



Convergencia de vías de señalización en un modelo de apoptosis

Monica Ararat Sarria

Universidad del Rosario

Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud

Bogotá, Colombia

2014

Convergencia de vías de señalización en un modelo de apoptosis

Monica Ararat Sarria

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Maestría en Genética Humana

Directora:

Luisa Marina Matheus Merino B.Sc., M.Sc., Ph.D

Universidad del Rosario

Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud

Bogotá, Colombia

2014

Dedicatoria

A Dios, porque sin el nada podría haber hecho.

A mis padres y a mi familia, porque gracias a su apoyo, sus consejos y su presencia logro alcanzar esta meta. A mis profesores por su enseñanza, paciencia y apoyo en cada paso dado. A mis amigos por su compañía en los momentos buenos y malos.

Agradecimientos

A Dios, porque me ha acompañado y guiado en cada paso que doy.

A Luisa Matheus por sus conocimientos, su compañía, su apoyo incondicional, por sus consejos y su gran paciencia en todos los momentos ocurridos.

A los docentes de la maestría, Nora Contreras, Dora Fonseca, Heidi Mateus, Carlos Prada, Paul Laissue, Carlos Restrepo, por sus conocimientos y ayuda.

A Manuel Alfonso Patarroyo y a la FIDIC por su apoyo y colaboración.

A mis padres, porque sin ellos no habría tenido la fuerza para salir adelante.

A mis hermanos por su tolerancia y su escucha incondicional.

A mi familia por apoyarme.

A mis amigos por su escucha y consejos.

Tabla de contenido

Agradecimientos	i
Tabla de contenido	ii
Lista de figuras	vi
Lista de tablas	viii
Lista de abreviaturas	ix
Resumen	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1 Endotelio	2
2.2 Sepsis	2
2.2.1 Daño endotelial por proceso bacteriano	3
2.3 Apoptosis	3
2.3.1 Vías de apoptosis	4
2.3.2 Ceramida	5
2.3.2.1 Relación infección-ceramida-apoptosis	5
2.3.3 Mecanismos de regulación de la apoptosis	6
2.3.3.1 La familia Bcl2	6
2.3.3.2 Inhibidores de caspasa (IAPS)	6
2.3.4 Vías de señalización por apoptóticas: MAPK	6
2.3.4.1 Quinasa p38	7
2.3.4.2 Quinasa SAPK/JNK	8
2.3.4.3 ASK1	8
2.3.5 Vías de señalización anti apoptótica	9

2.3.5.1.1	AKT	9
2.4	Proteína C Activada	9
3.	JUSTIFICACIÓN	11
4.	OBJETIVOS	12
4.1	Objetivo general	12
4.2	objetivos específicos	12
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	13
5.1	Modelo celular Células EA.hy926	13
5.2	Análisis de proteínas	13
5.2.1	Inhibidores químicos	13
5.2.2	Lisis celular	14
5.2.3	Western Blotting	14
5.2.4	ELISA	14
5.2.5	Inmunofluorescencias	15
5.3	Valoración de la apoptosis	15
5.3.1	Ensayo de viabilidad con MTT	15
5.3.2	Ensayo de viabilidad mediante citometría de flujo	15
5.3.3	Actividad caspasa	15
5.3.3.1	Análisis de la activación de caspasa 3/7 mediante citometría de flujo	15
5.3.3.2	Análisis fluorométrico de la activación de caspasa 3	16
5.3.3.2.1	Actividad caspasa 3	16
5.3.3.2.1	Actividad caspasa 9	16
5.4	Análisis estadístico	16
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17

6.1 Determinación de la disminución de la viabilidad en presencia de ceramida	17
6.1.1 Análisis de la morfología celular	17
6.1.2 Ensayo MTT	17
6.1.3 Activación de caspasas	18
6.2 Análisis de las vías de señalización	19
6.2.1 Estandarización del ensayo de ELISA	19
6.2.2 Western Blotting	21
6.2.3 Determinación de la inactivación/defosforilación de AKT en presencia de ceramida	21
6.2.4 Determinación de la activación/fosforilación de las quinasas SAPK/JNK y p38 MAPK en presencia de ceramida	22
6.2.4.1. Activación/fosforilación de la quinasa SAPK/JNK en presencia de ceramida	22
6.2.4.2. Activación/fosforilación de la quinasa p38 en presencia de ceramida	23
6.2.4.3 Activación/fosforilación de la quinasa ASK1 en presencia de ceramida	23
6.2.4.4 Localización de la quinasa SAPK/JNK al núcleo	25
6.3. Efecto del tratamiento con PCA sobre las vías de señalización	26
6.3.1 Efecto del tratamiento con PCA sobre la activación de AKT	26
6.3.2 Efecto del tratamiento con PCA sobre la activación/inactivación de ASK1, p38, SAPK/JNK quinasas	27
6.4. Determinación de la activación/inactivación de p38, SAPK/JNK, ASK1 y AKT ante la acción toxica de la ceramida en presencia de inhibidores químicos y PCA	28
6.4.1. Estandarización de las concentraciones de inhibidores	28
6.4.1.1. Inhibidor de p38	28
6.4.1.2. Inhibidor de SAPK/JNK	29

6.4.1.3. Inhibidor de ASK1	29
6.4.1.4. Inhibidor de AKT	30
6.4.2 Efecto del tratamiento con PCA y con inhibidores químicos sobre la inactivación/defosforilación de p38	31
6.4.2.1 Efecto de la inhibición química de p38	31
6.4.2.2 Efecto de la inhibición química de SAPK/JNK	34
6.4.2.3 Efecto de la inhibición química de ASK1	36
6.4.2.4 Efecto de la inhibición química de AKT	38
6.5. Efecto de la activación/inactivación de p38, SAPK/JNK, ASK1 y AKT en presencia de inhibidores químicos y PCA	40
6.5.1 Activación de Caspasa 3	40
6.5.2. Activación de la caspasa 3/7 por citometria de flujo	40
6.5.3. Activación de Caspasa 9	43
6.5.4 Ensayo de supervivencia	44
7. CONCLUSIONES	45
8. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS	46
9. BIBLIOGRAFÍA	47
ANEXOS	
ANEXO 1. SOLUCIONES DE TRABAJO	58
ANEXO 2 PRODUCCIÓN ACADÉMICA DERIVADA DEL TRABAJO	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.3.1.1 Vía extrínseca de la apoptosis	4
Figura 2.3.1.2 Vía intrínseca de la apoptosis	5
Figura 2.3.3.1 Activación de las vías pro apoptóticas	7
Figura 6.1.1.1 Efecto del tratamiento de ceramida sobre la morfología celular	17
Figura 6.1.2.1. Ensayo de viabilidad relativa	18
Figura 6.1.3.1 Ensayo de Apoptosis	19
Figura 6.2.1.1. Ensayo de ELISA Indirecto	20
Figura 6.2.3.1. Activación de AKT con el tratamiento con C2 ceramida.	21
Figura 6.2.4.1.1 Activación de SAPK/JNK con el tratamiento con C2 ceramida	22
Figura 6.2.4.2.1. Activación de p38 con el tratamiento con C2 ceramida	23
Figura 6.2.4.3.1. Activación de ASK1 con el tratamiento con C2 ceramida	24
Figura 6.2.4.4.1. Locacización de la quinasa SAPK/JNK en al núcleo	25
Figura 6.3.1.1 Activación de AKT	26
Figura 6.3.2.1. Activación de quinasas proapoptóticas ASK1, SAPK/JNK y p38	27
Figura 6.3.2.2 Posible efecto de PCA y C2-ceramida sobre las quinasas AKT, ASK, SAPK/JNK y p38.	28
Figura 6.4.1.1.1. Ensayo MTT del inhibidor de p38	28
Figura 6.4.1.2.1. Ensayo MTT del inhibidor de SAPK/JNK	29
Figura 6.4.1.3.1 Ensayo MTT en presencia de DTT	29
Figura 6.4.1.3.2 Ensayo de supervivencia.	30
Figura 6.4.2.1.1. Inactivación de p38	31
Figura 6.4.2.1.2. Activación de p38 y AKT.	32
Figura 6.4.2.1.3. Modelo hipotetico del efecto de SB203580 sobre las vias de señalizacion.	33

Figura 6.4.2.2.1. Inactivación de SAPK/JNK	34
Figura 6.4.2.2.2. Activación de SAPK/JNK.	35
Figura 6.4.2.2.3. Modelo hipotetico del efecto de SP600125 sobre las vias de señalizacion	35
Figura 6.4.2.3.1. Inactivación de ASK1.	36
6.4.2.3.2. Modelo hipotetico del efecto de TRX sobre las vias de señalizacion.	37
Figura 6.4.2.4.1. Inactivación de AKT.	38
Figura 6.4.2.4.2. Activación de ASK1.	39
Figura 6.4.2.4.3. Modelo hipotetico del efecto de LY600125 sobre las vias de señalizacion.	39
Figura 6.5.1.1. Activación de Caspasa 3	40
Figura 6.5.2.1 Ensayo de Apoptosis.	42
Figura 6.5.2.2. Activación de Caspasa 3.	43
Figura 6.5.3.1, Activación de Caspasa 9.	43
Figura 6.5.4.1 Ensayo de Supervivencia.	44

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.2.1 Estudios sobre sepsis en Colombia.	3
Tabla 5.2.1.1. Inhibidores químicos.	13

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT:	Proteína quinasa B
ASK:	MAPK quinasa. Siglas del inglés "Apoptosis signal-regulating kinase 1"
BCA:	Acido bicinconínico
BSA:	Albumina de suero bovino
C2-ceramida:	Ceramida con un ácido graso de dos carbonos
DISC:	Complejo de señalización de inducción de muerte
DMSO:	Dimetilsulfóxido
EDTA:	Etilenetildiamina
ERK:	Quinasa regulada por señales extracelulares
HRP:	Peroxidasa de rábano
HUVEC:	Células endoteliales de cordón umbilical humano
JNK:	Quinasa c-Jun N-terminal
LY294002:	Inhibidor de AKT. Hidrocloruro de 2-(4-morfolinil)-8-fenil-1(4H)-bensopiran-4-ona
MAPK:	Proteína quinasa activada por mitógenos
MTT:	Bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazolit-2)-2, 5 difenil tetrazolio
PBS:	Solución salina de fosfato amortiguadora de pH
PCA:	Proteína C activada
PI:	Yoduro de propidio
PI3K/Akt:	Vía de supervivencia celular
rpm:	Revoluciones por minuto
SDS:	Dodecilsulfato de sodio

SFB: Suero Fetal Bobino
TBS: Solución salina amortiguadora
Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

Resumen

La sepsis es un evento inflamatorio generalizado del organismo inducido por un daño causado generalmente por un agente infeccioso. El patógeno más frecuentemente asociado con esta entidad es el *Staphylococcus aureus*, responsable de la inducción de apoptosis en células endoteliales debida a la producción de ceramida. Se ha descrito el efecto protector de la proteína C activada (PCA) en sepsis y su relación con la disminución de la apoptosis de las células endoteliales. En este trabajo se analizó la activación de las quinasas AKT, ASK1, SAPK/JNK y p38 en un modelo de apoptosis endotelial usando las técnicas de Western Blotting y ELISA. Las células endoteliales (EA.hy926), se trataron con C2-ceramida (130 μ M) en presencia de inhibidores químicos de cada una de estas quinasas y PCA. La supervivencia de las células en presencia de inhibidores químicos y PCA fue evaluada por medio de ensayos de activación de las caspasas 3, 7 y 9, que verificaban la muerte celular por apoptosis. Los resultados evidencian que la ceramida reduce la activación de AKT y aumenta la activación de las quinasas ASK, SAPK/JNK y p38, en tanto que PCA ejerce el efecto contrario. Adicionalmente se encontró que la tiorredoxina incrementa la activación/fosforilación de AKT, mientras que la quinasa p38 induce la defosforilación de AKT.

1. Introducción

En los seres multicelulares la muerte celular programada se presenta como un proceso fisiológico que desempeña un rol muy importante en el desarrollo embriológico y en los tejidos adultos (Cooper, 2012). Cuando a nivel tisular se altera el equilibrio entre la proliferación y la eliminación celular se presentan distintas patologías tales como los trastornos neurodegenerativos, sepsis, cáncer y enfermedades autoinmunes (Elmore 2007). En el caso de la sepsis, a causa del estímulo producido por los agentes patógenos, se producen diferentes alteraciones que desencadenan la apoptosis de las células endoteliales, con el consiguiente incremento en la morbimortalidad de los pacientes afectados. Por tal motivo, el estudio de las vías moleculares que conducen a la apoptosis endotelial es de gran utilidad para el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas.

Se han desarrollado diferentes medicamentos orientados al manejo de las diversas complicaciones relacionadas con sepsis, entre ellos se destaca la drotrecogina alfa, o Proteína C Activada (PCA), indicada inicialmente para el manejo de la sepsis grave, por su conocida acción antitrombótica, anti-inflamatoria y antiapoptótico (Bernard et al. 2001). Sin embargo, el mecanismo molecular mediante el cual PCA actúa sobre las quinasas involucradas en el proceso de apoptosis aún no está completamente dilucidado. En estudios previos realizados por investigadores pertenecientes a la línea de investigación en muerte celular de la Universidad del Rosario se determinó la relación entre el efecto anti-apoptótico de la PCA con la activación de la quinasa antiapoptótica AKT. Dando continuidad a este estudio, en el presente trabajo se evaluó la acción de la PCA sobre las quinasas proapoptóticas ASK1, SAPK/JNK y p38, así como la quinasa antiapoptótica AKT en células endoteliales tratadas con C2-ceramida. Este modelo representa una aproximación al proceso de apoptosis endotelial inducido por la infección con *Staphylococcus aureus*.

2. MARCO TEORICO

2.1 Endotelio

El endotelio representa el órgano vital más importante del cuerpo humano, se encuentra como una monocapa que tapiza los vasos sanguíneos. Entre sus funciones se encuentra la regulación del flujo sanguíneo, así como las repuestas inmunológicas e inflamatorias (Gastón, 2008). Las células endoteliales tienen una forma poligonal, alargada. Embriológicamente este tejido se origina del mesoderma, gracias al proceso conocido como vasculogénesis (Kumar, Abbas, and Fausto 2005)

Normalmente el endotelio responde a señales físicas, químicas y a una gran variedad de factores tales como tono vascular, trombogénesis, adhesión celular y procesos inflamatorios de las paredes vasculares (Deanfield, Halcox, and Rabelink 2007; Humphrey 2008). Al presentarse la activación del endotelio, este pierde su función reguladora protectora, tornándose trombogénico y se produce una alteración en la actividad vasomotora, además debido a la injuria estas células entran en apoptosis, aumentando más el daño subsecuente (Melgarejo, 2005). Una de las causas de activación endotelial es la Sepsis.

2.2 Sepsis

La presencia de agentes infecciosos en sangre desencadena el proceso de sepsis caracterizado por una respuesta inflamatoria sistémica generalizada y exagerada que puede llegar a comprometer la vida del paciente debido a las alteraciones hemodinámicas, hemostáticas e inflamatorias que induce, llevando a falla multiorgánica y finalmente a la muerte (Wheeler and Bernard 1999). Los agentes patógenos que causan este evento generalmente pueden ser hongos o bacterias, siendo estas últimas las más comunes, sobre todo las de origen nosocomial. *Staphylococcus aureus* es la bacteria más frecuentemente detectada en hemocultivos de pacientes comprometidos con sepsis (J. Vincent et al. 2009; Mayr, Yende, and Angus 2014). Este patógeno produce múltiples factores de virulencia, entre ellos se encuentran la toxina β y la hemolisina que han sido relacionados con el daño endotelial (Calvinho, Donnelly, and Dodd 1993; Esen et al. 2001; J. Vincent et al. 2009; Mayr, Yende, and Angus 2014; Camussone and Calvinho 2013).

Los pacientes con sepsis presentan fiebre o hipotermia, taquicardia, taquipnea, edema e hiperglicemia, alteración en los niveles leucocitarios y en el estado hemodinámico, disfunción orgánica múltiple y alteración en la perfusión de los tejidos (Wheeler and Bernard 1999; Dellinger et al. 2008; Angus and van der Poll 2013).

La sepsis es la causa de mayor morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados, y representa altos costos a los sistemas de salud. Su incidencia ha incrementado a nivel mundial, debido al aumento de la proporción de personas de la tercera edad y de pacientes inmunosuprimidos (cáncer, SIDA), así como al efecto causado por la multi-resistencia a los agentes microbianos de los patógenos (Restrepo et al. 1992; Molina et al. 2011). La sepsis ocasionada por infecciones respiratorias, secundaria a la infección nosocomial por *S. aureus* representa una patología frecuente en las unidades de cuidado intensivo en nuestro país (Molina et al. 2011). Estudios epidemiológicos realizados en Colombia indican que la tasa de mortalidad ocasionada por sepsis se encuentra entre un 30 a un 38% de los pacientes hospitalizados (López and Dennis 2009)(Tabla 2.2.1).

Autor, año	Diseño del estudio	Población estudiada(n)	Mortalidad
Jaimes, 1998	Serie de casos, retrospectiva	Pacientes con bacteremia (n=432)	38%
Zapata, 2001	Estudio de cohorte prospectivo	Pacientes con SDRIS no traumática en 2 hospitales (n=533)	33.6%
Jaimes, 2003	Estudio de cohorte prospectivo	Pacientes admitidos en 2 centros de emergencias (n=734)	30.7%
Jaimes, 2004	Corte transversal	Pacientes que requirieran hemocultivo (n=500)	22.6% vs 36% (Hemocultivos negativos vs positivos)

Tabla 2.2.1 Estudios sobre sepsis en Colombia. Adaptado de López C & Dennis R.

En las últimas décadas se ha intentado comprender las características fisiopatológicas y biológicas de la sepsis, buscando encontrar nuevas terapias efectivas, enfocadas en el estudio de agentes específicos como las cascadas de las citoquinas, factores relacionados con la disregulación de la coagulación e inmunomoduladores (Rivers, Nguyen, and Havstad 2001; Hotchkiss and Karl 2003). En la sepsis severa, definida como sepsis asociada a falla multiorgánica aguda, estudios clínicos mostraron que la administración de PCA mejoraba la evolución de los pacientes, razón por la cual esta molécula ha sido ampliamente estudiada (Bernard et al. 2001; Mayr, Yende, and Angus 2014).

2.2.1 Daño endotelial por proceso bacteriano

Cuando existe un estímulo que favorece la lesión vascular y daño endotelial, como lo que ocurre con las sustancias de origen bacteriano, se presenta la activación del endotelio, estimulando su actividad pro-coagulante, alterándose la liberación del óxido nítrico, con la consecuente variación en la regulación vasomotora, y la subsecuente apoptosis de las células endoteliales (Kumar, Abbas, and Fausto 2005).

2.3 Apoptosis

La apoptosis, descrita por primera vez por Kerr *et al.* en 1972, es un proceso fisiológico normal de muerte celular inducido por diversos estímulos, en algunos casos participa en el proceso de desarrollo de tejidos, como ocurre en la embriogénesis y el desarrollo fetal, también se encuentra involucrada en la regulación de la proliferación celular. También se ha descrito apoptosis inducida por daño del ADN o injuria celular (Cooper and Hausman 2010). La alteración en este proceso puede ocasionar disfunción de los tejidos y ser causal de enfermedades neurodegenerativas, sepsis, inmunológicas, cáncer, entre otras (Bagci et al. 2006)

2.3.1 Vías de apoptosis

Existen dos formas generales de desencadenamiento de la apoptosis: vía extrínseca y la vía intrínseca. La primera vía involucra la activación de los receptores de muerte a través de FAS ligando o TNF, que por medio de la formación de complejos con otras proteínas activan inicialmente las caspasas iniciadoras 8 y 10, y posteriormente activación de las caspasas efectoras 3 y 7 y la consecuente inducción irreversible del proceso de destrucción celular (Figura 2.3.1.1) (Ouyang et al. 2012).

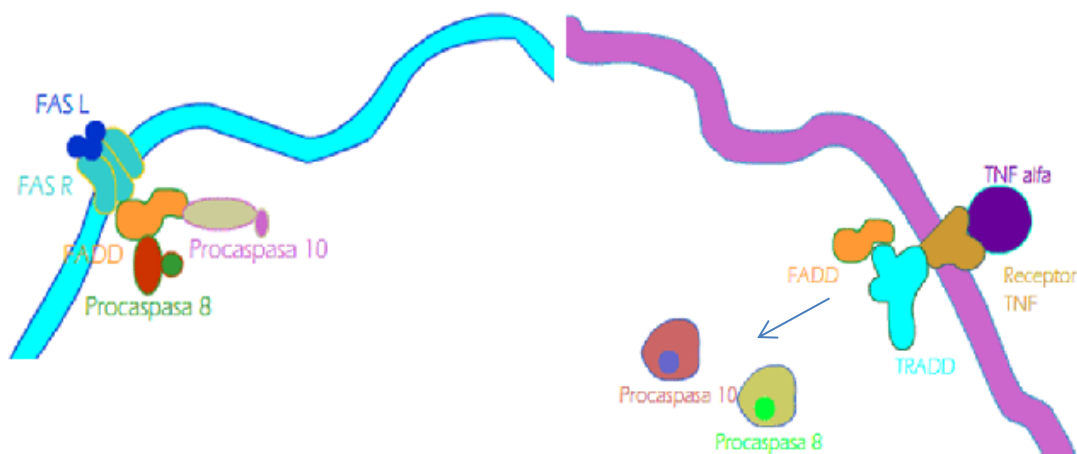


Figura 2.3.1.1 Vía extrínseca de la apoptosis. En la vía extrínseca de la apoptosis los ligandos de muerte (TNF-R y FAS) desencadenan el proceso de apoptosis. En el caso de Fas inicia cuando FasL se une a su receptor FasR y al dominio de muerte asociado a Fas (FADD); en el otro caso comienza cuando TNF- α se une TNF-R junto con FADD y a la proteína del receptor del factor de necrosis tumoral tipo 1 asociado al dominio de muerte (TRADD), seguido del clivaje y activación de las procaspasas 8 y 10 (Ouyang et al. 2012).

La otra forma de iniciación del proceso de apoptosis, conocida como vía intrínseca, ocurre por la activación de la caspasa iniciadora 9. El proceso se desencadena por un daño mitocondrial que lleva a la formación de poros en la membrana mitocondrial y a la salida de citocromo C al citoplasma, el cual junto con la proteína APAF, ATP y la procaspasa 9 forman el complejo llamado apoptosoma responsable de la activación de la caspasa efectoras 3 y la consecuente cadena de eventos tales como la activación de DNAsas (responsables del clivaje del ADN nuclear), por el clivaje de ICAD (Inhibidor de las Desoxiribonucleasas Activada por Caspasa) y el clivaje de las proteínas estructurales fodrina y gelsolina. El rompimiento de estas proteínas, responsables de la integridad estructural de la célula, ocasiona una alteración en la arquitectura de la célula y la formación de invaginaciones en la superficie celular que posteriormente darán origen a los cuerpos apoptóticos, y que serán reconocidos y fagocitados por los macrófagos (Portt et al. 2011).

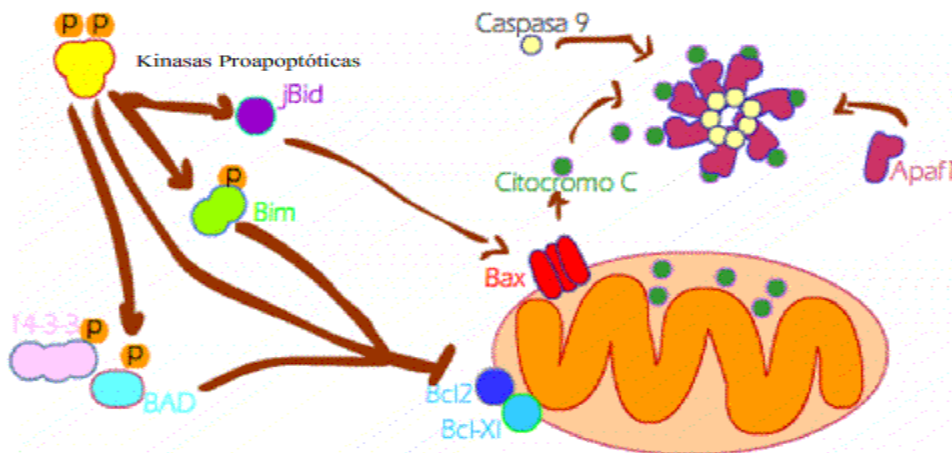


Figura 2.3.1.2 Vía intrínseca de la apoptosis. Las quinasas pro-apoptóticas actúan sobre las proteínas de la familia Bcl-2, inhibiendo a Bcl-2 y Bcl-xl, y activando a Bid, Bim, BAD y Bax, lo que produce la formación de poros en la membrana mitocondrial, la salida del citocromo C desde la mitocondria al citoplasma y la formación de un complejo compuesto por citocromo C, ATP, Apaf1 y caspasa 9, conocido como apoptosoma (Dhanasekaran and Reddy 2008; C.-L. Chen et al. 2008; Liao et al. 2013).

La activación de las proteínas Bcl-2 pro-apoptóticas, Bad, Bim y Bak, directamente responsables de la formación de poros en la mitocondria puede ocurrir por el estímulo de las proteínas quinasas pro-apoptóticas SAPK/JNK y p38 o por estímulos que comprometen a la mitocondria (Liao et al. 2013; Czubowicz and Strosznajder 2014).

2.3.2 Ceramida

Las ceramidas son N-acil-esfingosinas compuestas por un ácido graso unido a un grupo amino de una esfingosina. Estos esfingolípidos funcionan como segundo mensajeros en diversos procesos celulares: apoptosis, proliferación, detención del ciclo celular y diferenciación (Arboleda et al. 2010). Se generan de tres formas, la primera a partir del rompimiento de la esfingomielina de la membrana celular por medio de una esfingomielinasa; la segunda es la síntesis *de novo*, que ocurre en el retículo endoplásmico a partir de la condensación del palmitato y la serina, y la tercera vía ocurre por la ruptura de esfingolípidos complejos y glicosfingolípidos en compartimentos celulares ácidos, tales como los endosomas y los lisosomas. En relación con el proceso de apoptosis, se ha descrito que las ceramidas participan en la formación de poros en la membrana mitocondrial directamente, o indirectamente a través de su acción sobre las quinasas pro-apoptóticas ASK1, SAPK/JNK y p38 o mediante la inhibición de la proteína quinasa anti-apoptótica AKT que lleva a la activación de las proteínas Bcl-2 pro-apoptóticas Bax y Bak (Merrill and Wang 1986; Stoica et al. 2005; Arboleda et al. 2010; Hage-Sleiman et al. 2013)

2.3.2.1 Relación infección-ceramida-apoptosis

Se ha descrito que el *S. aureus* induce la apoptosis de células endoteliales mediante la activación de las caspasas 3 y 8, la liberación del citocromo C, estimulando la vía SAPK/JNK y la producción de ceramida (Esen et al. 2001). Esta capacidad de inducir apoptosis puede representar mecanismos de sobrevivencia de la bacteria al ocasionar daño tisular, comprometiendo la respuesta inmune y promoviendo por lo tanto la dispersión bacteriana.

S. aureus produce, entre sus factores de virulencia, la β -toxina, una exoproteína hemolítica que funciona como una esfingomielinasa rompiendo la esfingomielina presente en las membranas celulares y liberando ceramida al citoplasma. Esta toxina se ha relacionado con lesiones vasculares en tejido mamario de vacas (O'Callaghan et al. 1997; Calvino, Donnelly, and Dodd 1993; Grassmé et al. 2008; Camussone and Calvino 2013)

2.3.3 Mecanismos de regulación de la apoptosis

2.3.3.1 La familia Bcl-2

Las proteínas de la familia de Bcl-2 se encuentran involucradas en la regulación de la apoptosis al estar relacionadas con la integridad de la membrana mitocondrial. Este grupo de proteínas poseen cuatro grupos de dominios de homología conservados, designados BH1, BH2, BH3 y BH4. Estas proteínas pueden clasificarse según su función en: anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xl), que inhiben la apoptosis al interactuar con los miembros pro-apoptóticos de este grupo; proteínas ejecutoras (Bax, Bak), relacionadas con formación de poros en la membrana externa mitocondrial y las que son pro-apoptóticas que tienen únicamente el dominio BH3 (Bid, Bim, Bad, Bik) y que se encuentran en relación directa con la activación de las proteínas ejecutoras (Cosentino and García-Sáez 2014).

2.3.3.2 Inhibidores de caspasas (IAPs)

Las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP) son una familia de proteínas, descritas inicialmente en baculovirus, que funcionan como inhibidores endógenos de la apoptosis. Entre las IAPs se encuentran la proteína inhibitoria de apoptosis neuronal (NAIP), IAP ligada al cromosoma X (XIAP), survivina y IAPs humanas 1 y 2 (HIAP-1 y HIAP-2) (Ambrosini, Adida, and Altieri 1997).

Para inhibir la apoptosis las IAP bloquean a las caspasas efectoras 3, 7 y 9 (Duckett et al. 1998; Holcik and Korneluk 2000; Huang et al. 2001).

2.3.4 Vías de señalización proapoptóticas: MAPK

Las MAPKs son una familia denominadas proteínas quinasa activadas por mitógenos. Estas quinasas fosforilan diferentes grupos de sustratos y regulan diversos procesos celulares tales como proliferación celular, tumorigénesis, diferenciación celular y apoptosis (Ennis, Fultz, and Smith 2005). Las MAPKs se encuentran altamente conservadas en la evolución (Meister et al. 2013) y funcionan en forma de cascadas, en las cuales las quinasas que se encuentran corriente arriba fosforilan y por tanto activan a las que se encuentran en un nivel inferior de la cascada, esto permite una regulación y una integración de múltiples señales (Kieran et al. 1999).

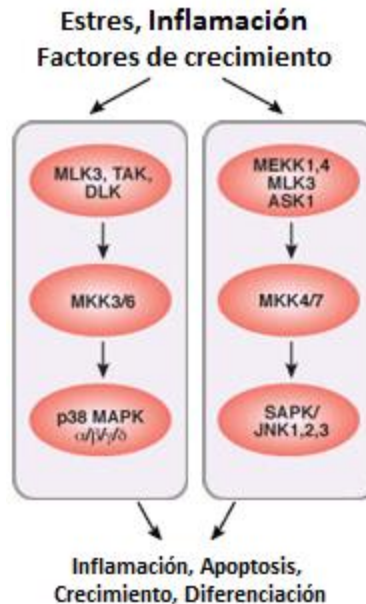


Figura 2.3.4.1 Activación de las vías pro apoptóticas. Adaptado de CST Pathway, de Cell Signaling Technology®

Las MAP quinasa pueden ser translocadas al núcleo, y allí participar en la regulación de la transcripción al fosforilar factores de transcripción y otras proteínas nucleares. Estas quinasa pueden ser activadas por diferentes estímulos, como estrés, TNF, interleuquina 1, choque osmótico, choque de calor, radiación ultravioleta, daño del ADN e inhibidores de la síntesis proteica (Kieran et al. 1999; S. Yang, Galanis, and Sharrocks 1999)

2.3.4.1 Quinasa p38

Inicialmente identificadas como proteínas activadas en respuesta a factores que inducen estrés celular y citoquinas pro-inflamatorias, los miembros de la familia de p38 responden a factores estresores como el choque osmótico, radiación UV, citoquinas pro-inflamatorias, hipoxia entre otros factores de estrés (Raman, Chen, and Cobb 2007). Se han descrito cuatro isoformas, las dos primeras p38 α (MAPK14) y p38 β (MAPK11), son activadas por fosforilación en Thr-180 y Tyr-182, y se expresan en todos los tejidos. p38 γ (MAPK12), es fosforilada en Thr-183 y Tyr-185. p38 δ (MAPK13) es activada por fosforilación en Thr-180 y Tyr-182. Las proteínas p38 γ y p38 δ presentan una distribución más limitada y selectiva (Wagner and Nebreda 2009).

Los genes que codifican para las proteínas p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ están ubicados en los cromosomas 6p21.3-p21.2, 22q13.33 y 6p21.31 respectivamente (Wagner and Nebreda 2009).

La activación de las proteínas de la familia p38 puede inducir la proliferación celular, detención del ciclo celular, inflamación, apoptosis, dependiendo de las vías de señalización activadas y de la regulación osmótica, estrés celular y eventos del ciclo celular (Zarubin and Han 2005; Darling and Cook 2014). Se ha identificado que la proteína MAPKAP quinasa-2 (MAPKAP2) es estimulada por p38 secundario a estresores celulares, citoquinas proinflamatorias, lipopolisacáridos (LPS) (Schett

et al. 2000). Se ha descrito en células de epitelio intestinal que p38 induce la expresión de Bax y p53, lo que lleva a la activación de caspasa 8, 9 y 3 (Gao et al. 2014).

2.3.4.2 Quinasa SAPK/JNK

SAPK/JNK es una serina/treonina proteína quinasa miembro de la familia de proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK), (Ennis, Fultz, and Smith 2005). Fueron inicialmente identificadas como las quinasas que fosforilan y transactivan el dominio n-terminal del factor de transcripción *c-Jun* en respuesta al tratamiento de las células con luz UV (Kyriakis and Joseph 1990). Para este grupo de proteínas existen 3 genes que codifican las más de diez isoformas de SAPK/JNK por medio de un splicing alternativo. SAPK/JNK 1 (MAPK8) ubicado en 10q11.22, SAPK/JNK 2 (MAPK9) que se encuentra en 5q35, SAPK/JNK 3 (MAPK10) localizado en 4q22.1-q23. SAPK/JNK 1 y 2 se expresan en todos los tejidos y son activadas por fosforilación de Thr-183 y Tyr-185, mientras que SAPK/JNK 3 se expresa en cerebro y se activa por fosforilación en Thr-221 y Tyr-223. (Manning and Davis 2003).

SAPK/JNK se activa por diversos procesos de estrés celular incluidos radiación UV, radiaciones ionizantes, agentes metilantes, choque térmico y estrés del retículo endoplásmico. La activación de SAPK/JNK promueve señales de muerte y se encuentra relacionada con los miembros de la familia de Bcl-2 implicados en muerte celular como Bim, JBid y BAD (Dhanasekaran and Reddy 2008; "Author ' S Personal Copy Signaling of Endothelial Cytoprotection in Transplantation"; Darling and Cook 2014).

2.3.4.3 ASK-1

Es una proteína MAP quinasa quinasa quinasa (MAPKKK) codificada por el gen *map3k5*, ubicado en 6q22.33. Se encuentra relacionada con apoptosis, diferenciación y supervivencia celular (Takeda 2000). Se activa en respuesta a especies reactivas de oxígeno (ROS), citoquinas proinflamatorias y estrés de retículo endoplásmico (J. Song et al. 2014). Regula las vías de señalización de las proteínas quinasas SAPK/JNK y p38, fosforilando y activando las quinasas MKK4/MKK7 y MKK3/MKK6, que se encuentran corriente arriba de SAPK/JNK y p38 (Figura 2.3.3.1) (H. Liu et al. 2000; Xiaoming et al. 2008). ASK-1 es regulada por la proteína reductora tiorredoxina (TRX), que inhibe su actividad serina-treonina quinasa (Madan et al. 2013). Se ha descrito que la ceramida induce la activación de ASK por medio de la defosforilación del aminoácido Ser-83 y la fosforilación de Thr845. Adicionalmente la ceramida produce la inactivación de TRX por medio de la proteína de interacción con tiorredoxina (TXnip) que produce la disociación de ASK-1 con la tiorredoxina, activando la vía de las MAPK pro-apoptóticas (Zhou and Summers 1998; C.-L. Chen et al. 2008).

La fosforilación de ASK-1 por AKT en el aminoácido serina localizado en la posición 83 disminuye su actividad y lleva a la reducción de la activación de SAPK/JNK disminuyendo notablemente la apoptosis inducida por estrés (Darling and Cook 2014).

2.3.5 Vías de señalización anti apoptótica

2.3.5.1 AKT

AKT, también conocida como PKB o la quinasa RAC, es una serina/treonina quinasa conocida como la principal vía de transducción de señales involucrada en la regulación de la proliferación, crecimiento y supervivencia celular mediada por estímulos extracelulares. AKT regula por fosforilación a GSK3 β , Bad, MDM2, caspasa 9, FOXO (M. Kim et al. 2009). AKT fosforila directamente a ASK1, con lo que regula de forma negativa a SAPK/JNK y p38 MAPK (Ichijo 1999; Stoica et al. 2005; M. Kim et al. 2009). Se han descrito tres isoformas de AKT altamente conservadas: AKT1/PKB α , AKT2/PKB β y AKT3/PKB γ ; los genes que codifican para las tres isoformas se encuentran localizadas en los cromosomas 14q32, 19q13 y 1q14 respectivamente; AKT1 y AKT2 se encuentran expresadas en todos los tejidos, mientras que AKT3 se expresa en neuronas y testículos.

Cada miembro de la familia de AKT contiene un dominio de homología a pleckstrina localizado en el extremo N-Terminal, un dominio quinasa en la región central y un dominio regulador en el extremo C-terminal, que contiene un motivo hidrofóbico (Ichijo 1999). La activación de AKT requiere de la fosforilación del fosfatidil inositol,4,5-bifosfato (PIP2) por medio de la proteína fosfatidilinositol 3-quinasa (PI-3K) presente en la membrana plasmática, generándose el fosfatidil inositol3,4,5-trifosfato (PIP3) que sirve de ligando para atraer a AKT en la membrana plasmática, por su interacción con el dominio de pleckstrina. Una vez AKT se encuentra en las cercanías de la membrana es fosforilado por la quinasa dependiente de 3-fosfatidilinositol 1 (PKD1) y PDK2 en Thr³⁰⁸ y de Ser⁴⁷³, quedando AKT en su forma activada (G. Song, Ouyang, and Bao 2005; Hemmings and Restuccia 2012). Ha sido previamente reportado que la ceramida inhibe a PI-3K, resultando en la pérdida de activación de AKT (Schubert 2000; Bourbon, Sandirasegarane, and Kester 2002; Hsieh et al. 2014) Adicionalmente las ceramidas activan las fosfatasa de proteína PP2A, que defosforilan a AKT (Yin et al. 2006).

2.4 La proteína C activada

Diversas formas de abordaje y manejo han sido planteadas para el tratamiento de la sepsis, desde el manejo de la infección, el manejo de las variables hemodinámicas, así como el manejo de los procesos inflamatorios y trombotogénicos que se presentan en esta patología (Wheeler and Bernard 1999; Dellinger et al. 2008; Deutschman and Tracey 2014). Es bien conocido que el endotelio es el blanco principal del proceso séptico y su activación es la responsable de la sintomatología presentada en este tipo de pacientes (Trzeciak et al. 2014). El control de esta respuesta endotelial y el incremento de la viabilidad de estas células endoteliales contribuiría a la mejor evolución de esta patología, por lo que se han aplicado medicamentos que buscan este fin, entre ellos la Proteína C Activada (PCA) dado su efecto antitrombótico (Wheeler and Bernard 1999; J.-L. Vincent et al. 2003).

La proteína C es una serina proteasa endógena dependiente de la vitamina K, que es sintetizada como zimógeno principalmente en el hígado y secretada al torrente sanguíneo (concentración aproximada de 70 nM, vida media de 6-16 h) (Palencia Herrejón 2005). La proteína C es activada por clivaje al unirse a su receptor en el endotelio (EPCR), y su interacción con el complejo trombina-trombomodulina (Mosnier, Zlokovic, and Griffin 2007). En células endoteliales y queratinocitos, PCA activa a su vez a los receptores PAR-1 activando de vías de señalización que se

encuentran relacionadas con la activación de la quinasa anti-apoptótica AKT (Bernard and Vincent 2001; Guo et al. 2013).

Debido a su actividad anticoagulante, profibrinolítica, antiinflamatoria y citoprotectora, la PCA puede servir como un agente de protección endotelial. Hace algún tiempo, la PCA fue utilizada en el tratamiento de pacientes con sepsis severa puesto que estudios en humanos mostraban que reducía la mortalidad en un 19.4% (Esmon 2003; Bernard and Vincent 2001; Esmon 2012; Darwish and Liles 2013). Sin embargo recientemente su uso ha sido suspendido puesto que su efecto anticoagulante y fibrinolítico ocasionaba incremento de hemorragias (Ranieri et al. 2012). Investigaciones realizadas en modelos murinos han reportado que una variante modificada de la PCA, con mínima actividad anticoagulante pero con la misma acción sobre las vías de señalización ha sido capaz de reducir en un 40% la mortalidad de los ratones ocasionada por infecciones bacterianas (Kerschen et al. 2007; Bae et al. 2007; Guo, Singh, and Wang 2009).

Varios reportes han descrito la actividad citoprotectora de PCA en diferentes tejidos: endotelio (Mosnier, Zlokovic, and Griffin 2007; Hemmer et al. 2011a; Bartolome et al. 2008), podocitos (Madhusudhan et al. 2012), y neuronas (Guo et al. 2004). La actividad citoprotectora de PCA está relacionada con la regulación de la activación de las caspasas 3, 8 y 9, la reducción de p53 y el incremento de las proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas (Cheng et al. 2003; Du et al. 2011).

3. Justificación

La sepsis es la causa más frecuente de muerte en pacientes hospitalizados alrededor del mundo, se han descrito múltiples formas de manejo de esta entidad para aumentar la sobrevivencia de los pacientes, una de ellas ha sido el uso de proteína C activada (PCA), por sus múltiples efectos benéficos que permiten disminuir la morbi-mortalidad de los pacientes, entre estos se menciona el efecto anti-apoptótico sobre las células endoteliales. Poco se conoce del efecto del tratamiento de PCA sobre la activación/inactivación de la vía de las MAPKs, por lo que es importante realizar el estudio de su acción por medio de modelos *in vitro*. El uso de ceramida en células endoteliales, como modelo *in vitro* de sepsis ocasionada infección por *S. aureus*, permite el estudio de los mecanismos moleculares de acción de la PCA sobre las vías de supervivencia de la célula.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General.

Analizar la regulación de la quinasa ASK1 como punto de convergencia entre las vías PI3K/AKT y MAPK en un modelo *in vitro* de apoptosis endotelial inducida por ceramida.

4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el estado de activación/fosforilación de AKT en presencia de ceramida.
2. Examinar la activación/fosforilación de las quinasas p38 MAPK y SAPK/JNK en presencia de ceramida.
3. Estimar la activación/fosforilación de la quinasa ASK1 en presencia de ceramida.
4. Evaluar el efecto del tratamiento con PCA sobre la activación/inactivación de ASK1, p38, SAPK/JNK y AKT quinasas.
5. Determinar la activación/inactivación de p38, SAPK/JNK, ASK1 y AKT ante la acción tóxica de la ceramida en presencia de inhibidores químicos y PCA.

5. Materiales y métodos

5.1 Modelo celular Células EaHy926

Se cultivaron células EA.hy926 (ATCC® CRL-2922™), que son el resultado del híbrido entre células de endotelio de cordón umbilical (HUVEC) y carcinoma pulmonar humano (A549) (Edgell, 1983). Se seleccionó este tipo celular por sus características morfológicas y bioquímicas comunes al tejido endotelial. Estas células se mantuvieron en medio D-MEM/F12 (GIBCO) suplementado con glucosa al 0.4%, NaHCO₃ al 0.37 %, suero fetal bovino al 10% (EUROBIO), penicilina (100U/ml) estreptomina (100µg/ml), las células se incubaron a 37°C con CO₂ al 5%.

Para realizar los tratamientos las células fueron sembradas en platos de 6 pozos. Se utilizaron para los tratamientos de las células proteína C activada (SIGMA) 5nM por 1 hora y C2-ceramida (SIGMA) en una concentración de 130µM por 4 horas. Las concentraciones de PCA y ceramida habían sido previamente estandarizadas por investigadores del grupo de muerte celular (Martinez, 2010a). Inhibidor de p38 SB203590 (Cell Signaling) 10µM por 1 hora, inhibidor de SAPK/JNK SB600125 (Millipore) 20µM por 1 hora, Tiorredoxina (SIGMA) 100nM por 1 hora, e inhibidor de AKT (LY294002, Cell Signaling) 20µM por 1 hora.

Se realizaron los tratamientos de la siguiente manera:

- Células control sin tratamiento
- Células tratadas con C2-ceramida (130 µM) durante diferentes tiempos según el experimento
- Células tratadas con proteína C activada (5nM) por una hora
- Células tratadas con PCA y C2-ceramida
- Células tratadas con cada uno de los inhibidores
- Células tratadas con los inhibidores y ceramida
- Células tratadas con PCA, cada uno de los inhibidores y ceramida.

5.2 Análisis de proteínas

5.2.1 Inhibidores químicos

Para realizar la inhibición de cada una de las quinasas implicadas en las vías de señalización se utilizaron inhibidores químicos, para cada una de las proteínas (Tabla 5.2.1.1). Para SAPK/JNK se utilizó el inhibidor SB600125, que compite por el sitio de unión a ATP (Ennis, Fultz, and Smith 2005). En el caso de p38 se utilizó el inhibidor SB203590 que inhibe la actividad catalítica de p38 al unirse al sitio de unión al ATP de p38 (Eyers et al. 1998). AKT fue inhibido utilizando LY294002, que inhibe la actividad enzimática de PI3K al competir por el sitio de unión a ATP (Vlahos et al. 1994; L. Hu, Sun, and Hu 2010). Para ASK1 se utilizó Tiorredoxina, que se ha descrito como un inhibidor fisiológico de ASK1, que se une a la región N-terminal de ASK1 y la inhibe, también se ha descrito que TRX en células endoteliales induce la ubiquitización y degradación de ASK1 (Saitoh et al. 1998; Y. Liu 2002).

Quinasa	Nombre del inhibidor	Concentración utilizada
AKT	LY294003	20 μ M
ASK1	Tiorredoxina	100nM
SAPK/JNK	SP600125	20 μ M
p38	SB203580	10 μ M

Tabla 5.2.1.1. Inhibidores químicos de las vías de señalización estudiadas.

5.2.2 Lisis celular

Una vez realizados los diferentes tratamientos, las células fueron lavadas con PBS frío y raspadas. Se les adiciono buffer de lisis (Tris-HCL 20mM pH 7.5, NaCl 150mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, TritonX-100 1%, Pirofosfato de sodio 20 mM, beta glicerofosfato 1mM, Na₃VO₄ 1mM, Leupeptina 1 μ g/ml, PMSF 1mM), se incubaron en hielo por 5 minutos y fueron sonicadas en 3 pulsos de 3 segundos cada uno, y centrifugadas a 14.000 RPM por 10min a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se llevó a cabo la cuantificación de proteínas por el método de BCA. En este ensayo se cuantifica la conversión de Cu²⁺ a Cu⁺ mediada por los enlaces peptídicos de las proteínas, este cambio del estado de oxidación del cobre en un medio alcalino lleva a un cambio en la coloración de la reacción, de un color verde a púrpura. Para esta cuantificación se utilizó como referencia una curva seriada de albumina y se cuantificó en espectrofotómetro a una longitud de onda de 562nm.

5.2.3 Western Blotting

Posterior a la cuantificación de los extractos correspondientes a los diferentes tratamientos, se cargaron 30 μ g de proteínas totales en un gel SDS PAGE al 12%. La electroforesis se llevó a cabo a 100V por 90 minutos. Luego se realizó el proceso de transferencia a la membrada de PVDF a 100V por 1 hora. Una vez transferidas las proteínas a la membrana se llevó a cabo el bloqueo con solución de bloqueo (TBS 1X, Tween 20 al 0.05%, BSA al 1%) por 1 hora en agitación continua, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con TBST (TBS 1X, Tween 20 al 0.05%). Se realizó el tratamiento de la membrana con el anticuerpo requerido en una concentración de 1:500, se utilizaron anticuerpos anti SAPK/JNK, anti SAPK/JNK-p, anti ASK1, anti ASK1-p, anti AKT, anti AKT-p, anti p38, anti p38-p. La incubación de la membrana con el anticuerpo en solución de bloqueo se realizó toda la noche, a continuación se realizaron 3 lavados, cada uno de 5 minutos en agitación continua, y se incubo con el anticuerpo secundario IgG de conejo conjugado con HRP(Cell Signaling Technology) en una concentración de 1:1000 por una hora. Posteriormente se realizó la detección con el estuche ECL. El rompimiento del agente quimio-luminiscente por la actividad enzimática de la peroxidasa de rábano (HRP), produce la emisión de luz que es detectada en una película de rayos X.

5.2.4 ELISA

El ensayo de ELISA se realizó en platos de 96 pozos marca Corning diseñados para ELISA. Inicialmente se trató la placa con 100 μ l del anticuerpo primario que reconocía la forma total de la proteína (dilución 1:1000 en PBS), se incubó a 4°C toda la noche; al día siguiente se retiró el anticuerpo y se procedió a lavar 4 veces con buffer de lavado (PBS 1X y Tween 20 al 0.05%), se realizó el bloqueo con buffer de bloqueo (PBS 1X, Tween 20 al 0.05% y albumina sérica bovina (BSA) al 1%), se incubo a 37°C por 2 horas, después de realizado el bloqueo se lavó 4 veces con buffer de lavado y se colocaron los 20 μ g de extracto proteínas totales dejando en incubación a 37°C por 1 hora. Posteriormente se lavó 4 veces con buffer de lavado y se colocó el anticuerpo secundario, específico para la forma fosforilada de la proteína estudiada (dilución 1:1000), se incubó a 37°C por una hora. Luego de la incubación se procedió a lavar nuevamente cuatro veces

con buffer de lavado y se colocó el anticuerpo anti-IgG de conejo sintetizado en cabra conjugado con HRP, se incubó a 37°C por 30 min y se lavó 4 veces con buffer de lavado. Posteriormente se procede a realizar la detección con TMB utilizando 100µl por pozo e incubando 10min a 37°C. La reacción se detuvo con 100ul de solución stop (HCL 1M) y se cuantificó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450nm.

5.2.5 Inmunofluorescencias

Para realizar las inmunofluorescencias las células fueron cultivadas en cajas de 6 pozos sobre laminillas y en estas cajas se realizaron los tratamientos requeridos.

Una vez terminados los tratamientos se aspiró el medio de cultivo y se lavó con PBS 1X, se fijaron las células con metanol al 100% y se incubó a -20°C por 5 minutos, se lavó 3 veces con PBS 1X y se bloqueó con buffer de bloqueo (BSA al 10% en PBS 1X) a 37°C por una hora, luego se lavó 3 veces con PBS 1X y se colocó el anticuerpo contra la forma fosforilada de la proteína diluido en buffer de bloqueo en una concentración de 1:1000, se incubó a 4°C toda la noche en cámara humificada. A continuación se realizaron 5 lavados con PBS 1X y se colocó el anticuerpo secundario de cabra anti- IgG conejo conjugado con DyLight™ 405 diluido en buffer de bloqueo 1:1000 por 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda, luego se lavó 5 veces con PBX 1X. Según fuera necesario se realizó el marcaje de los núcleos con bromuro de etidio en una concentración de 3ng/ml en PBS 1X. El marcaje de los núcleos se realizó con bromuro de etidio, luego se lavaron 5 veces con PBX 1X y se procedió al montaje de las laminillas en una lámina de vidrio para su posterior observación en un microscopio de fluorescencia.

5.3 Valoración de la apoptosis

5.3.1 Ensayo de viabilidad con MTT

Este método permite determinar la viabilidad celular por medio de una reacción colorimétrica que se presenta al reducirse el compuesto tetrasolito a formazan, tomando una coloración purpura.

Para el ensayo de supervivencia MTT se sembraron las células en caja de 96 pozos, dejando 10.000 células por pozo y se realizaron los diferentes tratamientos a las células. Cumplidos los tiempos de tratamiento se reemplazó el medio por una mezcla de 20% MTT y 80% PBS, se dejó incubar a 37°C por una hora, se retiró el MTT de las cajas por inversión, con golpes secos, se adicionaron 100ml de isopropanol a cada pozo, se dejó en agitación por 30 minutos y se cuantificó en espectrofotómetro a una longitud de onda de 595nm.

5.3.2 Ensayo de viabilidad mediante citometría de flujo

Se realizó por medio del estuche MUSE™ Count and Viability el conteo y viabilidad de las células EA.hy926. Este estuche marca de forma diferencial las células viables y las no viables basado en la permeabilidad de las células y la unión de los colorantes del ensayo al ADN celular (7-AAD y yoduro de propidio).

5.3.3 Actividad Caspasa

5.3.3.1 Análisis de la activación de caspasa 3/7 mediante citometría de flujo

Se realizó la detección de caspasa 3/7 en las células EA.hy926 usando el estuche MUSE™ caspasa 3/7 el cual determina el conteo y el porcentaje de células que están en apoptosis por la actividad de las caspasas ejecutoras 3/7. Uno de los reactivos contiene un colorante que se une al ADN y está conjugado al sustrato DEVD, cuando el colorante se encuentra unido al DEVD, este no puede unirse al ADN. El clivaje del complejo colorante-DEVD por la caspasas 3/7 resulta en la liberación del colorante, su translocación al núcleo y la unión del colorante al ADN y producción de fluorescencia. También tiene en la muestra el marcador 7-AAD como indicador de la integridad estructural, con lo que se logra distinguir de las células vivas las que se encuentran en estadios tempranos de apoptosis.

5.3.3.2 Análisis fluorométrico de la activación de caspasa 3

5.3.3.2.1 Actividad Caspasa 3

Se realizó la detección de la Caspasa 3 con el estuche para medición fluorométrica de caspasa de 3 de SIGMA (CASP-3-F) que se basa en la hidrólisis del péptido sustrato acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-metilcumarina (Ac-DEVD-AMC) por la caspasa 3, resultando en la liberación de la molécula fluorescente 7-amino-4 metilcumarina (AMS). La fluorescencia fue cuantificada a una longitud de onda de excitación de 360 nm y a 535 nm la emisión.

5.3.3.2.1 Actividad Caspasa 9

Mediante el estuche Chemicon's MCH6/Caspase-9 Fluorometric Protease Assay, se realizó la detección de la activación de la caspasa 9. El ensayo se basa en la detección del clivaje del sustrato LEHD-AFC (7-amino-4-trifluorometil coumarina) por el sustrato o por la caspasa, lo que hace que se libere el AFC emitiendo fluorescencia.

5.4. Análisis Estadístico.

La significancia estadística entre 2 grupos fue realizada usando los métodos no paramétricos U de Mann-Whitney y Significancia asintótica bilateral, por medio del programa IBM SPSS. La significancia estadística se definió con una $P \leq 0.05$

6. Resultados y discusión

Con el fin de evaluar el proceso de apoptosis inducida por ceramida en un modelo *in vitro* de células endoteliales, se procedió a analizar la cinética de la activación/inactivación de las vías de señalización anti-apoptóticas y pro-apoptóticas inducida por el tratamiento con C2-ceramida.

6.1. Determinación de la disminución de la viabilidad en presencia de ceramida

6.1.1 Análisis de la morfología celular.

En estudios anteriores realizados en el grupo de investigación de muerte celular de la Universidad del Rosario se había observado que el tratamiento con ceramida de las células endoteliales EA.hy926 ocasionaba muerte celular. Los resultados obtenidos en los ensayos de actividad caspasa 3, caspasa 8 y caspasa 9, así como la visualización de la condensación de la cromatina y la fragmentación del DNA sugieren que la muerte celular es debida a apoptosis (datos no presentados) (Morales et al. 2009)

Al realizar el tratamiento de las células endoteliales con C2-ceramida (130 μM), compuesto permeable a la membrana plasmática, se aprecia un cambio en la morfología de la célula (encogimiento) y desprendimiento celular (Figura 6.1.1.1). Los resultados sugieren que el tratamiento con ceramida induce la activación de vías de señalización que llevan a la activación de la cascada de las caspasas, clivaje de los elementos estructurales de la célula, como lo son la actina y la fodrina, produciéndose un cambio morfológico visible (Di Bartolomeo and Spinedi 2002; Choi et al. 2006; C.-L. Chen et al. 2008)

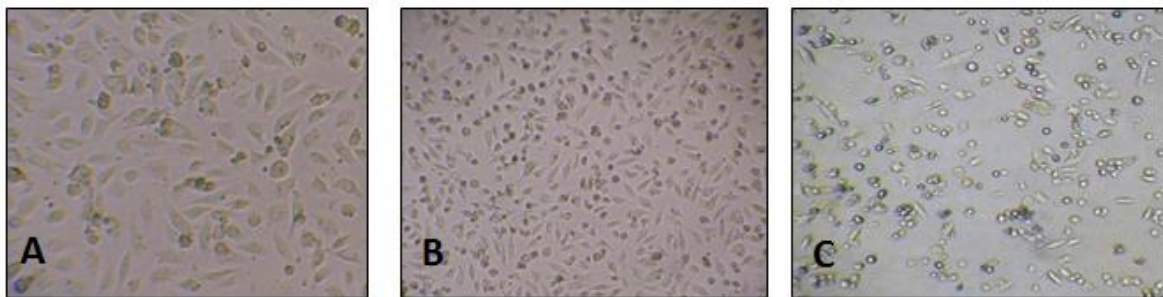


Figura 6.1.1.1 Efecto del tratamiento de ceramida sobre la morfología celular. Las células endoteliales EA.hy926 fueron tratadas con C2-ceramida durante diferentes tiempos, y se observaron los cambios morfológicos inducidos por esta. A. Células endoteliales sin tratamiento. B. Células tratadas con C2-ceramida (130 μM) por 6 horas. C. Células tratadas con C2-ceramida (130 μM) por 12 horas. Morfología observada con microscopía de luz. 400X.

6.1.2 Ensayo MTT

Con el fin de analizar la supervivencia de las células, se realizó una curva de viabilidad durante diferentes tiempos de exposición a la ceramida. Se utilizó C2-ceramida a una concentración de 130 μM y se observó la supervivencia con el ensayo MTT. Los valores de supervivencia observados durante diferentes tiempos de tratamiento muestran una disminución gradual de la viabilidad. Entre 4 y 6 horas aproximadamente el 50% de las células no son viables (Figura 6.1.1.2).

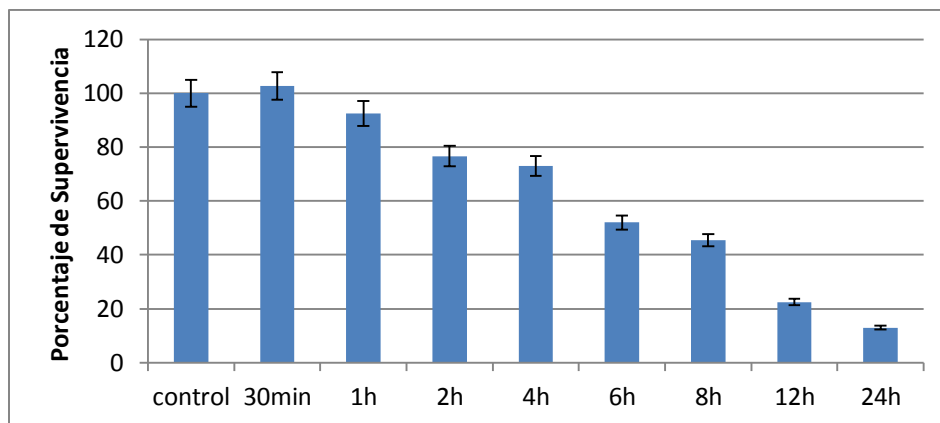


Figura 6.1.2.1. Ensayo de viabilidad relativa. Las células endoteliales fueron tratadas con C2-ceramida durante 24 horas. La detección de las células viables se realizó usando ensayo MTT. Células no tratadas se usaron como un control positivo.

Estudios realizados en neuronas corticales con C2-ceramida usando una concentración de 40µM reportan que las neuronas presentaban una degeneración progresiva. A las 12 horas de tratamiento no se evidenciaba una pérdida de viabilidad significativa, luego a las 24 horas el 50% sobrevivía y a las 48 horas el 10% sobrevivía, lo que nos muestra también una disminución de la viabilidad celular dependiente del tiempo de tratamiento (Willaime et al. 2001)

El principio del MTT, descrito por Slater et al en 1963, sugería que las sales de tetrazolio eran reducidas por las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial, característica que fue aprovechada por Mossman en 1983, para desarrollar el ensayo MTT (Slater, Sawyer, and Strauli 1963; Mosmann 1983). Años después se ha reportado que buena parte de la reducción del MTT ocurre en sitios extra mitocondriales, involucrando a NADH y NADPH, por lo cual sustancias que interfieran con el contenido de NAD(P)H pueden llevar a estimaciones de supervivencia erróneas (Berridge and Tan 1993). Este efecto puede presentarse al realizar el tratamiento de las células con DTT y Tioeredoxina ocasionando resultados sesgados al evaluar la supervivencia con esta técnica.

6.1.3 Activación de caspasas

Para verificar que la muerte celular presentada en estas células corresponde a apoptosis, se analizó la activación de caspasa3/7 mediante citometría de flujo. En este ensayo también se observó un aumento progresivo de las células apoptóticas.

Más del 60% de células son positivas para caspasa3/7 a las seis horas de tratamiento (Figura 6.1.1.3). Con lo que se puede concluir que la ceramida induce muerte celular mediada por caspasas que aumenta con el tiempo de exposición a la toxina.

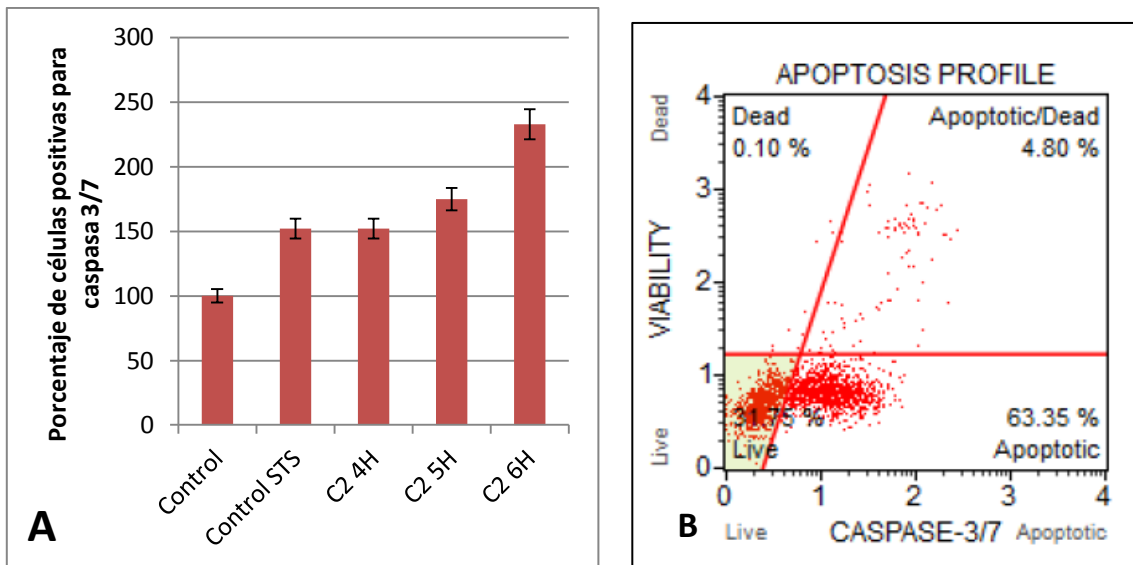


Figura 6.1.3.1 Ensayo de Apoptosis. Las células endoteliales fueron tratadas con C2-ceramida 130 μ M por 6 horas. Se realizó la detección de células en apoptosis usando el estuche MUSE™ Caspasa 3/7. A. Porcentajes de células con marcaje positivo para caspasa3/7 B. Gráfico de puntos de dos dimensiones correspondiente a las 6 horas de tratamiento con ceramida. Las células no tratadas se usaron como control y células tratadas con estaurosporina (STS) en una concentración 10uM, fueron usadas como control positivo de apoptosis.

6.2 Análisis de las vías de señalización

Al comprobar que la muerte celular producida por el tratamiento de las células endoteliales con ceramida correspondía a apoptosis, se procedió a observar lo que ocurría con las quinasas anti apoptóticas AKT y pro apoptóticas ASK1, SAPK/JNK y p38, frente al tratamiento con ceramida. El estudio de la fosforilación/defosforilación de las quinasas se realizó empleando las técnicas de Western Blotting y ELISA.

De acuerdo con lo publicado en la literatura la activación de la quinasa ASK1 (MAPKKK), activa a las quinasas MKK3/6 y MKK4/7, que a su vez activara a p38 MAPK y SAPK/JNK que se encuentran involucradas en la inducción de la apoptosis mediante la modulación de proteínas pro-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-xL) y anti-apoptóticas (Bim, Bax y Bak). (Saitoh et al. 1998; C.-L. Chen et al. 2008; Thévenod and Lee 2013)

6.2.1 Estandarización del ensayo de ELISA

Para la realización de los ELISAs indirectos se tomó como base el protocolo de estuche PathScan® Sandwich ELISA Protocol (Colormetric ELISA) de Cell Signaling, y los protocolos reportados en la literatura (Culteck 2006; Robles 2009) (Figura 6.2.1.1). Inicialmente se estandarizó la cantidad de anticuerpo requerida para cada ensayo, realizando una serie de diluciones de cada anticuerpo (1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000) y utilizando para la detección 30 μ g de proteínas totales provenientes de lisados de células sin tratamiento. Se observó el cambio en la coloración de la placa y el cambio en la absorbancia de la luz en un espectrofotómetro a 450nm (Figura 6.2.1.1 B). De todas las diluciones realizadas se encontró que la dilución 1:1000 era una dilución óptima para el primer y segundo anticuerpo y 1:2000 era suficiente para el tercer anticuerpo, luego se procedió a

estandarizar la cantidad mínima de proteínas totales que podría ser utilizada en el ensayo ((Figura6.2.1.1 C), realizando la prueba con 10µg, 20µg, 25µg, 30,µg y 50µg, y concluyéndose que 20µg era una concentración adecuada de proteínas totales para realizar la prueba. Finalmente se realizó la estandarización de los tiempos de incubación de cada uno de los anticuerpos que forman parte del sistema, y del número de lavados suficientes para optimizar los resultados. (Datos no presentados).

Los ensayos se realizaron en cajas de 96 pozos fondo plano, marca Corning, como aparecen recomendados en el protocolo de PathScan® Sandwich ELISA, se realizó la incubación del primer anticuerpo (sintetizado en ratón) contra la versión total de la quinasa a estudiar (detecta tanto las formas fosforiladas como las desfosforiladas) , en una dilución 1:1000 a 4°C durante toda la noche, posteriormente se realizaron tres lavados con solución de lavado (PBS 1X, Tween 20 al 0.05%), y luego se procedió a realizar el bloqueo de la placa con solución de bloqueo (BSA al 1%, PBS 1X, Tween 20 al 0.05%) a 4°C por una hora, después se realizaron tres lavados con solución de lavado y se procedió a la adición de 20µg de proteínas totales procedentes del lisado celular, se incubo a 4°C por 12 horas y posteriormente se realizaron tres lavados, luego se adicionó el anticuerpo que reconoce la forma fosforilada de la quinasa a estudio (sintetizado en conejo) a una dilución de 1:1000 se realizó una incubación por una hora a 37°C, luego de la incubación se realizaron tres lavados con solución de lavado y se adicionó el anticuerpo de detección (anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a HRP sintetizado en cabra) en una dilución de 1:2000, y se incubó por una hora, seguido de tres lavados con la solución de lavado. Finalmente se realizó el proceso de detección usando 100 µl TMB (sustrato de HRP), se incubó durante 10 minutos a 37°C. La reacción se detuvo con HCL 1M. La lectura de las placas se realizó en un espectrofotómetro a longitud de onda de 450nm (Figura 6.2.1.1).

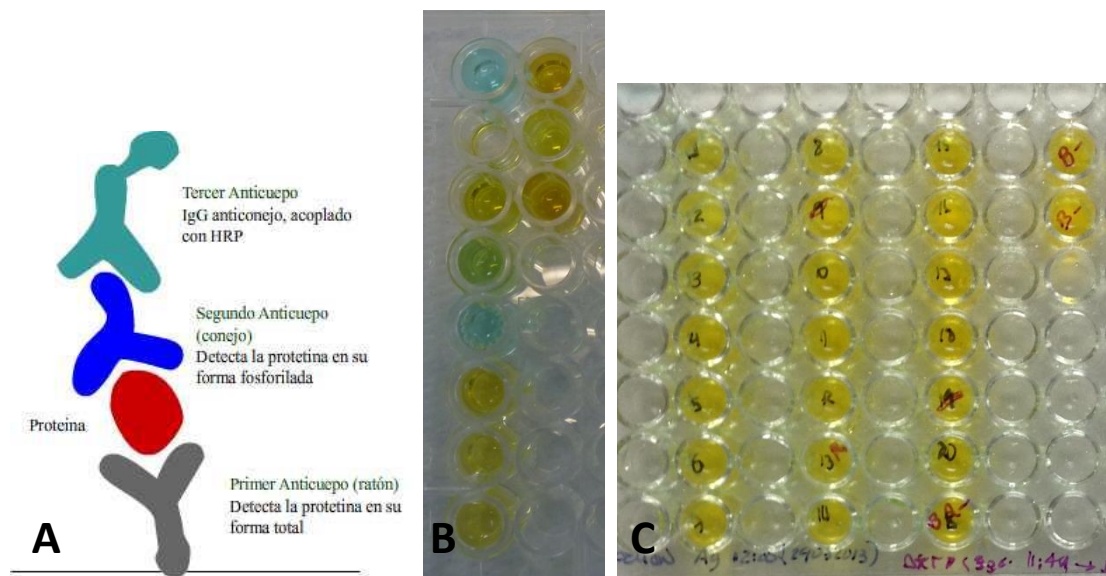


Figura 6.2.1.1. Ensayo de Elisa Indirecto. Se realizó la prueba de ELISA indirecto para cada quinasa analizada. A. En primer lugar se utiliza un anticuerpo de ratón contra la forma total de la proteína a estudio, seguido de un segundo anticuerpo de conejo contra la forma fosforilada de la proteína y finalmente se usa un tercer anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a HRP para la detección de la reacción usando TMB. B. Ensayo realizado para la estandarización de la dilución de los anticuerpos C. Ensayo realizado para la estandarización la concentración de proteínas.

6.2.2 Western Blotting

La detección de las formas fosforiladas de las quinasa mediante Western Blotting es complicada debido a la presencia de gran cantidad de fosfatasa en los extractos celulares. En los cocteles de inhibidores se usaron 2.5 mM pirofosfato de sodio, 1 mM β -glicerofosfato, 1 mM Na_3VO_4 y 1 mM de fluoruro de sodio. Debido a que la caseína de la leche es rica en proteínas fosforiladas y con el fin de evitar que el anticuerpo fuese a reaccionar inespecíficamente con estas proteínas, se empleó BSA en lugar de leche descremada a la solución de bloqueo. También se omitió el uso de Tween 20 en las soluciones de bloqueo y de lavado. Adicionalmente se intentó agregar directamente a las células el buffer de carga, con el fin de disminuir la probabilidad de que las enzimas las fosfatasa defosforilaran las proteínas. A pesar de la implementación de estas modificaciones no siempre fue posible obtener buenas señales y por lo tanto se priorizó el uso de la técnica de ELISA indirecto.

6.2.3 Determinación de la inactivación/defosforilación de AKT en presencia de ceramida

AKT ha sido descrita como la principal quinasa implicada en las vías de señalización anti-apoptótica. Esta proteína es activada por fosforilación de los aminoácidos serina en la posición 473 y treonina en la posición 308. Para determinar la activación/inactivación se utilizaron las técnicas de Western blotting y ELISA.

El análisis de la activación de AKT en células tratadas con C2-ceramida ($130\mu\text{M}$) se realizó por medio de las técnicas ELISA y Western Blotting. La ceramida se aplicó durante diferentes tiempos, desde 5 minutos hasta 1 hora, observándose un aumento en la activación de AKT entre los primeros 5 a 15 minutos de tratamiento y con una posterior disminución gradual de la activación hacia la hora de tratamiento (Figura 6.2.3.1 parte A)

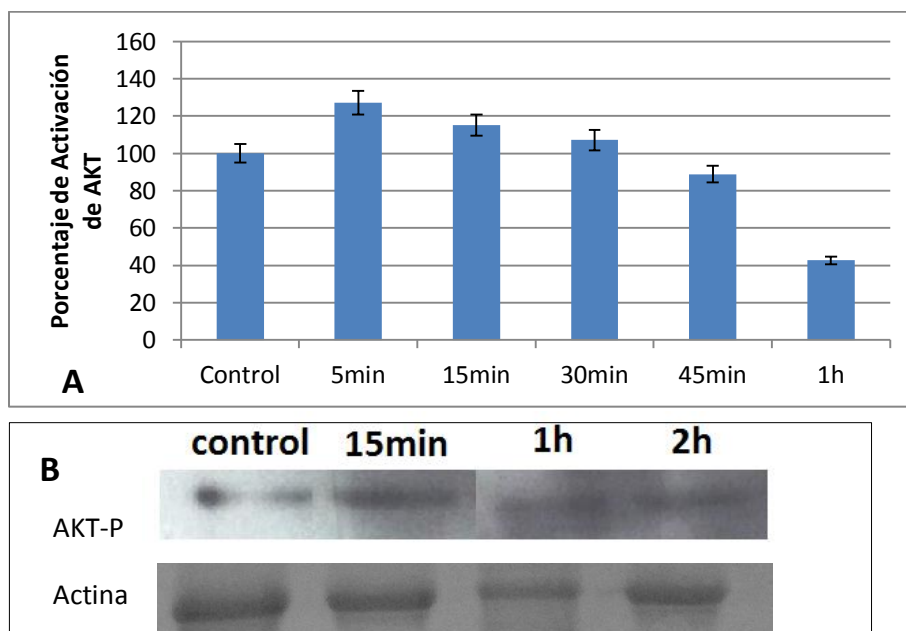


Figura 6.2.3.1. Activación de AKT con el tratamiento con C2-ceramida. Las células EA.hy926 fueron tratadas con $130\mu\text{M}$ de C2-ceramida. A. Se observó por medio de la técnica de ELISA la fosforilación de AKT a los 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos y una hora de

tratamiento. Se tomaron como control las células sin tratamiento B. Fosforilación de AKT a los 15 minutos, 1 y 2 horas mediante Western Blotting. Se utilizó el anticuerpo contra la forma fosforilada de AKT en la posición Ser-473. Se tomaron como control las células sin tratamiento.

Los resultados obtenidos usando la técnica de Western Blotting para la determinación de la activación de AKT también muestran un aumento de la fosforilación/activación a los 15 minutos de tratamiento, con una disminución a la hora y que persiste a las 2 horas (Figura 6.2.3.2). El aumento y posterior disminución de la fosforilación de AKT fue también observado en el ELISA. Se ha reportado en estudios realizados en células neuronales que la activación de AKT disminuye por la acción de la C2-ceramida (Grassmé et al. 2008; Arboleda et al. 2010). También ha sido reportada la disminución de la activación de AKT en células promieloblastos, HL-60, ocasionada por el tratamiento con ceramida, lo que podría confirmar los hallazgos encontrados en las células endoteliales (Hae Jong Kim et al. 2008).

6.2.4 Determinación de la activación/fosforilación de las quinasas SAPK/JNK y p38 MAPK en presencia de ceramida

La activación de las quinasas pro-apoptóticas SAPK/JNK y p38 en las células endoteliales tratadas con C2-ceramida se estudió mediante Western Blotting y ELISA.

6.2.4.1. Activación/fosforilación de la quinasa SAPK/JNK en presencia de ceramida

En los resultados del Western blotting se aprecia un aumento inicial de la activación de SAPK/JNK entre los 30 minutos y las 2 horas de tratamiento, con una ligera disminución hacia la tercera hora (Figura 6.2.4.1.1 A). Al realizar el ensayo de ELISA se observó un ligero aumento en la primera hora de tratamiento con respecto al control y una disminución de la activación en la tercera hora, semejando un poco lo observado por medio de la técnica de Western Blotting (Figura 6.2.4.1.1 B).

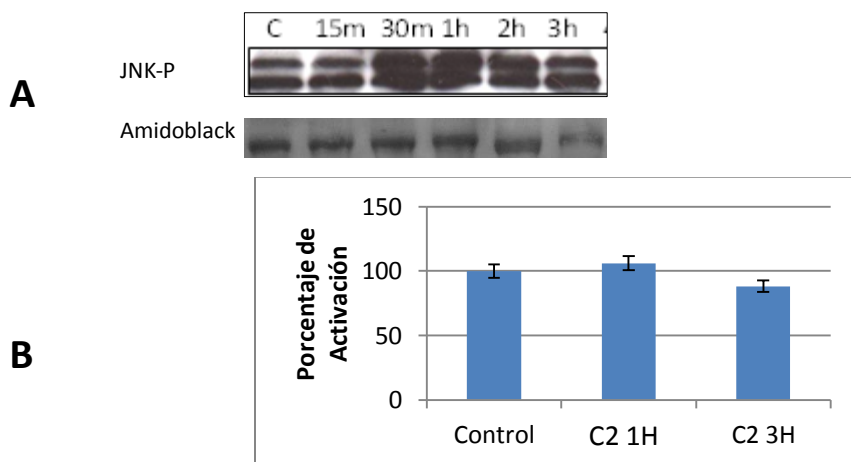


Figura 6.2.4.1.1 Activación de SAPK/JNK con el tratamiento con C2-ceramida. Las células EA.hy926 fueron tratadas con 130 μ M de C2-ceramida. Por medio de la técnica de western blotting (A) y ELISA (B) se observó la activación por medio de fosforilación de la molécula SAPK/JNK. Los tratamientos con ceramida se realizaron durante 15, 30 minutos y 1, 2 y 3 horas. Se tomó como control (C) las células sin tratamiento. Se tomó como control de carga la membrana teñida con amidoblack. Se utilizó el anticuerpo contra la forma fosforilada de SAPK/JNK en las posiciones Thr-183/Tyr-185.

La ceramida modula las señales apoptóticas de la célula e induce la activación de SAPK/JNK (C.-L. Chen et al. 2008). En células neurales la ceramida induce la activación de SAPK/JNK y a p38, por lo que es posible que se presente un efecto similar en las células endoteliales (Stoica et al. 2005). En otro estudio de muerte neuronal inducida por ceramida se reporta un aumento en la fosforilación de SAPK/JNK a partir de las 6 horas de tratamiento hasta las 24 horas de tratamiento (Willaime et al. 2001). Lo que implica que en los modelos de muerte celular de endotelio y neuronas inducida por ceramida se encuentra implicada en la activación de la vía proapoptótica SAPK/JNK.

6.2.4.2. Activación/fosforilación de la quinasa p38 en presencia de ceramida

En el caso de la quinasa p38, los resultados de Western Blotting muestran un aumento progresivo de la activación/fosforilación de p38 hasta las 5 horas. Al observar la activación en tiempos cortos por medio de la técnica de ELISA se observa un aumento entre los cinco y los quince minutos de tratamiento que posteriormente disminuye hacia la hora de tratamiento (Figura 6.2.4.2.1), presentándose posiblemente una forma de activación bimodal de p38 con el tratamiento con ceramida.

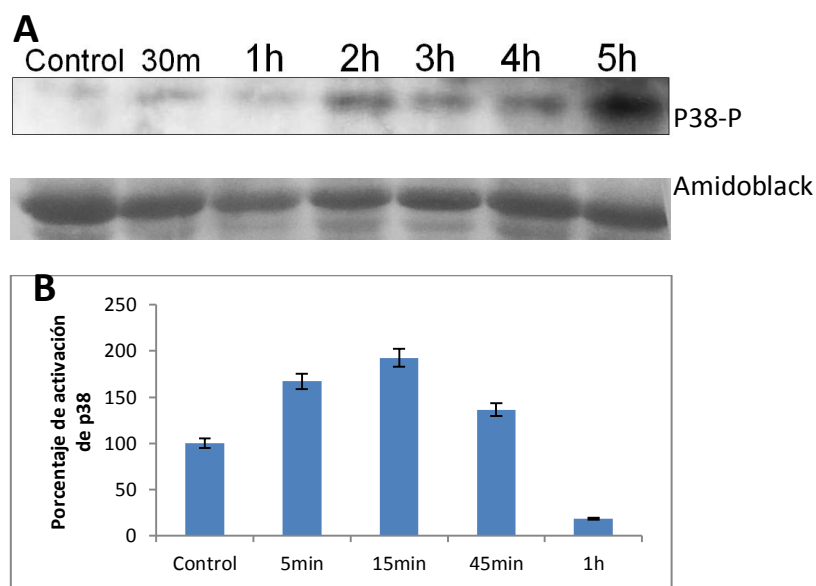


Figura 6.2.4.2.1. Activación de p38 con el tratamiento con C2-ceramida. Las células EA.hy926 fueron tratadas con 130 μ M de C2-ceramida durante diferentes tiempos y se observó la actividad de p38 a través del tiempo. A. Western Blotting. B. ELISA. Se tomó como control (C) las células sin tratamiento. Se utilizó el anticuerpo contra la forma fosforilada de p38 en las posiciones Thr-180/Tyr-182.

En células HL-60 tratadas con ceramida se ha descrito un aumento de la activación/fosforilación de p38, esto mismo ha sido reportado en los estudios realizados en hibridoma de células T de ratón (C.-L. Chen et al. 2008; Hae Jong Kim et al. 2008), lo que se podría correlacionar con los hallazgos encontrados. Willaime y colaboradores reportan la activación de p38 desde tiempos tempranos y que se mantiene por 24 horas, en un modelo de muerte neuronal inducido por ceramida.

6.2.4.3 Activación/fosforilación de la quinasa ASK1 en presencia de ceramida

Al analizar la activación de ASK1 debida al tratamiento con ceramida se observa tanto en los resultados del Western Blotting como en los resultados de la técnica de ELISA, un aumento de la activación entre la primera y la cuarta hora (Figura 6.2.4.3.1).

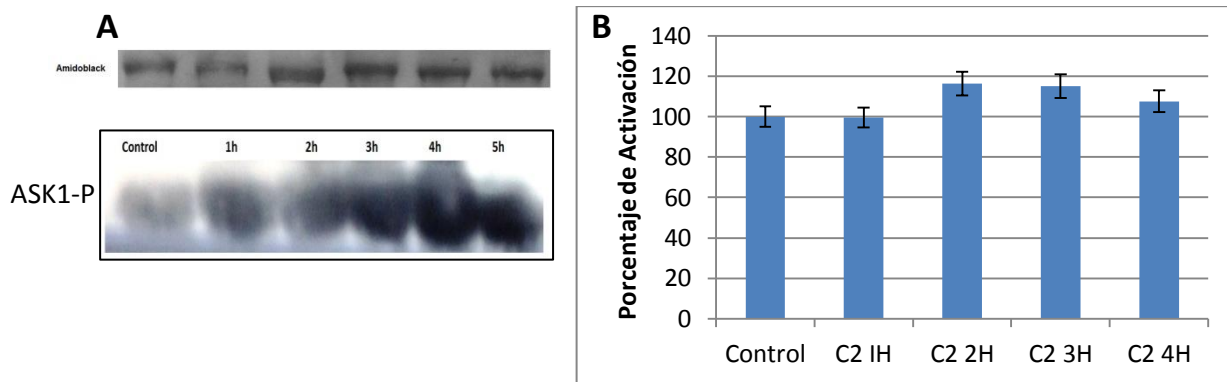


Figura 6.2.4.3.1. Activación de ASK1 con el tratamiento con C2-ceramida. Las células EA.hy926 fueron tratadas con 130 μ M de C2-ceramida durante diferentes tiempos. Se observó la actividad de ASK1 a través del tiempo. A. Western Blotting. B. ELISA. Se tomó como control (C) las células sin tratamiento. Se utilizó el anticuerpo contra la forma fosforilada de ASK en la posición Ser-83.

Estudios previos que reportan que la ceramida está relacionada con el aumento de la activación de ASK1, en células T Jurkat, debido a que la ceramida induce la expresión de TXnip que produce la inhibición de ASK1 (C.-L. Chen et al. 2008). También está descrito que el efecto de aumento de activación de la ceramida sobre ASK está relacionado con el aumento de la activación de SAPK/JNK y p38 (Morad and Cabot 2013)

Es posible que las células al ser tratadas con la ceramida presenten un aumento inicial temprano de la activación las proteínas quinasas ASK1, SAPK/JNK y p38, que posteriormente disminuye ligeramente. Esta activación inicial podría estar desencadenando el proceso de apoptosis en la célula al activar fosfatasas que inactivan a la vía de supervivencia AKT. Se ha reportado en la literatura que la acción de las quinasas en la célula es dependiente de la concentración y el tiempo que tengan en la célula para producir su acción (Wagner and Nebreda 2009)

Para la realización de los ensayos ulteriores, las células se trataron con ceramida durante cuatro horas debido a que los resultados de viabilidad y de activación de caspasas 3/7 muestran que en este periodo de incubación aproximadamente el 50% de las células están muertas. Otra razón es que entre las 3 y las 4 horas se encuentra la mayor activación de la quinasa pro-apoptótica ASK1 (Figura 6.2.4.3.1)

6.2.4.4 Localización de la quinasa SAPK/JNK en el núcleo

Al realizar el tratamiento de las células con C2-ceramida, se observó la localización de la quinasa SAPK/JNK fosforilada en el núcleo (Figura 6.2.4.4.1)

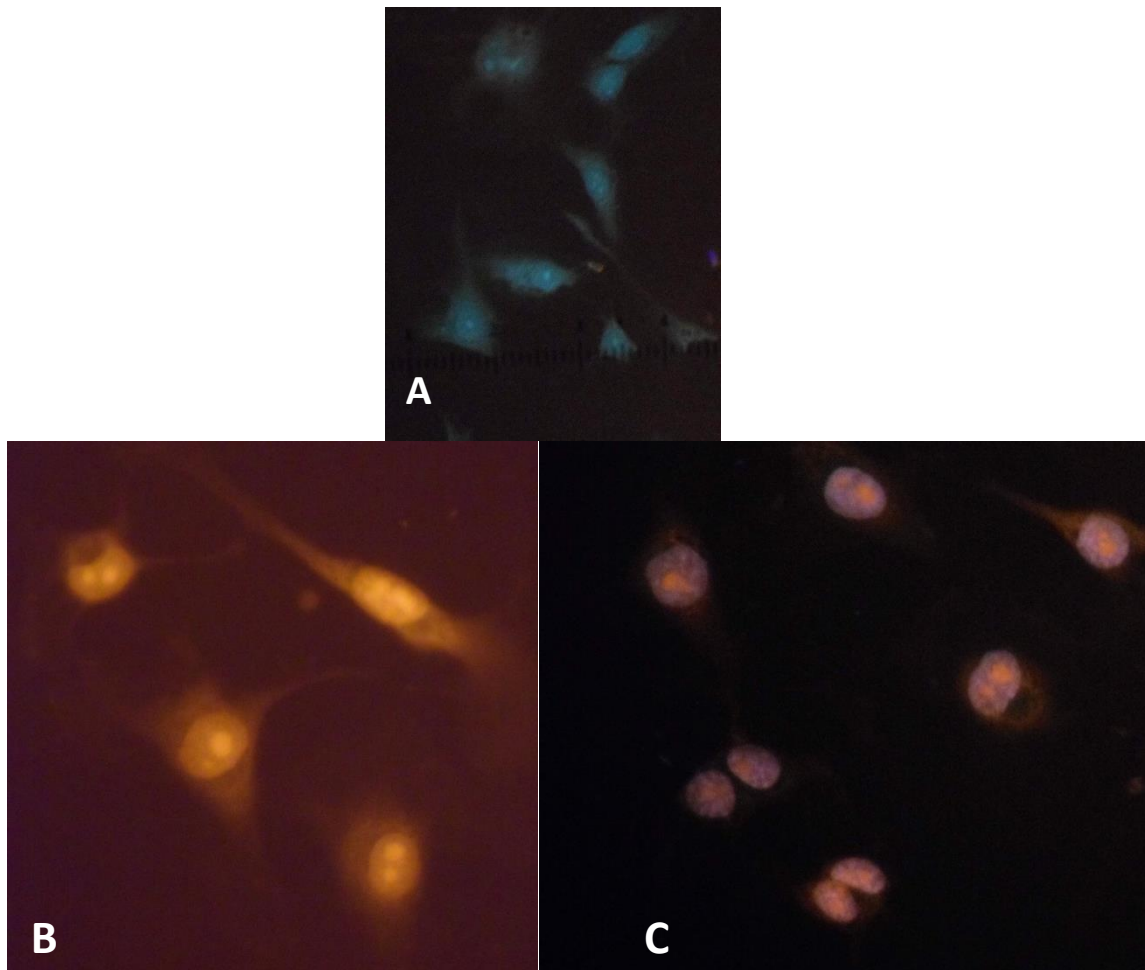


Figura 6.2.4.4.1. Localización de la quinasa SAPK/JNK en el núcleo. Las células endoteliales EA.hy926 fueron tratadas con C2-ceramida 130 μ M por 3 horas y se observó la ubicación de SAPK/JNK fosforilada. A. Células con el anticuerpo contra la forma fosforilada de JNK detectado con el anticuerpo secundario conjugado a DyLight™ 405. B. Células con el anticuerpo contra JNK conjugado con DyLight™ 405, núcleos teñidos con bromuro de etidio. C. Células con los núcleos marcados con bromuro de etidio.

Al realizar el tratamiento de las células con C2-ceramida por 3 horas y observar la ubicación de SAPK/JNK fosforilada en las células endoteliales por medio de inmunofluorescencia podemos observar la presencia de esta quinasa en el núcleo de las células, lo que puede sugerir una posible translocación de SAPK/JNK al núcleo, probablemente debida al tratamiento con ceramida. Este efecto también ha sido descrito en células neuronales tratadas con ceramida en una concentración de 40 μ M a partir de las 8 horas de tratamiento (Willaime-Morawek et al. 2003).

6.3. Efecto del tratamiento con PCA sobre las vías de señalización

6.3.1 Efecto del tratamiento con PCA sobre la activación de AKT

En estudios previos realizados por integrantes de la línea de investigación en muerte celular se había analizado la actividad anti-apoptótica de la proteína C activada (PCA) en modelos de apoptosis endotelial y apoptosis neuronal. Los resultados mostraban que el pre-tratamiento con PCA (5nM) reducía la muerte celular inducida por ceramida que y esta disminución estaba relacionada con la activación de AKT. Sin embargo, la PCA no mostro actividad antiapoptótica cuando se realizaba el cotratamiento con ceramida o cuando la PCA se aplicaba posterior al tratamiento con ceramida (Morales et al. 2009; Camargo 2010; Martinez 2010a). Estos resultados fueron corroborados en este estudio. Debido a que los resultados de las cinéticas de activación de las diferentes quinasa obtenidos usando ELISA presentaron un comportamiento similar al observado con Western Blotting, en esta parte del trabajo se empleó principalmente el método ELISA.

Al realizar el cotratamiento de las células con C2-ceramida y con PCA se observa un aumento significativo de la activación de AKT comparado con las células tratadas con ceramida. Este incremento en la activación de AKT puede estar relacionado con la protección de la célula endotelial contra apoptosis (Esmon 2003; Cheng et al. 2003; Mosnier and Griffin 2003; Hemmer et al. 2011b). En estudios previos con un análogo de PCA (3K3A-PCA) en células progenitoras neurales humanas también se encontró un aumento en la activación de AKT (Guo et al. 2013)

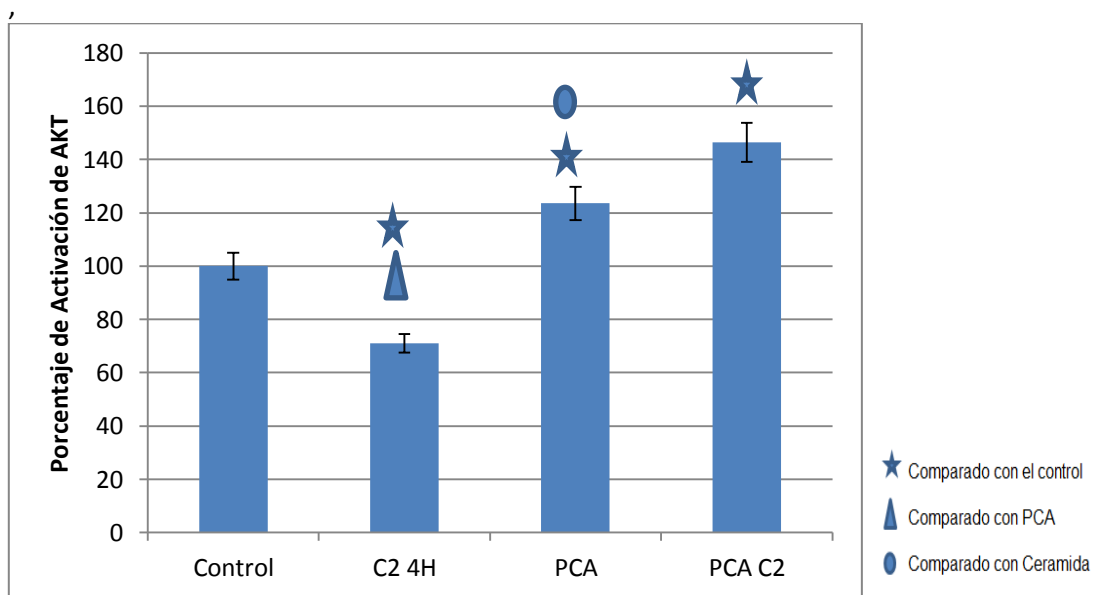


Figura 6.3.1.1 Activación de AKT. Las células endoteliales Ea.hy926 fueron tratadas con C2-ceramida (130 μ M) por 4 horas y PCA (5nM) por una hora. Se observó la activación de la quinasa anti-apoptótica AKT. Se utilizaron como control células sin tratamiento. Se considera el nivel de significancia $p \leq 0.05$

6.3.2 Efecto del tratamiento con PCA sobre la activación/inactivación de ASK1, p38, SAPK/JNK quinasas

Se analizó el efecto de la PCA sobre la activación/inactivación de las quinasas proapoptóticas ASK1, SAPK/JNK y p38 por medio de la técnica de ELISA. Se observó que el tratamiento de las células endoteliales únicamente con la PCA lleva a una disminución en la activación de las quinasas proapoptóticas. Al realizar el tratamiento de las células con PCA y posteriormente con ceramida se aprecia también una reducción en la activación de estas quinasas con respecto al tratamiento solo con ceramida (Figura 6.3.2.1).

Este efecto de disminución de la activación de p38 inducido por PCA ha sido previamente descrito en células endoteliales tratadas con IL-1 β (Nold et al. 2007).

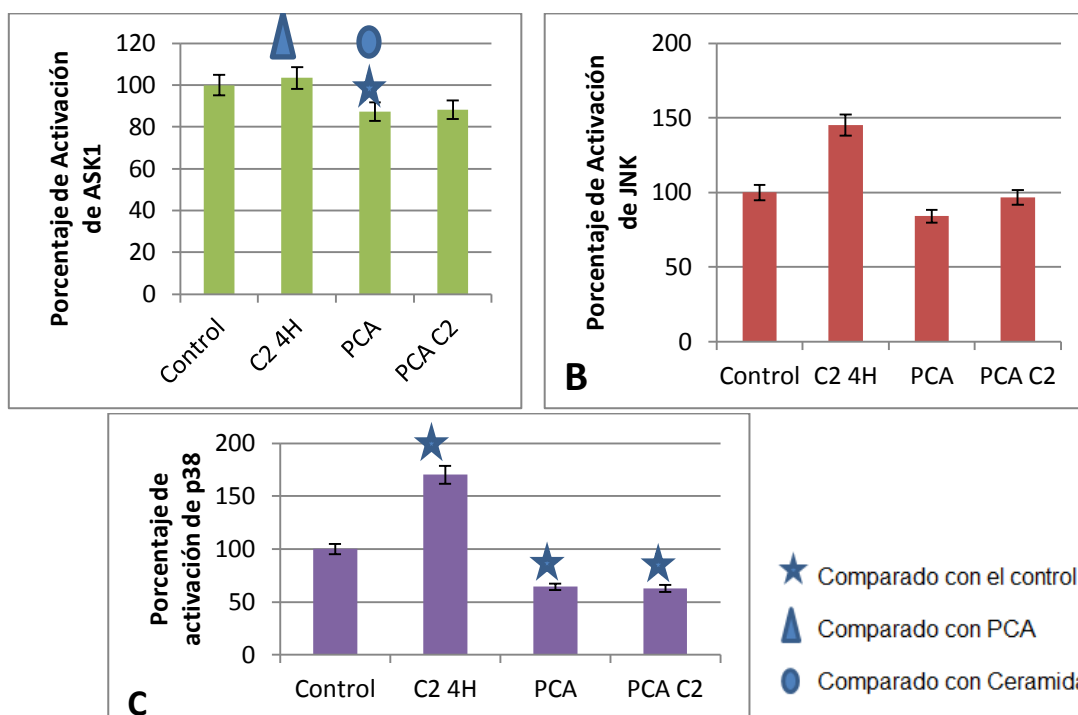


Figura 6.3.2.1. Activación de quinasas proapoptóticas ASK1, SAPK/JNK y p38. Las células endoteliales Ea.hy926 fueron tratadas con C2-ceramida (130 μ M) por 4 horas y PCA (5nM) por una hora. Se observó la activación de las quinasas pro-apoptóticas ASK1 (A), SAPK/JNK (B), y p38 (C), se utilizaron como control células sin tratamiento. Se considera el nivel de significancia $p \leq 0.05$

La disminución de la activación de ASK, SAPK/JNK y p38 observada en el tratamiento de las células con PCA y C2-ceramida, comparada con el nivel de activación de estas mismas quinasas en el caso de las células tratadas solo con C2-ceramida puede ser debido al efecto de activación de AKT producido por la PCA y que contrarrestaría el efecto inhibitorio de la ceramida sobre esta quinasas, logrando además de forma secundaria una disminución de la activación de SAPK/JNK y p38. Chen y colaboradores usando un modelo experimental en ratas con pancreatitis aguda severa que recibieron tratamiento con PCA, describieron una disminución en la expresión pancreática de p38 y SAPK/JNK (P. Chen et al. 2007). En el modelo utilizado en este trabajo se analizó la activación de las vías de señalización, pero no se realizaron estudios del efecto de PCA sobre la expresión génica.

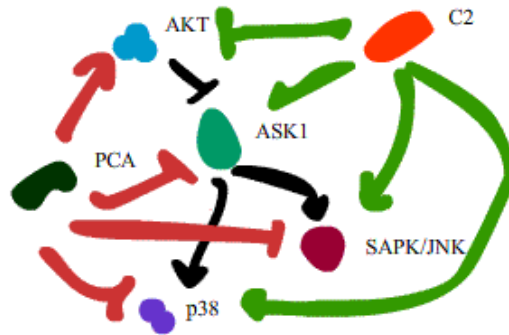


Figura 6.3.2.2 Posible efecto de PCA y C2-ceramida sobre las quinasas AKT, ASK, SAPK/JNK y p38. La ceramida presenta una acción inhibitoria sobre AKT y activadora sobre ASK1 e indirectamente sobre SAPK/JNK y p38. Según los resultados encontrados es posible que PCA presente una acción activadora sobre AKT y que indirectamente presente una acción inhibitoria sobre ASK1, SAPK/JNK y p38.

6.4. Determinación de la activación/inactivación de p38, SAPK/JNK, ASK1 y AKT ante la acción toxica de la ceramida en presencia de inhibidores químicos y PCA

6.4.1. Estandarización de las concentraciones de inhibidores

Para cada inhibidor se estandarizaron las concentraciones y los tiempos de incubación de forma que se presentara el efecto inhibitor del reactivo, sin comprometer la supervivencia de las células.

6.4.1.1. Inhibidor de p38

Con el fin de determinar el efecto del tiempo de incubación con el inhibidor de p38 SB203580, sobre la supervivencia celular se utilizó la concentración de 10 μM del inhibidor; esta concentración había sido previamente utilizada en la literatura en modelos de endotelio (Hyo Jung Kim et al. 2005; Liang et al. 2011). Se observa que a la hora de tratamiento hay una supervivencia superior al 60%, razón por la cual esta condición fue seleccionada para realizar el ensayo.

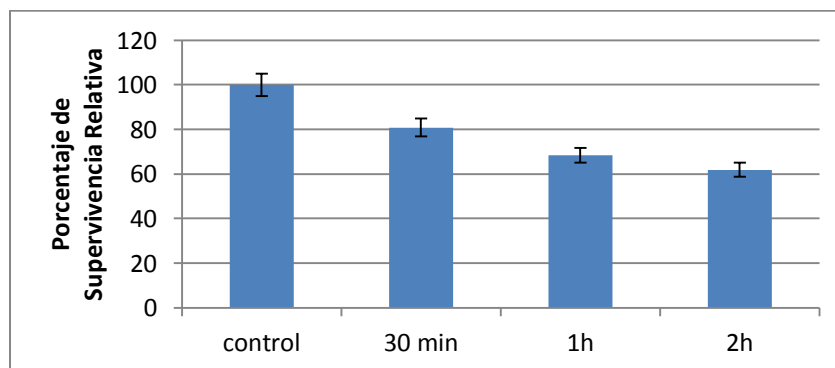


Figura 6.4.1.1.1. Ensayo MTT del inhibidor de p38. Las células EA.hy926 fueron tratadas con el inhibidor de p38 (SB203580) (10 μM) y se midió la supervivencia de las células a los 30 minutos, a la hora y a las dos horas de tratamiento. Se utilizó como control las células sin tratamiento.

6.4.1.2. Inhibidor de SAPK/JNK

Para el caso del inhibidor de JNK (SB600125) se utilizaron 5, 10 y 20 μM del inhibidor con el fin de determinar el efecto de las dosis y el tiempo de incubación con el inhibidor (Figura 6.4.1.1.1) (Palmieri, Perego, and Palombo 2012). Se observó que con una concentración de 10 μM se presentaba una supervivencia de las células de aproximadamente el 80%, por lo que se escogió dicha concentración para realizar los tratamientos ulteriores.

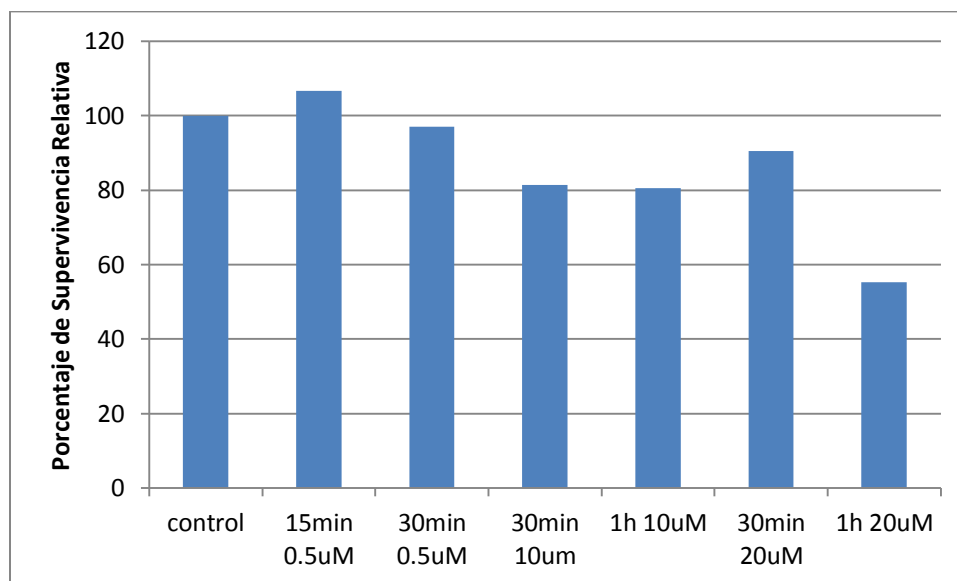


Figura 6.4.1.2.1. Ensayo MTT del inhibidor de SAPK/JNK. Las células EA.hy926 fueron tratadas con el inhibidor de JNK. Se utilizaron 0.5 μM del inhibidor durante 15 minutos, 30 minutos y una hora de tratamiento, 10 μM y 20 μM durante 30 minutos y 1 hora de tratamiento. Se tomó como control las células sin tratamiento.

6.4.1.3. Inhibidor de ASK1

Debido a la actividad de ASK1 es regulada por su estado de óxido-reducción, se utilizó inicialmente el agente reductor DTT (ditiotreitól). Como se muestra en la figura 6.4.1.3.1 el ensayo MTT no es el adecuado puesto que se observa una sobre-estimación de la viabilidad debido a que el DTT reacciona directamente con las sales de tetrazolio (Shoemaker, Cohen, and Campbell 2004). El poder antioxidante de la tiorredoxina también ocasiona el mismo efecto (resultado no mostrado). Por tal motivo, en los experimentos que involucraban los inhibidores químicos de las vías de señalización se utilizaron los ensayos de citometría de flujo con el estuche MUSETM Count and Viability para la determinación de la viabilidad.

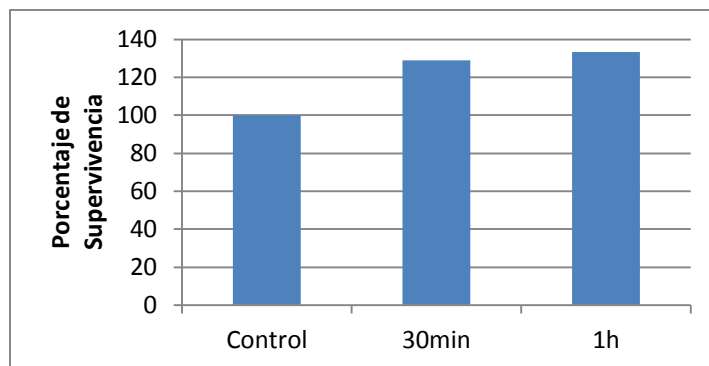


Figura 6.4.1.3.1 Ensayo de MTT en presencia de DTT. Las células EA.hy926 fueron tratadas con DTT y se evaluó la supervivencia observada por medio del ensayo MTT, se realizó el tratamiento con DTT 100 μ M y se midió la absorbancia a los 30 minutos y a la hora tratamiento, se utilizó como control las células sin tratamiento.

Para tiorredoxina se usó una concentración de 100 μ M según lo descrito en la literatura (Rubartelli et al. 1995; Medhora and Dhanasekaran 2008). Se realizó un ensayo de supervivencia por citometría de flujo con el estuche MUSE™ Count and Viability para seleccionar el tiempo de tratamiento y se observó que a la hora de tratamiento se presenta una supervivencia de aproximadamente el 95.06%, por lo que esta concentración fue escogida para este trabajo.

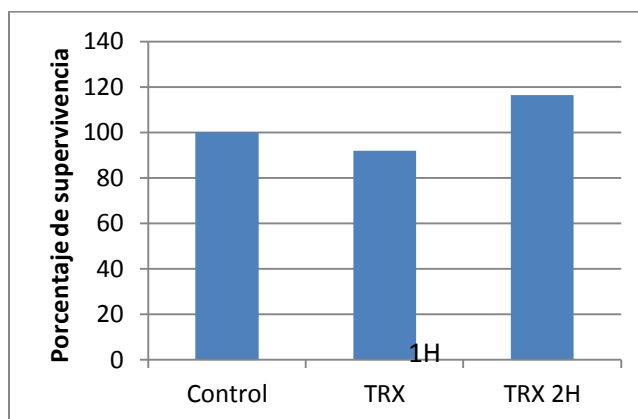


Figura 6.4.1.3.2 Ensayo de supervivencia. Las células EA.hy926 fueron tratadas con 100nM de TRX y se evaluó la supervivencia observada por medio de citometria de flujo con el estuche MUSE™ Count and Viability. Se utilizó como control las células sin tratamiento.

6.4.1.4. Inhibidor de AKT

Para la inhibición de la vía de señalización AKT, se utilizó el inhibidor químico LY294002 a una concentración de 20 μ M por una hora. Esta concentración había sido previamente optimizada para un modelo de apoptosis endotelial inducida por ceramida, por la estudiante del grupo de investigación María Alejandra Martínez en su trabajo de tesis (Martinez 2010)-

6.4.2 Efecto del tratamiento con PCA y con inhibidores químicos sobre la inactivación/defosforilación de p38

Por medio de la técnica de ELISA se observó la activación/fosforilación o inactivación/defosforilación de las proteínas quinasas con el tratamiento con PCA y la inhibición química de cada una de las quinasas

6.4.2.1 Efecto de la inhibición química de p38

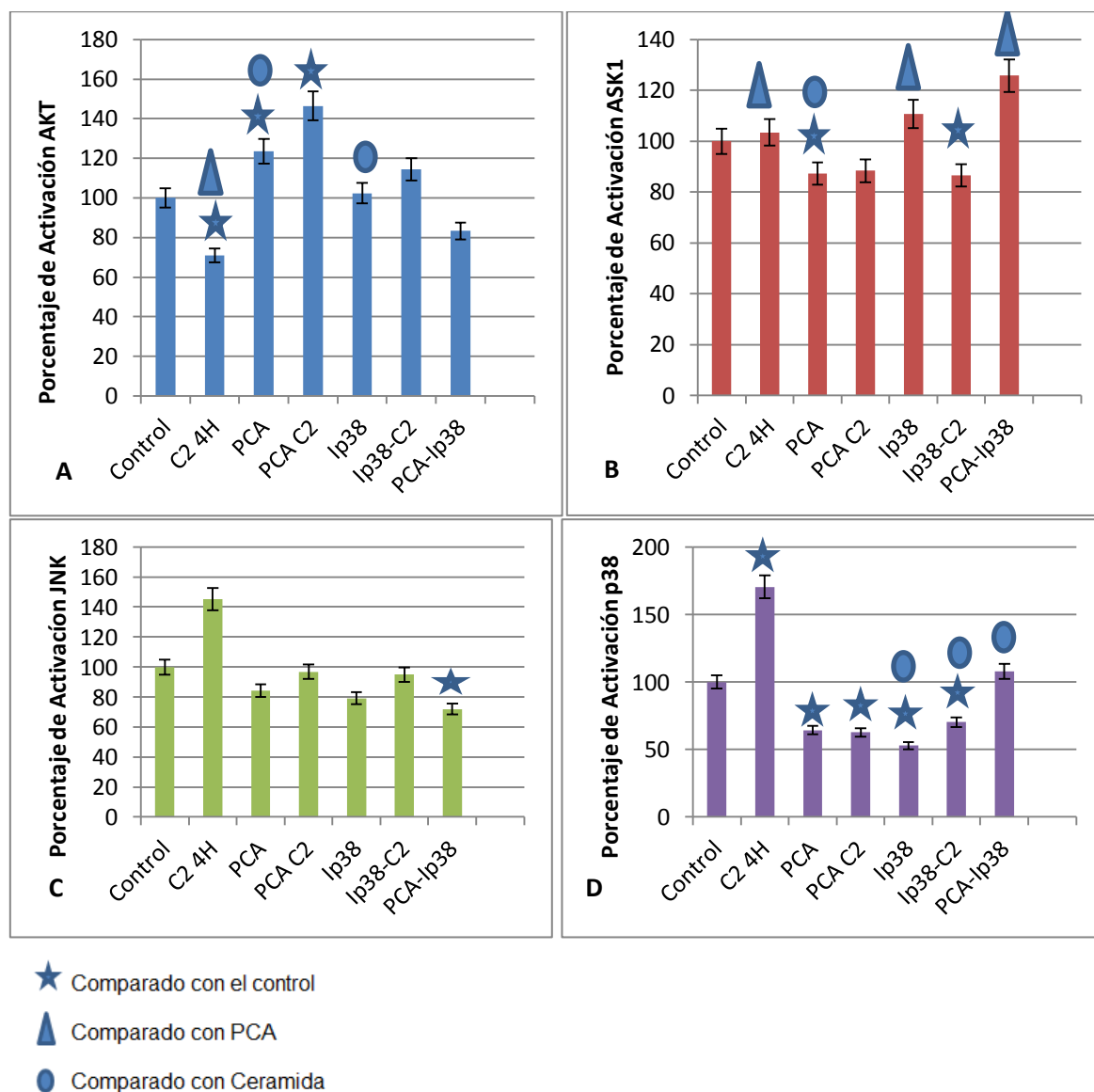


Figura 6.4.2.1.1. Inactivación de p38. Las células endoteliales Ea.hy926 fueron tratadas con C2-ceramida (130 μ M) por 4 horas, PCA (5nM) por una hora, SB203580 (Ip38) 10 μ M por una hora. Se observó la activación de las quinasas AKT, ASK1, SAPK/JNK, p38, se utilizaron como control células sin tratamiento. Se considera el nivel de significancia $p \leq 0.05$

Al analizar los datos obtenidos por medio de la técnica de ELISA (Figura 6.4.2.1.1) se observa que cuando se realizó el tratamiento de las células con el inhibidor de p38, SB203580, se aprecia una disminución de la activación de p38 en un 28.12%. Esta disminución en la activación comparada con el control y con C2-ceramida es estadísticamente significativo y comprueba la inhibición de p38, como se encuentra reportado en la literatura (Hae Jong Kim et al. 2008). El tratamiento con el inhibidor de p38 y el cotratamiento del inhibidor de p38 y C2-ceramida produce un incremento de la activación de AKT comparado con el tratamiento con ceramida (Figuras 6.4.2.1.1). Al realizar el tratamiento. Aunque no se encuentra descrito en la literatura, se encontró que el cotratamiento de PCA y el inhibidor de p38 aumentaban la activación de p38 y de ASK sin afectar la supervivencia (Figuras 6.4.2.1.1, 6.4.2.1.2, 6.5.4.1)

Este efecto ha sido también evidenciado en estudios previos realizados en células HL-60, en donde sugieren que la inhibición de p38 inhibe la defosforilación de AKT inducida por ceramida, lo que podría ser responsable de ese resultado (Hae Jong Kim et al. 2008). Al analizar la activación de ASK se aprecia una disminución de su actividad que es significativa con respecto al control cuando las células son tratadas con ceramida y el inhibidor de p38. Esto podría ser explicado por el efecto de AKT sobre ASK1 (Zhang et al. 2005; C.-L. Chen et al. 2008). Al realizar el cotratamiento las células con PCA y SB203580 se evidencia un aumento en la activación de ASK que es significativo al compararlo con PCA y una disminución de la activación de JNK que es significativo al compararla con el control. Este resultado podría ser explicado por la inhibición de la expresión de SAPK/JNK, descrita previamente por Chen y colaboradores. Se ha descrito que el estrés oxidativo junto con la inactivación de p38 puede hacer que se produzca una activación de AKT (Gutierrez 2010).

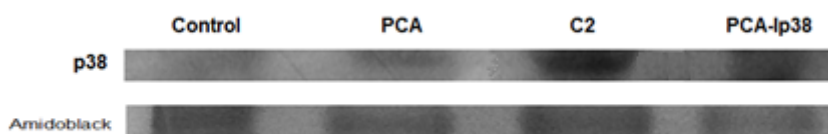


Figura 6.4.2.1.2. Activación de p38 y AKT. Las células endoteliales fueron tratadas con C2-ceramida (130 μ M), PCA (5nM) , e inhibidor de p38 (SB203580 20 μ M). Se observó la activación de p38 (A) y AKT (B) con cada uno de los tratamientos por medio de la tecnica Western Blotting. Se tomó como control las células sin tratamiento.

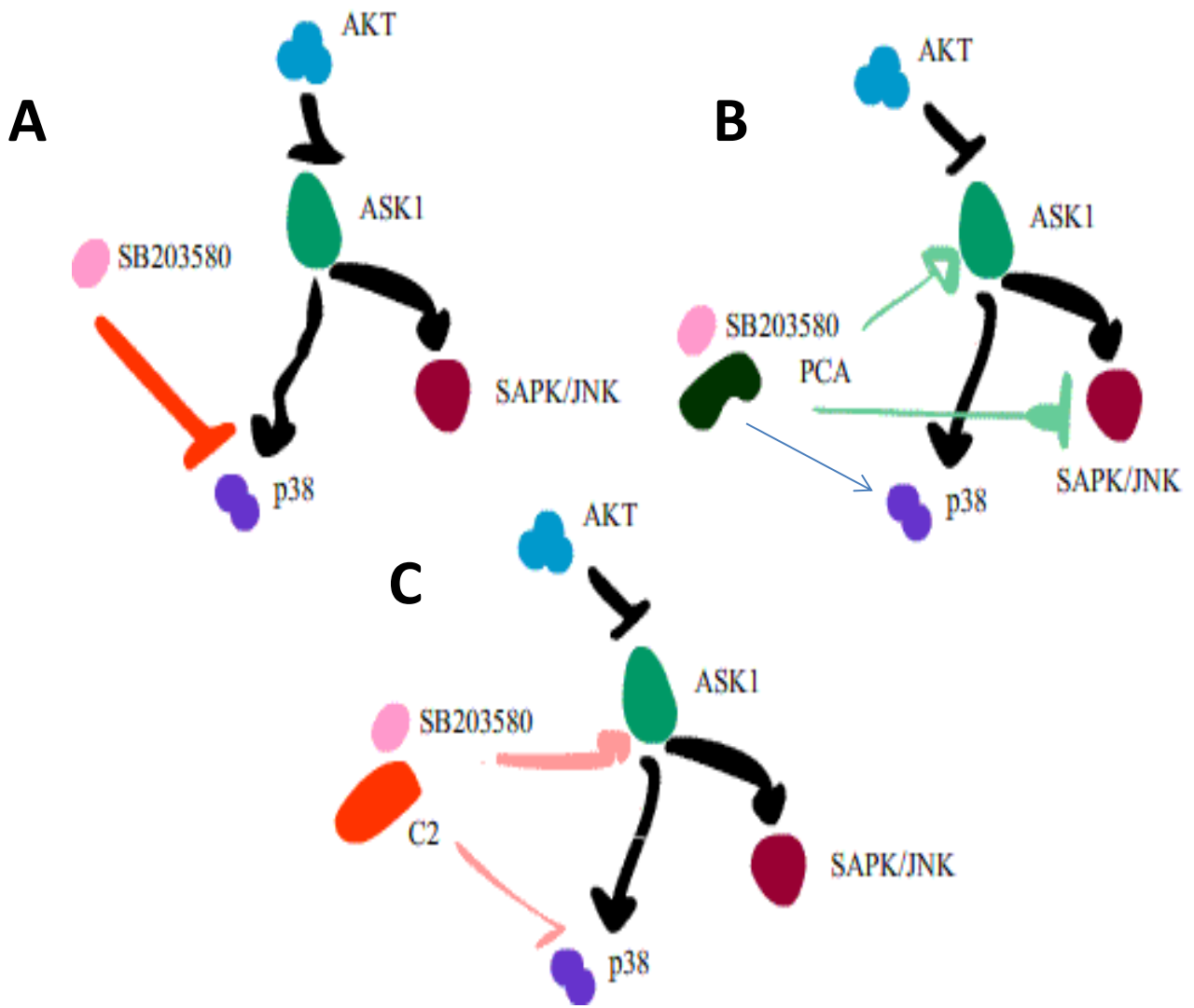


Figura 6.4.2.1.3. Modelo hipotético del efecto de SB203580 sobre las vías de señalización. Se ilustra el efecto de SB203580 y los cotratamientos con PCA y C2-ceramida sobre las quinasas AKT, ASK, SAPK/JNK y p38. A. Efecto del inhibidor sobre las vías. B. Efecto del cotratamiento del inhibidor con PCA. C. Efecto del cotratamiento del inhibidor con ceramida.

6.4.2.2 Efecto de la inhibición química de SAPK/JNK

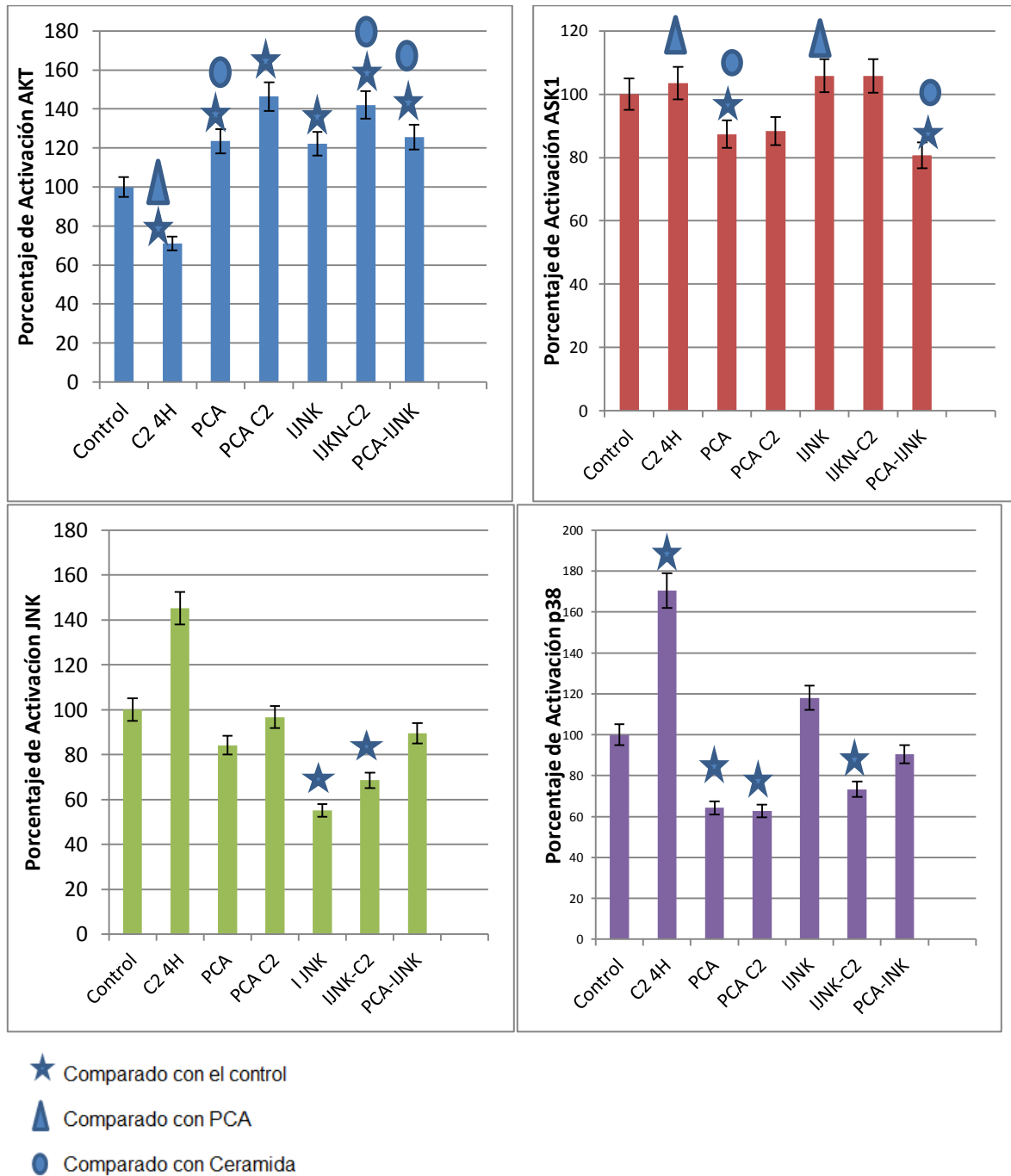


Figura 6.4.2.2.1. Inactivación de SAPK/JNK. Las células endoteliales Ea.hy926 fueron tratadas con C2-ceramida (130 μ M) por 4 horas, PCA (5nM) por una hora, SP600125 (IJNK) 20 μ M por una hora. Se observó la activación de las quinasas AKT, ASK1, SAPK/JNK, p38, se utilizaron como control células sin tratamiento. Se considera el nivel de significancia $p \leq 0.05$

Cuando se realizó el análisis de los tratamientos con el inhibidor de SAPK/JNK por medio de la técnica de ELISA (Figura 6.4.2.2.1) se observó que las células endoteliales que fueron tratadas con el inhibidor de SAPK/JNK SB600125 presentan una inhibición del 44.93% de la activación de SAPK/JNK, estadísticamente significativo frente al control y que corresponde a lo reportado previamente (Palmieri, Perego, and Palombo 2012). También se observa un aumento en la activación de AKT que es significativo frente al control, que podría ser por una acción indirecta del inhibidor de SAPK/JNK sobre la fosforilación AKT. Al tratar las células con el inhibidor de SAPK/JNK y C2-ceramida se observa una disminución significativa de la activación de SAPK/JNK y p38, que pueden deberse a la inhibición de SAPK/JNK. Al realizar el cotratamiento de las células con el inhibidor de SAPK/JNK y PCA se aprecia un aumento significativo en la activación/fosforilación de AKT y una disminución de ASK1. En todos los tratamientos con el inhibidor de SAPK/JNK SP600125 se observó un aumento significativo de la activación de AKT, es posible que exista una acción indirecta de este inhibidor sobre AKT y eso este causando este resultado. Por medio de la técnica Western Blotting se evidenció un aumento importante de la fosforilación de SAPK/JNK con el tratamiento con C2-ceramida y una disminución de esta con los cotratamientos con inhibidor SAPK/JNK-C2ceramida e inhibidor SAPK/JNK-PCA.

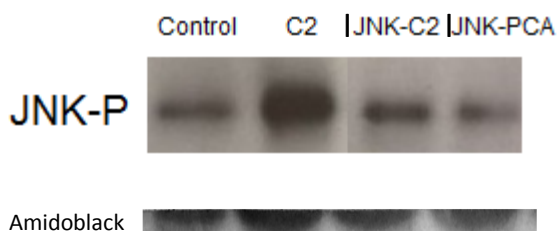


Figura 6.4.2.2. Activación de SAPK/JNK. Las células endoteliales fueron tratadas con C2-ceramida (130 μ M), PCA (5nM) e inhibidor de SAPK/JNK (20 μ M). Se observó la activación de SAPK/JNK por medio de la técnica Western Blotting. Se usaron como control células sin tratamiento.

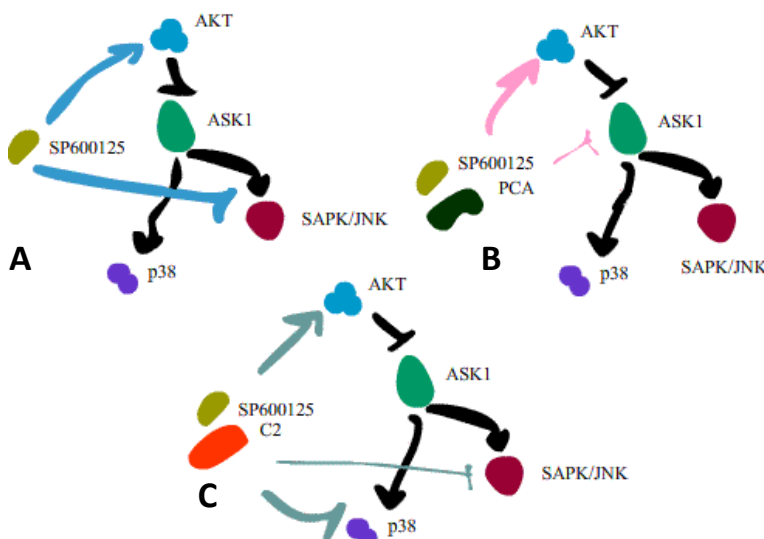


Figura 6.4.2.3. Modelo hipotético del efecto de SP600125 sobre las vías de señalización. Se ilustra el efecto de SP600125 y los cotratamientos con PCA y C2-ceramida sobre las quinasas AKT, ASK, SAPK/JNK y p38. A. Efecto del inhibidor sobre las vías. B. Efecto del cotratamiento del inhibidor con PCA. C. Efecto del cotratamiento del inhibidor con ceramida.

6.4.2.3 Efecto de la inhibición química de ASK1

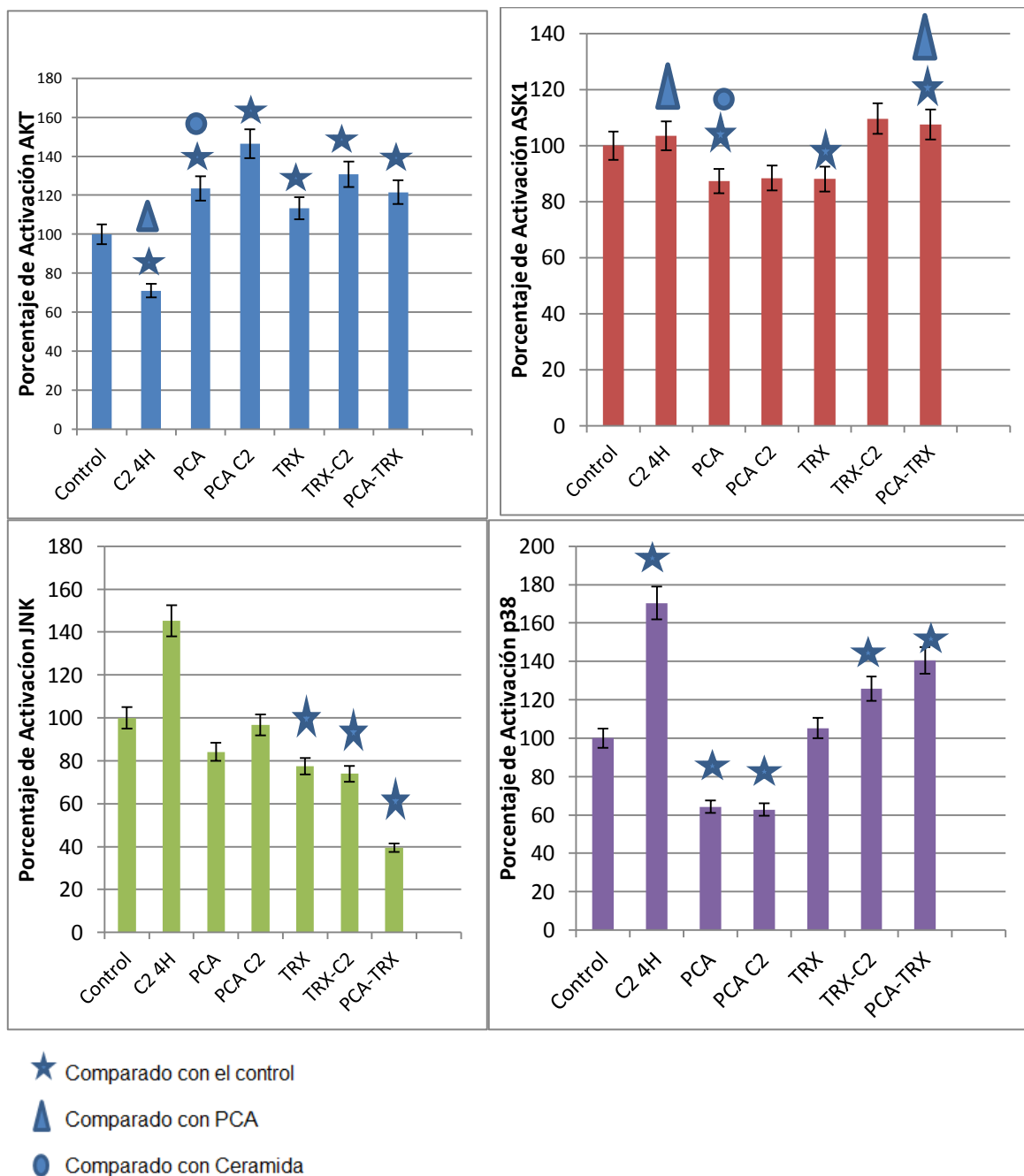
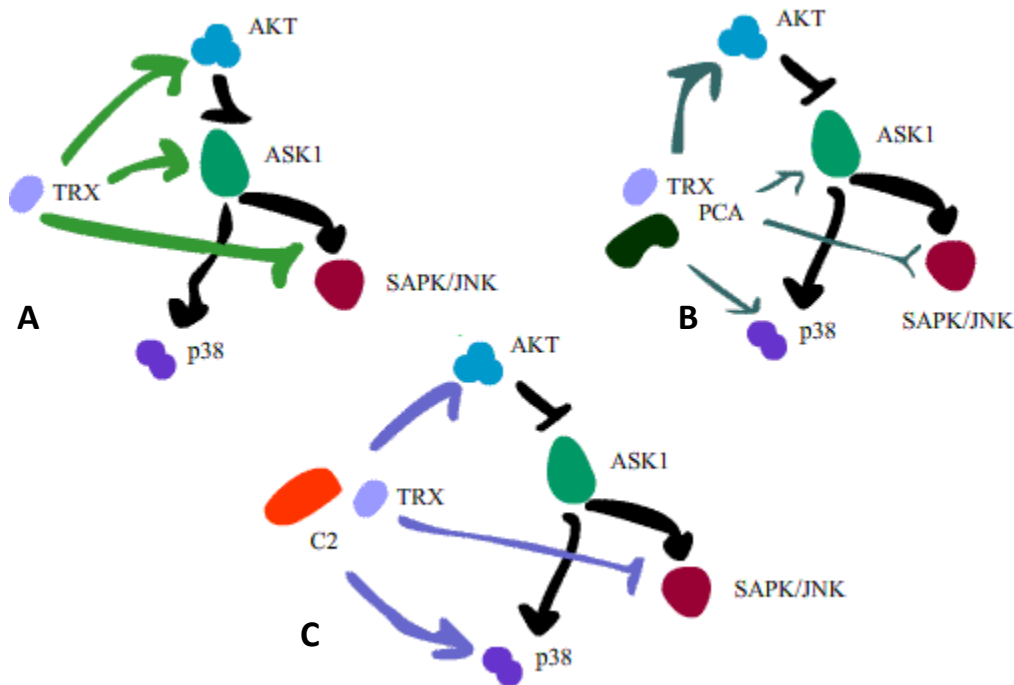


Figura 6.4.2.3.1. Inactivación de ASK1. Las células endoteliales Ea.hy926 fueron tratadas con C2-ceramide (130 μ M) por 4 horas, PCA (5nM) por una hora, TRX (100nM) por una hora. Se observó la activación de las quinasas AKT, ASK1, SAPK/JNK, p38, se utilizaron como control células sin tratamiento. Se considera el nivel de significancia $p \leq 0.05$

Al analizar los resultados obtenidos por la técnica de ELISA (Figura 6.4.2.3.1) se observó que tratamiento de las células con tirorredoxina, el inhibidor de ASK1, produjo una inhibición del

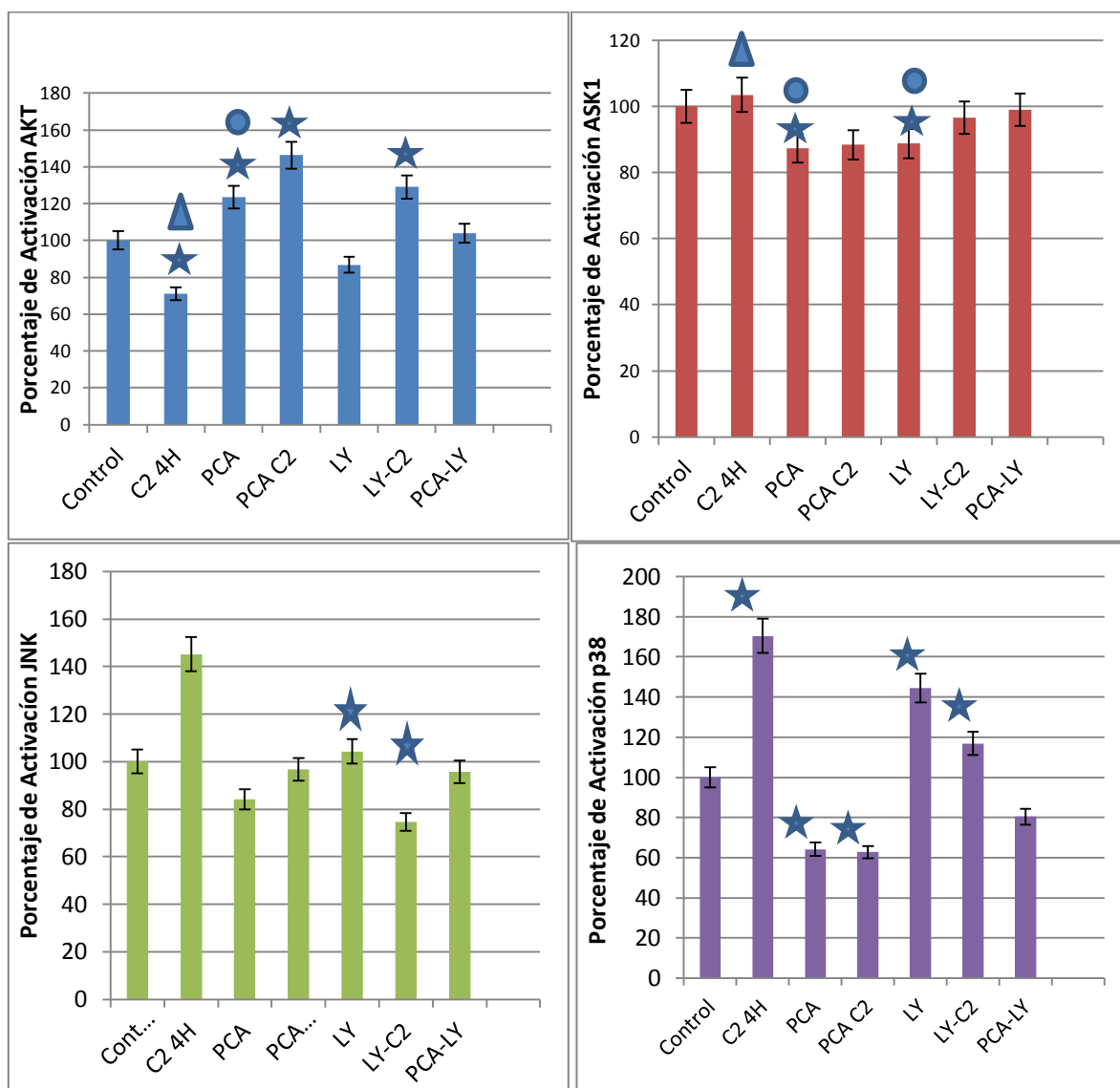
11.93%, que es estadísticamente significativa al compararla con el control y corresponde a lo esperado y reportado por la literatura (Rubartelli et al. 1995). También se observó un aumento en la activación de AKT que es significativo con respecto al control y una disminución significativa de la activación de SAPK/JNK, posiblemente por la inhibición de ASK1 (Y. Liu 2002; Thévenod and Lee 2013). Al realizar el tratamiento de las células con C2-ceramida y TRX se observó un aumento en la activación de AKT significativo. El tratamiento con el inhibidor de ASK1 no tiene efecto sobre la actividad de p38. Una disminución significativa de la activación de SAPK/JNK acorde con la relación existente entre ASK1 y SAPK/JNK. El aumento de la activación de p38 en presencia del inhibidor de ASK1 podría explicarse por la existencia de otra vía de señalización activada por ceramida e independiente de ASK1.

Cuando se realizó el cotratamiento con PCA y TRX se evidenció un aumento en la activación de AKT, lo que se espera debido al tratamiento con PCA, relacionado con la activación de AKT (X. V Yang et al. 2009). La disminución de la activación de SAPK/JNK que pueden ser por la acción de PCA sobre estas quinasas y que en cierta forma evidenciaría una acción de PCA sobre la fosforilación SAPK/JNK no dependiente de ASK1 (C.-L. Chen et al. 2008), y un aumento en la activación de p38.



6.4.2.3.2. Modelo hipotético del efecto de TRX sobre las vías de señalización. Se ilustra el efecto de TRX y los cotratamientos con PCA y C2-ceramida sobre las quinasas AKT, ASK, SAPK/JNK y p38. A. Efecto del inhibidor sobre las vías. B. Efecto del cotratamiento del inhibidor con PCA. C. Efecto del cotratamiento del inhibidor con ceramida.

6.4.2.4 Efecto de la inhibición química de AKT



- ★ Comparado con el control
- ▲ Comparado con PCA
- Comparado con Ceramida

Figura 6.4.2.4.1. Inactivación de AKT. Las células endoteliales Ea.hy926 fueron tratadas con C2-ceramida (130 μ M) por 4 horas, PCA (5nM) por una hora, LY294002 (LY) 20 μ M por una hora. Se observó la activación de las quinasas AKT, ASK1, SAPK/JNK, p38, se utilizaron como control células sin tratamiento. Se considera el nivel de significancia $p \leq 0.05$

Al realizar el tratamiento de las células con el inhibidor de AKT, LY294002 se observa inhibición de la activación de AKT en un porcentaje de 13.21% que no es estadísticamente significativo, similar a lo reportado previamente en otros estudios (Wan et al. 2007). Se observa una disminución significativa de la activación de ASK1, que contradice los resultados obtenidos con el Western Blot

(Figura 6.4.2.4.2) y con estudios previos que muestran la inhibición de ASK1 con AKT (Zhang et al. 2005). También se aprecia un aumento significativo de SAPK/JNK y p38 posiblemente debido a la disminución de la inhibición de AKT sobre estas quinasas. Al cotratarse las células con el inhibidor de AKT y C2-ceramida se observó un aumento significativo de la activación de AKT, una disminución significativa de la activación de JNK y un aumento de la activación de p38. Por medio de la técnica Western Blotting se observó un aumento de la activación de ASK1 con el cotratamiento de LY294002 y C2-ceramida. El tratamiento de las células con el inhibidor de AKT y PCA no mostró cambios significativos.

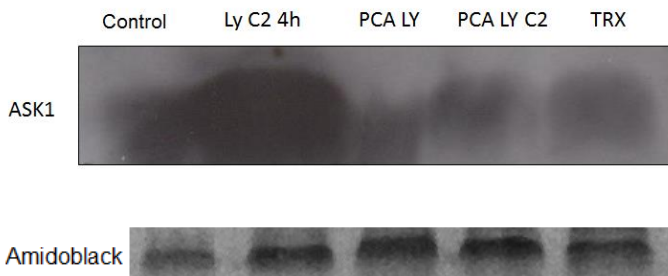


Figura 6.4.2.4.2. Activación de ASK1. Las células endoteliales fueron tratadas con C2-ceramida (130 μ M) por 4 horas, PCA (5nM) por una hora, LY294002 (LY) 20 μ M, TRX(100nM) por una hora. Por medio de la técnica Western Blotting se observó la activación/fosforilación de ASK1. Se usaron como control células sin tratamiento.

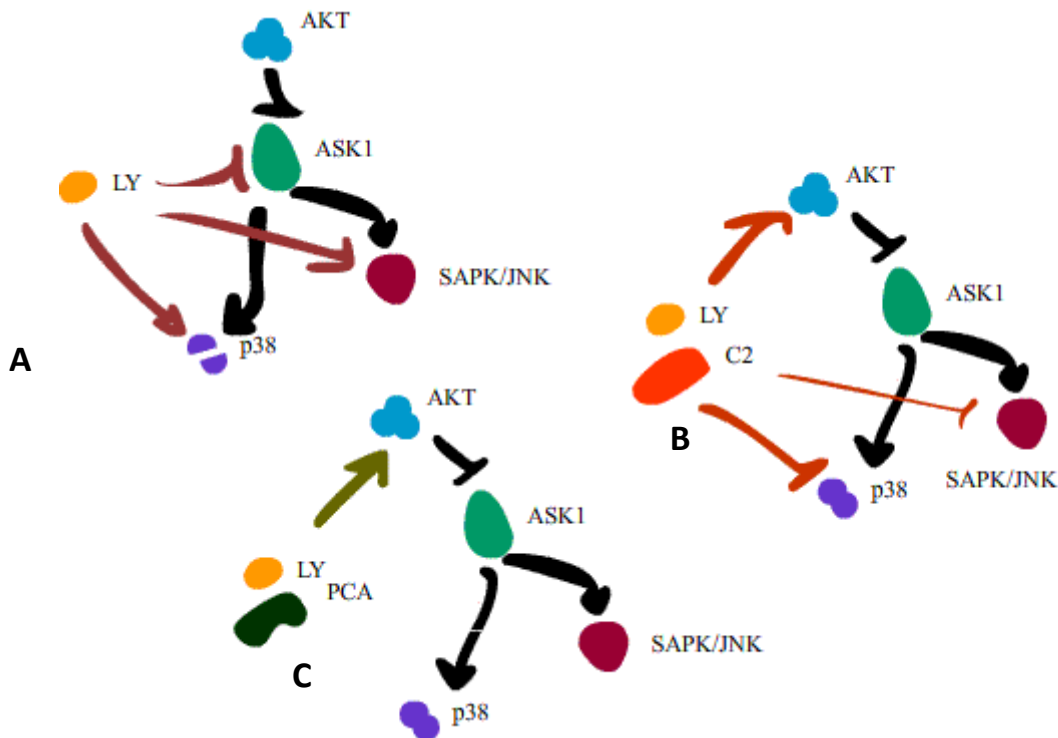


Figura 6.4.2.4.3. Modelo hipotético del efecto de LY600125 sobre las vías de señalización. Se ilustra el efecto de LY600125 y los cotratamientos con PCA y C2-ceramida sobre las quinasas AKT, ASK, SAPK/JNK y p38. A. Efecto del inhibidor sobre las vías. B. Efecto del cotratamiento del inhibidor con PCA. C. Efecto del cotratamiento del inhibidor con ceramida.

6.5. Efecto de la activación/inactivación de p38, SAPK/JNK, ASK1 y AKT en presencia de inhibidores químicos y PCA

Para evaluar el efecto de la activación/inactivación de p38, SAPK/JNK, ASK1 y AKT ante la acción tóxica de la ceramida en presencia de inhibidores químicos y PCA se realizaron los ensayos de activación de Caspasa 3/7 por citometria de flujo y caspasa 3 y 9 por tecnica fluorometrica. Para observar la supervivencia celular se realizó un ensayo citométrico.

6.5.1. Activación de Caspasa 3

Con el fin de verificar que el tratamiento con C2-ceramida lleva a la activación de la caspasa 3, se realizó un ensayo con el inhibidor específico de caspasa 3 AcDEVD-CHO (Figura 6.5.1.1). Se observa un aumento de la actividad de caspasa 3 con el tratamiento con C2-ceramida aproximadamente el 800% comparado con la caspasa purificada (0.5µg/ml) según lo recomendado por la casa de manufactura. La células sin tratamiento muestran un porcentaje de activación de caspasa 3 que corresponde a la muerte por apoptosis esperada en células sin tratamiento.

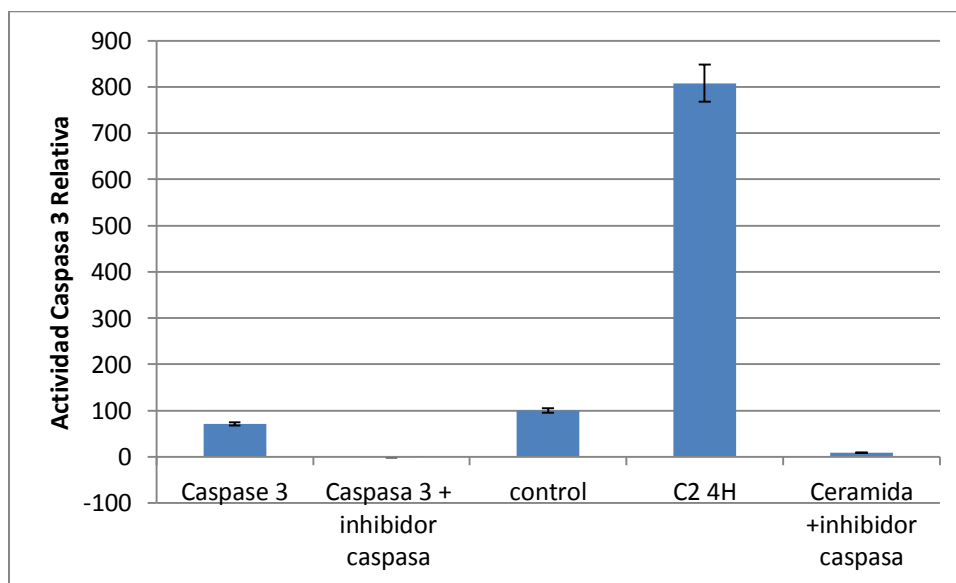


Figura 6.5.1.1. Activación de Caspasa 3. Las células endoteliales fueron tratadas con C2-ceramida (130 µM) por 4 horas. Se observó la actividad Caspasa 3. Los extractos celulares se incubaron con el inhibidor de caspasa 3. Se utilizó como control positivo la enzima caspasa 3 purificada.

La reducción de la actividad caspasa 3 con su inhibidor específico en presencia de ceramida corrobora que la actividad detectada corresponde específicamente a la actividad caspasa 3, lo que demuestra que la muerte celular inducida por ceramida es mediada por apoptosis.

6.5.2 Activación de la caspasa 3/7 por citometria de flujo.

Al realizar el ensayo de activación de caspasa3/7 mediante citometría de flujo se observó que el cotratamiento de las células con PCA y el inhibidor de AKT comparado con el tratamiento únicamente con el inhibidor muestra una disminución de la actividad caspasa 3 y caspasa 9 y un

aumento de la supervivencia celular relacionado con un ligero aumento de la activación/fosforilación de AKT y una disminución de la activación/fosforilación de p38 (Figuras 6.4.2.4.1; 6.5.2.1; 6.5.3.1; 6.5.4.1).

Cuando se utilizó el cotratamiento de PCA con el inhibidor de ASK1 también se observó una disminución de la actividad caspasa 3, caspasa 9 y un aumento de la supervivencia asociado con un aumento de la activación/fosforilación de AKT y una disminución de la activación/fosforilación de SAPK/JNK. (Figuras 6.4.2.3.1; 6.5.2.1; 6.5.3.1; 6.5.4.1).

Los resultados del cotratamiento de PCA con el inhibidor de SAPK/JNK mostraron un aumento de la caspasa 3, una disminución de la caspasa 9, observándose también una disminución de la supervivencia relacionada con una disminución de la fosforilación de ASK1.

Al utilizar el cotratamiento de PCA con inhibidor de p38 se apreció una disminución de la actividad caspasa 3 y un aumento de la supervivencia asociado con un incremento de la activación ASK1 y una disminución de la fosforilación de AKT y SAPK/JNK.

Al analizar el efecto del cotratamiento de ceramida con los inhibidores de ASK y SAPK/JNK se observó que los niveles de activación de caspasa 3 se reducen a nivel del control, lo que sugiere que estas dos quinasas son las responsables de desencadenar las cascadas de señalización que llevan a la activación de caspasa 3.

El cotratamiento de ceramida con el inhibidor de p38 mostró un incremento de la activación de caspasa 3, que podría ser explicado por la activación de SAPK/JNK por la inhibición química de p38 (Cheung et al. 2003; Muniyappa and Das 2008)

Adicionalmente es de interés el aumento en la activación/fosforilación de p38 detectado al realizar el cotratamiento de PCA con el inhibidor de ASK1, pero a pesar de esta activación no se aprecia aumento de la actividad caspasa 3 o del porcentaje de células muertas (Figuras 6.4.2.3.1; 6.4.2.3.2; 6.5.2.2). Por otro lado cuando las células endoteliales fueron tratadas con el inhibidor de p38 y PCA se observó un incremento de la actividad de ASK1, sin que se note aumento de la actividad caspasa 3, caspasa 9 o del porcentaje de células muertas. Es posible que existan uno o varios intermediarios entre PCA y ASK o p38 que se encuentren afectados por tioredoxina o SB203580 y que alteren la acción de PCA. La ausencia de aumento de la activación de la caspasa 3 y 9 se podría explicar por la acción de PCA sobre AKT, que a su vez fosforila e inactiva la caspasa 9.

La reducción de la actividad caspasa 3 inducida por PCA ha sido previamente descrita en un modelo en ratas donde se demostró que el uso de PCA reducía la apoptosis neuronal (Memos et al. 2009). Este efecto es debido a la activación de PAR1, por la PCA y Trombomodulina (Guo et al. 2004; Zlokovic and Griffin 2011). En otro estudio, en un modelo de apoptosis neuronal inducida por NMDA y estaurosporina, el tratamiento con PCA inducía una disminución de la activación de caspasa 3 (Fernández et al. 2003; Mosnier and Griffin 2003; Guo et al. 2004; Guo et al. 2013).

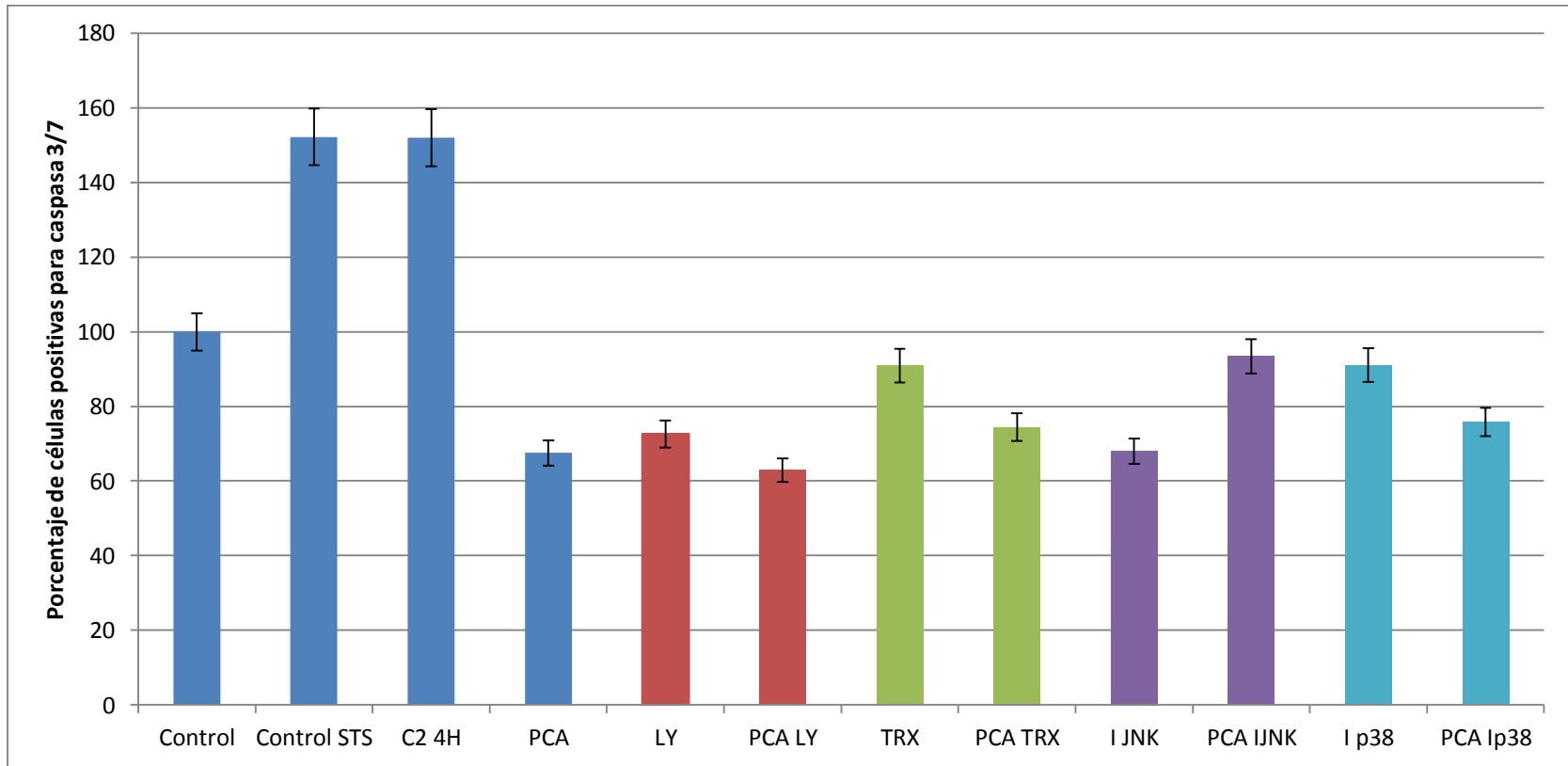


Figura 6.5.2.1 Ensayo de Apoptosis. Las células endoteliales fueron tratadas con C2-ceramida 130 μ M por 4 horas, PCA 5nM por una hora, el inhibidor químico de AKT LY294002 (Ly) 20 μ M por una hora, el inhibidor químico de ASK1 Tiorredoxina (TRX) 100nM por una hora, el inhibidor de SAPK/JNK SP600125(I JNK) por una hora y el inhibidor de p38 SB203580 (Ip38) por una hora. Se realizó la detección de células en apoptosis usando el estuche MUSE™ Caspasa 3/7. Las células no tratadas se usaron como control y células tratadas con estaurosporina (STS) fueron usadas como control de apoptosis.

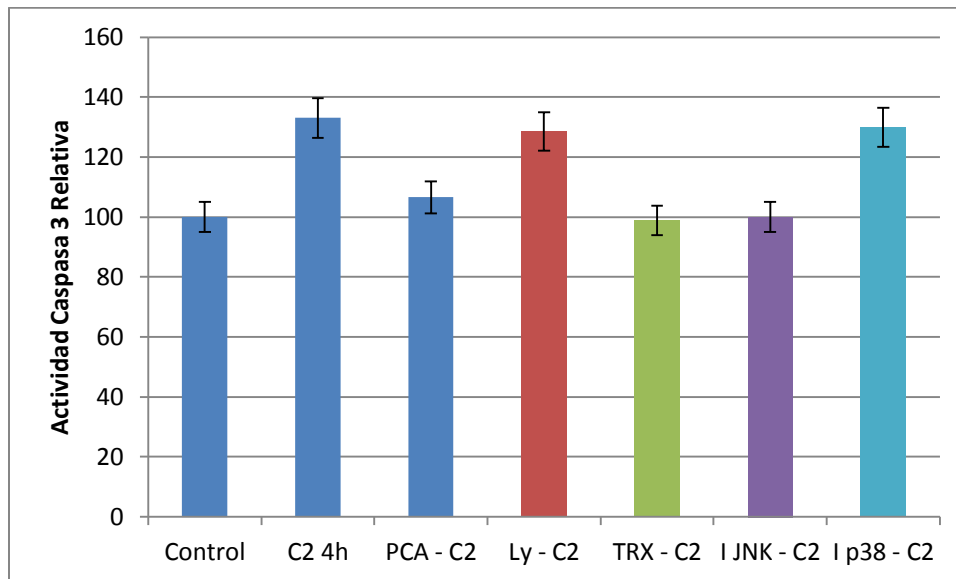


Figura 6.5.2.2. Activación de Caspasa 3. Se trataron las células EA.hy926 con C2-ceramida 130µM por 4 horas, PCA 5nM por una hora, el inhibidor químico de AKT LY294002 (Ly) 20uM por una hora, el inhibidor químico de ASK1 Tiorredoxina (TRX) 100nM por una hora, el inhibidor de SAPK/JNK SP600125(I JNK) por una hora y el inhibidor de p38 SB203580 (Ip38) por una hora. Se realizó un ensayo con el estuche de caspasa 3 fluorométrico (SIGMA)

6.5.3. Activación de Caspasa 9.

Al revisar la activación de la caspasa 9 por técnica fluorométrica se observó una disminución de la activación de la caspasa 9 al realizar el cotratamiento de las células con PCA-TRX y PCA-SP600125 al compararlo con el tratamiento de las células con cada uno de estos inhibidores de forma individual.

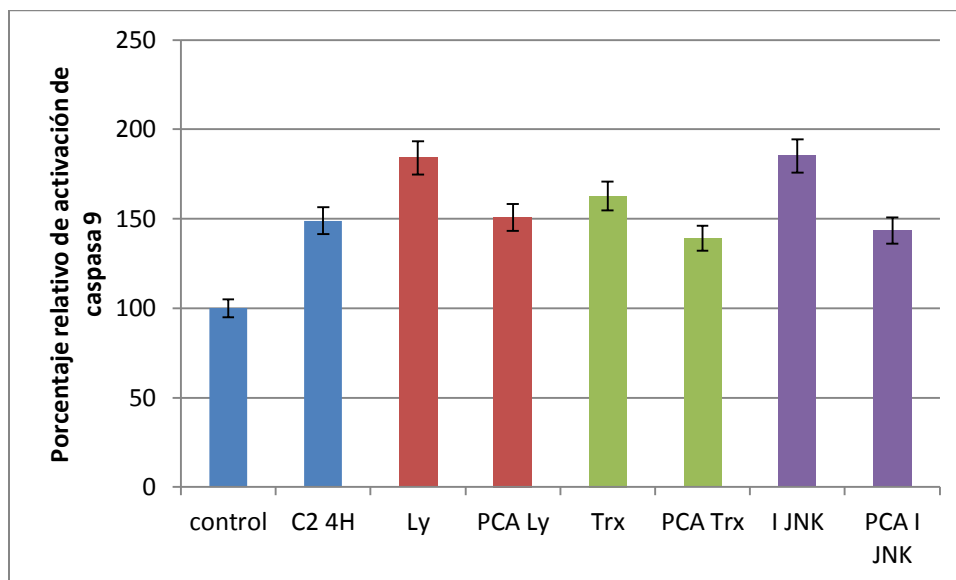


Figura 6.5.3.1, Activación de Caspasa 9. Se trataron las células EA.hy926 con C2-ceramida 130µM por 4 horas, PCA 5nM por una hora, el inhibidor químico de AKT LY294002 (Ly) 20uM por una

hora, el inhibidor químico de ASK1 Tiorredoxina (TRX) 100nM por una hora, el inhibidor de SAPK/JNK SP600125(I JNK) por una hora. Se realizó un ensayo con el estuche de caspasa 9 fluorométrico (MILLIPORE)

6.5.4 Ensayo de supervivencia

Al realizar el ensayo de supervivencia por medio de la técnica citométrica, haciendo uso del estuche MUSE™ Count and Viability, se observó que el tratamiento con PCA y el inhibidor de AKT aumenta levemente la supervivencia de la célula con respecto al tratamiento de las células con este inhibidor únicamente, efecto similar se observó en los casos de los cotratamientos de las células con PCA y los otros inhibidores, exceptuando el caso del cotratamiento de PCA con el Inhibidor de SAPK/JNK, en el cual se observa una disminución de la supervivencia.

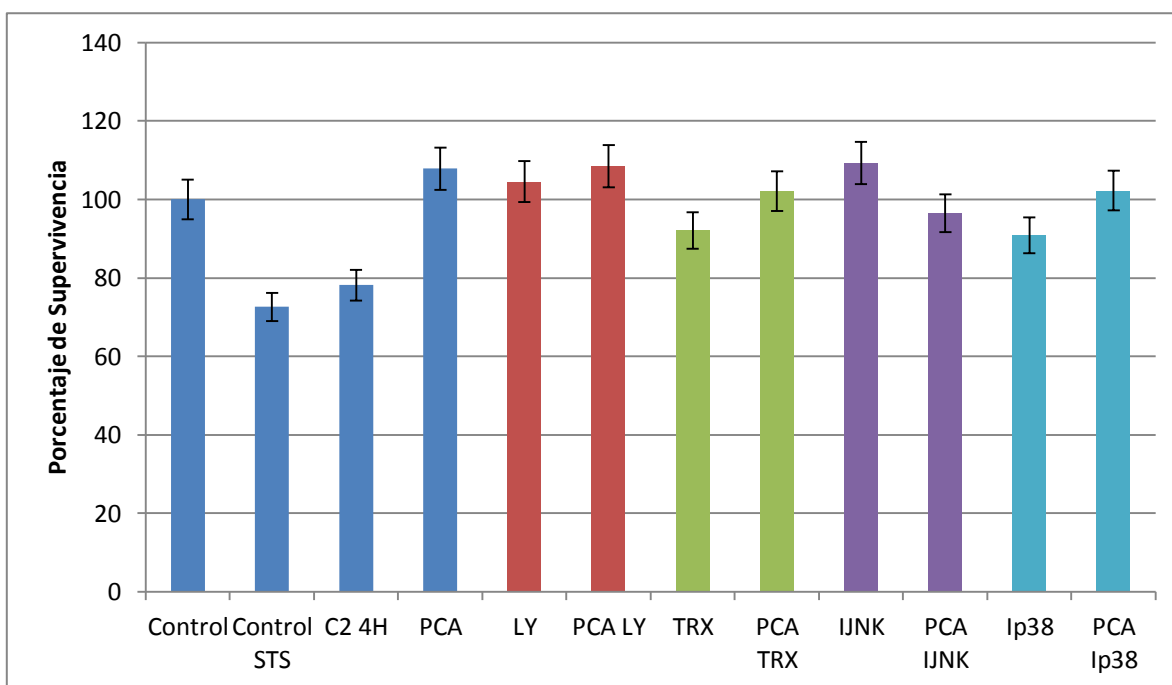


Figura 6.5.4.1 Ensayo de Supervivencia. Las células endoteliales fueron tratadas con C2-ceramida 130µM por 4 horas, PCA 5nM por una hora, el inhibidor químico de AKT LY294002 (Ly) 20uM por una hora, el inhibidor químico de ASK1 Tiorredoxina (TRX) 100nM por una hora, el inhibidor de SAPK/JNK SP600125(I JNK) por una hora y el inhibidor de p38 SB203580 (Ip38) por una hora. Se realizó la detección de células en apoptosis usando el estuche MUSE™ Count and Viability. Las células no tratadas se usaron como control y células tratadas con estaurosporina (STS) fueron usadas como control de apoptosis.

7. Conclusiones

La ceramida disminuye la supervivencia de las células endoteliales por medio de la inactivación de la quinasa AKT y de la activación de las quinasas ASK1, SAPK/JNK y p38.

Los resultados sugieren que el efecto anti-apoptótico de la PCA está relacionado con la disminución de la activación/fosforilación de las quinasas SAPK/JNK, ASK1 y p38.

La PCA se encuentra relacionada con el aumento de la activación de AKT, lo que está ligado al aumento de la supervivencia de las células.

La inducción de la caspasa 3 por ceramida puede depender de la activación/fosforilación de las quinasas ASK1 y SAPK/JNK.

La muerte inducida por ceramida es dependiente del tiempo de tratamiento y de su acción sobre las quinasas.

Según los resultados encontrados es posible que el inhibidor de SAPK/JNK, (SP600125) se encuentre involucrado en la activación de las quinasa AKT.

La acción anti-apoptótica de la tioredoxina puede estar relacionada con el aumento en la activación de AKT.

La fosforilación quinasa p38 contribuye a la defosforilación de AKT.

Es posible que existan uno o varios intermediarios entre PCA y ASK o p38 que se encuentren afectados por tioredoxina o SB203580 y que alteren la acción de PCA.

8. Recomendaciones y perspectivas

En vista que el efecto de los inhibidores sobre las quinasas es dependiente del tiempo de tratamiento y de la concentración del inhibidor, se recomienda realizar un estudio de los efectos de los inhibidores sobre las quinasas y la supervivencia durante periodos largos de tiempo.

Al realizar la inhibición de las quinasas estudiadas por medio de inhibidores químicos, se observó que estos por si solos pueden llegar a tener efecto sobre la supervivencia de las células, por lo que se sugiere realizar la inhibición de las quinasas empleando ARNs de interferencia (Zhang, Wei, Yang, & Yu, 2004).

El carácter apolar de los inhibidores (con excepción de la tioredoxina), hizo necesario que estos compuestos fuesen diluidos en DMSO. Se sugiere que en los próximos ensayos se utilice un control con DMSO, ya que este puede interferir con la interpretación de los resultados dado su efecto sobre el ciclo celular y la fosforilación de las proteínas (Ponzio et al. 1998; Santos et al. 2003; Julien et al. 2012).

Es de interés corroborar el efecto de la inhibición de las vías de señalización mediante el estudio de las moléculas blanco de cada una de las quinasas, por ejemplo GSK3 β , FOXO3a, FOXO1, c-Jun entre otras.

Se sugiere el estudio de vías alternas de activación SAPK/JNK y p38.

Es recomendable realizar estudios del efecto de PCA sobre la expresión de los genes que codifican para las quinasas.

9. Bibliografía

- Ambrosini, G, C Adida, and DC Altieri. 1997. "A Novel Anti-Apoptosis Gene, Survivin, Expressed in Cancer and Lymphoma." *Nature Medicine*. 3 (8): 917-921
- Angus, Derek C, and Tom van der Poll. 2013. "Severe Sepsis and Septic Shock." *The New England Journal of Medicine* 369 (9): 840–51.
- Arboleda, Gonzalo, Yolanda Cárdenas, Yeldy Rodríguez, Luis Carlos Morales, Luisa Matheus, and Humberto Arboleda. 2010. "Differential Regulation of AKT, MAPK and GSK3 β during C2-Ceramide-Induced Neuronal Death." *Neurotoxicology* 31 (6): 687–93.
- Bae, Jong-Sup, Likui Yang, Chandrashekhara Manithody, and Alireza R Rezaie. 2007. "Engineering a Disulfide Bond to Stabilize the Calcium-Binding Loop of Activated Protein C Eliminates Its Anticoagulant but Not Its Protective Signaling Properties." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (12): 9251–59.
- Bagci, E Z, Y Vodovotz, T R Billiar, G B Ermentrout, and I Bahar. 2006. "Bistability in Apoptosis: Roles of Bax, Bcl-2, and Mitochondrial Permeability Transition Pores." *Biophysical Journal* 90 (5): 1546–59.
- Bartolome, Sonja, John G Wood, Alfred J Casillan, Steven Q Simpson, and Amy R O Brien-ladner. 2008. "ACTIVATED PROTEIN C ATTENUATES MICROVASCULAR INJURY DURING SYSTEMIC HYPOXIA" 29 (3): 384–87.
- Bernard, GR, JL Vincent, PF Laterre, SP LaRosa, JF Dhainaut, A Lopez-Rodriguez, JS Steingrub, et al. 2001. "Efficacy and Safety of Recombinant Human Activated Protein C for Severe Sepsis." *New England Journal of Medicine* 345 (3): 219–25.
- Berridge, MV, and AS Tan. 1993. "Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction." *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 303 (2): 474-482.
- Bourbon, Nicole a, Lakshman Sandirasegarane, and Mark Kester. 2002. "Ceramide-Induced Inhibition of Akt Is Mediated through Protein Kinase Czeta: Implications for Growth Arrest." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (5): 3286–92.
- Calvinho, L F, W J Donnelly, and K Dodd. 1993. "Effect of Partially Purified Staphylococcus Aureus Beta-Haemolysin on the Mammary Gland of the Mouse." *Zentralblatt Für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B* 40 (8): 559–68.
- Camargo, Maria Helena. 2010. "Efecto Neuroprotector de La Proteína C Activada Ante La Apoptosis Inducida Por C2-Ceramida En Células CAD: Activación de La Vía PI3K-AKT". Universidad Nacional de Colombia.

- Camussone, CM, and LF Calvinho. 2013. "Factores de Virulencia de Staphylococcus Aureus Asociados Con Infecciones Mamarias En Bovinos: Relevancia Y Rol Como Agentes Inmunógenos." *Revista Argentina de Microbiologia* 45 (2): 119–30.
- Chen, Chia-Ling, Chiou-Feng Lin, Wen-Tsan Chang, Wei-Ching Huang, Chiao-Fang Teng, and Yee-Shin Lin. 2008. "Ceramide Induces p38 MAPK and JNK Activation through a Mechanism Involving a Thioredoxin-Interacting Protein-Mediated Pathway." *Blood* 111 (8): 4365–74.
- Chen, Ping, Yongping Zhang, Minmin Qiao, and Yaozong Yuan. 2007. "Activated Protein C, an Anticoagulant Polypeptide, Ameliorates Severe Acute Pancreatitis via Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinases." *Journal of Gastroenterology* 42 (11): 887–96.
- Cheng, Tong, Dong Liu, John H Griffin, José a Fernández, Francis Castellino, Elliot D Rosen, Kenji Fukudome, and Berislav V Zlokovic. 2003. "Activated Protein C Blocks p53-Mediated Apoptosis in Ischemic Human Brain Endothelium and Is Neuroprotective." *Nature Medicine* 9 (3): 338–42.
- Cheung, Peter C F, David G Campbell, Angel R Nebreda, and Philip Cohen. 2003. "Feedback Control of the Protein Kinase TAK1 by SAPK2a/p38alpha." *The EMBO Journal* 22 (21): 5793–5805.
- Choi, Soon-Young, Min-Jung Kim, Chang-Mo Kang, Sangwoo Bae, Chul-Koo Cho, Jae-Won Soh, Jae-Hong Kim, et al. 2006. "Activation of Bak and Bax through c-Abl-Protein Kinase Cdelta-p38 MAPK Signaling in Response to Ionizing Radiation in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (11): 7049–59.
- Cooper, Geoffrey M., and Robert E. Hausman. 2010. *Cooper La Célula*. 5ta ed. MARBÁN.
- Cosentino, Katia, and Ana J García-Sáez. 2014. "Mitochondrial Alterations in Apoptosis." *Chemistry and Physics of Lipids* 181C (April). Elsevier Ireland Ltd: 62–75.
- Culteck. 2006. "Fundamentos Y Tipos de ELISAs.", 1–7. en <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-ELISA-protocolos.pdf>.
- Czubowicz, Kinga, and Robert Strosznajder. 2014. "Ceramide in the Molecular Mechanisms of Neuronal Cell Death. The Role of Sphingosine-1-Phosphate." *Molecular Neurobiology*, January. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24420784>.
- Darling, Nicola J, and Simon J Cook. 2014. "The Role of MAPK Signalling Pathways in the Response to Endoplasmic Reticulum Stress." *Biochimica et Biophysica Acta*, January. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24440275>.
- Darwish, Ilyse, and W Conrad Liles. 2013. "Emerging Therapeutic Strategies to Prevent Infection-Related Microvascular Endothelial Activation and Dysfunction." *Virulence* 4 (6): 572–82.
- Deanfield, John E, Julian P Halcox, and Ton J Rabelink. 2007. "Endothelial Function and Dysfunction: Testing and Clinical Relevance." *Circulation* 115 (10): 1285–95.

- Dellinger, R Phillip, Mitchell M Levy, Jean M Carlet, Julian Bion, Margaret M Parker, Roman Jaeschke, Konrad Reinhart, et al. 2008. "Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock: 2008." *Critical Care Medicine*,36:296–327.
- Deutschman, Clifford S, and Kevin J Tracey. 2014. "Sepsis: Current Dogma and New Perspectives." *Immunity* 40, 4: 463–75.
- Dhanasekaran, D N, and E P Reddy. 2008. "JNK Signaling in Apoptosis." *Oncogene* 27 (48): 6245–51.
- Di Bartolomeo, Sabrina, and Angelo Spinedi. 2002. "Ordering Ceramide-Induced Cell Detachment and Apoptosis in Human Neuroepithelioma." *Neuroscience Letters* 334 (3): 149–52.
- Du, Zhao-Jiang, Takuhiro Yamamoto, Tomoko Ueda, Mihoko Suzuki, Yasuo Tano, and Motohiro Kamei. 2011. "Activated Protein C Rescues the Retina from Ischemia-Induced Cell Death." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52 (2): 987–93.
- Duckett, Colin S, Feng Li, Yu Wang, Kevin J Tomaselli, B Craig, Robert C Armstrong, Y U Wang, and Craig B Thompson. 1998. "Human IAP-Like Protein Regulates Programmed Cell Death Downstream of Bcl-X L and Cytochrome c Human IAP-Like Protein Regulates Programmed Cell Death Downstream of Bcl-X L and Cytochrome c." *Molecular and Cellular Biology* 18 (1): 608-15
- Elmore, Susan. 2007. "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death." *Toxicologic Pathology* 35 (4): 495–516.
- Ennis, BW, KE Fultz, and KA Smith. 2005. "Inhibition of Tumor Growth, Angiogenesis, and Tumor Cell Proliferation by a Small Molecule Inhibitor of c-Jun N-Terminal Kinase." *THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS* 313 (1): 325–32.
- Esen, M, B Schreiner, V Jendrossek, F Lang, K Fassbender, H Grassmé, and E Gulbins. 2001. "Mechanisms of Staphylococcus Aureus Induced Apoptosis of Human Endothelial Cells." *Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death* 6 (6): 431–39.
- Esmon, Charles T. 2003. "The Protein C Pathway." *Chest* 124 (3 Suppl): 26S–32S.
- Esmon, 2012. "Protein C Anticoagulant System--Anti-Inflammatory Effects." *Seminars in Immunopathology* 34 (1): 127–32.
- Eyers, Patrick A, Molly Craxton, Nick Morricel, Philip Cohen, and Michel Goedert. 1998. "Conversion of SB 203580-insensitive MAP Kinase Family Members to Drug-Sensitive Forms by a Single Amino-Acid Substitution." *Chemistry & Biology* 5 (6): 321-328
- Fernández, José a, Xiao Xu, Dong Liu, Berislav V Zlokovic, and John H Griffin. 2003. "Recombinant Murine-Activated Protein C Is Neuroprotective in a Murine Ischemic Stroke Model." *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 30 (3): 271–76.

- Gao, J, L Qian, X Wang, M Wu, Y Zhang, H Ye, S Zhu, and Y Yu. 2014. "Activation of p38-MAPK by CXCL4/CXCR3 Axis Contributes to p53-Dependent Intestinal Apoptosis Initiated by 5-Fluorouracil." *Cancer Biology & Therapy* 15 (8).
https://www.landesbioscience.com/article/29114/full_text/#load/info/all.
- Grassmé, H1, KA Becker, Y Zhang, and E Gulbins. 2008. "Ceramide in Bacterial Infections and Cystic Fibrosis." *Biological Chemistry*. 389 (11): 1371-9.
- Guo, Huang, Dong Liu, Harris Gelbard, Tong Cheng, Rae Insalaco, José a Fernández, John H Griffin, and Berislav V Zlokovic. 2004. "Activated Protein C Prevents Neuronal Apoptosis via Protease Activated Receptors 1 and 3." *Neuron* 41 (4): 563-72.
- Guo, Huang, Itender Singh, and Yaoming Wang. 2009. "Neuroprotective Activities of Activated Protein C Mutant with Reduced Anticoagulant Activity." *European Journal of Neuroscience* 29 (6): 1119-30.
- Guo, Huang, Zhen Zhao, Qi Yang, and M Wang. 2013. "An Activated Protein C Analog Stimulates Neuronal Production by Human Neural Progenitor Cells via a PAR1-PAR3-S1PR1-Akt Pathway." *The Journal of Neuroscience* 33 (14): 6181-90.
- Gutierrez, Alvaro. 2010. "INTERACCIONES ENTRE LA RUTA DE p38 α MACK Y LAS RUTAS Rac-1 Y C3G EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS: IMPLICACIONES FUNCIONALES." UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.
- Hage-Sleiman, Rouba, Maria O Esmerian, Hadile Kobeissy, and Ghassan Dbaibo. 2013. "p53 and Ceramide as Collaborators in the Stress Response." *International Journal of Molecular Sciences* 14 (3): 4982-5012.
- Hemmer, Christoph J, Micha Löbermann, Marcus Unverricht, a Vogt, Robert Krause, and Emil C Reisinger. 2011a. "Activated Protein C Protects Vascular Endothelial Cells from Apoptosis in Malaria and in Sepsis." *Tropical Medicine & International Health : TM & IH* 16 (8): 906-13.
- Hemmer. 2011b. "Activated Protein C Protects Vascular Endothelial Cells from Apoptosis in Malaria and in Sepsis." *Tropical Medicine & International Health : TM & IH* 16 (8): 906-13.
- Hemmings, Brian a, and David F Restuccia. 2012. "PI3K-PKB/Akt Pathway." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (9): a011189. doi:10.1101/cshperspect.a011189.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22952397>.
- Holcik, M, and R G Korneluk. 2000. "Functional Characterization of the X-Linked Inhibitor of Apoptosis (XIAP) Internal Ribosome Entry Site Element: Role of La Autoantigen in XIAP Translation." *Molecular and Cellular Biology* 20 (13): 4648-57.
- Hotchkiss, Richard S, and Irene E Karl. 2003. "The Pathophysiology and Treatment of Sepsis." *The New England Journal of Medicine* 348 (2): 138-50.

- Hsieh, Chang-Ting, Jen-Hua Chuang, Wen-Chin Yang, Yi Yin, and Yenshou Lin. 2014. "Ceramide Inhibits Insulin-Stimulated Akt Phosphorylation through Activation of Rheb/mTORC1/S6K Signaling in Skeletal Muscle." *Cellular Signalling* 26 (7): 1400–1408.
- Hu, Lingai, Yukun Sun, and Jian Hu. 2010. "Catalpol Inhibits Apoptosis in Hydrogen Peroxide-Induced Endothelium by Activating the PI3K/Akt Signaling Pathway and Modulating Expression of Bcl-2 and Bax." *European Journal of Pharmacology* 628: (1-3). 155–63.
- Hu, Xiaoming, Zhongfang Weng, Charleen T Chu, Lili Zhang, Guodong Cao, Yanqin Gao, Armando Signore, et al. 2011. "Peroxiredoxin-2 Protects against 6-Hydroxydopamine-Induced Dopaminergic Neurodegeneration via Attenuation of the Apoptosis Signal-Regulating Kinase (ASK1) Signaling Cascade." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (1): 247–61.
- Huang, Y, Y C Park, R L Rich, D Segal, D G Myszka, and H Wu. 2001. "Structural Basis of Caspase Inhibition by XIAP: Differential Roles of the Linker versus the BIR Domain." *Cell* 104 (5): 781–90.
- Humphrey, J D. 2008. "Vascular Adaptation and Mechanical Homeostasis at Tissue, Cellular, and Sub-Cellular Levels." *Cell Biochemistry and Biophysics* 50 (2): 53–78.
- Ichijo, H. 1999. "From Receptors to Stress-Activated MAP Kinases." *Oncogene* 18 (45): 6087–93.
- Julien, Carl, François Marcouiller, Alexis Bretteville, Noura B El Khoury, Joanie Baillargeon, Sébastien S Hébert, and Emmanuel Planel. 2012. "Dimethyl Sulfoxide Induces Both Direct and Indirect Tau Hyperphosphorylation." *PloS One* 7 (6): e40020.
- Kerschen, Edward J, José a Fernandez, Brian C Cooley, Xia V Yang, Rashmi Sood, Laurent O Mosnier, Francis J Castellino, Nigel Mackman, John H Griffin, and Hartmut Weiler. 2007. "Endotoxemia and Sepsis Mortality Reduction by Non-Anticoagulant Activated Protein C." *The Journal of Experimental Medicine* 204 (10): 2439–48.
- Kieran, M W, S Katz, B Vail, L I Zon, and B J Mayer. 1999. "Concentration-Dependent Positive and Negative Regulation of a MAP Kinase by a MAP Kinase Kinase." *Oncogene* 18 (48): 6647–57.
- Kim, Hae Jong, Ji Eun Oh, Sang Woo Kim, Young Jin Chun, and Mie Young Kim. 2008. "Ceramide Induces p38 MAPK-Dependent Apoptosis and Bax Translocation via Inhibition of Akt in HL-60 Cells." *Cancer Letters* 260 (1-2): 88–95.
- Kim, Hyo Jung, Claudia a Vosseler, Peter C Weber, and Wolfgang Erl. 2005. "Docosahexaenoic Acid Induces Apoptosis in Proliferating Human Endothelial Cells." *Journal of Cellular Physiology* 204 (3): 881–88.
- Kim, M-a, H-J Kim, H J Jee, a J Kim, Y-S Bae, S S Bae, and J Yun. 2009. "Akt2, but Not Akt1, Is Required for Cell Survival by Inhibiting Activation of JNK and p38 after UV Irradiation." *Oncogene* 28 (9): 1241–47.

- Kumar, V, AK Abbas, and N Fausto. 2005. *Robbins Y Cotran Patología Estructural Y Funcional*. Elsevier Saunders.
- Kyriakis, John, and Avruch Joseph. 1990. "pp54 Microtubule-Associated Protein 2 Kinase." *The Journal of Biological Chemistry*. 265 (28). 17355-63.
- Li, Xiaonan, Yuanyuan Rong, Mei Zhang, Xing Li Wang, Scott a LeMaire, Joseph S Coselli, Yun Zhang, and Ying H Shen. 2009. "Up-Regulation of Thioredoxin Interacting Protein (Txnip) by p38 MAPK and FOXO1 Contributes to the Impaired Thioredoxin Activity and Increased ROS in Glucose-Treated Endothelial Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 381, 4: 660–65.
- Liang, Chao, Zhanggang Xue, Hao Wang, and Ping Li. 2011. "Propofol Upregulates Heme Oxygenase-1 Through Cells Under Oxidative Stress Conditions" *Journal of Neurosurgical Anesthesiology*. 23 (3): 229–35.
- Liao, Lizhen, Qin Zhou, Yan Song, Weikang Wu, Huimin Yu, Sheng Wang, Yanling Chen, Meihong Ye, and Lihe Lu. 2013. "Ceramide Mediates Ox-LDL-Induced Human Vascular Smooth Muscle Cell Calcification via p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling." *PLoS One* 8 (12): e82379.
- Liu, Hong, Hideki Nishitoh, Hidenori Ichijo, and M John. 2000. "Activation of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 (ASK1) by Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 2 Requires Prior Dissociation of the ASK1 Inhibitor Thioredoxin Activation of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 (ASK1) by Tumor Necrosis F" *Circulation Research*. 90:1259-1266.
- Liu, Y. 2002. "Thioredoxin Promotes ASK1 Ubiquitination and Degradation to Inhibit ASK1-Mediated Apoptosis in a Redox Activity-Independent Manner." *Circulation Research* 90 (12): 1259–66.
- López, Cesar Alberto, and Rodolfo Dennis. 2009. "EPIDEMIOLOGÍA DE LA SEPSIS EN LA FUNDACIÓN CARDIOINFANTIL - INSTITUTO DE CARDIOLOGIA - BOGOTÁ EPIDEMIOLOGÍA DE LA SEPSIS EN LA FUNDACIÓN CARDIOINFANTIL -". Universidad del Rosario.
- Madan, Esha, Rajan Gogna, Periannan Kuppusamy, Madan Bhatt, Abbas Ali Mahdi, and Uttam Pati. 2013. "SCO2 Induces p53-Mediated Apoptosis by Thr845 Phosphorylation of ASK-1 and Dissociation of the ASK-1-Trx Complex." *Molecular and Cellular Biology* 33 (7): 1285–1302.
- Madhusudhan, Thati, Hongjie Wang, Beate K Straub, Elisabeth Gröne, Qianxing Zhou, Khurram Shahzad, Sandra Müller-Krebs, et al. 2012. "Cytoprotective Signaling by Activated Protein C Requires Protease-Activated Receptor-3 in Podocytes." *Blood* 119 (3): 874–83.
- Manning, Anthony M, and Roger J Davis. 2003. "Targeting JNK for Therapeutic Benefit: From Junk to Gold?" *Nature Reviews. Drug Discovery* 2 (7): 554–65.

- Martinez, Maria Alejandra. 2010a. "Estudio in Vitro de La Activación de La Vía PI3K/AKT Como Consecuencia Del Efecto Protector de PCA Frente a La Ceramida En Endotelio." Universidad de los Andes-Universidad del Rosario.
- Mayr, Florian B, Sachin Yende, and Derek C Angus. 2014. "Epidemiology of Severe Sepsis." *Virulence* 5 (1): 4–11.
- Medhora, Meetha, and Anuradha Dhanasekaran. 2008. "Role of JNK in Network Formation of Human Lung Microvascular Endothelial Cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294(4):L676-85.
- Meister, Melanie, Ana Tomasovic, Antje Banning, and Ritva Tikkanen. 2013. "Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Scaffolding Proteins: A Recount." *International Journal of Molecular Sciences* 14 (3): 4854–84.
- Memos, Nikolaos, Alex Betrosian, Evangelos Messaris, Maria Boutsikou, Agapi Kataki, Emmy Chatziagianni, Marilena Nikolopoulou, Emmanuel Leandros, and Manousos Konstadoulakis. 2009. "Administration of Human Protein-C Concentrate Prevents Apoptotic Brain Cell Death after Experimental Sepsis." *Brain Research* 1264 April: 119–26.
- Merrill, Alfred H, and Elaine Wang. 1986. "Biosynthesis of Long-Chain (Sphingoid) Bases from Serine by LM Cells" *The Journal of Biological Chemistry*. 301 (8): 3764–69.
- Molina, F J, C a Díaz, L Barrera, G De La Rosa, R Dennis, C Dueñas, M Granados, et al. 2011. "[Microbiological Profile of Infections in the Intensive Care Units of Colombia (EPISEPSIS Colombia).]" *Medicina Intensiva / Sociedad Española de Medicina Intensiva Y Unidades Coronarias* 35 (2): 75–83.
- Morad, Samy a F, and Myles C Cabot. 2013. "Ceramide-Orchestrated Signalling in Cancer Cells." *Nature Reviews. Cancer* 13 (1): 51–65.
- Morales, L.C., J. Díaz, M.H. Camargo, H. Arboleda, G. Arboleda, and L.M. Matheus. 2009. "Protective Role of Activated Protein C Against Apoptosis in Neuronal and Endothelial Models." PSM01-12, *Journal Compilation r 2009 International Society for Neurochemistry, J. Neurochem.*, 108 (Suppl. 1), 82–156.
- Mosmann, T. 1983. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays." *Journal of Immunological Methods* 65 (1-2): 55–63.
- Mosnier, Laurent O, and John H Griffin. 2003. "Inhibition of Staurosporine-Induced Apoptosis of Endothelial Cells by Activated Protein C Requires Protease-Activated Receptor-1 and Endothelial Cell Protein C Receptor." *The Biochemical Journal* 373 (Pt 1): 65–70.
- Mosnier, Laurent O, Berislav V Zlokovic, and John H Griffin. 2007. "The Cytoprotective Protein C Pathway." *Blood* 109 (8): 3161–72.

- Muniyappa, H, and KC Das. 2008. "Activation of c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) by Widely Used Specific p38 MAPK Inhibitors SB202190 and SB203580: A MLK-3-MKK7-Dependent Mechanism." *Cellular Signalling* 20 (4): 675–83.
- Nold, Marcel, Claudia Nold-Petry, Doris Fischer, Bernd Richter, Roman Blaheta, Josef Pfeilschifter, Heiko Muhl, Dietmar Schranz, and Alex Veldman. 2007. "Activated Protein C Downregulates p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Improves Clinical Parameters in an in-Vivo Model of Septic Shock." *Thrombosis and Haemostasis*, 98(5):1118-26.
- O'Callaghan, R J, M C Callegan, J M Moreau, L C Green, T J Foster, O M Hartford, L S Engel, and J M Hill. 1997. "Specific Roles of Alpha-Toxin and Beta-Toxin during Staphylococcus Aureus Corneal Infection." *Infection and Immunity* 65 (5): 1571–78.
- Ouyang, L, Z Shi, S Zhao, F-T Wang, T-T Zhou, B Liu, and J-K Bao. 2012. "Programmed Cell Death Pathways in Cancer: A Review of Apoptosis, Autophagy and Programmed Necrosis." *Cell Proliferation* 45 (6): 487–98.
- Palencia Herrejón, Eduardo. 2005. "Proteína C Activada En La Sepsis Grave." *Revista de Medicina Intensiva*, 1–17. <http://remi.uninet.edu/2005/03/REMIC03.htm>
- Palmieri, Daniela, Patrizia Perego, and Domenico Palombo. 2012. "Apigenin Inhibits the TNF α -Induced Expression of eNOS and MMP-9 via Modulating Akt Signalling through Oestrogen Receptor Engagement." *Molecular and Cellular Biochemistry* 371 (1-2): 129–36.
- Ponzio, G, a Loubat, N Rochet, L Turchi, R Rezzonico, D Farahi Far, V Dulic, and B Rossi. 1998. "Early G1 Growth Arrest of Hybridoma B Cells by DMSO Involves Cyclin D2 Inhibition and p21[CIP1] Induction." *Oncogene* 17 (9): 1159–66.
- Portt, Liam, Grant Norman, Caitlin Clapp, Matthew Greenwood, and Michael T Greenwood. 2011. "Anti-Apoptosis and Cell Survival: A Review." *Biochimica et Biophysica Acta* 1813 (1): 238–59.
- Raman, M, W Chen, and M H Cobb. 2007. "Differential Regulation and Properties of MAPKs." *Oncogene* 26 (22): 3100–3112.
- Ranieri, V Marco, B Taylor Thompson, Philip S Barie, Jean-François Dhainaut, Ivor S Douglas, Simon Finfer, Bengt Gårdlund, et al. 2012. "Drotrecogin Alfa (activated) in Adults with Septic Shock." *The New England Journal of Medicine* 366 (22): 2055–64.
- Restrepo, Arcos I., Marco Carmelo Dueñas, Guillermo Ortiz González, Marcela Granados, Martín Carvajal Carlos Álvarez, Carlos Acosta, Arturo Arias, Luis H. Atehortúa, Rubén Camargo, Ernesto Martínez Gisela De La Rosa, Julio Durán, Juan L. Echeverri, Bladimir Gil, Carlos Hurtado, Juan D. Vélez Carlos Rebolledo, Carlos Saavedra, Julio Sandoval, Julio Velandia, José A. Vélez, Y Representantes De Los Comités De La Asociación Colombiana De Medicina Intensiva, And Y Cuidado Intensivo (Amci) Y La Asociación Colombiana De Infectología (ACIN). 1992. "Consenso Colombiano En Sepsis", 46–56.

- Rivers, E, B Nguyen, and S Havstad. 2001. "Early Goal-Directed Therapy in the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock." *New England Journal of Medicine* 345 (19): 1368–77.
- Robles, Carlos. 2009. "Protocolo de Elisa Indirecto Para La Detección Y Medición de Anticuerpos Contra Brucella Ovis En Suero de Ovinos." *Comunicación Técnica. Producción Animal*, 1–4.
- Rubartelli, Anna, Neris Bonifaci, Roberto Sitia, and Anna Rubarteli. 1995. "High Rates of Thioredoxin Secretion Correlate with Growth Arrest in Hepatoma Cells", *Cancer Research*. 55: 675–80.
- Saitoh, M, H Nishitoh, M Fujii, K Takeda, K Tobiume, Y Sawada, M Kawabata, K Miyazono, and H Ichijo. 1998. "Mammalian Thioredoxin Is a Direct Inhibitor of Apoptosis Signal-Regulating Kinase (ASK) 1." *The The European Molecular Biology Organization Journal* 17 (9): 2596–2606.
- Santos, Nuno C., J. Figueira-Coelho, J. Martins-Silva, and Carlota Saldanha. 2003. "Multidisciplinary Utilization of Dimethyl Sulfoxide: Pharmacological, Cellular, and Molecular Aspects." *Biochemical Pharmacology* 65 (7): 1035–41.
- Schett, G, M Tohidast-Akrad, J S Smolen, B J Schmid, C W Steiner, P Bitzan, P Zenz, K Redlich, Q Xu, and G Steiner. 2000. "Activation, Differential Localization, and Regulation of the Stress-Activated Protein Kinases, Extracellular Signal-Regulated Kinase, c-JUN N-Terminal Kinase, and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase, in Synovial Tissue and Cells in Rheumatoid Arthritis." *Arthritis and Rheumatism* 43 (11): 2501–12.
- Schubert, K. M. 2000. "Ceramide Inhibits Protein Kinase B/Akt by Promoting Dephosphorylation of Serine 473." *Journal of Biological Chemistry* 275 (18): 13330–35.
- Shoemaker, Mark, Isaac Cohen, and Michael Campbell. 2004. "Reduction of MTT by Aqueous Herbal Extracts in the Absence of Cells." *Journal of Ethnopharmacology* 93 (2-3): 381–84.
- Slater, T F, Barbara Sawyer, and Ursula Strauli. 1963. "STUDIES ON SUCCINATE-TETRAZOLIUM REDUCTASE SYSTEMS III. POINTS OF COUPLING OF FOUR DIFFERENT TETRAZOLIUM SALTS" *Biochimica et Biophysica Acta*. 77: 383–93.
- Song, Gang, Gaoliang Ouyang, and Shideng Bao. 2005. "The Activation of Akt/PKB Signaling Pathway and Cell Survival." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 9 (1): 59–71.
- Song, Juhyun, Kyung Ah Park, Won Taek Lee, and Jong Eun Lee. 2014. "Apoptosis Signal Regulating Kinase 1 (ASK1): Potential as a Therapeutic Target for Alzheimer's Disease." *International Journal of Molecular Sciences* 15 (2): 2119–29.
- Stoica, Bogdan a, Vilen a Movsesyan, Susan M Knoblach, and Alan I Faden. 2005. "Ceramide Induces Neuronal Apoptosis through Mitogen-Activated Protein Kinases and Causes Release of Multiple Mitochondrial Proteins." *Molecular and Cellular Neurosciences* 29 (3): 355–71.

- Takeda, K. 2000. "Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 (ASK1) Induces Neuronal Differentiation and Survival of PC12 Cells." *Journal of Biological Chemistry* 275 (13): 9805–13.
- Thévenod, Frank, and Wing-Kee Lee. 2013. *Cadmium and Cellular Signaling Cascades: Interactions between Cell Death and Survival Pathways. Archives of Toxicology*. Vol. 87 (10):1743-86.
- Trzeciak, Stephen, Philipp Schuetz, William C Aird, and Nathan I Shapiro. 2014. "Biomarkers of Endothelial Cell Activation in Early Sepsis" 39 (5): 427–32.
- Vincent, Jean-Louis, Derek C Angus, Antonio Artigas, Andre Kalil, Bruce R Basson, Hassan H Jamal, Gerald Johnson, and Gordon R Bernard. 2003. "Effects of Drotrecogin Alfa (activated) on Organ Dysfunction in the PROWESS Trial." *Critical Care Medicine* 31 (3): 834–40.
- Vincent, JL, J Rello, John Marshall, and E Silva. 2009. "International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units." *Jama* 302 (21): 2323–29.
- Vlahos, CJ, WF Matter, KY Hui, and RF Brown. 1994. "A Specific Inhibitor of Phosphatidylinositol 3-Kinase, 2-(4-Morpholinyl)-8-Phenyl-4H-1-Benzopyran-4-One (LY294002)." *Journal of Biological Chemistry* 269 (7): 5241–48.
- Wagner, Erwin F, and Angel R Nebreda. 2009. "Signal Integration by JNK and p38 MAPK Pathways in Cancer Development." *Nature Reviews. Cancer* 9 (8): 537–49.
- Wan, Meifang, Yousheng Li, Hua Xue, Qiurong Li, and Jieshou Li. 2007. "Eicosapentaenoic Acid Inhibits TNF-Alpha-Induced Lnk Expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells: Involvement of the PI3K/Akt Pathway." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 18 (1): 17–22.
- Wheeler, AP, and GR Bernard. 1999. "Treating Patients with Severe Sepsis." *New England Journal of Medicine*, 340(3): 207–14.
- Willaime, S, P Vanhoutte, J Caboche, Y Lemaigre-Dubreuil, J Mariani, and B Brugg. 2001. "Ceramide-Induced Apoptosis in Cortical Neurons Is Mediated by an Increase in p38 Phosphorylation and Not by the Decrease in ERK Phosphorylation." *The European Journal of Neuroscience* 13 (11): 2037–46.
- Willaime-Morawek, S, K Brami-Cherrier, J Mariani, J Caboche, and B Brugg. 2003. "C-Jun N-Terminal Kinases/c-Jun and p38 Pathways Cooperate in Ceramide-Induced Neuronal Apoptosis." *Neuroscience* 119 (2): 387–97.
- Xiaoming, Hu, Weng Zhongfang, T. Chu Charleen, Zhang Lili, Cao Guodong, Gao Yanqin, Signore Armando, Zhu Jianhui, J. Timothy Teresa Hastings¹, and Greenamyre Jun Chen. 2008. "Peroxiredoxin-2 Protects against 6-Hydroxydopamine-Induced Dopaminergic Neurodegeneration via Attenuation of the ASK1 Signaling Cascade." *Brain Behavior and Immunity* 22 (5): 4109.

- Yang, Shen-hsi, Alex Galanis, and Andrew D Sharrocks. 1999. "Targeting of p38 Mitogen-Activated Protein Kinases to MEF2 Transcription Factors Targeting of p38 Mitogen-Activated Protein Kinases to MEF2 Transcription Factors" 19 (6): 4028-38.
- Yang, Xia V, Yajnavalka Banerjee, José a Fernández, Hiroshi Deguchi, Xiao Xu, Laurent O Mosnier, Rolf T Urbanus, et al. 2009. "Activated Protein C Ligation of ApoER2 (LRP8) Causes Dab1-Dependent Signaling in U937 Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (1): 274–79.
- Yin, Ke-Jie, Chung Y Hsu, Xiao-Yan Hu, Hong Chen, Sha-Wei Chen, Jan Xu, and Jin-Moo Lee. 2006. "Protein Phosphatase 2A Regulates Bim Expression via the Akt/FKHRL1 Signaling Pathway in Amyloid-Beta Peptide-Induced Cerebrovascular Endothelial Cell Death." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (8): 2290–99.
- Zarubin, Tyler, and Jiahuai Han. 2005. "Activation and Signaling of the p38 MAP Kinase Pathway." *Cell Research* 15 (1): 11–18.
- Zhang, Rong, Dianhong Luo, Robert Miao, Lanfang Bai, Qingyuan Ge, William C Sessa, and Wang Min. 2005. "Hsp90-Akt Phosphorylates ASK1 and Inhibits ASK1-Mediated Apoptosis." *Oncogene* 24 (24): 3954–63.
- Zhang, X., Wei, L., Yang, Y., & Yu, Q. (2004). Sodium 4-phenylbutyrate induces apoptosis of human lung carcinoma cells through activating JNK pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*, 93(4), 819–29.
- Zhou, Honglin, and SA Summers. 1998. "Inhibition of Akt Kinase by Cell-Permeable Ceramide and Its Implications for Ceramide-Induced Apoptosis." *Journal of Biological Chemistry*. 273(26):16568-75.
- Zlokovic, Berislav V, and John H Griffin. 2011. "Cytoprotective Protein C Pathways and Implications for Stroke and Neurological Disorders." *Trends in Neurosciences* 34 (4): 198–209.

ANEXOS

ANEXO 1. SOLUCIONES DE TRABAJO

1.1 MEDIO DE CULTIVO COMPLETO

- Medio DMEM/F12 (Gibco)
- 4 g/l (25mM) glucosa
- 100 U/ml de penicilina
- 100 µg/ml de estreptomicina
- 10% suero fetal bovino

1.2 PBS 1X

- 2 mM KH_2PO_4
- 10 mM Na_2HPO_4
- 2,7 mM KCl
- 1,3 mM NaCl

1.3 Buffer de lisis

- 20mM pH 7.5Tris-HCL
- 150mM NaCl
- 1mM EDTA
- 1mM EGTA
- 1% (v/v) TritonX-100
- 20 mM pirofosfato de sodio
- 25 mM fluoruro de sodio
- 1mM β -glicerofosfato
- 1mM Na_3VO_4
- 1µg/ml Leupeptina
- 1mM PMSF

1.4 Solución TBS

- 20 Mm Tris
- 137 mM NaCl

1.5 Solución de bloqueo

- TBS 1X,
- 0.05%Tween 20
- 1% BSA

1.6 Solución TBST

- TBS 1X,
- 0.05%Tween 20

1.7 Buffer de lavado ELISA

- PBS 1X
- 0.05%Tween 20

1.8 Buffer de bloqueo ELISA

- PBS 1X
- 0.05%Tween 20
- 1% BSA

1.9 Buffer de bloqueo inmunofluorescencia

- PBS 1X
- 10 % BSA

ANEXO 2 PRODUCCIÓN ACADÉMICA DERIVADA DEL TRABAJO

Ponencias en Simposios, Conferencias y Congresos

Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Colombia
Primer Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular. Junio 2014. Cruz-Arevalo L., Salazar-Alvarez L.C., Ararat M., Matheus L.M. “Expresión de genes pertenecientes a la familia Bcl-2 en un modelo de apoptosis endotelial inducida por ceramida”. Trabajo aceptado para presentación en modalidad de poster. Las memorias serán compiladas y publicadas por el sello editorial de la Sociedad Colombiana de Ciencias Químicas.

Universidad del Rosario. Bogotá. Colombia
IV Encuentro de Investigación, Universidad del Rosario. Octubre 2013. Ararat, M., Cediell, J.F., Martínez, M.A., Díaz, J.A., Matheus, L.M. “Convergencia de vías de señalización en un modelo de apoptosis”. Trabajo presentado en modalidad de presentación oral. Las memorias serán compiladas y publicadas por la Editorial de la Universidad del Rosario.

Universidad El Bosque. Bogotá. Colombia
XLVIII Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas. Octubre 2013. Ararat, M., Matheus, L.M. “Activación Vías de Señalización en un Modelo de Apoptosis Inducida por Ceramida”. Publicado en Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas. Memorias. Vol. 25(Suplemento 1):162. ISSN:0120-4173. Trabajo presentado en modalidad de poster.

Capítulos de libros

Matheus, L.M, Parra-Medina, R., Ararat, M., Díaz, J.A. Cell death. In Autoimmunity from bench to bedside. Juan-Manuel Anaya, Yehuda Shoenfeld, Adriana Rojas-Villarraga, Roger A. Levy, Ricard Cervera Editores. Editorial Univeridad del Rosario. Páginas 219-234. ISBN 978-958-738-366-9.