



# Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias  
Escuela de Química y Farmacia

PROFESOR PATROCINANTE: Dr. Rafael Burgos A.  
INSTITUTO: Farmacología  
FACULTAD: Ciencias Veterinarias

PROFESOR CO-PATROCINANTE: Dr. Juan L. Hancke O.  
INSTITUTO: Farmacología  
FACULTAD: Ciencias Veterinarias

**“ROL DE MAPK-NF- $\kappa$ B SOBRE EL AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DE COX-2 EN  
CÉLULAS HL-60 DIFERENCIADAS A NEUTRÓFILOS ACTIVADAS CON PAF Y  
fMLP”**

Tesis presentada como parte de  
los requisitos para optar al  
Título de Químico Farmacéutico.

**JESSICA LORETO IGOR FLORES**

VALDIVIA-CHILE  
2005

*“ Hay un tiempo para cada cosa y un tiempo para hacerla bajo el cielo...”*

*Ec. 3, 1-2*

*Dedicada a mis Padres*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al realizar esta tesis muchas personas estuvieron involucradas tanto en la parte formativa como en la parte espiritual. Y en estas pocas líneas quiero agradecer en primer lugar al Dr. Burgos por darme un voto de confianza al aceptarme como su alumna tesista sin conocerme.

Dar gracias a Angélica por guiarme, aconsejarme, enseñarme y aguantarme durante todo este proceso formativo.

Al Dr. Hancke por su buen humor, su calidez y su forma distinta de ver la vida. Y a todos los integrantes del Instituto de Farmacología por hacer un ambiente ameno donde trabajar

Quiero agradecer a mis Padres y hermanos por que muchas veces cuando flaqueé y dude de mi, ellos estaban ahí para fortalecerme, apoyarme y darme las fuerzas para seguir.

También agradecer a todas mis amigas y amigos, que son los hermanos que uno elige en la vida, las personas que alimentan mi espíritu, los que están cuando hay tristezas y alegrías y que en este momento están contentos junto a mi.

Finalmente y no menos importante dar gracias a Dios por estar siempre conmigo, y al financiamiento de esta tesis FONDECYT 1010204.

## INDICE

Capítulo		Página
	Dedicatoria	
	Agradecimiento	
1.	RESUMEN .....	1
1.	SUMMARY .....	2
2.	ABREVIATURAS .....	3
3.	INTRODUCCION .....	4
3.1	Neutrófilos .....	4
3.2	Factor Activante Plaquetario.....	6
3.3	N-formil-meteonil-leucil-fenilalanina.....	8
3.4	Factor Nuclear-kB .....	9
3.5	COX-2 .....	11
3.6	HIPOTESIS .....	12
3.7	OBJETIVO GENERAL .....	12
3.7.1	Objetivos Específicos .....	12
4.	MATERIALES Y METODOS .....	13
4.1	Materiales .....	13

4.2	Métodos.....	14
4.2.1	Cultivo y diferenciación de células HL-60 .....	14
4.2.2	Condiciones Experimentales .....	15
4.2.2.1	Extractos citosólicos .....	15
4.2.2.2	Extractos totales .....	16
4.3	Western blot.....	16
4.4	Movilización de calcio intracelular .....	17
5.	Resultados.....	18
5.1	Movilización de calcio intracelular en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos estimuladas con fMLP y PAF.....	18
5.2	Fosforilación de las proteínas MAPK ERK1/2 y p38 en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos estimuladas con fMLP .....	20
5.3	Fosforilación de las proteínas MAPK ERK1/2 y p38 en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos estimuladas con PAF.....	22
5.4	Tiempo de Degradación de IKBa en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos estimuladas con PAF y fMLP .....	24
5.5	Rol de MAPK y PI3K en la degradación de IκBa en células HL 60 diferenciadas a neutrófilos estimuladas con PAF .....	27
5.6	Expresión de COX-2 en células HL-60 diferenciadas a Neutrófilos estimuladas con fMLP y PAF .....	30

5.7	Rol de MAPK y PI3K en la expresión de COX-2 en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos estimulados con fMLP.....	32
5.8	Efecto de andrografolido en la expresión de COX-2 en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos estimuladas con PAF y fMLP...	35
6.	DISCUSION .....	37
7.	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	42
8.	ANEXOS.....	51

## 1. RESUMEN

En este trabajo se estudió el efecto de fMLP y PAF sobre la expresión de COX-2 y la posible participación de la vía MAPK-NF- $\kappa$ B. Para este propósito se utilizaron células de la línea HL-60 diferenciadas a neutrófilos. Para demostrar la diferenciación se midió la movilización de  $[Ca^{++}]_i$  por espectrofluorescencia utilizando la sonda Fura-2AM, inducida por PAF y fMLP, además de la reducción de NBT. Posteriormente, las células HL-60 diferenciadas fueron estimuladas con PAF y fMLP para demostrar la activación de MAPK, la expresión de COX-2 y degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ . Algunos experimentos fueron realizados en presencia de inhibidores de MAPK, PI3K, NF- $\kappa$ B. Se analizó por western blot la fosforilación de las proteínas ERK1/2, p38, degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ , y expresión de COX-2.

Se observó que fMLP y PAF fosforilaron a las proteínas ERK1/2 y p38, que los dos estimulantes tienen la capacidad de activar NF- $\kappa$ B y de expresar COX-2. Se concluyó que la vía MAPK ERK1/2 controla la expresión de COX-2 en células HL-60 diferenciadas estimuladas con fMLP. Por su parte, PAF induce expresión de COX-2 a través de la ruta MAPK p38. Por último, la expresión de COX-2 inducida por PAF, esta regulada fuertemente por la activación de NF- $\kappa$ B, pero parece probable que existen otros factores de transcripción para regular la expresión de COX-2 cuando las células son activadas con fMLP.

## SUMMARY

In this work the effect of fMLP and PAF on the expression COX-2 and the participation of the MAPK-NF- $\kappa$ B pathway was studied. For this purpose cells of the line HL-60 differentiated to neutrophils were used. To demonstrate differentiation, the mobilization of  $[Ca^{++}]_i$  was measured by spectrofluorescence using the Fura-2AM probe induced by PAF and fMLP, and reduction of NBT. Then, the differentiated cells HL-60 were stimulated with PAF and fMLP to demonstrate the activation of MAPK, COX-2 expression, and I $\kappa$ B $\alpha$  degradation. Some experiments were achieved in presence of inhibitors of MAPK, PI3K, NF- $\kappa$ B, and the phosphorylated of the proteins ERK1/2, p38, I $\kappa$ B $\alpha$  degradation and COX-2 expression were analyzed by western blot.

It was observed that fMLP and PAF phosphorylated the ERK1/2 and p38 proteins, and have the ability to activate NF- $\kappa$ B and express COX-2. The fMLP and PAF pathway ERK1/2 MAPK controls the COX-2 expression in cells differentiated HL-60 stimulated with fMLP on the other hand PAF induces COX-2 expression through the p38 MAPK route. Finally, the expression of COX-2 induced by PAF, is significantly regulated by the activation of NF- $\kappa$ B, however, it is probable that other transcription factors regulate also the expression COX-2 when the cells are activated by fMLP.



## 2. ABREVIATURAS

<b>fMLP</b>	<b>N-formilmetionina-leucil-fenilalanina.</b>
<b>PAF</b>	<b>Factor activante plaquetario.</b>
<b>MAPK</b>	<b>Proteínas quinasas activadas por mitógeno</b>
<b>PI3K</b>	<b>Fosfatidil inositol 3 quinasa.</b>
<b>ERK1/2</b>	<b>Quinasas reguladas por señales extracelulares.</b>
<b>DMSO</b>	<b>Dimetilsulfoxido.</b>
<b>PLC</b>	<b>Fosfolipasa C.</b>
<b>PKC</b>	<b>Proteína quinasa C.</b>
<b>HBSS</b>	<b>Solución salina balanceada de Hank's.</b>
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	<b>Factor Nuclear Kappa B</b>
<b>COX-2</b>	<b>Ciclooxigenasa-2</b>
<b>HL-60</b>	<b>Human leukemia</b>
<b>LPS</b>	<b>Lipopolisacaridos</b>
<b>MEK</b>	<b>Quinasa extracelular mitógena</b>
<b>NBT</b>	<b>Reacción de nitroazul de tetrazolio</b>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>Interleuquina 1 beta</b>
<b>iNOS</b>	<b>Oxido nítrico sintasa</b>

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 Neutrófilos

El sistema inmune posee componentes moleculares (por ejemplo: complemento, anticuerpos, proteínas de fase aguda, citoquinas) y celulares. En este grupo se encuentran las células clasificadas como leucocitos polimorfonucleares (Edwards *et al* 1994). Dentro de éstos, los neutrófilos son un pilar fundamental en la respuesta efectiva contra las infecciones producidas por microorganismos extracelulares (Swain *et al*, 1998), como la mayoría de las bacterias y ciertos hongos (Edwards *et al*, 1994).

Los polimorfonucleares derivan de un progenitor mieloide en la medula ósea. Después de entrar al torrente circulatorio los neutrófilos se dividen en dos grupos; uno circulante y otro marginal. Estos compartimientos o grupos permanecen en un equilibrio dinámico que es importante en la respuesta ante cualquier lesión. Después de algunas horas en la circulación, los polimorfonucleares pasan a los tejidos. Los neutrófilos se caracterizan por un núcleo multilobulado, profusión de gránulos citoplasmáticos (primarios o azurófilos, secundarios o específicos y terciarios) y acúmulos de glucógeno; tienen escaso retículo endoplásmico, pocos ribosomas y algunas mitocondrias.

Al producirse una lesión hay un aumento de la adherencia de los polimorfonucleares al endotelio vascular (*marginación*), y la diapedesis a través de la pared de los vasos sanguíneos pequeños de los tejidos afectados. La adherencia es un prerequisite para la *migración* ulterior al compartimiento extravascular y su reversibilidad es crítica para la evolución normal de la respuesta inflamatoria (Patiño *et al*, 1991).

Los neutrófilos desarrollan diversas acciones que favorecen la destrucción de microorganismos como: degranulación lisosómica, producción de radicales libres de oxígeno, fagocitosis (Patiño *et al* 1991), síntesis y liberación de quimioquinas y otros mediadores pro-inflamatorios como por ejemplo TNF $\alpha$ , IL-1- $\alpha$  (Witko-Sarsat *et al* 2000, Kracht, *et al* 2002). Proteínas reguladas a nivel transcripcional y dependen de la activación del Factor de Transcripción Nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B) (Barnes *et al.*, 1997). Además los neutrófilos inducen enzimas tales como ciclooxigenasa (COX) y Oxido Nítrico sintasa (iNOS) cuyos productos son como prostaglandinas y oxido nítrico, respectivamente (Kracht, *et al* 2002).

Se ha evidenciado que los factores quimiotácticos aumentan la adherencia de los polimorfonucleares provocando un traslado de receptores a la superficie celular para C3bi, laminina desde los gránulos secundarios y terciarios. En este fenómeno interviene el endotelio y participa TNF $\alpha$  e IL-1- $\alpha$ . Las células endoteliales se vuelven adhesivas para leucocitos y empiezan a producir una serie de moléculas que amplifican el fenómeno inflamatorio (Patiño *et al* 1991).

Unas de las sustancias quimiotácticas más importantes son; Factor Activante Plaquetario (PAF), péptidos bacterianos (fMLP) (Patiño *et al* 1991).

### 3.2 Factor Activante Plaquetario

El Factor Activante Plaquetario cumple un importante rol en procesos inflamatorios y en la respuesta inmune. Durante la inflamación el PAF induce hipotensión, causa broncoconstricción y aumenta la permeabilidad vascular (Chao *et al* 1993).

El PAF (1-*O*-alquil-2-(*R*)acetil-gliceril-3-fosforilcolina) es uno de los más potentes fosfolípidos agonistas conocidos, es liberado por varios tipos de células como por ejemplo; macrófagos, plaquetas, basófilos, neutrófilos, eosinófilos y células endoteliales. Se produce por la ruptura de precursores de lípidos de la membrana plasmática (Prescott *et al*, 2000). Su precursor es 1- *O*-alquil-2- acil-glicerofosfocolina, lípidos que se encuentran en gran concentración en membranas de varios tipos de células. El PAF es sintetizado a partir de dicho sustrato en dos fases, la primera fase comprende la acción de la fosfolipasa  $A_2$  con la formación de liso-PAF y un ácido graso libre (ácido araquidónico). En los neutrófilos esta reacción es una importante fuente de ácido araquidónico, el cual es metabolizado hasta dar prostaglandinas y leucotrienos. En la segunda fase, liso-PAF es acetilado por acetil-CoA para formar el PAF. La síntesis del PAF puede ser estimulada durante las reacciones antígeno-anticuerpos o por otras sustancias como agentes quimiotácticos, trombina, colágeno, y autocoides (Goodman *et al*, 1996).

El paso inicial del PAF en la activación de polimorfonucleares es unirse a un receptor de siete dominios transmembrana, que activa la proteína heterotrimérica  $G_q$  (Chao *et al* 1993) y  $G\alpha_i$  en neutrófilos de bovino (Hidalgo *et al*, 2004), lo que produce una respuesta rápida que incluye adherencia, quimiotaxis, liberación de gránulos enzimáticos (Chao and Olson 1993; Ishii and Shimizu, 2000), PAF también produce efectos bioquímicos como activación de fosfolipasa C- $\gamma$  y fosfolipasa  $A_2$ , que lleva a la hidrólisis de fosfoinositol y liberación de ácido araquidónico,

respectivamente. También se produce un aumento de la concentración de calcio citosólico, y activación de proteínas quinasas (Chao *et al*, 1993), cambios de pHi, entre otros (Hidalgo *et al*, 2004).

Por otra parte, el PAF también produce fosforilación de proteínas en tirosina y de varias proteínas intracelulares, induce también activación de MAPK (ERK1/2) por la vía PI3K en neutrófilos de cobayo (Ferby *et al*, 1994). La proteína PI3K es una enzima heterodimérica que fosforila la posición D-3 de la cabeza inositol de lípidos fosfoinositidos. La familia PI3K comprende tres clases I, II, III (Fruman *et al*, 1998). La familia I es dividida dentro de subfamilias I<sub>A</sub> y I<sub>B</sub>, y hay cuatro isoformas de PI3K I conocidas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) todas expresadas en leucocitos (Wymann *et al*, 1998)

PAF además puede activar MKK3 para seguir con la fosforilación de p38 MAPK (Nick *et al*, 1997).

Las MAPK son una familia de proteínas que tiene tres distintos miembros ERK1/2 (p44/42), p38, JNK y estas pueden ser activadas por estrés físico-químico, lipopolisacáridos, citoquinas como por ejemplo; IL-1 y TNF $\alpha$ , PAF y fMLP (Krump, *et al* 1997).

De particular interés es la relativa incapacidad del neutrófilo para producir anión superóxido después de la estimulación con el PAF, bajo condiciones fisiológicas la liberación de anión superóxido inducida por PAF es mínima (Nick, *et al* 1997).

En células endoteliales el PAF provoca la expresión de genes proinflamatorios induciendo iNOS y COX-2 y se encuentra asociado a un aumento de la fosforilación de ERK1/2 (Marrche *et al*, 2002)

Además se describe que PAF en células de ovario de hamster regularía la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Kravchenko, *et al* 1995).

### 3.3 N-formil-metionil-leucil-fenilalanina

N-formil-metionil-leucil-fenilalanina es un péptido sintético homólogo a los péptidos originados en la lisis de bacterias. Este es un potente activador de los neutrófilos (Chao *et al*, 1993).

La estimulación de los neutrófilos con fMLP resulta en un extenso rango de respuestas funcionales incluyendo ensamblaje de actina, adherencia, entrada de calcio, quimiotaxis, producción de superóxido (fenómeno conocido como “estallido respiratorio”), liberación de gránulos enzimáticos (Nick *et al*, 1997) y fagocitosis (Avdi *et al*, 1996).

La activación de los neutrófilos con fMLP comienza con la unión de éste a su receptor de siete dominios transmembrana, que activa la proteína  $G_{i2}$  (Avdi *et al*, 1996), que a su vez activa la enzima PLC- $\gamma$  y su efecto neto es fosforilar otras enzimas intracelulares (Chao *et al* 1993), como son: PKC, p21, MAPK (Dewas, *et al* 2000). También a fMLP se le ha atribuido la generación de fosfato inositol, movilización de calcio, y activación de PLC- $\beta$ . Se ha demostrado la activación de PLD, PI3K. Se conoce que fMLP regula la vía de activación de Ras, Raf, MEK y MAPK (Avdi, *et al* 1996).

Se ha indicado que luego de la unión de fMLP a su receptor se inicia una secuencia de fosforilación de proteínas, eventos que incluyen la activación de la proteína kinasa dependiente Ras (Raf y MAP/ERK kinasa kinasa-1 (MEKK-1)) que fosforila y activa la MAP/ERK kinasa (MEK-1 y MEK-2) que activan la MAPK p42/44 (ERK). La activación de esta vía de kinasas es máximo entre 1-2 minutos después de la exposición con fMLP. Se reporta que fMLP activa fuertemente a las proteínas MAPK p38 y p42/44. La activación de ERK por fMLP ocurre a través

de la activación de MEK1/MEK2, mientras la activación de p38 por fMLP parece ocurrir a través de la activación de MKK3 (Nick *et al*, 1997)

Se ha descrito que la activación de p38 por fMLP está envuelto en la síntesis de IL-8 y TNF $\alpha$  en monocitos (You-Li Zu, *et al* 1998), también se ha demostrado que en neutrófilos estimulados con TNF $\alpha$  y fMLP induce la activación y traslocación nuclear del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (You-Li Zu, *et al* 1998, McDonald *et al*, 1997).

### **3.4 Factor Nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)**

El factor de Transcripción NF- $\kappa$ B es un importante regulador de genes envueltos en la respuesta inmune, apoptosis, proliferación celular (Matthew, *et al* 2000), y contribuyen a la patogénesis de procesos inflamatorios crónicos como por ejemplo; asma y artritis reumatoidea (Yamamoto *et al* 2001).

En neutrófilos, macrófagos, linfocitos, células endoteliales, epiteliales, mesenquimales, NF- $\kappa$ B puede ser activado por una variedad de estímulos patógenos, incluyendo productos bacterianos y proteínas virales, además de citoquinas, factores de crecimiento, isquemia/reperfusión, y estrés oxidativo. La activación coordinada que ocurre en casi todo los tipos celulares envuelve respuesta inflamatoria, que es una parte integral de la respuesta defensiva para patógenos y estrés (Makarov, 2001).

NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción que comprende la familia de proteínas Rel que incluyen RelA (p65), c-Rel, RelB, NF- $\kappa$ B1 (p50), y NF- $\kappa$ B2 (p52) (Makarov, 2001), todos tienen una región conservada de 300 aminoácidos amino-terminal conocida como Región de Homología Rel. Esta región es responsable de la unión al DNA, dimerización y localización nuclear (Simeonidis, *et al* 1999). La más abundante forma encontrada en células estimuladas es el

heterodímero RelA/ NF- $\kappa$ B1 (p65/p50). En células sin estímulos, NF- $\kappa$ B reside en el citoplasma en forma latente, y debe traslocarse hacia el núcleo para su función. La retención citoplasmática de NF- $\kappa$ B es proporcionada por la interacción con una proteína inhibitoria conocida como I $\kappa$ B (Makarov, 2001). Esta interacción tiene dos consecuencias funcionales, primero el complejo NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B está secuestrado en el citoplasma, porque las proteínas I $\kappa$ Bs enmascaran la señal de localización nuclear de NF- $\kappa$ B por medio de la interacción directa proteína-proteína; y segundo las proteínas I $\kappa$ Bs pueden inhibir la unión al DNA de NF- $\kappa$ B y promueve el transporte de NF- $\kappa$ B hacia el citoplasma (Simeonidis, *et al* 1999).

La familia I $\kappa$ B consiste de tres miembros: I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ ; las tres proteínas tienen diferencias sustanciales *in vivo*, I $\kappa$ B $\alpha$  es rápidamente degradada mientras que I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$  son degradadas con una cinética lenta. Entonces las proteínas I $\kappa$ Bs inhiben NF- $\kappa$ B con diferente eficiencia. Por ejemplo I $\kappa$ B $\alpha$  es un fuerte inhibidor de NF- $\kappa$ B con respecto a I $\kappa$ B $\beta$ , mientras que I $\kappa$ B $\epsilon$  entra al núcleo ineficientemente (Simeonidis, *et al* 1999).

El proceso de señalización inducido por I $\kappa$ B envuelve pasos consecutivos de fosforilación, ubiquitinación, y degradación proteasomal, que son controlados por tres largos complejos multiproteicos; llamados I $\kappa$ B kinasa (IKK). Parece probable que miembros de la familia MAP kinasa kinasa kinasa (MAPKKK) jueguen un rol importante en el control del complejo IKK kinasa (Dong *et al*, 2002).

Se ha descrito también que NF- $\kappa$ B estimula la expresión de enzimas cuyos productos contribuyen a la patogénesis del procesos inflamatorios, incluyendo la forma inducible de iNOS que genera óxido nítrico y la enzima inducible COX-2 (Yamamoto *et al*, 2001).



### 3.5 COX-2

Las ciclooxigenasas son las enzimas que catalizan el paso limitante de la síntesis de prostaglandinas, convirtiendo ácido araquidónico en prostaglandinas H<sub>2</sub> (Cao et al, 2002). Existen dos isoformas de estas enzimas, ciclooxigenasa-1 (COX-1) es expresada constitutivamente en células sanas, mientras que ciclooxigenasa-2 (COX-2) es inducida por estímulos pro-inflamatorios (Pang et al, 2003).

A pesar de la estructura similar entre las dos isoformas (Cao et al, 2002) existe un 60% de homología en aminoácidos (Versteeg et al, 1998), COX-1 y COX-2 difieren sustancialmente en la regulación de su expresión y sus roles en tejidos biológicos y enfermedades (Cao et al, 2002).

Los niveles de expresión de COX-1 permanecen considerablemente constantes y sólo aumenta después de la estimulación de las células con factores de crecimiento, citoquinas o agentes promotores de tumores. Se dice que COX-1 es esencial para las funciones primarias comunes, tales como: protección de la mucosa (Hinz *et al*, 2001), agregación plaquetaria y regulación del flujo renal sanguíneo (Versteeg et al, 1998).

COX-2 no es detectado en la mayoría de los tejidos, pero los niveles de expresión son inducidos rápidamente bajo estimulación de las células con varias sustancias, incluyendo lipopolisacáridos (Hinz *et al*, 2001), citoquinas, endotoxinas y factores de crecimiento (Versteeg *et al*, 1998).

Se han hechos grandes progresos en la comprensión de los roles funcionales de COX-2 en el crecimiento celular, muerte celular, movilidad celular y en cáncer. Estudios con esta enzima han generado alentadores resultados. Inhibidores no específicos de COX, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs), y recientemente desarrollados inhibidores específicos de

COX-2 han mostrado significantes efectos en reducir la incidencia y progresión de tumores en modelos animales y en tratamiento de pacientes con cáncer (Cao et al, 2002).

Todos los antecedentes sugieren que PAF y fMLP controlarían la expresión de genes a través de MAPK y NF- $\kappa$ B.

### **3.6 HIPÓTESIS**

**“fMLP y PAF aumentan la expresión de COX-2 en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos, a través de la vía MAPK- NF- $\kappa$ B”**

### **3.7 OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar la vía MAPK- NF- $\kappa$ B para ver la expresión de COX-2.

#### **3.7.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Evaluar la diferenciación de células HL-60 inducida por DMSO por medición de flujos de calcio
- Demostrar la expresión de COX-2 en células HL-60 diferenciadas estimuladas con PAF y fMLP.
- Evaluar el rol de NF- $\kappa$ B en la expresión de COX-2.
- Demostrar la participación de MAPK en la expresión de COX-2.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Materiales

#### Laboratorio Merck<sup>R</sup>

NaCl, HCl, KCl, Glicerol, Azul de bromofenol, NaMoO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, D-glucosa, Glicina, CaCl, DMSO, Etanol.

#### Laboratorio Winkler<sup>R</sup>

Ácido Acético, Tris, Acrilamida, Bisacrilamida, HEPEs, DTT, SDS, β-mercaptoetanol Reactivo de Bradford.

#### Calbiochem<sup>R</sup>

PMSF, NaVO<sub>3</sub>, UO126, fMLP, PAF.

#### Cell Signaling<sup>R</sup>

Anticuerpos anti-p-ERK1/2, anti-IgG rabbit unido a peroxidasa, anti-IgG mouse unido a peroxidasa, anti-p38, anti-p-p38.

#### Pharmacia Biotech<sup>R</sup>

Tween-20, Triton-100.

#### Santa Cruz<sup>R</sup>

Anticuerpo anti-ERK1/2, anti-IκBα

#### Promega<sup>R</sup>

LY294002, SB203580

#### Sigma<sup>R</sup>

Anti-Actina, Digitonina, Albumina de Bovino

#### Amershan Life Science<sup>R</sup>

EGTA

## **Otros Laboratorios**

Inhibidores de proteasas **Roche<sup>R</sup>**, Metanol **TCL**, Leche Svelty **Nestlé<sup>R</sup>**, TEMED **BiosChile<sup>R</sup>**, COX-2 **Cayman Chemical Company<sup>R</sup>**, FURA-2AM **Molecular Probes<sup>R</sup>**, Chemiluminescence **Perkin Elmer Life Science<sup>R</sup>**.

## **Eppendorf<sup>R</sup>**

Centrífuga 5702, Tubos eppendorf 600 µl, 1.5, 2.0 ml.

## **Hettich<sup>R</sup>**

Centrífuga EBA 12, Centrífuga Mikro 22R.

## **Perkin Elmer<sup>R</sup>**

Espectrofluorimetro LS55, Espectrofotometro.

## **BOECO<sup>R</sup>**

Pipetas automáticas 1,50, 200, 1000 µl, Vortex V-1.

## **Otros materiales**

Baño termoregulado Memmert, Balanza analítica Scientech, Películas Autoradiograficas Kodak, Tubos falcon 15 y 50 ml, Pipetas Pasteur, Cámara de Neubauer, Microscopio óptico Motic.

## **4.2 Métodos**

### **4.2.1 Cultivo y diferenciación de células HL-60**

En la parte experimental se usó la línea celular de origen mieloide HL-60 proveniente de una leucemia mieloide aguda, como modelo de trabajo para los experimentos con PAF y fMLP. Esta línea celular fue diferenciada a neutrófilos en presencia de 1,3% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Santos-Beneit *et al.*, 2000), y es el modelo más apropiado y utilizado para el estudio de procesos celulares del neutrófilo. Las células HL-60 se mantuvieron en medio RPMI-1640

suplementado con 2 mM L-glutamina, 10% de suero fetal de ternero inactivado por temperatura y antibióticos, en condiciones de cultivo de 5% CO<sub>2</sub> y 37° C. Las células fueron diferenciadas a neutrófilos por incubación con 1.3% de DMSO durante 5 días, donde las células HL-60 adquieren las características morfológicas y génicas de neutrófilos maduros, como lo describen Santos-Beneit *et al.*, (2000). Al quinto día se analizó la diferenciación a neutrófilos mediante la técnica de Reducción de Nitroazul de Tetrazolio (NBT)

## **4.2.2 Condiciones experimentales**

### **4.2.2.1 Extractos citosólicos**

Las células HL-60 diferenciadas a neutrófilos  $5 \times 10^6$  fueron incubadas con PAF y fMLP a 37°C a distintos tiempos, para obtener el tiempo de degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ . Conocido este, las células fueron pretratadas con inhibidores UO126 (1 $\mu$ M) que inhibe MEK1/2; SB203580 (10 $\mu$ M) que bloquea a p38; LY 294002 (10 $\mu$ M) que inhibe PI3K, y estimuladas con PAF y fMLP (0.1 $\mu$ M). Después las células fueron lavadas con PBS 1X. Luego las células fueron lisadas con *buffer A* (Hepes 10mM; KCl 10 mM; EDTA 0.1Mm; EGTA 0.1 Mm; DTT 1Mm; PMSF 0.5 Mm; NaVO<sub>4</sub> 1mM; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 10mM; Inh. Prot. 10 $\mu$ g/ml; NaF 5mM), se agregó nonidet-P40, las células fueron centrifugadas a 500xg por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante corresponde a los extractos citosólicos. Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford y los extractos fueron almacenados a -80°C.

#### 4.2.2.2 Extractos totales

Para estos experimentos se usaron  $5 \times 10^6$  de células, estas fueron pretratadas 10 minutos con diferentes inhibidores LY294002 ( $10 \mu\text{M}$ ), SB203580 ( $10 \mu\text{M}$ ), UO126 ( $1 \mu\text{M}$ ), luego incubadas con PAF y fMLP ( $0.1 \mu\text{M}$ ) por dos horas a  $37^\circ\text{C}$ . Cumplido este tiempo las células fueron centrifugadas a  $500 \times g$  durante 5 minutos. Después las células fueron lisadas con *buffer de lisis* (Tris HCl  $0.5 \text{M}$  pH 7.4; EDTA  $0.5 \text{M}$ ; EGTA  $0.25 \text{M}$ ; Inh. Prot  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ; NaF  $0.5 \text{M}$ ;  $\text{NaVO}_4$   $0.2 \text{M}$ ; PMSF  $100 \text{mM}$ ; DTT  $100 \text{mM}$ ; Triton x-100) durante 45 minutos, centrifugadas a  $22000 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$  por 45 minutos. El sobrenadante son los extractos totales. Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford y guardadas a  $-80^\circ\text{C}$ .

#### 4.3 Western blot

Las proteínas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalante a 90 volt en buffer de corrida 1X (anexo 8.1), la cantidad de proteínas para el análisis de COX-2 fueron  $80 \mu\text{g}$  y para la determinación de  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$   $40 \mu\text{g}$ . Luego electrotransferidas a membrana de nitrocelulosa a  $0.02 \text{ A}$  por 140 minutos, en buffer de transferencia (anexo 8.2). La membrana fue bloqueada con buffer de bloqueo (anexo 8.5) por lo menos una hora. Luego incubada toda la noche con anticuerpos para anti-COX-2 (1:1000), anti- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  (1:2000), después lavadas tres veces con TBS-T (anexo 8.4), seguido por la incubación de una hora y media con un anticuerpo secundario unido a peroxidasa, lavadas tres veces con TBS-T, y finalmente reveladas mediante quimioluminiscencia (ECL). Como control de la cantidad de proteínas en el gel, se removieron los anticuerpos con solución *stripping* (SDS; Tris  $62.5 \text{mM}$ ;  $\beta$ -mercaptoetanol) durante dos horas, seguido de lavados con TBS-T a lo menos dos horas, la membrana es fue bloqueada por una hora, incubada toda la noche con anticuerpo anti-actina

(1:20000), luego lavada tres veces con TBS-T, y vuelta a incubar por al menos una hora y media con anticuerpo secundario unido a peroxidasa, lavado tres veces con TBS-T, y revelado por quimioluminiscencia. Se realizó un análisis densitométrico de las señales obtenidas con cada anticuerpo, utilizando el programa SCION-IMAGE, del NIH.

#### **4.4 Movilización de Calcio intracelular**

Se resuspendieron las células HL-60 diferenciadas a neutrófilos en  $20 \times 10^6$ /ml de en HBSS/ $\text{Ca}^{++}$  (anexo 8.6). Se incubaron 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  a una concentración de  $2 \mu\text{M}$  FURA-2AM. Se lavaron y se reconstituyó el pellet de células en HBSS/ $\text{Ca}^{++}$   $2 \times 10^6$ /ml. Se midió la fluorescencia en el espectrofluorímetro termoregulado con agitador magnético a 340 nm y 380 nm de excitación y 509 nm de emisión, se usaron 2ml de células por cubeta  $2 \times 10^6$  células.

## **5. RESULTADOS**

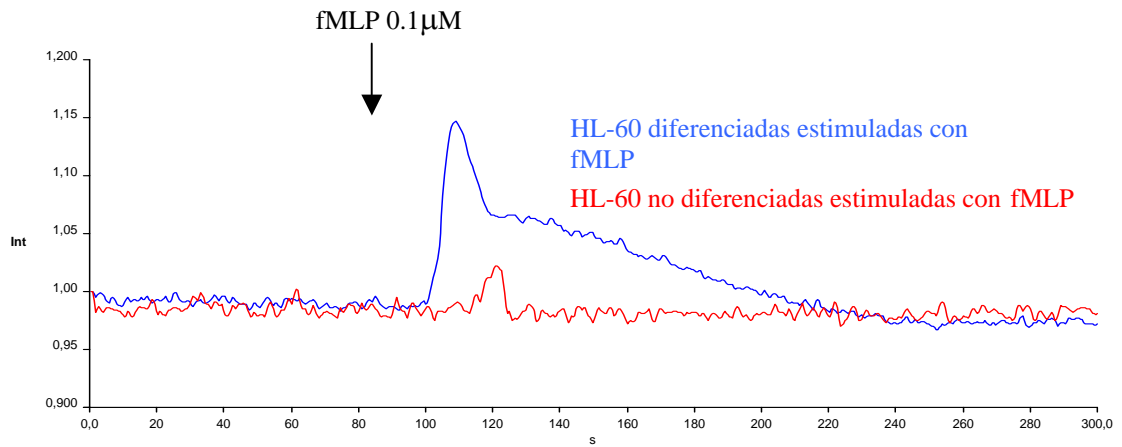
### **5.1 Movilización de calcio intracelular en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos estimuladas con fMLP y PAF**

La movilización de Calcio intracelular en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos fue analizada con Fura-2, y estimuladas con PAF y fMLP a la concentración de  $0.1\mu\text{M}$

En la figura 1A y 1B se observa que fMLP y PAF, producen un rápido aumento de Calcio intracelular, en células diferenciadas comparación con las células HL-60 no diferenciadas, donde no produce ningún movimiento.



A



B

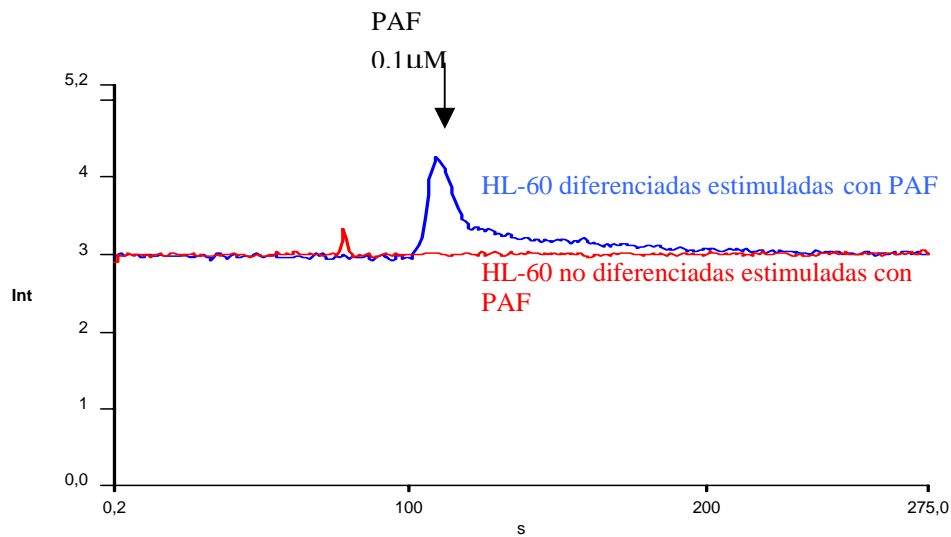


Figura 1. A: se ve la rápida movilización de Calcio intracelular en el tiempo inducido por fMLP en células diferenciadas y no diferenciadas, marcadas con Fura 2AM, monitoreado fluorimétricamente. B: se observa la rápida movilización de Calcio intracelular en el tiempo inducido por PAF en células diferenciadas y no diferenciadas, marcadas con Fura 2AM, monitoreado fluorimétricamente.

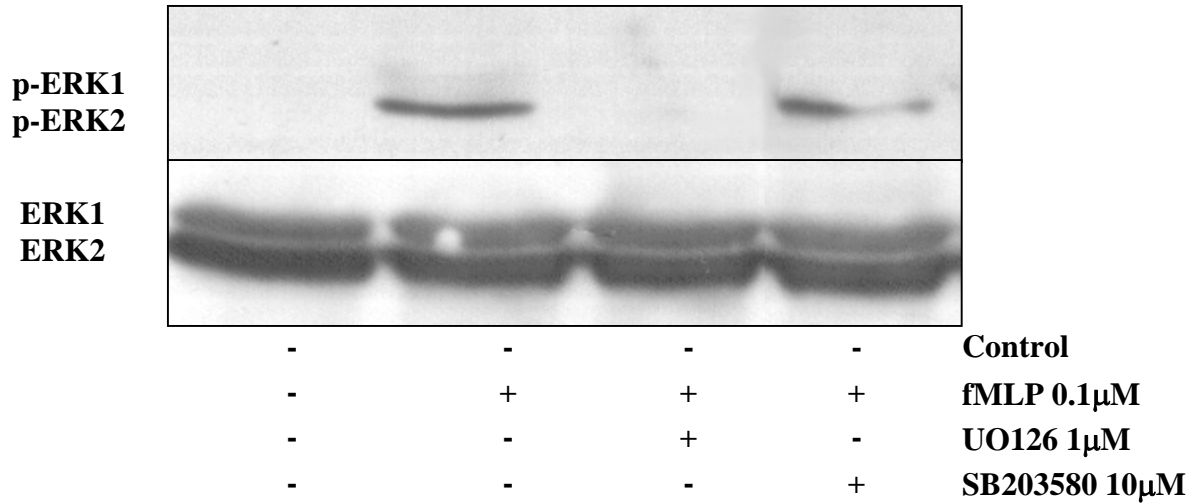
## **5.2 Fosforilación de las proteínas MAPK ERK1/2 y p38 en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos estimuladas con fMLP.**

El estado de fosforilación de las proteínas MAPK ERK1/2 y p38 se evaluó en dos distintos experimentos (ver figura 2A y 2B).

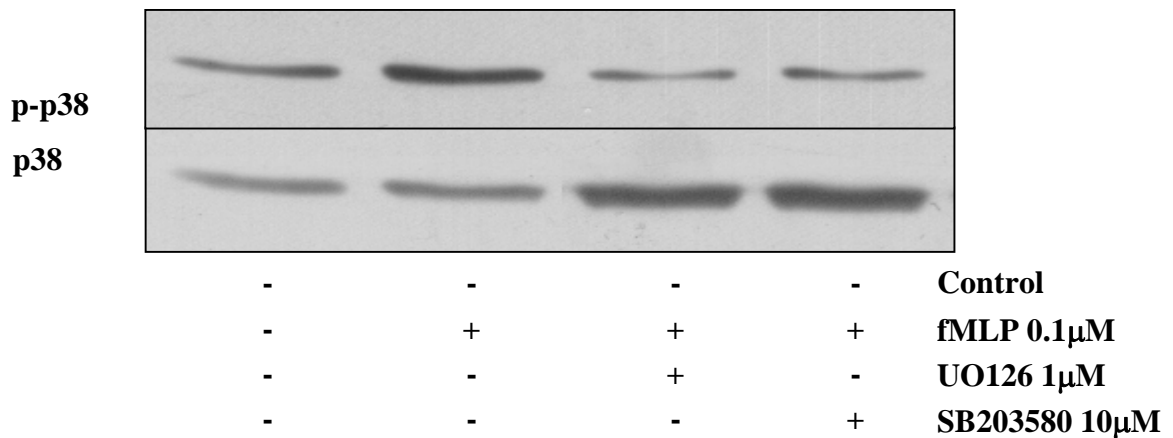
Primero las células HL-60 diferenciadas a neutrófilos fueron preincubadas durante 15 minutos con dos distintos inhibidores, SB203580, a una concentración de 10 $\mu$ M y UO126, a la concentración de 0.1 $\mu$ M. Luego las células fueron estimuladas con fMLP a la concentración de 0.1 $\mu$ M durante 2 minutos, y analizadas por inmunoblot con distintos anticuerpos. Para la fosforilación de las proteínas se ocupó anti fosfo-p38, anti fosfo-ERK1/2, y para ver la cantidad total de proteínas ERK1/2, p38.

En la figura 2. A: se observó que fMLP tuvo la capacidad de fosforilar la proteína ERK1/2. Al usar bloqueadores para la vía MAPK se ve la completa inhibición de la activación de la proteína ERK1/2 con el bloqueador UO126 en comparación con la fosforilación que se produce con el inhibidor SB203580. B: se ve que fMLP fosforila fuertemente a la proteína p38 y al usar los inhibidores UO126 y SB203580 se ve la disminución de la activación de la proteína p38 con los dos bloqueadores, resultado no esperado por que UO126 es un inhibidor de MEK1/2 y no de p38.

A



B



**Figura 2.** A: se observa por western blot el efecto de los inhibidores UO126 (1  $\mu$ M) y SB203580 (10  $\mu$ M) sobre la fosforilación de las proteínas MAPK ERK1/2, estimuladas con 0.1 $\mu$ M de fMLP y en B: Efecto de los inhibidores UO126 (1  $\mu$ M) y SB203580 (10  $\mu$ M) sobre la fosforilación de las proteínas MAPK p38, estimuladas con 0.1 $\mu$ M de fMLP.

### **5.3 Fosforilación de las proteínas MAPK ERK1/2 y p38 en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos estimuladas con PAF.**

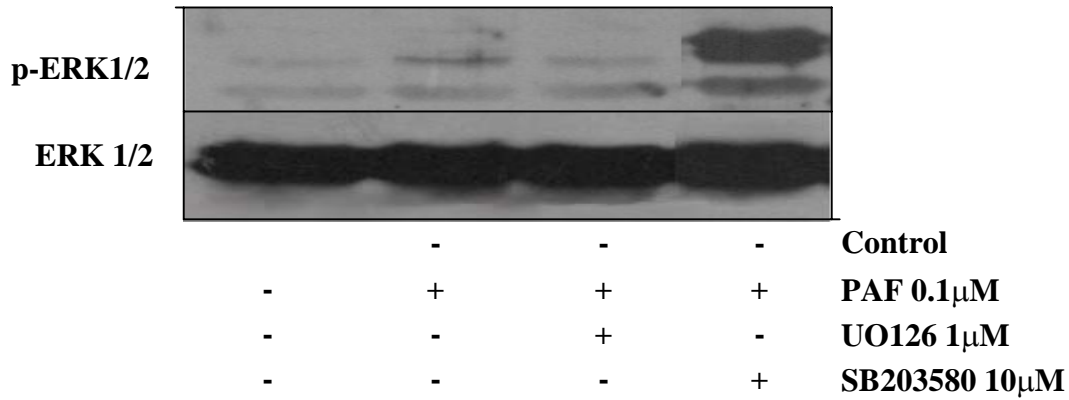
El estado de fosforilación de las proteínas MAPK ERK1/2 y p38 se evaluó en dos distintos experimentos (ver figura 3A y 3B).

Las células HL-60 diferenciadas a neutrófilos fueron preincubadas durante 15 minutos con dos distintos inhibidores, SB203580, a una concentración de 10 $\mu$ M y UO126, a la concentración de 0.1 $\mu$ M. Luego las células fueron estimuladas con PAF a la concentración de 0.1 $\mu$ M durante 2 minutos, y analizadas por inmunoblot con distintos anticuerpos. Para la fosforilación de las proteínas se ocupó anti fosfo-p38, anti fosfo-ERK1/2, y para ver la cantidad total de proteínas ERK1/2, p38.

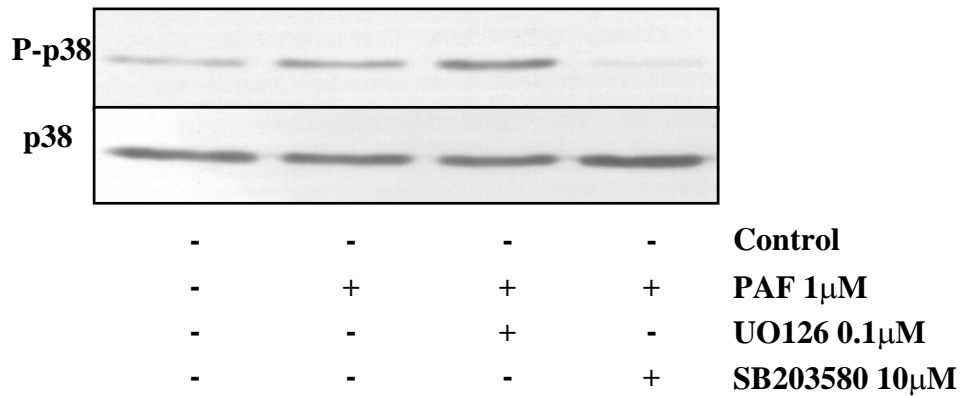
En la figura 3A se ve que PAF activó levemente a la proteína ERK1/2, y que el inhibidor UO126 disminuyó la fosforilación de la proteína ERK1/2, no así SB203580 que muestra una fuerte fosforilación.

En la siguiente figura 3B se demuestra que PAF activa a la proteína p38 y al bloquear esta proteína con SB203580 se produce una inhibición completa, la cual no se observa en el carril que presenta el inhibidor UO126.

A



B



**Figura 3.** A: se observa mediante western blot el efecto de los inhibidores UO126 (1 μM) y SB203580 (10 μM) sobre la fosforilación de las proteínas MAPK ERK1/2, estimuladas con 0.1 μM de PAF y en B: Observa el efecto de los inhibidores UO126 (1 μM) y SB203580 (10 μM) sobre la fosforilación de las proteínas MAPK p38, estimuladas con 0.1 μM de fMLP.

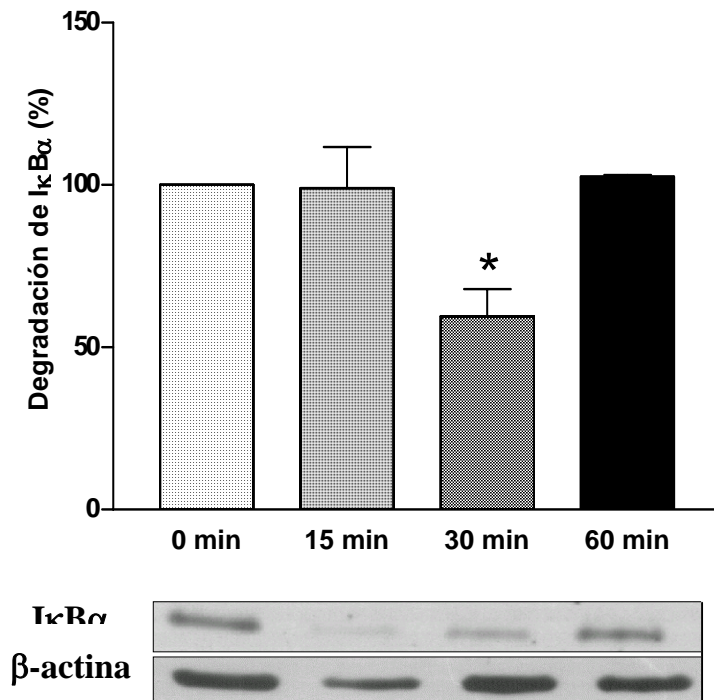
#### **5.4 Tiempo de Degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos estimuladas con PAF y fMLP**

Para analizar la activación de NF- $\kappa$ B, primero se evaluó el tiempo de degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  (ver figuras 4 y 5).

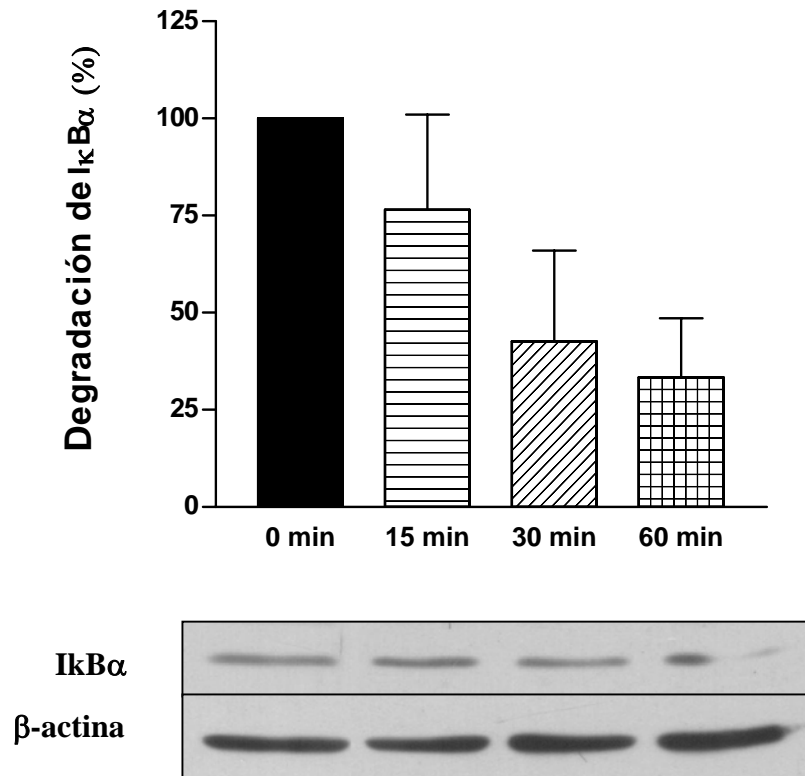
Las células HL-60 diferenciadas a neutrófilos fueron estimuladas con PAF y fMLP a la concentración de 0.1 $\mu$ M durante distintos tiempos 15, 30, 60 minutos; luego las células fueron lisadas con buffer A para obtener los extractos citosólicos. Las proteínas fueron analizadas por inmunoblot. Tratadas con anticuerpos anti-I $\kappa$ B $\alpha$  y detectadas con quimioluminiscencia. Como control de la cantidad de proteína cargada en cada carril se usó  $\beta$ -actina.

El tiempo de degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  en el citosol en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos estimuladas con PAF se puede ver en la figura 4 que se produjo a los 30 minutos, aumentando la cantidad de proteína a la hora de estimulación.

En la figura 5 las células estimuladas con fMLP mostraron una disminución de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  también a los 30 minutos, que siguió disminuyendo hasta los 60 minutos.



**Figura 4:** Degradación de la proteína IκBα en el tiempo, inducido por la estimulación de PAF 0.1 μM en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos. Cada barra del gráfico representa el promedio de al menos tres experimentos con su desviación estándar. \* p<0.05



**Figura 5:** Degradación de la proteína IκBα en el tiempo, inducido por la estimulación de fMLP 0.1 μM en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos. Cada barra del gráfico representa un promedio de dos experimentos con su desviación estándar.



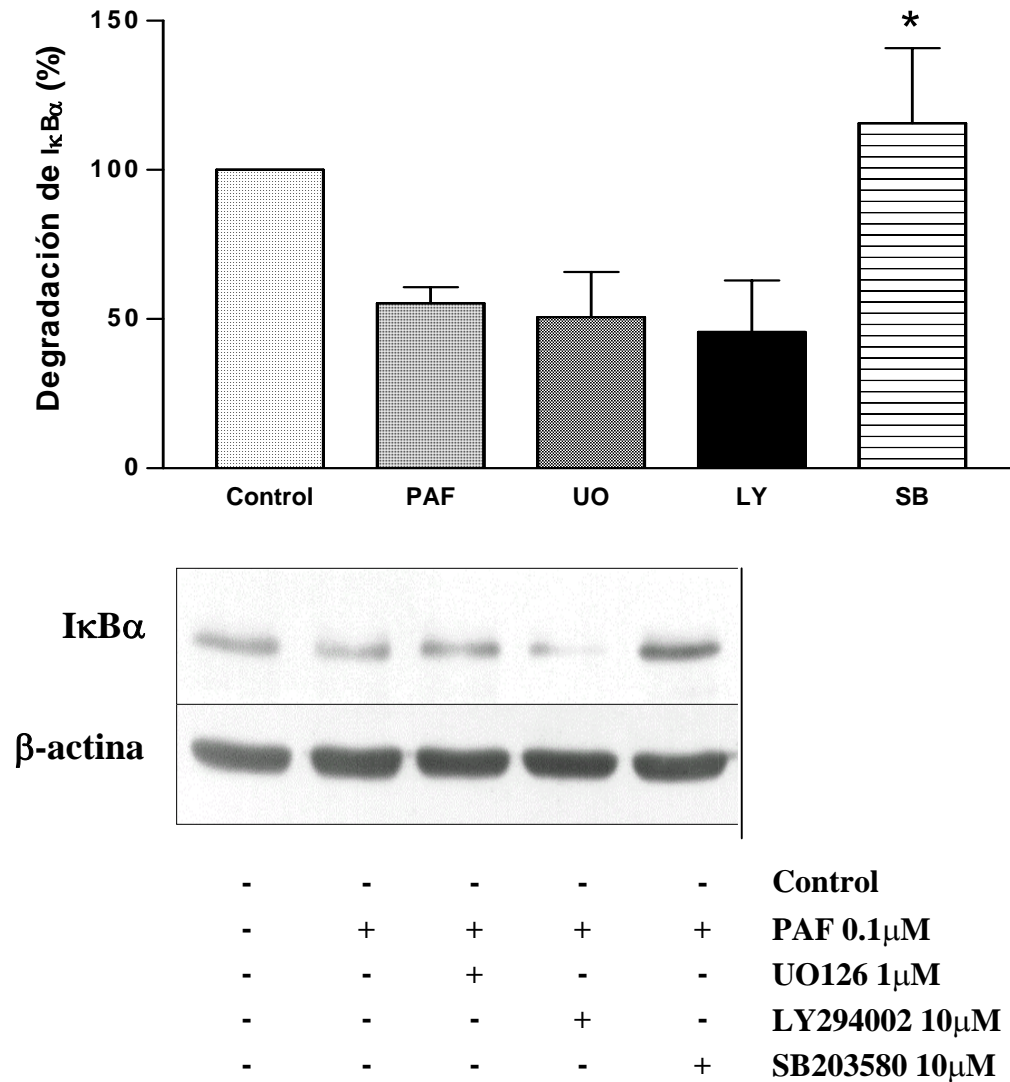
### **5.5 Rol de MAPK y PI3K en la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos estimuladas con PAF y fMLP.**

Para observar el rol que cumple la vía MAPK (ERK1/2, p38) y PI3K en la activación de NF- $\kappa$ B se evaluó la degradación de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$ . (Ver figura 6 y 7).

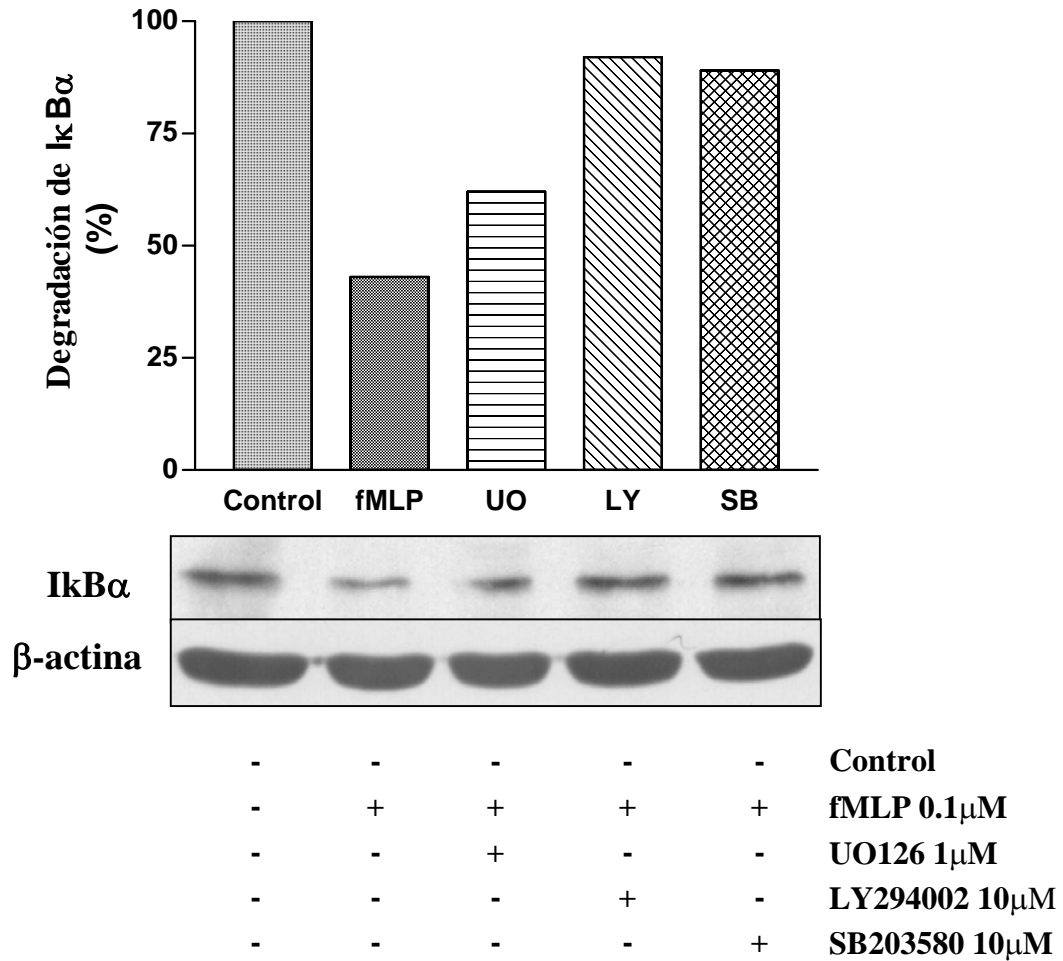
Las células HL-60 diferenciadas a neutrófilos fueron pretratadas con distintos inhibidores, SB203580 a la concentración de 10 $\mu$ M; UO126 a una concentración de 1 $\mu$ M y LY294002 a la concentración de 10 $\mu$ M. Luego las células fueron estimuladas por media hora con 0.1 $\mu$ M de PAF y fMLP, lisadas con buffer A para obtener extractos citosólicos. Estos fueron analizados por western blot. Tratados con anticuerpos anti-I $\kappa$ B $\alpha$  detectadas con quimioluminiscencia. Como control de la cantidad de proteína cargada en cada carril  $\beta$ -actina.

La figura 6 muestra que PAF activó NF- $\kappa$ B por la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ , y la vía por la cual se produjo esta activación fue a través de la proteína p38, porque ésta al ser inhibida no produce la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ .

En la figura 7 se muestra que fMLP tuvo la capacidad de degradar I $\kappa$ B $\alpha$  y que fMLP activó a NF- $\kappa$ B por dos vías que son PI3K y p38, porque al ser bloqueadas no produce la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ .



**Figura 6:** Efecto de los distintos inhibidores SB203580, UO126, LY294002 sobre la degradación de IκBα, en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos estimuladas con 0.1μM de PAF durante 30 minutos. Cada barra del gráfico representa mínimo 3 experimentos por separado, con su respectiva desviación estándar. \* p<0.05



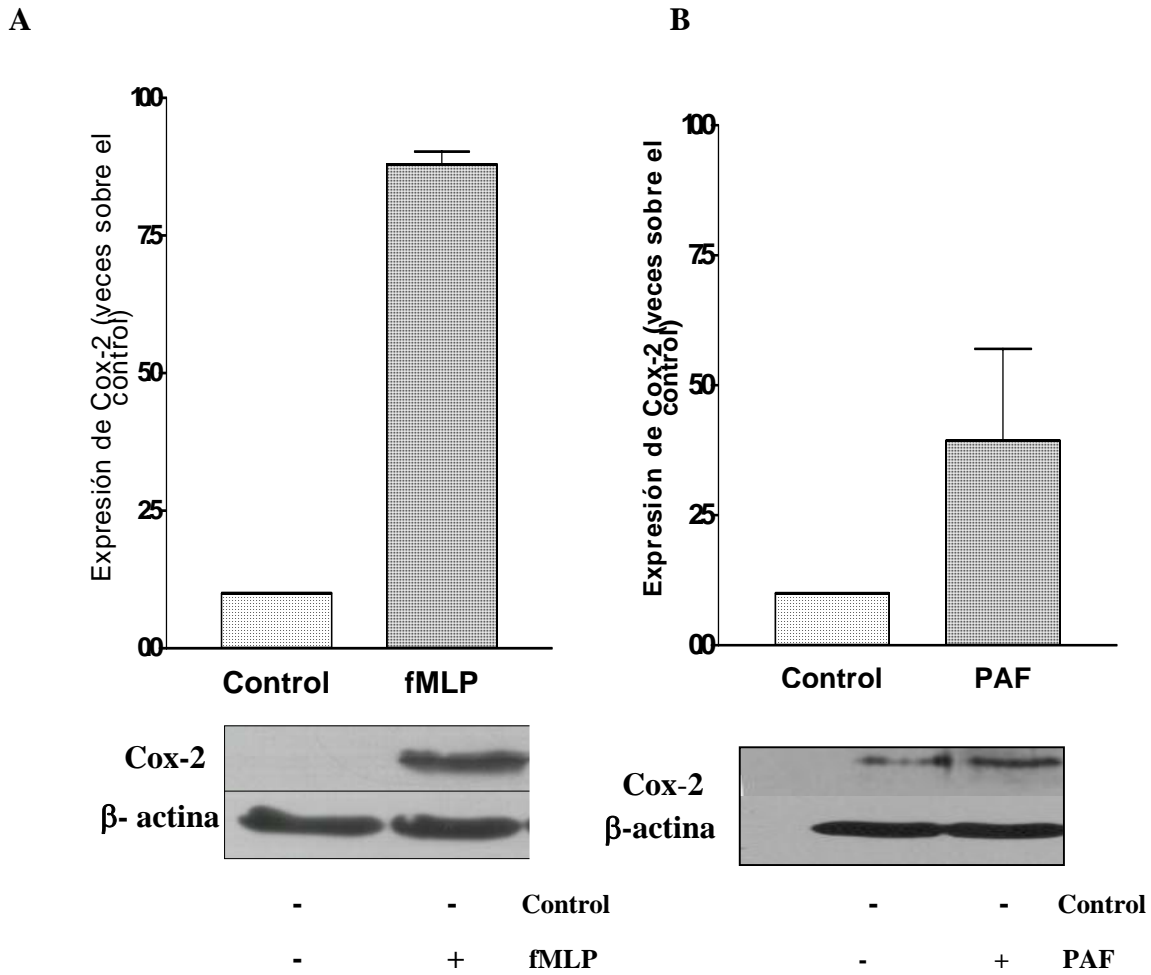
**Figura 7:** Efecto de los distintos inhibidores SB203580, UO126, LY294002 sobre la degradación de IκBα, en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos estimuladas con 0.1μM de fMLP durante 30 minutos. Cada barra del gráfico representa a un solo experimento.

## **5.6 Expresión de COX-2 en células HL-60 diferenciadas a Neutrófilos estimuladas con fMLP y PAF**

La expresión de COX-2 en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos se evaluó teniendo en cuenta que estas células presentan sin estímulos bajos niveles de la proteína COX-2 y al ser estimuladas con fMLP y PAF hay una fuerte expresión de esta enzima.

En las figuras 8 y 9 las células HL-60 diferenciadas a neutrófilos fueron estimuladas con 0.1 $\mu$ M de fMLP y PAF durante dos horas, luego las células fueron lisadas con buffer de lisis para la obtención de proteínas totales. Estas fueron analizadas por inmunoblot. Tratadas con anticuerpos anti-COX-2 y como control de la cantidad de proteínas  $\beta$ -actina.

Al estimular las células HL-60 diferenciadas a neutrófilos con fMLP (ver figura 8) se observa una fuerte expresión de la proteína COX-2 con respecto al control, cuando las células fueron estimuladas con PAF como se observó en la figura 9 que este estímulo también indujo la enzima COX-2, pero con menor intensidad que el estímulo anterior.



**Figura 8** A: Efecto de fMLP (0.1 $\mu$ M) sobre la expresión de COX-2, en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos luego de 2 horas de estímulo. B: efecto de PAF (0.1 $\mu$ M) sobre la expresión de COX-2, en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos luego de 2 horas de estímulo. Cada barra representa el promedio de al menos tres experimentos.

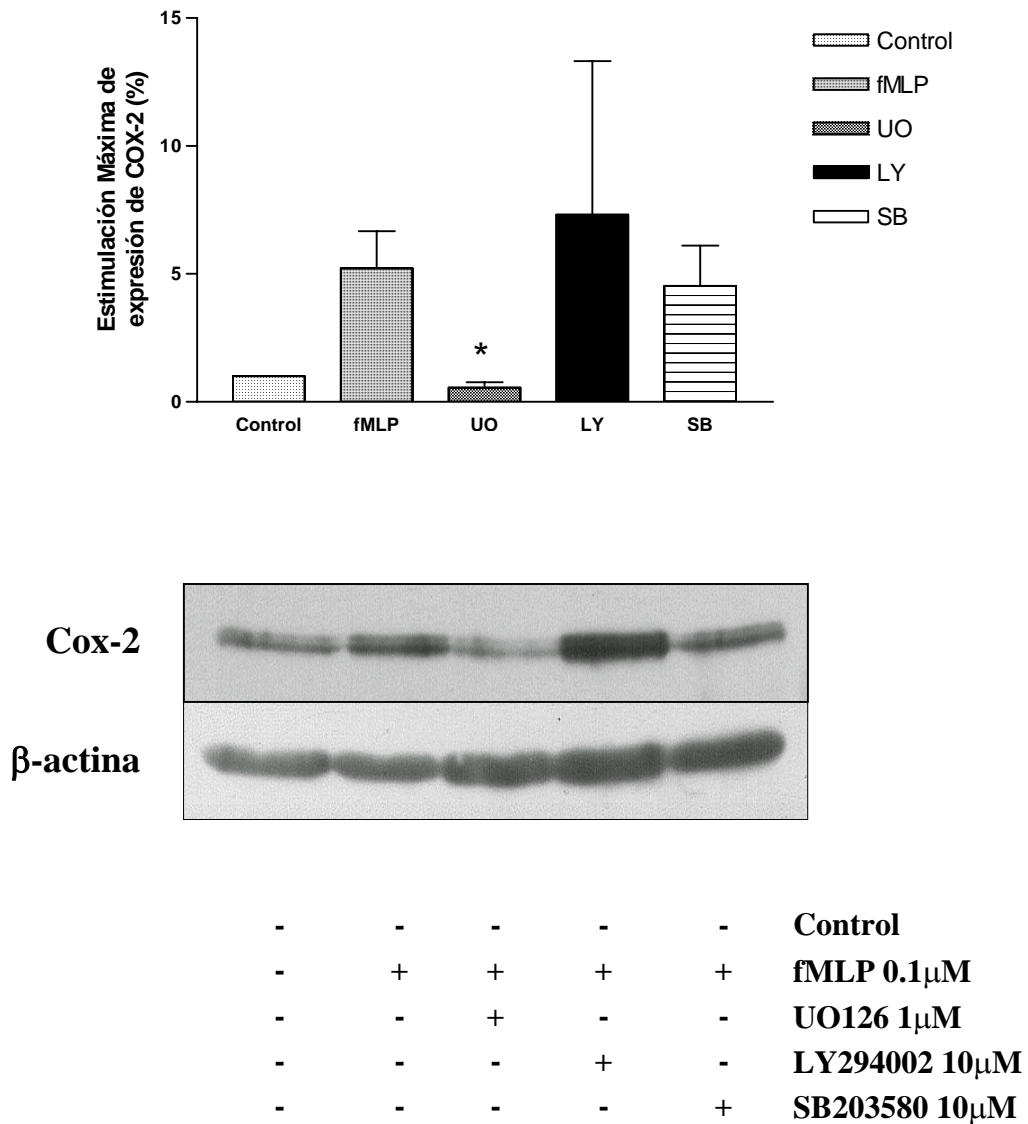
### **5.7 Rol de MAPK y PI3K en la expresión de COX-2 en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos estimulados con fMLP y PAF**

Los neutrófilos producen grandes cantidades de prostanoïdes, en respuesta de distintos estímulos. Esta inducción es causando por la expresión de la proteína COX-2.

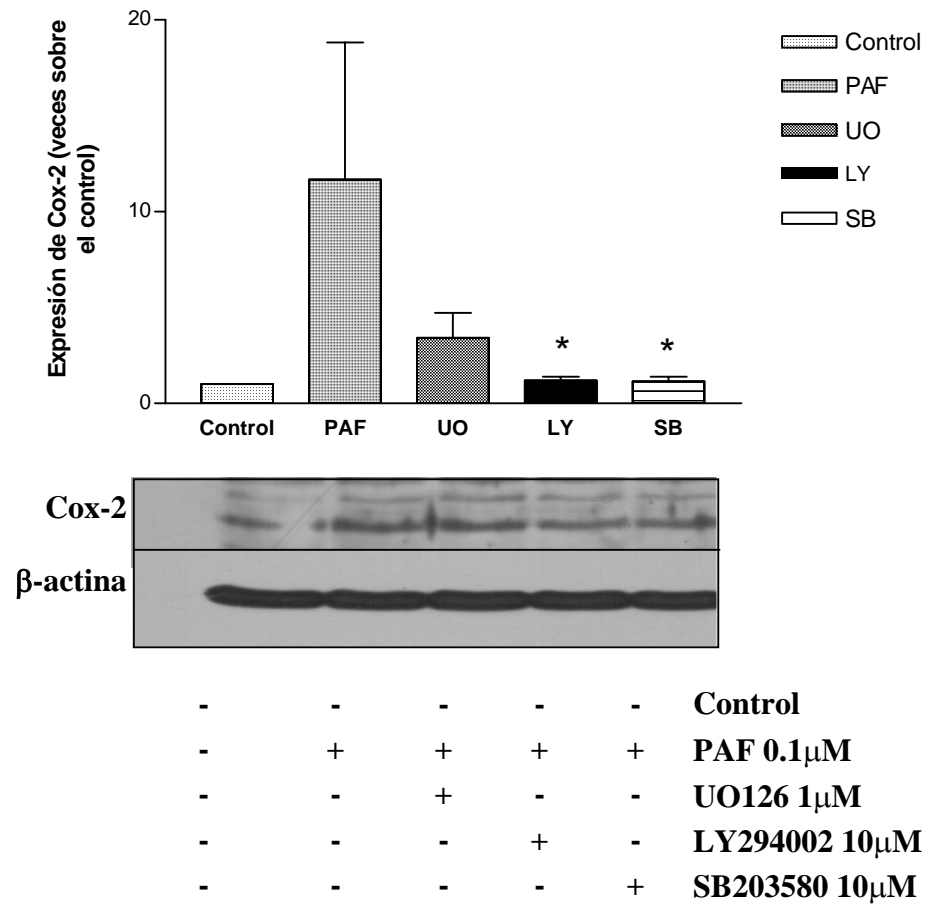
Para determinar el rol que cumplen las proteínas MAPK (ERK1/2, p38) y PI3K en la expresión de la proteína COX-2 ver figuras 9 y 10. Las células HL-60 diferenciadas a neutrófilos fueron preincubadas 10 minutos con distintos inhibidores, SB203580 usando concentración de 10 $\mu$ M; UO126 en concentración de 1 $\mu$ M y LY294002 a la concentración de 10 $\mu$ M y posteriormente fueron estimuladas con 0.1 $\mu$ M de PAF y fMLP. Tratadas con anticuerpos anti COX-2, y  $\beta$ -actina para el control de la cantidad de proteínas.

fMLP tuvo la capacidad de expresar la proteína COX-2. En la figura 9, se observó que fMLP estimuló la expresión de COX-2 y que la vía implicada en esta expresión es la familia MAPK específicamente ERK1/2 por que al usar UO126 se disminuyó casi completamente la expresión de la enzima, no pasa lo mismo con los otros dos inhibidores LY294002 y SB203580.

Como se había demostrado anteriormente la proteína COX- 2 es expresa en neutrófilos a ser estimulados con PAF. Al bloquear las vías MAPK y PI3K se puede observar en la figura 10 que PAF ocupa la ruta de p38 para expresar la enzima.



**Figura 9:** Efecto de SB203580, UO126 y LY294002 en la expresión de la proteína COX-2 en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos estimuladas con 0.1μM de fMLP. Cada barra representa al menos tres experimentos al menos \*\* p<0.01 comparado con el control.



**Figura 10:** Efecto de SB203580, UO126 y LY294002 en la expresión de la proteína COX-2 en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos estimuladas con 0.1 $\mu$ M de PAF.



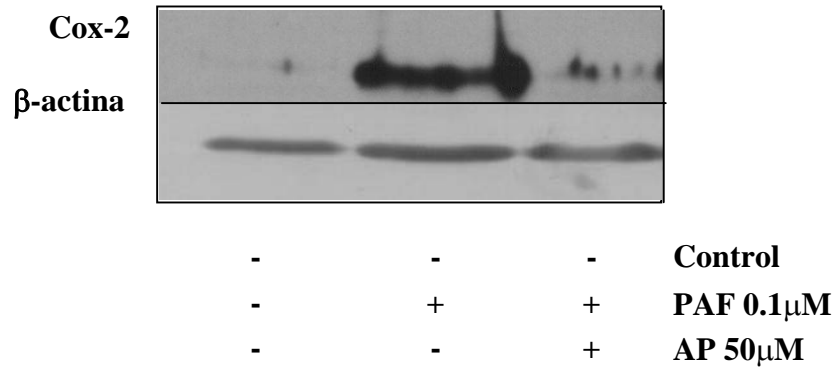
### **5.8 Efecto de andrografolido en la expresión de COX-2 en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos estimuladas con PAF y fMLP.**

Se conoce que andrografolido es un inhibidor de NF- $\kappa$ B, y para saber el efecto que causa andrografolido en la expresión de COX-2, se realizó el siguiente experimentos ver figura 11 A y 11 B.

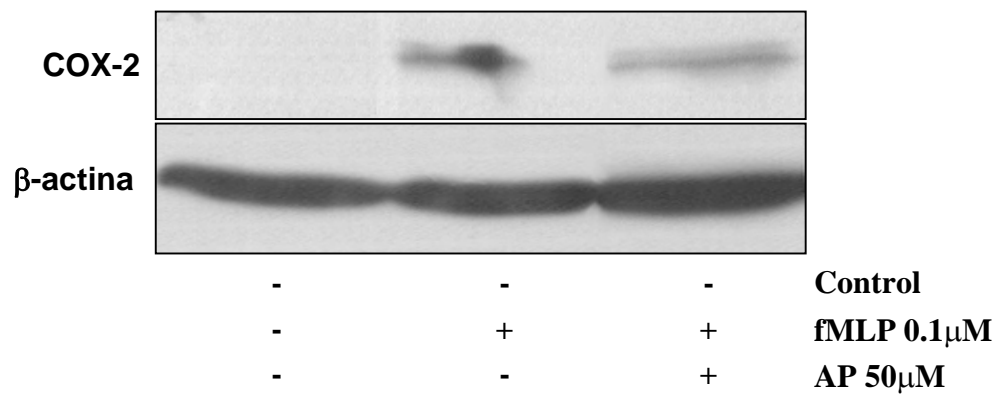
Las células HL-60 fueron preincubadas 30 minutos con andrografolido 50 $\mu$ M. Siguiendo con la estimulación de PAF y fMLP en concentración de 0.1 $\mu$ M. Analizadas por western blot, tratadas con anticuerpo anti-COX-2 y como control de la carga en cada carril  $\beta$ -actina.

En la figura 11A se observó que andrografolido puede inhibir fuertemente la inducción de la expresión de COX-2 cuando el estímulo fue PAF. El efecto de inhibición que produjo andrografolido en la expresión de COX-2 en células estimuladas con fMLP, no fue fuerte (ver figura 11B), como el observado con PAF.

A



B



**Figura 11. A:** Efecto inhibitor de andrografolido sobre la expresión de COX-2 en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos estimuladas con 0.1μM de PAF. **B:** Efecto inhibitor de andrografolido sobre la expresión de Cox-2 en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos estimuladas con 0.1μM de fMLP.

## 6. DISCUSIÓN

El presente trabajo realizado permitió primero, evaluar la diferenciación de las HL-60 por medio de la movilización de calcio intracelular. Estas células al ser diferenciadas expresan receptores para varias moléculas de señal intercelular como por ejemplo: receptores de PAF, receptores de Histamina H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub>, receptores péptidos formil, etc., (Klinker *et al*, 1996). La estimulación de neutrófilos con fMLP resulta en activación de PLC y mediante inositol trifosfato se produce inmediatamente aumento de calcio citosólico. La activación de neutrófilos con PAF resulta también en movilización de calcio de los almacenes intracelulares (Steel *et al*, 2002).

Para ver el rol que juegan MAPK en la mediación de la transducción de señal intracelular, se observó la fosforilación de p38 y de ERK1/2. Al usar inhibidores para estas dos enzimas se observó que UO126 produjo una inhibición completa en la fosforilación de ERK1/2, que no fue afectada por SB203580 (You-Li Zu *et al*, 1998). Estos resultados son similares a los obtenidos por Nick 1997 que describe a fMLP como un activador significativo de MEK1/MEK2. Por otra parte, fMLP también puede fosforilar a la proteína p38, que se observó al ser inhibida por SB203580, esta activación es a través de la proteína MKK3 (Nick *et al*, 1997).

PAF produjo una activación de ERK1/2 en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos, lo que concuerda con la fosforilación de MEK1 y de MEK2 observada en neutrófilos humanos (Nick *et al*, 1997), y es dependiente de la vía Ras/Raf-1/MEK (Khreiss *et al*, 2004). Se demostró que PAF fosforiló a la proteína p38 (fig. 3B), y fue bloqueada completamente con el inhibidor SB203580. Lo que lleva a decir que PAF activó predominantemente la proteína p38, lo que ha sido descrito por otros autores en neutrófilos humanos (Nick *et al*, 1997). Otro reporte menciona

que PAF activó MAPK p38, pero que la respuesta con otro estímulo como TNF $\alpha$  es más pronunciada (Brown *et al*, 2004).

Para conocer la activación de NF- $\kappa$ B en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos, y teniendo como antecedente, que esta proteína se encuentra en el citoplasma retenida por otra proteína inhibitoria formando un complejo I $\kappa$ B $\alpha$ -NF- $\kappa$ B (Simeonidis *et al*, 1999), se realizó una cinética para evaluar tiempo que demora en desaparecer la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  del citoplasma y así poder encontrar un indicador de activación de NF- $\kappa$ B. Se observó que el tiempo de degradación de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  fue a los 30 minutos (fig. 4), un poco más tarde que lo reportado por Kravchenko, 1995, que menciona que la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  es observada a los de 15 minutos y es seguida por una síntesis de la proteína a los 60 minutos (Kravchenko *et al*, 1995). Otro reporte hechos en neutrófilos estimulados con TNF mencionan una rápida degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  (15 minutos) en la fracción citoplasmática y nuclear (Castro-Alcaraz *et al*, 2002). Por otro lado, en la cinética de degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  realizada con fMLP se evidencio una fuerte disminución de la proteína desde los 30 a los 60 minutos (fig. 5), similar a lo descrito por otros autores en neutrófilos humanos (McDonald *et al*, 1997).

Existen reportes que mencionan la participación de las proteínas MAPK en la activación de NF- $\kappa$ B (El Bekay *et al*, 2003). En este sentido, en células estimuladas con PAF se observó que SB203580, pero no LY294002 y UO126, redujo la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ , (fig. 6), indicando la participación de p38. Cuando las células fueron activadas con fMLP (fig. 7), se observó que la degradación I $\kappa$ B $\alpha$  es dependiente de las vías p38 y PI3K. Existen pocos antecedentes en la

literatura sobre las vías de transducción de señal involucradas en la activación de NF- $\kappa$ B por sustancias quíomicitáticas. Un reporte hecho en neutrófilos humanos estimulados con AngII demuestra que la activación NF- $\kappa$ B, es completamente suprimida con SB203580 y PD098059 indicando que la localización nuclear de este factor es dependiente de la activación de p38 y ERK1/2 en neutrófilos humanos (El Bekay *et al*, 2003). Por otro lado, células musculares lisas de bronquio humanas tratadas con un conjunto de estímulos TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , SB203580 tuvo poco efecto en la degradación de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$ , indicando que p38 no afectaría la activación de NF- $\kappa$ B (Singer *et al*, 2003).

La activación de NF- $\kappa$ B lleva a la expresión de enzimas como iNOS y COX-2 (Yamamoto *et al*, 2000). Para analizar la síntesis de COX-2 los neutrófilos fueron estimuladas con fMLP y con PAF durante 2 horas donde se produjo una fuerte expresión de la proteína, similar a lo obtenido en macrófagos estimulados con LPS (Caivano *et al*, 2000). En este estudio se demostró que la cantidad de enzima expresada en neutrófilos por PAF (fig. 8B) es menor a la obtenida por fMLP (fig 8A). Se ha descrito que los neutrófilos humanos expresan COX-2 en respuesta a LPS y que la acumulación máxima se produce a las 3 horas después de la estimulación (Maloney *et al*, 1998). En el año 1998, se registró que en neutrófilos humanos, tratados con una serie de estímulos entre estos fMLP, fueron capaces de activar la inmunoreactividad de COX-2 tempranamente a los 30 minutos después de la estimulación, aumentando los niveles sobre una hora (Pouliot *et al*, 1998). Por otro lado, se ha descrito que, PAF induce genes de transcripción de COX-2 y de iNOS, en células endoteliales microvasculares de cerebro de porcino (Marrache *et al*, 2002).

Debido a que, en este trabajo se demostró que PAF y fMLP activan las proteínas MAPK y que a su vez inducen la expresión de COX-2, se analizó el rol de MAPK en este fenómeno. Se observó que la expresión de COX-2 inducido por fMLP es inhibida por UO126 y no fue afectada con SB203580 y LY294002, sugiriendo que la vía ERK1/2 es la responsable del aumento de COX-2 (fig. 9). Cuando las células fueron estimuladas con PAF se observó que SB203580 y LY294002 fueron capaces de inhibir la expresión de la proteína COX-2, a diferencia de UO126 donde la inhibición no fue significativa (fig. 10), lo que indicaría el rol de p38 y PI3K en la regulación de la expresión de esta proteína. Existen reportes que mencionan a la proteína p38 y no a ERK1/2 en el control de la expresión de COX-2 en células de músculo liso bronquial estimuladas con  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{INF}\gamma$ ,  $\text{IL-1}\beta$  (Singer *et al*, 2003). Sin embargo, otros estudios hechos en macrófagos describen que la expresión de COX-2 inducida por LPS es inhibida de manera dosis dependiente por PD98059 y SB203580, y la adición de ambos inhibidores resulta en una completa inhibición de la expresión de la proteína (Caivano *et al*, 2000). Similarmente Nagano en el 2002, reportó que PD98059 y SB203580 reducen la producción de PGE2 y la expresión de la proteína COX-2 en neutrófilos humanos estimulados con LPS (Nagano *et al*, 2002). Por lo tanto ERK1/2 y p38 serían vías utilizadas por la expresión de COX-2 en leucocitos, y dependiendo del estímulo, existirán diferencias en la contribución de cada una de ellas.

NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción que activa la expresión de proteínas inflamatorias, en especial COX-2. Estudios recientes dicen que andrografolido es un antagonista de la activación de NF- $\kappa$ B por unión covalente de la cisteína 62 de p50, por lo que produce una interacción específica andrografolido/p50. (Xia Yi-Feng *et al*, 2004). Conociendo esto, se utilizó andrografolido como inhibidor de NF- $\kappa$ B. Se observó una fuerte inhibición de la expresión de

COX-2 por andrografolido al ser activado por PAF (fig. 11A), pero al ser estimulado con fMLP esta expresión fue menor (fig. 11B); indicando que existirían otros factores de transcripción involucrados en la expresión de COX-2

En conclusión, PAF activa la vía MAPK, fosforila predominantemente a p38, siguiendo esta ruta PAF degrada la proteína I $\kappa$ B $\alpha$ , activando así el factor de transcripción NF- $\kappa$ B; el cual hace aumentar la expresión de la proteína COX-2, pero involucraría además a la proteína PI3K en esta síntesis.

FMLP tiene la capacidad de activar a las MAPK p38 y ERK1/2. A través de p38 activaría a NF- $\kappa$ B, sin embargo esta vía no participaría en la expresión de COX-2 debido a que SB203580 no inhibe la expresión de esta proteína, Sin embargo ERK1/2 estaría involucrada en el control de la expresión de COX-2 inducida por fMLP, por lo tanto otra vía además de NF- $\kappa$ B participaría de su control, como el factor de transcripción AP-1 que es regulada a través de ERK1/2 (Jang *et al*, 2005).

**REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA**

- Avdi, N., Winston., Russel. M., Young, S., Jonson, G., Worthen, S.** (1996). Activation of MEKK by Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in Human Neutrophils. *J. Biol. Chem.* **271**, 33598-33606.
- Barnes P.J & Karin M** (1997) Nuclear factor Kappa B A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J. Med.* **336** 1066-1071.
- Brown, G., Stewart, M., Bissonette, S., Elias, A., Wilker, E., Yaffe, M.** (2004). Distinct Ligand-dependent roles for p38 MAPK in priming and activation of the neutrophil NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* **279**, 27059-27068
- Caivano, M., Cohen, P.** (2000). Role of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Mediating Lipopolysaccharide-Stimulated Induction of Cyclooxygenase-2 and IL-1 $\beta$  in RAW264 Macrophages. *J. Immunol.* **164**, 3018-3025.
- Cao, Y., Prescott, S.** (2002). Many Actions of Cyclooxygenase-2 in Cellular Dynamics and in Cancer. *J. Cell. Physiol.* **190**, 279-286.
- Chao, W., and Olson, M.** (1993). Platelet Activating Factor: Receptor and Signal Transduction. *Biochem. J.* **292**, 617-629.



- Dewas, C., Fay, M., Gougerot-Pocidallo, M., Benna, J.** (2000). The Mitogen-Activated Protein Kinase Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Pathway Is Involved In formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine-Induced p47<sup>phox</sup> Phosphorylation in Human Neutrophils. *J. Immunol.* **165**, 5238-5244.
- Dong, Q., Sclabas, G., Shuichi, F., Schmidt, C., Peng, B., Wu, T., Tsao, M., Evans, D., Abbruzzese, J., McDonnell, T., Chiao, P.** (2002). The function of multiple I $\kappa$ B $\alpha$ :NF- $\kappa$ B complexes in the resistance of cancer cells to Taxol-induced apoptosis. *N. Publ. G.* **21**, 6510-6519.
- Edwards, Steven W.** (1994) *Biochemistry and Physiology of the Neutrophil.* Cambridge University Press USA.
- El Bekay, R., Álvarez, M., Monteseirin, J., Álba, G., Chacon, P., Vega, A., Martín-Nieto, J., Jiménez, J., Pintado, E., Bedoya, F., Sobrino, F.** (2003). Oxidative stress is a critical mediator of the angiotensin II signal in human Neutrophils: involvement of Mitogen-activated protein kinase, calcineurin and the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Blood.* **102**, 662-671.
- Ferby, I., Waga, I., Sakanaka, C., Kume, K., Shimizi, T.** (1994). Wortmannin inhibits mitogen-activated protein kinase activation induced by platelet-activating factor in guinea pig neutrophils. *J. Biol. Chem.* **268**, 30485-30488.

**Fruman, D.A., Meyers, R.E., and Cantley, LY.** (1998). Phosphoinositide Kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 481-507.

**Goodman, L., Gilman, A.** (1996). Las bases farmacológicas de la terapéutica. Ed. McGraw-Hill Interamericana 9ª edición México.

**Hidalgo, M., Ojeda, F., Eyre, P., LaBranche, T., Smith, C. Hancke, J., Burgos, R.** (2004). Platelet-activating Factor increases pH(i) in bovine neutrophils through the PI3K-ERK1/2 pathway. *Br. J. Pharmacol.* **141**, 311-321.

**Hinz, B., Kay, B.** (2001). Cyclooxygenase-2 – 10 years later. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **300**, 367-375.

**Jang, JH., Surh, YJ.** (2005). AP-1 mediates beta-amyloid-induced iNOS expression in PC12 cells via the ERK2 and p38 MAPK signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **331**, 1421-8.

**Khreiss, T., József, L., Chan, J., Filep, J.** (2004). Activation of Extracellular signal-regulated kinase couples platelet-activating factor-induced adhesion and delayed apoptosis of human Neutrophils. *ELSEVIER.* **16**, 801-810.

**Klinker, Jan F.** (1996). G-Protein-coupled Receptors in HL-60 Human Leukemia Cells. *Elsevier Science Inc.* **27**, 33-54.

- Kracht, M., Saklatvala, J.** (2002). Transcriptional and Post-Transcriptional Control of Gene Expression in inflammation. *CYTOKINE*. **20**, 91-106.
- Kravchenko, V., Pan, Z., Han, J., Herbert, J., Ulevitch, R., Ye, R.** (1995). Platelet-activating Factor Induces NF- $\kappa$ B Activation through a G Protein-coupled Pathway. *J. Biol. Chem.* **270**, 14928-14934.
- Krump, E., Sanghera, J., Pelech, S., Furuya, W., Grinstein, S.** (1997). Chemotactic Peptide N-formyl- Met-Leu-Phe Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) and MAP-activated Protein Kinase-2 in Human Neutrophils. *J. Biol. Chem.* **272**, 937-944.
- Makarov, Sergei.** (2001). NF- $\kappa$ B in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction. *Arthritis Res* **3**, 200-206.
- Maloney, C., Kutchera, W., Albertine, K., McIntyre, T., Prescott, S., Zimmerman, G.** (1998). Inflammatory Agonist Induce Cyclooxygenase Type 2 Expression by Human Neutrophils. *J. Immunol.* **160**, 1402-1410.
- Marrache, A., Gobeil, F., Bernier, S., Stankova, J., Rola-Pleszczynski, M., Choufani, S., Bkaily, G., Bourdeau, A., Sirois, M., Vazquez-Tello, A., Fan, L., Joyal, J., Filep, J., Varma, D., Ribeiro-da-Silva, A., Chemtob, S.** (2002). Proinflammatory Gene Induction by Platelet-Activating Factor Mediated Via its Cognate Nuclear Receptor. *J. Immunol.* **169**, 6474-6481.

- Matthew, P., Verma, I.** (2000). Signal-dependent and -independent Degradation of free and NF- $\kappa$ B-bound I $\kappa$ B $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* **275**, 21278-21286.
- Mcdonald, P., Bald, A., Cassatella, M.** (1997). Activation of the NF- $\kappa$ B pathway by Inflammatory stimuli in human Neutrophils. *Blood.* **89**, 3421-3433.
- Nick, J., Avdi, N., Young, S., Knall, C., Gerwins, P., Johnson, G., Worthen, S.** (1997). Commun and Distinct Intracellular Signaling Pathways in Human Neutrophils Utilized by Platelet Activating Factor and FMLP, *J. Clin. Invest.* **99**, 975-986.
- Pang, L., Nie, M., Cobett, L., Knox, A.** (2003). Cliclooxygenase-2 Expression by Nonsteroidal Anyi-inflamtry Drugs in Human Airway Smooth Muscle Cells: Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *J. Immunol.* **170**, 1043-1051.
- Patiño, P., Garcia, D.** (1991). Fisiología de los Polimorfonucleares Neutrófilos. *IATREA.* **4**, 81-87.
- Pouliot, M., Gilbert, C., Borgeat, P., Poubelle, P., Bourgoïn, S., Creminon, C., Maclof, J., McColl, S., Naccache, P.** (1998). Expresión and actibity of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in agonist-activated human neutrophils. *FASEB J.* **612**, 1109-1123.

**Prescott, S., Zimmerman, G., Stafforini, D., McIntyre, T.** (2000). Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 419-445.

**Santos-Beneit, A.M. & Mollinedo, F.** (2000). Expression of genes involved in initiation, regulation, and execution of apoptosis in human neutrophils and during neutrophil differentiation of HL-60 cells. *J Leukoc Biol*, **67**, 712-24.

**Shuji, Nagano., Takeshi, Hiroaki, Niuro., Kunihiro, Yamaoka., Yojirou, Arinobu., Eiichi, Ogami., Mitsuteru, Akahoshi., Yasushi, Inoue., Katsuhisa, Miyake., Hitoshi, Nakashima., Yoshiyuki Niho and Mine Harada.** (2002). Molecular mechanisms of lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils: involvement of the mitogen-activated protein kinase pathway and regulation by anti-inflammatory cytokines. *Intern. Immunol.* **14**, 733-740.

**Shukla, Sh.** (1992); Platelet-activating Factor receptor and signal transduction mechanisms. *FASEB J.* **6**, 2296-2301.

**Simeonidis, S., Stauber, D., Chen, G., Hendrickson, W., Thanos, D.** (1999). Mechanisms by which I $\kappa$ B proteins control NF- $\kappa$ B activity. *Biochem.* **96** 49-54.

- Singer, Ch., Baker, K., McCaffrey, A., AuCoin, P., Dechert, M., Gerthoffer, W.** (2003). P38 MAPK and NF- $\kappa$ B mediate COX-2 expression in human airway myocytes. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **285**, L1087-L1098.
- Steel, H.C., Anderson, R.** (2002). Dissociation of the PAF-receptor from NADPH oxidase and adenylate cyclase in human Neutrophils results in accelerated influx and delayed clearance of cytosolic calcium. *Br. J. Pharmacol.* **136**, 81-89.
- Swain, S., Bunger, P., Sipes, K., Nelson, L., Jutila K., Boylan, S., Quinn, M.** (1998). Platelet-activating factor induces a concentration-dependent spectrum of functional responses in bovine neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **64**. 817-827.
- Versteeg, H., Van Bergen, P., Van Deventer, S., Peppelenbosch, M.** (1998). Cyclooxygenase-dependent signaling: molecular events and consequences. *FEBS.* **445**, 1-5.
- Wymann M.P., Pirola, L.** (1998). Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Bioch Biophys. Acta.* **1436**, 127-150.
- Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., Halbwachs-Mecarelli, L.** (2000). Biology Disease. *Lab. Invest.* **80**, 617-653.
- Yamamoto, Yumi., Gaynor, Richard B.** (2001). Therapeutic potential of inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J. Clin. Invest.* **107**, 135-142.

**Yi-Feng, X., Bu-Qing, Y, Yi-DaN, I., Jian-Guo, W., Xiang-Jiu, H., Xianfeng, L., Xinsheng, Y., Dawei, M., Arne, S., Hebbel, R., Nigel, S., Jian-o, G.** (2004). Andrographolide Attenuates Inflammation by Inhibition of NF- $\kappa$ B Activation through Covalente Modification of Reduced Cysteine 62 of p50. *J. Immunol.* **173**, 4207-4217.

**Zaitsu, M., Ishii, E., Hamasaki, Y.** (2002) Induction of thromboxane A<sub>2</sub> synthesizing enzymes in DMSO-induced granulocytic differentiation of HL-60 cells. *Elsevier Science.* **67**, 405-410.

**Zu You-Li., Qi J., Gilchrist, A., Fernandez, G., Vasquez-Abad, D., Kreutzer, D., Huang, Ch., Shaáfi, R.** (1998); P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation Is Required for Human Neutrophil Function Triggered by TNF- $\alpha$  or FMLP Stimulation. *J. Immunol.* **160**, 1982-1989.

## 8. ANEXOS

### 8.1 Buffer De Corrida 5X

Tris base	15,1g
Glicina	94,0g
SDS	5,0g
H <sub>2</sub> O c.s.p	1000ml

Diluir a 1X para la corrida electroforética.

### 8.2 Buffer de Transferencia

Tris base	3,0g
Glicina	15,14g
Metanol	200ml
H <sub>2</sub> O c.s.p	1000ml

### 8.3 TBS-10X pH 7,6

Tris base	24,2g
NaCl	80,0g
H <sub>2</sub> O c.s.p	500ml

Ajustar pH a 7,6 con HCl.



**8.4 TBS-T**

TBS 10X	50ml
Tween-20	0,5ml
H <sub>2</sub> O c.s.p	500ml

**8.5 Buffer de bloqueo**

Leche descremada	25,0g
TBS 10X	50ml
Tween-20	2,5ml
H <sub>2</sub> O c.s.p	500ml

**8.6 HBSS Ca<sup>++</sup>**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,0136g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	0,01035 g
NaCl	2,0 g
d-Glucosa	0,29 g 73
KCl	0,0932 g
CaCl	0,0249 g
H <sub>2</sub> O c.s.p	250ml
Ajustar pH 7,4.	