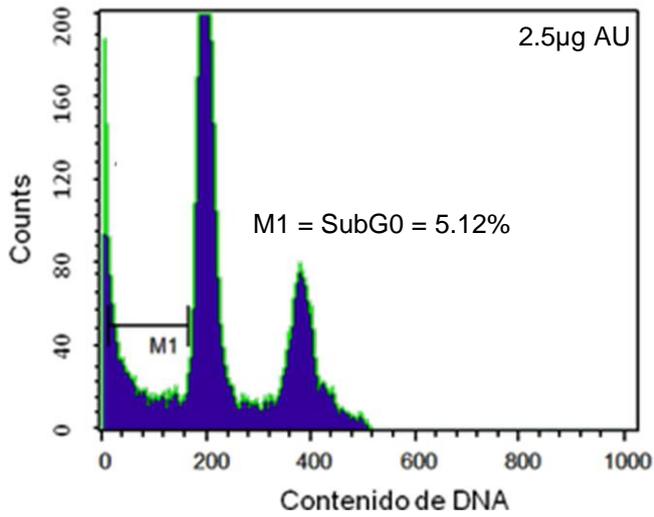
Inducción de apoptosis con AU en el cultivo primario de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano.

Para evaluar la inducción de muerte por apoptosis con AU en los fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano, se realizaron ensayos dosis-respuesta (2.5, 5, 10, 15, 20 y 25 μg) y tiempo-respuesta (4, 8, 12 y 24h) con sus respectivos testigos. En la figura 7 y 8, se muestran los resultados de un ensayo representativo de la inducción de apoptosis con las diferentes concentraciones de AU y 24 h de incubación. Los histogramas muestran en el eje de las X el contenido de DNA y en el eje de las Y el número de eventos, las fotografías correspondientes muestran los cambios morfológicos observados en las células para cada concentración de AU probada. En la figura 7, panel A, se muestra un resultado representativo del control de células sin inductor de apoptosis, donde se observa un porcentaje de células apoptóticas de 5.12%, dato congruente con la morfología celular, donde se mantienen las características del fibroblasto, células alargadas, delgadas y con núcleo central y con pocas células no adheridas. En los ensayos de inducción de apoptosis con cada una de las concentraciones probadas del AU, se observó un incremento significativo en el porcentaje de células apoptóticas (22.35, 33.98, 41.29, 36.96 y 24.98% respectivamente), con una relación directa en los cambios morfológicos observados para cada concentración, en general se observó pérdida de la morfología propia del fibroblasto y de su adherencia celular (Figura 7 panel B y C) y figura 8 panel A, B y C.

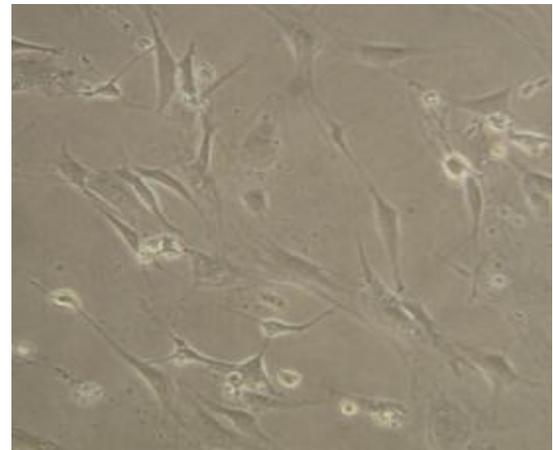
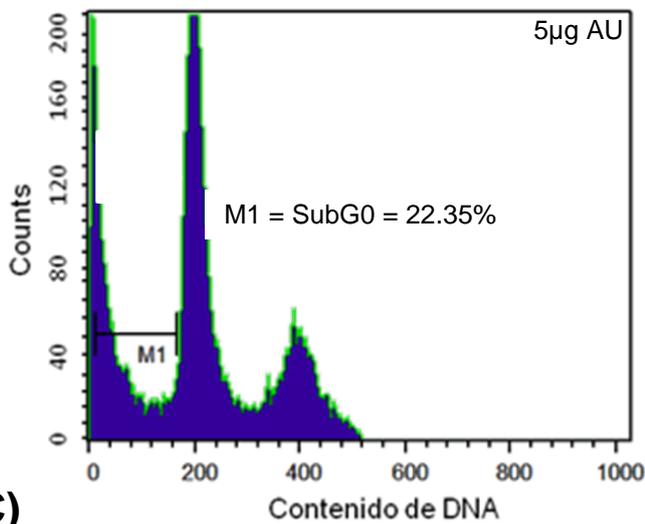
Los resultados del valor medio del porcentaje de células apoptóticas obtenidos de tres ensayos realizados en forma independiente se muestran en la tabla 2 y en la figura 9, donde se puede observar que las células testigo sin inductor mostraron un porcentaje de apoptosis de 2.49, 3.97, 3.70 y 4.21% cuando se incubaron 4, 8, 12 y 24h respectivamente. Porcentaje de células apoptóticas que no se incrementó significativamente para ninguna de las concentraciones probadas de AU a las 4 h de inducción. Para las 8 y 12 h de inducción de apoptosis con 5 μg de AU, se observó un incremento significativo en el porcentaje de células apoptóticas con un máximo de 15.13% con 25 μg de AU en las 8 h. La misma tendencia se observó a las 12 horas de inducción con un máximo de células apoptóticas de 25.18% con 20 μg de AU. Para el tiempo de

incubación de 24 h se observó la misma tendencia, con un porcentaje máximo de apoptosis de 28.08% con una concentración de 15 μg de AU, con tendencia a disminuir a las concentraciones de 20 y 25 μg de inductor. Por lo tanto, todos los ensayos posteriores se realizaron con las condiciones de inducción obtenidas con 15 μg de AU y 24 h de incubación.

(A)



(B)



(C)

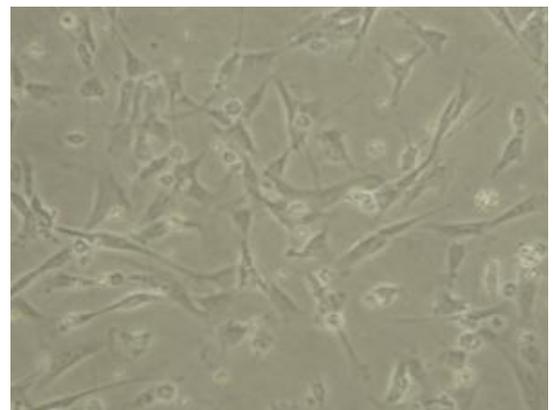
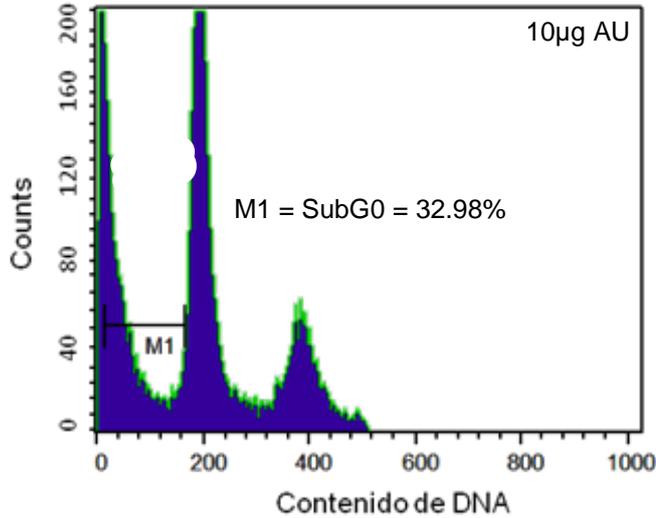


Figura 7. Porcentaje de células apoptóticas de un cultivo primario de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c. Se indujeron con 2.5 (Panel A), 5 (Panel B) y 10 µg (Panel C) de AU. Los histogramas muestran el contenido de DNA obtenido en un citómetro de flujo, de un ensayo representativo de la inducción de apoptosis con AU, en los fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano incubados durante 24h. Se muestran las imágenes correspondientes a la inducción de apoptosis vistas en un microscopio invertido de campo claro (400X).

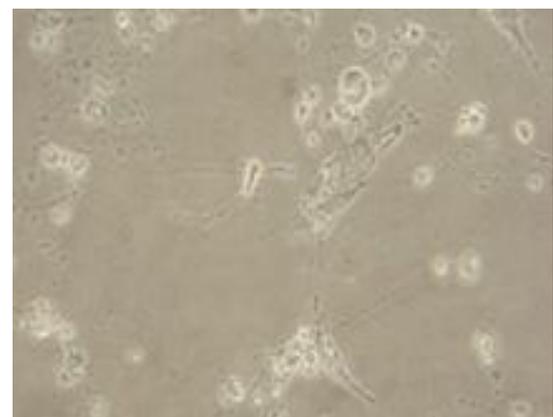
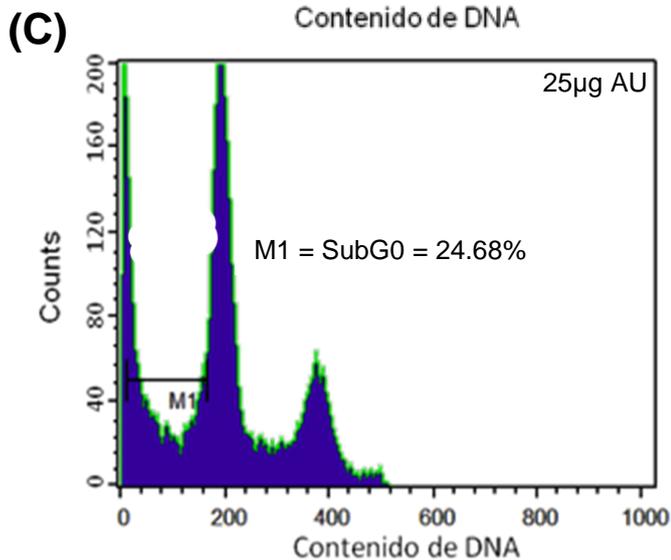
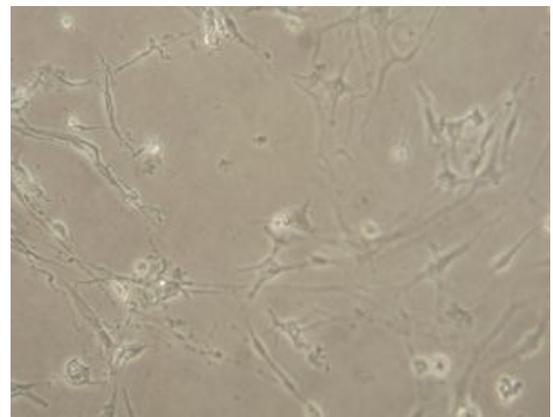
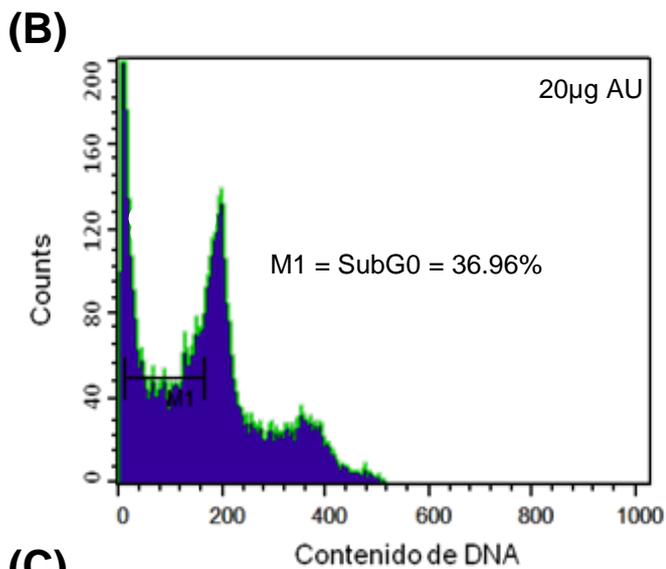
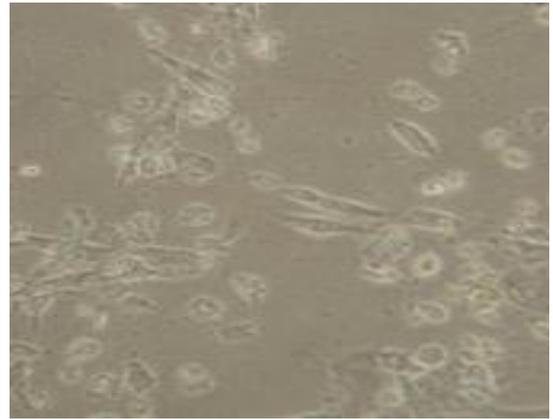
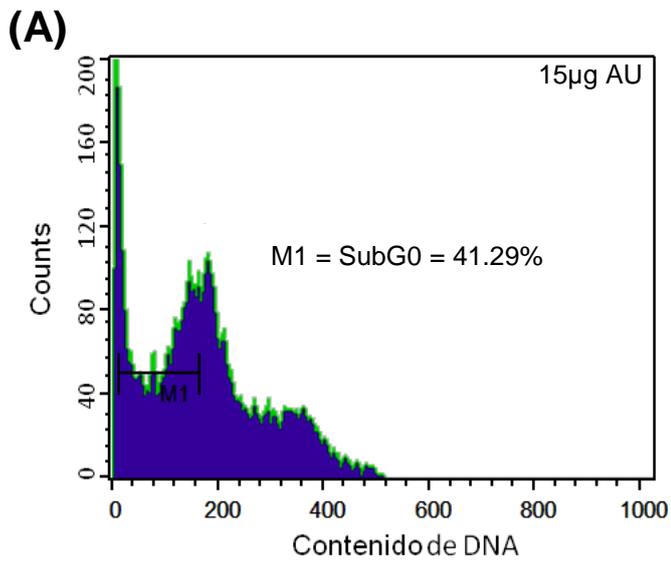


Figura 8. Porcentaje de células apoptóticas de un cultivo primario de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c. Se indujeron con 15 (Panel A), 20 (Panel B) y 25 µg (Panel C) de AU. Los histogramas muestran el contenido de DNA obtenido en un citómetro de flujo, de un ensayo representativo de la inducción de apoptosis con AU, en los fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano incubados durante 24h. Se muestran las imágenes correspondientes a la inducción de apoptosis vistas en un microscopio invertido de campo claro (400X).

Tabla 2. Inducción de apoptosis con ácido ursólico en fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano, dosis y tiempo respuesta, mediante la técnica pico SubG0.

AU (μg)	Porcentaje de células apoptóticas \pm una desviación estándar			
	4h	8h	12h	24h
Testigo	2.49 \pm 0.85	3.97 \pm 1.14	3.70 \pm 0.84	4.21 \pm 0.91
2.5	5.84 \pm 0.36	4.14 \pm 1.20	5.46 \pm 0.83	9.77 \pm 4.06*
5	6.09 \pm 2.31	8.75 \pm 2.72*	9.60 \pm 0.58*	12.56 \pm 4.99*
10	5.33 \pm 1.69	9.61 \pm 3.30*	10.47 \pm 0.31*	18.60 \pm 4.78*
15	6.69 \pm 0.94	8.96 \pm 0.77*	11.35 \pm 7.58*	28.08 \pm 1.13*
20	7.49 \pm 1.57	12.33 \pm 0.34*	25.18 \pm 1.95*	25.58 \pm 1.69*
25	7.89 \pm 1.49	15.13 \pm 0.58*	24.61 \pm 1.88*	19.36 \pm 3.15*

Los resultados representan el valor de la media \pm una desviación estándar del porcentaje de células apoptóticas (n=3), se consideran diferencias significativas cuando el valor de $p < 0.05$ (*) con respecto al testigo.

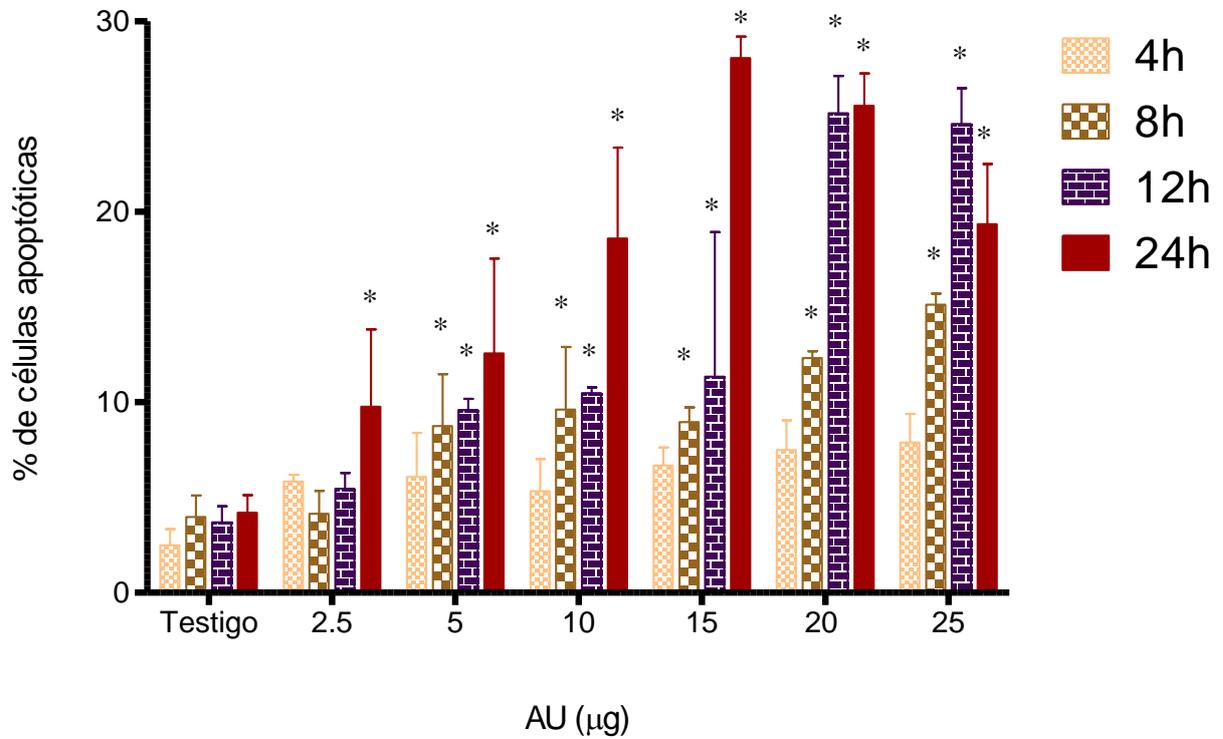


Figura 9. Inducción de apoptosis con ácido ursólico en fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c. Dosis y tiempo respuesta. Cada barra representa el valor de la media del porcentaje de células apoptóticas de tres ensayos realizado de forma independiente y la línea vertical representa una desviación estándar. Se consideraron diferencias significativas cuando el valor de $p < 0.05$ (*) con respecto al testigo.

Efecto de la HSP60 de *K. pneumoniae* sobre la apoptosis inducida con ácido ursólico en el cultivo primario de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c.

En la figura 10, se muestran los histogramas obtenidos en un citómetro de flujo, donde se puede observar el resultado de un ensayo representativo del efecto protector de la proteína enterobacteriana en la apoptosis inducida con AU en fibroblastos sinoviales. Los resultados obtenidos del valor medio en porcentaje de células apoptóticas inducidas con AU y el efecto protector de las HSP60 de *K. pneumoniae* (n=10) se muestran en la tabla 3, donde se puede observar, el porcentaje de apoptosis de los cultivos celulares sin ningún estímulo (4.20%) y de los testigo para la HSP60 de *K. pneumoniae* con 0.1, 1.0 y 10 µg (5.16, 6.12 y 6.84% respectivamente. El porcentaje de células apoptóticas se incrementó significativamente a 35.55%, cuando a las células se les indujo la muerte con AU. Cuando las células se incubaron con cada concentración de la proteína enterobacteriana y después se les indujo la muerte con AU, el porcentaje de células apoptóticas que se observó con el inductor disminuyó significativamente para todas las concentraciones probadas (0.1, 1.0 y 10 µg) de la proteína 30.44, 27.02 y 23.20% respectivamente (tabla 3, figura 11) y esta disminución fue dosis dependiente.

Tabla 3. Efecto anti-apoptótico de la HSP60 de *K. pneumoniae* sobre la apoptosis inducida con ácido ursólico, contenido de DNA obtenido por la técnica pico SubG0.

	Porcentaje de células apoptóticas ± una desviación estándar
Testigo 24h	4.20±2.95
0.1 µg de HSP60Kp	5.16±3.34
1 µg de HSP60Kp	6.12±4.82
10 µg de HSP60Kp	6.84±3.12
15 µg de AU	35.55±13.88*
0.1 µg de HSP60Kp + 15 µg AU	30.44±14.10*
1 µg de HSP60Kp + 15 µg AU	27.02±12.88*
10 µg de HSP60Kp + 15 µg AU	23.20±13.12*

Los resultados representan el valor de la media \pm una desviación estándar del porcentaje de células apoptóticas (n=10), se consideran diferencias significativas cuando el valor de $p < 0.05$ (*) con respecto a sus testigos.

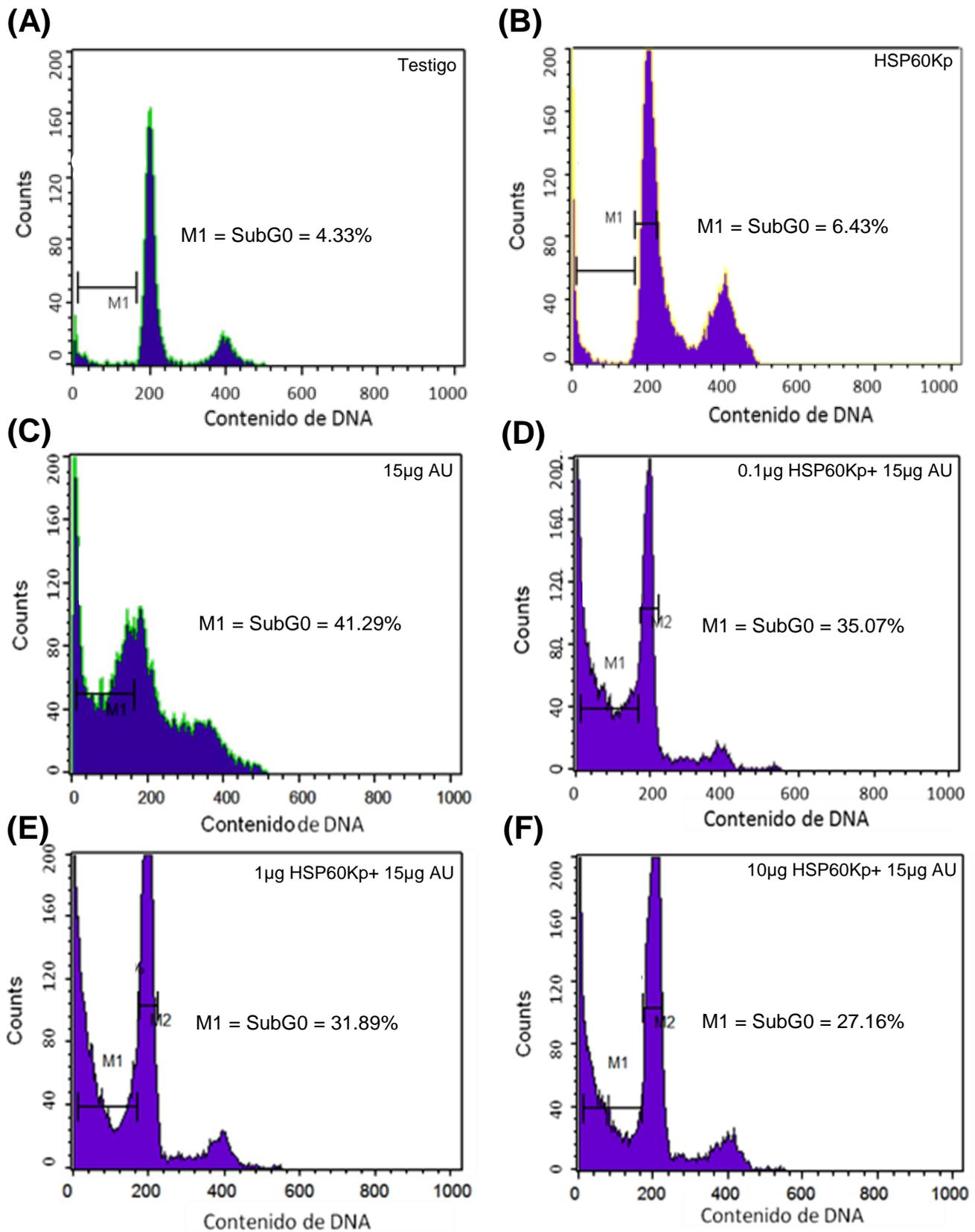


Figura 10. Porcentaje de células apoptóticas del efecto protector de la HSP60 de *K. pneumoniae*, sobre la apoptosis inducida con AU en fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c (técnica pico SubG0). Los histogramas muestran un ensayo representativo de cada una de las determinaciones. Testigo sin ningún estímulo (Panel A), testigo de proteína 10 µg (Panel B), inducción de apoptosis con AU (Panel C), efecto protector de la HSP60Kp 0.1, 1.0 y 10 µg (Panel D, E y F respectivamente).

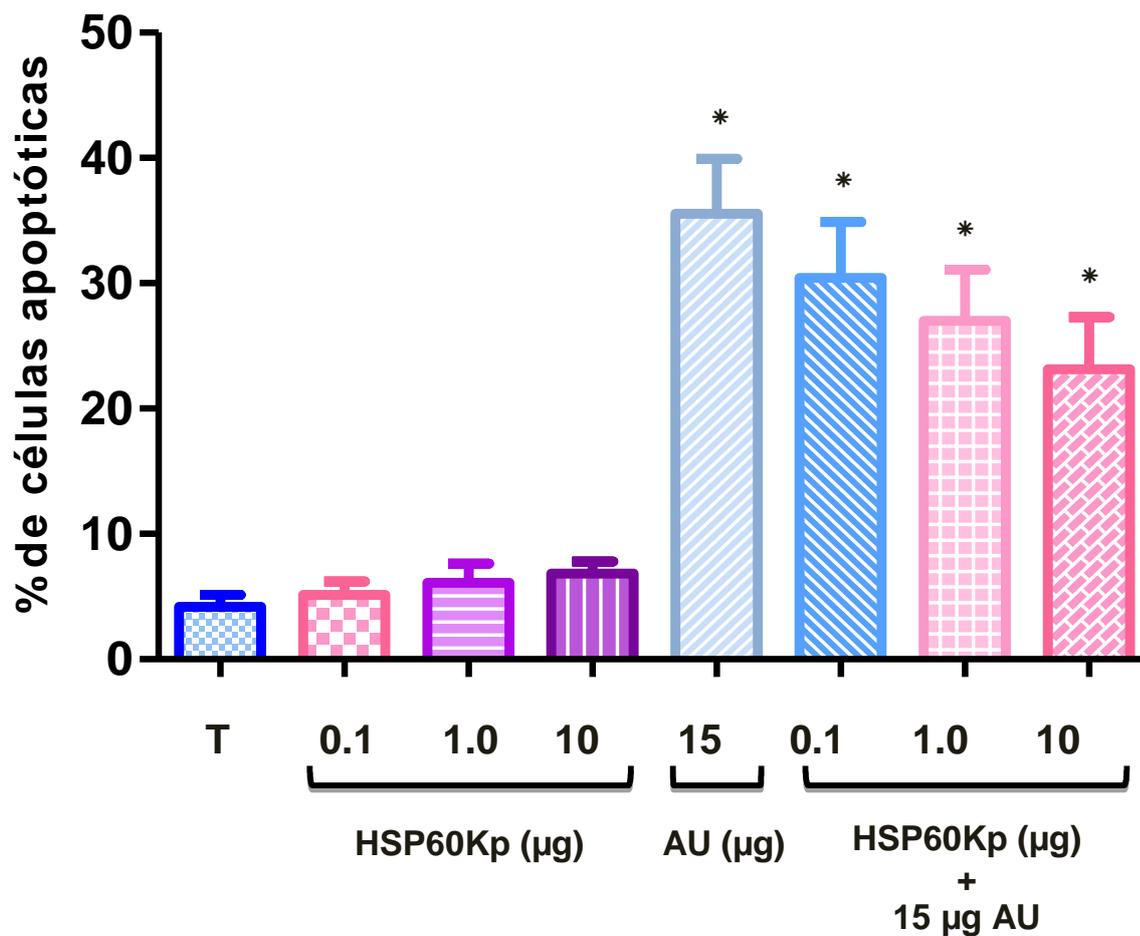


Figura 11. Efecto anti-apoptótico de la HSP60 de *K. pneumoniae*, sobre la apoptosis inducida con ácido ursólico en fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c. Cada barra representa el valor de la media del porcentaje de células apoptóticas de diez ensayos realizados de forma independiente y la línea vertical representa una desviación estándar. Se consideraron diferencias significativas cuando el valor de $p < 0.05$ (*) con respecto a sus testigos.

Efecto de la HSP60 de *K. pneumoniae* en la expresión de genes anti-apoptóticos (cIAP-1, IAP-2, Bcl-2, Bclx/L y cFLIP) en la apoptosis inducida con ácido ursólico en fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c.

La expresión de los genes anti-apoptóticos en los cultivos celulares se realizó mediante la técnica de RT-PCR. En la figura 12, panel A y B, se muestra un ensayo representativo de la expresión de los genes de interés a las 6 h y 24 h de incubación, respectivamente. El análisis semi-cuantitativo de la expresión relativa de los genes; Bcl-2, Bclx/L, cIAP-1, IAP-2, y cFLIP obtenidos a los tiempos de 6 y 24 h se muestran en la figura 13 y 14, respectivamente. Los resultados muestran que a las 6 h de incubación, en el testigo de células sin inductor no hubo expresión del gen Bcl-2, sin embargo su expresión se incrementó significativamente cuando a los cultivos celulares se le adicionó por separado; la HSP60Kp, el AU y la HSP60Kp más el AU (Figura 13, panel A). Para el gen Bclx/L se observó expresión basal en el testigo de células sin inductor, dato similar se vio en los cultivos con la HSP60Kp, su expresión disminuyó en un 50% en presencia del AU y en los cultivos que contenían la proteína más el AU (Figura 13, panel B). La expresión del gen cIAP1 fue similar para el testigo y para el cultivo con la proteína, en los cultivos que contenían el AU la expresión de este gen disminuyó significativamente a más de la mitad, pero aumentó en forma significativa ($p < 0.05$) cuando las células se incubaron con la proteína y después se les indujo apoptosis con el AU (Figura 13, panel C). Resultados similares se observaron en la expresión del gen cIAP2 en el testigo de células sin inductor, células más proteína y células con proteína más AU. Sin embargo, en el cultivo de células que contenía el AU no se observó la expresión de este gen (figura 13, panel D). El gen cFLIP se expresó en forma basal en el testigo de células sin inductor, expresión similar se observó en el cultivo de células con la HSP60Kp, expresión que disminuyó de forma significativa con el AU pero no aumentó en los cultivos que se incubaron con la proteína y posteriormente, se les indujo apoptosis con el AU. La expresión de los genes anti-apoptóticos a las 24 h se muestran en la figura 14, donde podemos observar para Bcl-2, Bclx/L, cIAP1 la misma expresión que se observó a las 6 h en el testigo y con la proteína. Para cIAP1 se observó una disminución no significativa en las células con AU y aumento, tampoco

significativo, con la proteína más el AU. Para cIAP2 y cFLIP se observó que la expresión basal del testigo sin estímulo aumentó significativamente en el cultivo celular con la HSP60Kp. Para todos los ensayos se utilizó como gen constitutivo el 18S, que se expresó en todos los sistemas.

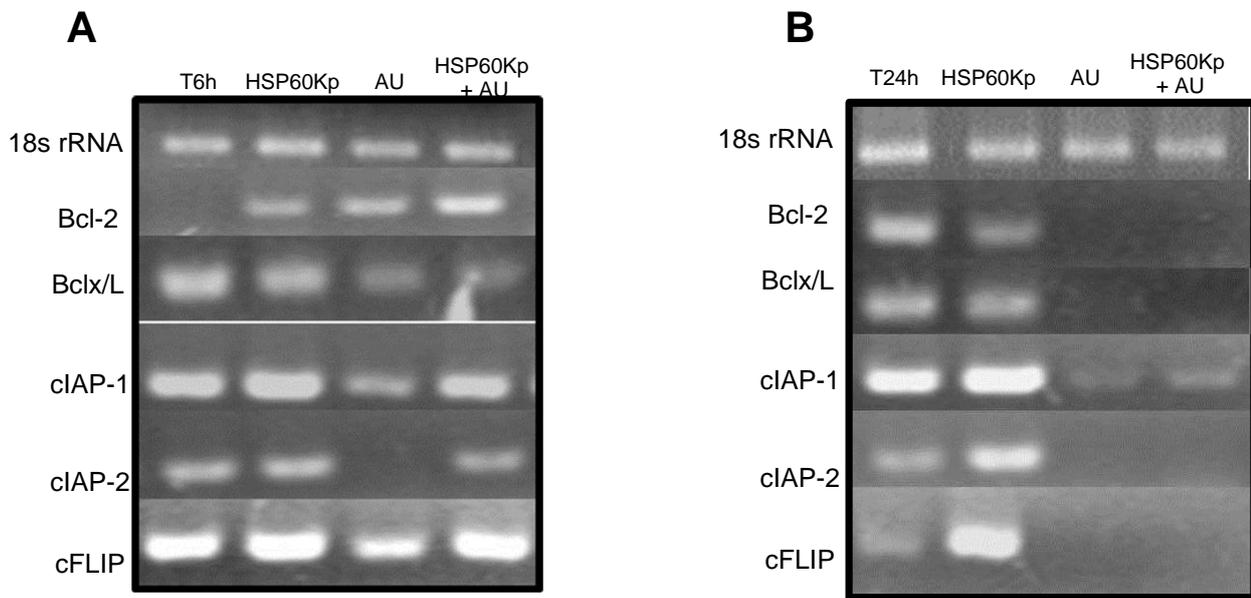


Figura 12. Efecto de la HSP60 de *K. pneumoniae* en la expresión de genes anti-apoptóticos (cIAP-1, IAP-2, Bcl-2, Bclx/L y cFLIP) en la apoptosis inducida con AU en fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c. El análisis se realizó en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio. Se muestra un resultado representativo de tres ensayos realizados de forma independiente de la expresión por RT-PCR del mRNA de los genes analizados en fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano a las 6h (Panel A) y 24h (Panel B) de incubación.

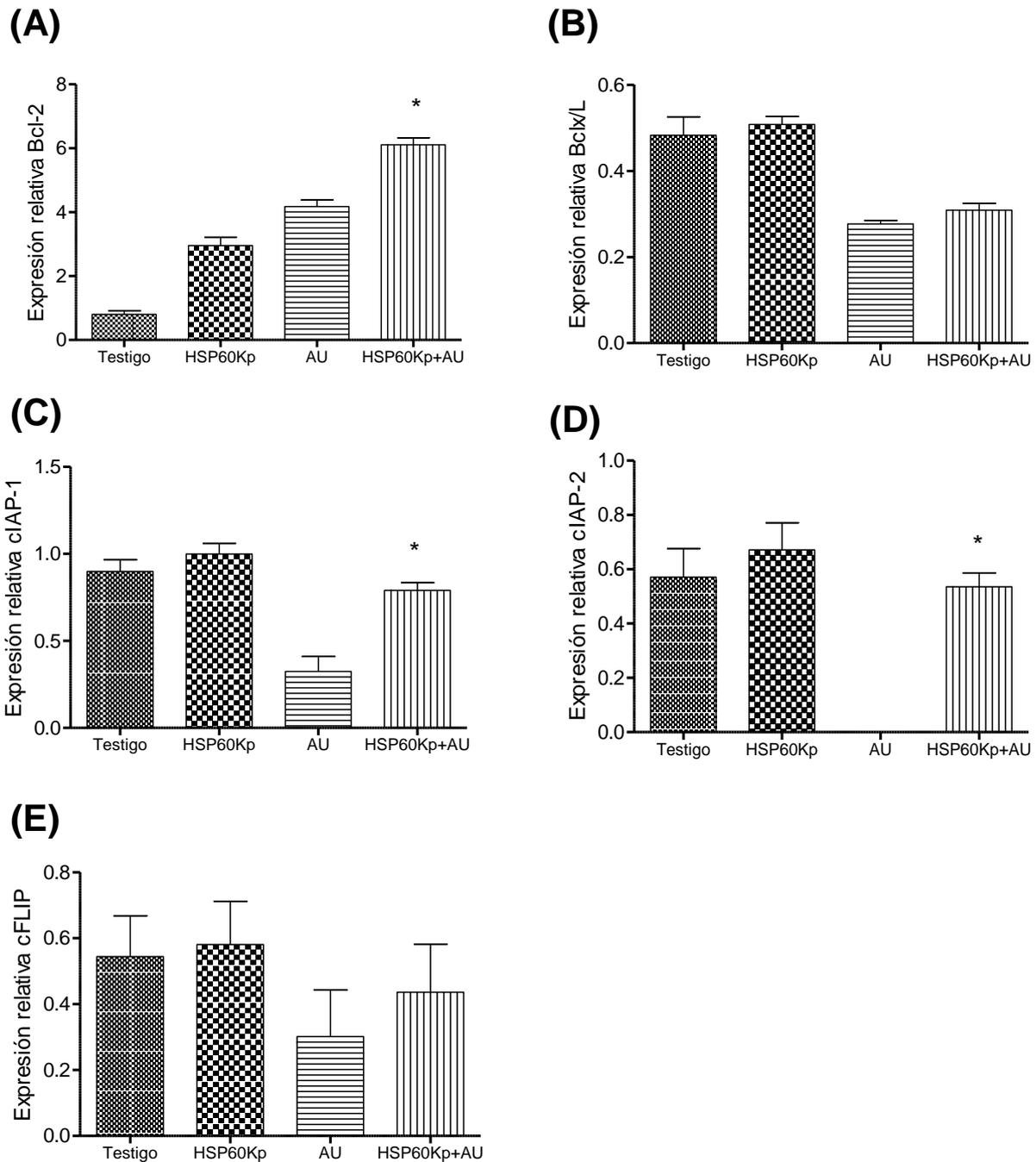


Figura 13. Análisis semicuantitativo del efecto de la HSP60 de *K. pneumoniae* en la expresión de genes anti-apoptóticos (cIAP-1, IAP-2, Bcl-2, Bclx/L y cFLIP) a las 6h de incubación. Expresión del mRNA de Bcl-2 (Panel A), Bclx/L (Panel B), cIAP1 (Panel C), cIAP2 (Panel D) y cFLIP (Panel E) en los fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c en presencia o ausencia de la HSP60Kp y del AU de tres ensayos realizados de forma independiente. Los resultados se muestran como la relación entre la intensidad de la expresión del gen de interés sobre la intensidad de la expresión de 18s rRNA. Cada barra representa el valor de la media y la línea vertical representa una desviación estándar. Se consideraron diferencias significativas cuando el valor de $p < 0.05$ (*).

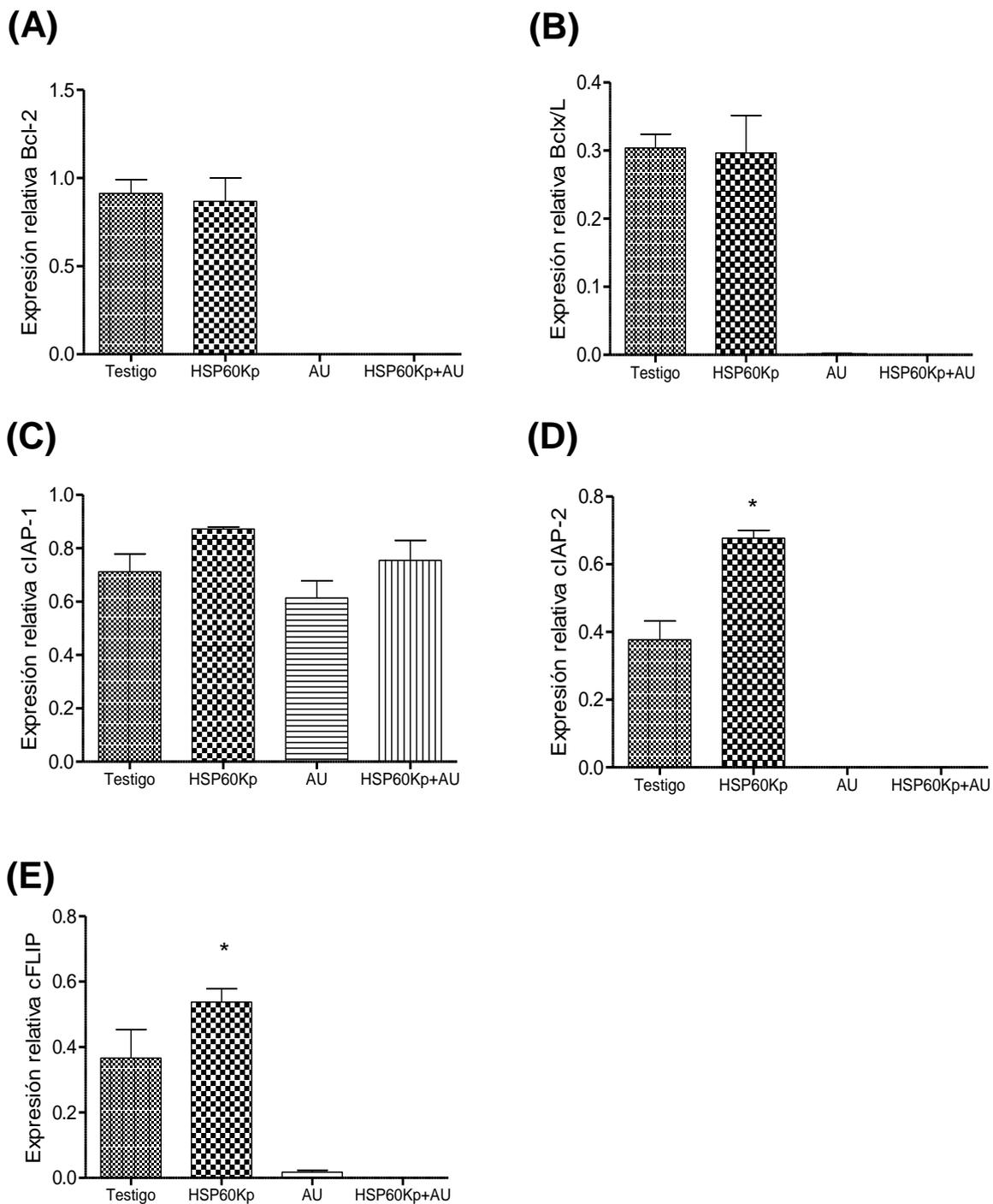


Figura 14. Análisis semicuantitativo del efecto de la HSP60 de *K. pneumoniae* en la expresión de genes anti-apoptóticos (cIAP-1, IAP-2, Bcl-2, Bclx/L y cFLIP) a las 24h de incubación (n=3). Expresión del mRNA de Bcl-2 (Panel A), Bclx/L (Panel B), cIAP1 (Panel C), cIAP2 (Panel D) y cFLIP (Panel E) en los fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c en presencia o ausencia de la HSP60Kp y del AU de tres ensayos realizados de forma independiente. Los resultados se muestran como la relación entre la intensidad de la expresión del gen de interés sobre la intensidad de la expresión de 18s rRNA. Cada barra representa el valor de la media y la línea vertical representa una desviación estándar. Se consideraron diferencias significativas cuando el valor de $p < 0.05$ (*).

VII. DISCUSIÓN

Las células responden a una gran variedad de estrés químico y fisiológico a través de la síntesis de un grupo de proteínas conocidas como proteínas de choque térmico (HSP). La inducción de esas proteínas protege a las células del daño causado por cambios bruscos de temperatura, radiación ultravioleta, exposición a radicales libres, etc. Las HSP son moléculas evolutivamente conservadas las cuales actúan como chaperonas en el plegamiento de proteínas recién sintetizadas, en la desnaturalización o agregación y facilitan su transporte a través de los canales de membrana. Estas funciones de las HSP sugieren su importante participación sobre la apoptosis, una forma de muerte celular fisiológica que tiene un papel importante en la regulación del sistema inmune. La apoptosis se ha definido como una serie de eventos moleculares y morfológicos, mediada por la activación de caspasas e inducida por dos vías de activación (vía intrínseca y vía extrínseca) que se caracterizan por la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, condensación de la cromatina, fragmentación de DNA, aspecto de burbuja en la membrana y la generación de cuerpos apoptóticos, finalizando este proceso con la fagocitosis de estos sin evidencia de reacción inflamatoria (Gusev y col, 2002).

La participación de las HSP en la regulación de la apoptosis, se ha reportado en diversos estudios, por ejemplo HSP27, HSP70 y la HSP90 pueden proteger de la apoptosis inducida con agentes quimioterapéuticos, luz UV, choque térmico, carencia de nutrientes, especies reactivas de oxígeno, disrupción del citoesqueleto, receptor de muerte, entre otras. Esta inhibición de la apoptosis se observó a diferentes niveles de las vías de señalización como: la salida de citocromo c, regulación negativa del ensamble del apoptosoma, interacción directa con proteínas pro-apoptóticas como Bax y Bid e inhibición de la activación de las caspasas. (Beere, 2005). Además, se ha observado que también participan en la estabilización de proteínas involucradas en cascadas de vías de señalización para la supervivencia celular como aquellas mediadas por AKT y NFkB. La HSP90 junto con Cdc37 mantiene la estabilidad y actividad de AKT inhibiendo su desfosforilación por PPA2 (Pyrophosphate phosphohydrolase 2) y de esta manera se asegura la fosforilación de Ikb lo que lleva a

la liberación de NFκB para su translocación al núcleo y llevar a cabo la transcripción de genes anti-apoptóticos de la familia IAP y Bcl-2 (Sato y col, 2000; Basso y col, 2002).

A diferencia de las HSP27, HSP70 y la HSP90 que tienen función anti-apoptótica, el papel de la HSP60 endógena ha sido controversial. Se ha observado que la HSP60 citoplasmática y mitocondrial tienen función anti-apoptótica y pro-apoptótica, respectivamente (Samali y col, 1999; Arya y col, 2007). Sin embargo, poco se sabe acerca de la función de las HSP60 enterobacterianas. En el 2004 Zhang y col, reportaron que la HSP60kDa de GroEl de *E. coli* protege a células epiteliales de la muerte inducida con luz UV y sugieren que el mecanismo de protección es a través de la activación de ERK (extracellular signal-regulated kinase) y la inhibición de caspasa 3.

En nuestro grupo de trabajo se ha reportado la participación de las proteínas de choque térmico de 60 kDa enterobacterianas en la respuesta inmune celular y humoral de sujetos sanos y de pacientes con espondiloartropatías (SpA) (Domínguez-López y col, 2000; 2002 y 2009). Los resultados de proliferación celular en CMSP en presencia de las HSP60 enterobacterianas, en ambos grupos de estudio, nos permitió recientemente, evaluar su función a nivel de muerte celular por apoptosis, donde se observó un efecto protector de estas proteínas sobre la apoptosis inducida con dexametasona, ácido úrsólico y H₂O₂ en CMSP de sujetos sanos y pacientes con SpA (Trujillo-Vizuet, 2005; Ortega-Ortega, 2007).

Con base en los antecedentes mencionados, en este trabajo se analizó el efecto protector de la HSP60 de *K. pneumoniae* en la apoptosis inducida con ácido úrsólico en un cultivo primario de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano. Para tratar de establecer lo anterior primero se obtuvieron las condiciones óptimas del cultivo primario, se obtuvo una confluencia del 80 al 90% en una semana y los cultivos mostraron las características morfológicas de los fibroblastos; células delgadas, alargadas y con núcleo central (figura 4). En la

membrana sinovial normal, se encuentran principalmente dos tipos de células, células tipo A o macrófagos (20%) y células tipo B o fibroblastos (80%) (Ladner y col, 2005). En los cultivos primarios de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano, se realizó la caracterización fenotípica, para conocer el porcentaje de fibroblastos en el cultivo. La caracterización mostró células positivas para el receptor CD90 o Thy-1, para la molécula de adhesión ICAM-1 y para la vimentina un componente de los filamentos intermedios que componen el citoesqueleto, así como, el marcaje negativo o menor para el receptor CD14 para macrófagos. Los datos mostraron porcentajes de expresión de los receptores y de las moléculas estudiadas similares a lo reportado en la literatura (Zimmermann y col, 2001), lo cual confirma que el cultivo primario de trabajo fue de fibroblastos sinoviales.

Hoy en día existen muchas técnicas de detección y cuantificación de apoptosis por citometría de flujo, basados principalmente en los cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares característicos de esta forma de muerte celular. Estos cambios pueden ser clasificados en tres estados de avance como temprano, inmediato y tardío. La técnica de pico SubG0 utilizada en nuestros ensayos de apoptosis (etapa tardía), permite la cuantificación del contenido de DNA empleando como fluorocromo el ioduro de propidio (IP) que se intercala estequiométricamente en el DNA, lo que permite emitir fluorescencia que es proporcional a la cantidad de DNA unido y de esta manera, diferenciar en qué fase del ciclo celular se encuentra cada célula (Telford y col, 1991; Moreno y col, 2000)

Una vez establecido el cultivo primario se procedió a llevar a cabo la inducción de muerte por apoptosis con el ácido ursólico (AU) en el cultivo primario de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano. Se realizaron ensayos dosis y tiempo respuesta, los resultados mostraron un incremento significativo del porcentaje de células apoptóticas obtenidas con cada concentración del AU y tiempo de incubación al comparar con el testigo. Estos datos son congruentes con lo reportado en la literatura donde se ha demostrado que el AU es un inductor de apoptosis en diferentes tipos celulares. Sin embargo, el mecanismo por el cual el AU induce apoptosis se desconoce. En células tumorales HL-60

de leucemia humana promielocítica y células Daudi, el AU se utilizó como inductor de apoptosis y provocó un incremento de Ca^{2+} intracelular, lo que sugiere que el aumento de las señales intracelulares de Ca^{2+} podrían estar implicadas en la apoptosis inducida por el AU (Baek y col, 1997; Lauthier y col, 2000). Se ha sugerido que el AU podría impedir la proliferación de diversas líneas de células cancerosas a través de la inhibición de la DNA polimerasa α y β y de la DNA topoisomerasas I y II, induciendo apoptosis mediante la activación proteolítica de caspasas (Tian y col, 2006). Además, se ha reportado que el AU induce apoptosis en la línea celular CO115, derivada de cáncer colorectal en humano, mediante la disminución de la actividad de PI3K y fosforilación de Akt. En la línea celular CAOv3 de cáncer de ovario en humano y en la línea celular M4Beu, induce apoptosis a través de la activación de la vía intrínseca mitocondrial, con un aumento en la expresión de Bax, disminución de Bcl-2 y activación de caspasa-3. En células de carcinoma hepatocelular HepG2, el AU indujo apoptosis por la activación de la caspasa-3, disminución de Bcl-2, aumento de Bax e inactivación de la vía de supervivencia PI3K/Akt y en células Huh7 derivadas del mismo carcinoma a través de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, interferencia en la relación de los niveles de expresión de moléculas pro-y antiapoptóticas de la familia Bcl-2, liberación del citocromo c mitocondrial al citosol, activación de la caspasa-9 y -3, suprimiendo la actividad de NF- κ B y la regulación baja de XIAP (Manu y Kuttan 2008; Tang y col, 2009; Wang y col, 2009; Xavier y col, 2009; Zhang y col, 2010). En células normales se desconoce el mecanismo de inducción de apoptosis del AU, sin embargo, por los datos previamente mencionados, podríamos sugerir que el AU al igual o en forma similar a las células tumorales, podría inducir liberación del citocromo c y otros factores pro-apoptóticos de la mitocondria por acción del Ca^{2+} , con la consiguiente activación de caspasas lo que daría como resultado la apoptosis celular. También podría ser a través de la inactivación de la vía de supervivencia PI3K/AKT, activación de la vía intrínseca con un aumento de Bax, disminución de Bcl-2 y la activación de las caspasas -9 y -3, suprimiendo la actividad de NF κ B y la regulación negativa de XIAP, la diferencia probablemente podría ser en la dosis necesaria como inductor para una célula normal y una célula cancerosa.

En los ensayos realizados para evaluar el efecto protector de las HSP60 de *K. pneumoniae* en la apoptosis inducida con el ácido ursólico en el cultivo primario de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano, se observó un bajo porcentaje de células apoptóticas en los testigos sin ningún estímulo, lo cual indica un adecuado control de los cultivos celulares y que el sistema empleado para evaluar este tipo de muerte funcionó de manera apropiada. Porcentajes similares a los testigos, se obtuvieron con los cultivos celulares que sólo se incubaron con las diferentes concentraciones de la proteína, lo que muestra que la HSP60 no tuvo efecto apoptótico en los fibroblastos sinoviales. Lo cual se puede atribuir a la función de la proteína como antígeno, que puede ser reconocida, procesada y presentada por células presentadoras de antígeno en moléculas de histocompatibilidad clase II y clase I a linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+, provocando la activación o proliferación celular, como lo reportado por nosotros, donde se observó proliferación y activación celular hacia estas proteínas en CMSP de pacientes con SpA y sujetos sanos (Domínguez-López, 1998; Vences-Velázquez, 2002; Zambrano-Zaragoza, 2005). En este caso el reconocimiento de las HSP por los fibroblastos sinoviales puede ser a través de los receptores de la familia TLR (TLR2 y/o TLR4) o CD91 como se ha reportado en la literatura (Hromadnikova y col, 2008). Además, se ha observado que los fibroblastos participan en la respuesta inmune de las articulaciones de pacientes con enfermedades reumáticas, lo que sugiere que pueden reconocer a las HSPs. En un modelo murino de artritis inducida con proteoglicano humano, la inmunización previa con la HSP70 micobacteriana induce in vitro respuesta proliferativa y respuesta humoral, con predominio del isotipo IgG1 de respuesta celular Th2 (Holló y col, 1999), lo cual apoya la inmunogenicidad que pueden tener las HSPs y su papel en la modulación de diversos procesos celulares.

Los resultados de la inducción de apoptosis con AU, en el cultivo primario de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano, mostraron un incremento significativo en el porcentaje de células apoptóticas con respecto a los testigos sin estímulo. Cuando las células se incubaron, previó a la inducción de apoptosis con el AU, con las diferentes concentraciones de la HSP60 de *K.*

pneumoniae el porcentaje de células apoptóticas disminuyó significativamente, lo que sugiere efecto protector de esta proteína en la apoptosis inducida con el AU en los fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano. El efecto protector de la HSP60 observado en estos ensayos, sugiere la interacción de las HSP60 a diferentes niveles de la cascada de activación de la apoptosis. Sin embargo, estas sugerencias en cuanto a la función de las HSP60 bacterianas, pueden requerir por un lado su unión a receptores presentes en las células, y por otro, su interiorización. Es posible que el efector protector se lleva a cabo por la interiorización de la proteína. Lo anterior lo respaldan los resultados obtenidos por Hromadnikova y col, 2008, donde encontraron una alta expresión del receptor CD91 en fibroblastos sinoviales obtenidos de pacientes con AR, molécula que puede llevar a cabo la endocitosis de la HSP70 mediada por receptor. Así como también los resultados obtenidos por nosotros donde observamos que para llevarse a cabo el efecto protector de la HSP60Kp en la apoptosis inducida con DXM en CMSP de sujetos sanos se requiere de la participación activa del citoesqueleto y por lo tanto la interiorización de la proteína (Ortega-Ortega, 2007). Además, se ha reportado que HSP exógenas pueden unirse y entrar a las células del huésped (Zhang y col, 2004). Una vez dentro la proteína podría estar participando en diferentes niveles de las vías de la apoptosis.

Los resultados obtenidos por RT-PCR sobre el efecto de la HSP60Kp en la expresión de genes anti-apoptóticos en la apoptosis inducida con AU en fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano nos muestran que el efecto protector de la proteína podría ser llevado a cabo mediante la regulación de la expresión de genes anti-apoptóticos principalmente por cIAP1, cIAP2 y Bcl-2, debido a que cuando las células se incuban previamente con la HSP60Kp y después se induce apoptosis con el AU la expresión de estos genes se ve aumentada de forma significativa cuando la comparamos con el testigo de inducción de apoptosis. Por lo tanto posiblemente la HSP60 de *K. pneumoniae* puede estar participando en la estabilización de cinasas como AKT, reportado en la literatura para las HSP endógenas (Chen y col, 2002; Park y col, 2003 y Parcellier y col, 2003) y así asegurar la fosforilación del inhibidor I κ B α para que

este libere a NFκB y pueda translocarse al núcleo para llevar a cabo la transcripción de genes anti-apoptóticos de la familia IAPs y Bcl-2. Lo anterior lo atribuimos, porque en ensayos realizados por nosotros (datos no reportados) sobre el efecto protector de la HSP60 de *K. pneumoniae* en la apoptosis inducida con DXM en CMSP observamos un aumento de IκBα fosforilado (Ser32) cuando las células se incubaron previamente con la proteína, lo cual nos lleva a sugerir que de forma similar, podría estar llevándose a cabo en los fibroblastos sinoviales un incremento en la fosforilación de IκBα. Sin embargo, para confirmar esto se tendrían que realizar ensayos a nivel de expresión de proteínas, para la activación de NFκB, así como de la expresión de proteínas cIAP1, cIAP2 y Bcl-2.

Los resultados obtenidos en este trabajo, nos sugieren cómo podría estar llevando a cabo su efecto protector la HSP60 de *K. pneumoniae*, sin embargo no descartan otras vías de señalización como en la vía extrínseca, donde la HSP60, podría interferir con la fosforilación de proteínas cinasas (JNK) lo que inhibe la fosforilación de moléculas pro-apoptóticas y por lo tanto, bloquea su función sobre la permeabilidad mitocondrial, evitando la salida de citocromo c, lo que se observa como una disminución en el porcentaje de células apoptóticas, este efecto podría ser muy similar a lo reportado con la HSP70 y la HSP27 de la célula (Beere, 2005). Otro punto donde podrían interactuar las HSP60 bacterianas, es en la unión del citocromo c con Apaf-1 e inhibiendo la formación del apoptosoma, bloqueando de esta manera la activación de procaspasa 9, en forma similar a lo reportado con las HSP70 y HSP90 de la célula eucarionte. Lo anterior, es probable que suceda por el hecho de que las HSP son evolutivamente conservadas y se ha reportado una alta homología entre las HSP bacterianas y las humanas.

VIII. CONCLUSIONES

- El ácido ursólico indujo apoptosis en el cultivo primario de fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano.
- La HSP60 de *K. pneumoniae* tiene efecto anti-apoptótico en la apoptosis inducida con ácido ursólico en fibroblastos sinoviales de ratón BALB/c sano y este efecto es dependiente de la concentración de la proteína.
- El efecto protector de la HSP60 *K. pneumoniae* en la apoptosis inducida con ácido ursólico en fibroblastos sinoviales puede ser a nivel de mensajero de moléculas anti-apoptóticas como cIAP-1, cIAP-2 y Bcl-2.

IX. REFERENCIAS

1. Arya R., Mallik M., Lakhotia S.C. (2007) Heat shock genes-integrating cell survival and death. *J. Biosci.* 32(3):595-610.
2. Baek J.H., Lee Y.S., Kang C.M., Kim J.A., Kwon K.S., Son H.C., Kim K.W. (1997) Intracellular Ca⁺ release mediates ursolic acid-induced apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *Int. J. Cancer.* 73:725-728.
3. Basso AD, Solit DB, Chiosis G, Giri B, Tsihchlis P, Rosen N. (2002). Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J Biol Chem.* 18; 277(42):39858-66.
4. Beere HM y Green DR. (2001). Stress Management-heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 11: 6-10.
5. Beere HM, Wolf BB, Cain, Kuwana, Tailor P, Morimoto R, Cohen G, y Green DR. (2000). Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the apaf-1 apoptosome. *Nat. Cell Biol.* 2: 469-475.
6. Beere HM. (2004). The stress of dying: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J. Cell Sci.* 117: 2641-2651.
7. Beere HM. (2005). Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J. Clin. Invest.* 115: 2633-2639.
8. Belles C., Kuhl A., Nosheny R. and Carding S.R. (1999) Plasma membrane expression of heat shock protein 60 in vivo in response to infection. *Infect Immun.* 67:4191-200
9. Brommer EJ, Dooijewaard BA, Dijkmans FC y Breedveld. (1992). Plasminogen activators in synovial fluid and plasma from patients with arthritis, *Ann. Rheum. Dis.* 51: 965-968.
10. Bukau B, Horwich AL, (1998). The Hsp70 y Hsp60 chaperone machines. *Cell.* 92: 351-366.

11. Caer F.R. (1994). Apoptosis. It's Significance in Cancer and Cancer Therapy. *Cancer*, 73: 2013-2026.
12. Charette SJ, Lavoie JN, Lambert H, Landry J. (2000). Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. *Mol Cell Biol.* 20: 7602-7612.
13. Chen G, Cao P y Goeddel DV. (2002). TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol. Cell.* 9:401-410.
14. Domínguez-López ML, Cancino Díaz ME, Jiménez-Zamudio L, Granados-Arriola J, Burgos-Vargas R, García-Latorre E. (2000). Cellular immune response to *Klebsiella pneumoniae* antigens in HLA-B27+ ankylosing spondylitis patients. *J. Rheumatol.* 27:1453-1460.
15. Domínguez-López ML, Burgos-Vargas R, Galicia-Serrano H, Bonilla-Sanchez MT, Rangel-Acosta HH, Cancino-Díaz ME, Jiménez-Zamudio L, Granados J, García-Latorre E. (2002). IgG antibodies to enterobacteria 60 kDa heat shock proteins in the sera of HLA-B27 positive ankylosing spondylitis patients. *Scand J Rheumatol.* 31:1-6.
16. Domínguez-López ML, Ortega-Ortega Y, Manríquez-Raya JC, Burgos-Vargas R, Vega-López A, García-Latorre E. (2009). Antibodies against recombinant heat shock proteins of 60 kDa from enterobacteria in the sera and synovial fluid of HLA-B27 positive ankylosing spondylitis patients. *Clin Exp Rheumatol.* 27(4):626-32.
17. Firestein GS. (1997). Rheumatoid synovitis and panus, *Rheumatology.* 5/13.1-5/13.5.
18. Garrido C, Bruey JM, Fromentin A, Hamman A, Arrigo AP y Solary E. (1999). HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *FASEB J.* 13: 2061-2070.
19. Gozani O, Boyce M, Yoo L, Karuman P y Yuan J. (2002). Life and death in paradise. *Nature Cell Biol.* 4: 159-162.
20. Green DR y Reed JC. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science.* 281: 1309-1312.

21. Green DR. (1998). Apoptotic pathways: The roads to ruin. *Cell*. 94: 695-698.
22. Groos A, McDonnell JM y Stanley JK. (1999). Bcl-2 Family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Dev*. 13: 1899-1911.
23. Gupta S. (2000). Suicidal journey in the Fas (t) track. *Rec Res Dev Immunol*. 2: 117-129.
24. Gusev N.B., Bogalcheva N.V. y Marston S.B. (2002). "Structure and properties of Small Heat Shock Proteins (sHSP) and Their Interaction with Cytoskeleton Proteins". *Biochemistry*. 67: 613-623.
25. Harmand P.O., Duvel R., Delage C., Simon A. (2005) Ursolic acid induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and caspase-3 activation in M4Beumelanoma cells. *Int J Cancer*. 114:1-11.
26. Hengartner MO. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776.
27. Hromadnikova I, Nguyen T, Zlacka D, Sedlackova L, Popelka S, Veigl D, Pech J, Vavrincova P, Sosna A. (2008). Expression of heat shock protein receptors on fibroblast-like synovial cells derived from rheumatoid arthritis-affected joints. *Rheumatol Int*. 28: 837-844.
28. Hunter JJ y Parlow TG. (1996). ECP-treated lymphocytes of chronic graft-versus-host disease patients undergo apoptosis wich involves both the Fas/FasL system and the Bcl-2 protein family. *J Biol Chem*. 271: 8521-8524.
29. Ikeda Y., Murakami A., Fujimura Y., Tachibana H., Yamada K., Masuda D., Hirano K., Yamashita S., Ohigashi H. (2007) Aggregated ursolic acid, a natural triterpenoid, induces IL-1beta release from murine peritoneal macrophages: role of CD36. *J Immunol*. 15; 178 (8):4854-64.
30. Itoh H., Kobayashi R., Wakui H., Komatsuda A., Ohtani H., Miura A.B., Otaka M., Masamune O., Andoh H., Koyama K. et al. (1995) Mammalian 60-kDa stress protein (chaperonin homolog). Identification, biochemical properties, and localization. *J Biol. Chem*. 2(270):13429-35.

31. Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase K y Nozawa-Inoue K. (2000). Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch. Histol. Cytol.* 63: 17-31
32. Jordán J. (2003). Apoptosis: muerte celular programada. *Bioquímica.* 22: 100-106.
33. Juarranz MG, Santiago B, Torroba M, Gutierrez-Cañas I, Palao G, Galindo M, Abad C, Martínez C, Leceta J, Pablos JL, Gomariz RP. (2004). Vasoactive intestinal peptide modulates proinflammatory mediator synthesis in osteoarthritic and rheumatoid synovial cells. *Rheumatology (Oxford)*, 43: 416-422.
34. Kerr J, Wyllie A, Currie A. (1972). Apoptosis: a basic biology phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26: 239-57.
35. Kirchhoff S.R., Gupta S., Knowlton A.A. (2002) Cytosolic heat shock protein 60, apoptosis, and myocardial injury. *Circulation.* 105 (24):899-904.
36. Kluck RM, Bossy-Wetzell E, Green DR y Newmeyer DD. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science.* 275: 1132-1326.
37. Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C. (2008). Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J Cell Mol Med.* 12 (3): 743-761.
38. Ladner MU, Ospelt C, Gay S, Distler O, Pap T. (2007). Cells of the synovium in rheumatoid arthritis Synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther.* 9: 223-232.
39. Lauthier F., Taillet L., Trouillas P., Delage C. y Simon A. (2000) Ursolic acid triggers calcium-dependent apoptosis in human Daudi cells. *Anti-cancer Drugs.* 11:737-745.
40. Lewis J, Devin A, Miller A, Lin Y, Rodríguez Y, Neckers L, Liu ZG. (2000). Disruption of hsp60 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis

- factor-induced nuclear factor-kappaB activation. *J Biol Chem.* 275: 10519-10526.
41. Li Z, Zhao X, y Wei Y. (2004). Regulation of apoptotic signal transduction pathways by the heat shock proteins. *Sci China C. Life Sci.* 47 (2): 107-114.
42. Li, GC. y Hahn, GM. (1990). Thermotolerance, thermoresistance and thermosensitization. In *Stress proteins in Biology and Medicine* (ed. R.I. Morimoto, A. Tissieres and C.E. Georgopoulos). Cold Spring Harbor, NY: *Cold Spring Harbor Press.* pp. 79-100.
43. Lin KM, Lin B, Lian IY, Mestril R, Scheffler IE y Dillmann WH. (2001). Combined and individual mitochondrial HSP60 and HSP10 expression in cardiac myocytes protects mitochondrial function and prevents apoptotic cell deaths induced by stimulated ischemia-reoxygenation. *Circulation.* 103, 1787-1792.
44. MacFarlane Marion y Williams Ann C. (2004). Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO rep* 5(7): 674-678.
45. Manu K.A., Kuttan G. (2008) Ursolic acid induces apoptosis by activating p53 and caspase-3 gene expressions and suppressing NF-kappaB mediated activation of bcl-2 in B16F-10 melanoma cells. *Int Immunopharmacol.* 8(7):974-981.
46. Mao H, Li F, Mosser DD, Schwartz JH, Wang Y y Borkan SC. (2003). Hsp72 inhibits focal adhesion kinase degradation in ATP-depleted renal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 278: 18214-18220.
47. Mor A, Abramson B y Pillinger HM. (2005). The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. *Clin. Immunol.* 115: 118-128.
48. Moreno EA, Cuéllar C, González DA. (2000). Métodos de detección de la apoptosis aplicaciones y limitaciones. *Rev Inst Nal Cancerol.* 46 (4), 275-280.
49. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI y Massie B. (2000). The chaperone function of Hsp70 is required para

- protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 20: 7146-7159.
50. Nakahara H, Nishimoto N. (2006). Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy in rheumatic diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 6: 373-381.
51. Newton K. y Strasser A. (2003). Caspases signal not only apoptosis but also antigen-induced activation in cells of the immune system. *Genes & Dev.* 17: 819-825.
52. Oltvai, Z.N., C.L. Milliman y S.J. Korsmeyer. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-619
53. Onishi Y y Kizaki H. (1994). Apoptosis and diseases. *Hum. Cell*: 7(1):27-32.
54. Ortega-Ortega Y. (2007). Participación de las proteínas de choque térmico de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* en la apoptosis inducida con dexametasona en células mononucleares. Tesis de maestría. ENCB.IPN.
55. Osborne B. (1996). Apoptosis and maintenance of homeostasis in the immune system. *Curr. Opin in Immunol.* 8(2): 245-254.
56. Osborne BA y Schwartz LM. (1994). Essential genes that regulate apoptosis. *Trends in Cell. Biol.* 4: 394-399.
57. Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM, Kumar V, Weichselbaum R, Nalin C, Alnemri E, Kufe D y Kharbanda S. (2000). Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J.* 19 (16):4310-4322.
58. Papa S y Skulachev VP. (1997). Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol. Cell Biochem.* 174 (1-2): 305-319
59. Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E y Garrido C. (2003). Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304: 505-512.

60. Parcellier A, Schmitt E, Gurbuxani S, Seigneurin-Berny D, Pance A, Chantome A, Plenchette S, Khochbin S, Solary E y Garrido C. (2003). HSP27 is a ubiquitin-binding protein Involved in I-kB α proteasomal degradation. *Mol. Cell. Biol.* 23: 5790-5802.
61. Park HS, Cho SG, Kim CK, Hwang HS, Noh KT, Kim MS, Huh SH, Kim MJ, Ryoo K, Kim EK, Kang WJ, Lee JS, Seo JS, Ko YG, Kim S, Choi EJ. (2002). Heat shock protein hsp72 is a negative regulator of apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol.* 22: 7721-7730.
62. Park KJ, Gaynor RB y Kwak YT. (2003). Heat shock protein 27 association with the I κ B kinase complex regulates tumor necrosis factor α -induced NF κ B activation. *J. Biol. Chem.* 278: 35273-35278.
63. Perkins ND. (2004). NF κ B: tumor promoter or suppressor. *Trends Cell Biol* 14: 64-69.
64. Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maise C, Daugas E, Zamzami N, Mark T, Jaattela M, Penninger JM, Garrido C, Kroemer G. (2001). Heat shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol.* 3: 839-843.
65. Salvesen GS y Duckett CS. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature Rev.* 3: 401-410.
66. Samali A, Cai J, Zhivotovsky B, Jones DP y Orrenius S. (1999). Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, HSP60 and HSP10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *EMBO J.* 18; 2040-2048.
67. Sánchez Torres Luvia E. y Vargas Diosdado F. (2003). Apoptosis el fenómeno y su determinación. *Tec Pecu Méx.* 41(1): 49-62.
68. Sando C. E. (2009) Ursolic acid. *J. Biol Chem.* 90: 477-495.
69. Sarkar S, Arya R y Lakhota SC. (2006). Chaperonins: In life and death; in Stress Response: A Molecular Biology Approach (eds) A S Sreedhar and U K Srinivas (Kerala, India: Research Signpost) pp 43-60.
70. Sato S, Fujita N y Tsuruo T. (2000). Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:10832-10837.

71. Savill J, Dransfield I, Gregory C y Haslett C. (2002). A Blast from the past: Clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nature*. 2: 965-975.
72. Savill J. (1997). Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *British Medical Bulletin*. 53 (3): 491-508.
73. Shan J.Z., Xuan Y.Y., Zheng S., Dong Q., Zhang S.Z. (2009) Ursolic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of HT-29 colon cancer cells by inhibiting the EGFR/MAPK pathway. *J Zhejiang Univ Sci B*. 10(9):668-74.
74. Simon, M.M., Reikerstorfer, A., Schwarz, A., Krone, C., Luger, T.A., Jaattela, M. y Schwarz, T. (1995). Heat shock 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release. *J. Clin. Invest.* 95: 926-933.
75. Steelman LS, Pohnert SC, Shelthon JG. (2004). JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/AKT y BCR_ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia*. 18: 189-218.
76. Tang C, Lu Y.H., Xie J.H., Wang F., Zou J.N., Yang J.S., Xing Y.Y., Xi T. (2009) Downregulation of survivin and activation of caspase-3 through the PI3K/Akt pathway in ursolic acid-induced HepG2 cell apoptosis. *Anticancer Drugs*. 20(4):249-58.
77. Telford WG, King LE, Fraker PJ. (1991). Evaluation of glucocorticoid-induced DNA fragmentation in mouse thymocytes by flow cytometry. *Cell Prolif*. 24: 447-459.
78. Tian Z., Lin G., Zheng R.X., Huang F., Yang M.S., Xiao P.G. (2006) Anti-hepatoma activity and mechanism of ursolic acid and its derivatives isolated from *Aralia decaisneana*. *World J Gastroenterol*. 14; 12(6):874-9.
79. Thome M y Tschopp J. (2001). Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nature*. 1: 50-54.
80. Trujillo-Vizuet MG. (2005). Efecto de las proteínas de choque térmico enterobacterianas sobre la apoptosis en células mononucleares de sangre periférica. Tesis de maestría. ENCB.IPN.

81. Van Molle W, Wielockx B, Mahieu T, Takada M, Taniguchi T, Sekikawa K y Libert C. (2002). HSP70 protects against TNF-induced lethal inflammatory shock. *Immunity* 16: 685-696
82. Vences-Velázquez A. (2002). Análisis de la activación y proliferación de células T de pacientes con espondilitis anquilosante en presencia de rHSP60 enterobacterianas. Tesis Maestría. IPN. México, D.F.
83. Wang X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & Dev.* 15: 2922-2933.
84. Wang Z, Malone M J, Thomenius F, Zhong F, Xu y Distelhorst. (2003). Dexamethasone-induced gene 2 (dig2) is a novel prosurvival stress gene induced rapidly by diverse apoptotic signals. *J. Biol. Chem.* 278: 27053-27058.
85. Wang X., Li L., Wang B., Xiang J. (2009) Effects of ursolic acid on the proliferation and apoptosis of human ovarian cancer cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 29(6):761-4.
86. Wymann M.P, Zvelebil M, Laffargue M. (2003). Phosphoinositide 3 kinase signaling which way to target. *Trends Pharmacol Sci* 7: 366-376.
87. Xanthoudakis S, Roy S, Rasper D, Hennessey T, Aubin Y, Cassady R, Tawa P, Ruel R, Rosen A y Nicholson DW. (1999). Hsp60 accelerates the maturation of pro caspasa-3 by upstream activator proteases during apoptosis. *EMBO J.* 18 (8): 2049-2056.
88. Xavier C.P., Lima C.F., Preto A., Seruca R., Fernandes F. M., Pereira W. C.(2009) Luteolin, quercetin and ursolic acid are potent inhibitors of proliferation and inducers of apoptosis in both KRAS and BRAF mutated human colorectal cancer cells. *Cancer Lett.* 28; 281(2):162-70.
89. Yang J, Khosravi-Far R, Chang HR y Baltimore D. (1997). Daxx, a novel fasbinding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell.* 89: 1066-1076.
90. Zambrano-Zaragoza F, García-Latorre E, Domínguez-López ML, Cancino-Díaz ME, Burgos-Vargas R, Jiménez-Zamudio L. (2005). CD4 and CD8 T cell response to the rHSP60 from *Klebsiella pneumoniae* in

- peripheral blood mononuclear cells from patients with ankylosing spondylitis. *Rev Invest Clin.* 57(4):555-562.
91. Zhang L, Pelech S y Uitto V. (2004). Bacterial GroEL heat shock protein 60 protects epithelial cells from stress-induced death through activation of ERK and inhibition of caspase 3. *Exp Cell Res.* 292: 231-240.
92. Zhang Y., Kong C., Zeng Y., Wang L., Li Z., Wang H., Xu C., Sun Y.(2010) Ursolic acid induces PC-3 cell apoptosis via activation of JNK and inhibition of Akt pathways in vitro. *Mol Carcinog.* 49(4):374-85.
93. Zimmermann T, Kunisch E, Pfeiffer R, Hirth A, Stahl DH, Sack U, Laube A, Liesaus E, Roth A, Palombo-Kinne E, Emmrich F y Kinne WR. (2001). Isolation and characterization of rheumatoid arthritis synovial fibroblast from primary culture-primary culture cells markedly differ from fourth-passage cells. *Arthritis Res.* 3:72-76.