



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**EFFECTO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS SOBRE EL BALANCE ENTRE LA PROLIFERACIÓN Y LA APOPTOSIS CELULAR EN LINFOCITOS T NORMALES Y TUMORALES. PARTICIPACIÓN DIFERENCIAL DE ISOENZIMAS DE PROTEINA QUINASA C Y DE OXIDO NITRICO SINTASA.**

**Tesis para optar al grado de Doctor de la Universidad de Buenos Aires**

**Lic. María Laura Barreiro Arcos**

**Directora: Dra. Graciela A. Cremaschi**  
**Consejero de Estudios: Dr. Eduardo Arzt**

**Laboratorio de Neuroinmunomodulación**  
**Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)**  
**Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)**

**Buenos Aires, Marzo de 2006**

**A Mariana**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero expresar mi sincero agradecimiento a la Dra. Graciela A. Cremaschi por su labor de dirección en el presente trabajo de tesis, por haberme dado la oportunidad de trabajar a su lado, por las enseñanzas recibidas, por su constante apoyo pero particularmente por su generosidad y su gran calidez humana.

Asimismo, quiero agradecer muy especialmente a la Bioq. Alicia J. Klecha por estar siempre presente, por su ayuda incondicional, por su buena predisposición y por sobre todas las cosas por su cálida amistad.

A María Rosa González Murano, por su excelente labor técnica, por su gran calidez humana, por estar siempre dispuesta a ayudar, por su gran compañía y por hacer agradable el trabajo de cada día.

A la Dra Ana María Genaro por poder contar con ella en todo momento y por colaborar desinteresadamente con mi trabajo, a la Dra Miriam R Wald por su apoyo y aliento constantes y a la Dra. Gabriela Gorelik, por su amistad, por transmitirme sus conocimientos y por su valiosísima ayuda durante los primeros años de mi tesis.

A todas mis compañeros de laboratorio Magalí, Laurita, Andrés, Roxana y Leonardo, por el tiempo compartido, por estar siempre y por hacer cada día que el ámbito laboral sea un lugar acogedor.

A la Dra. María Zorrilla por su cálida bienvenida y por cedernos un espacio para trabajar.

A la Directora del CEFYBO, Dra Ana María Franchi por sus constantes consejos y por su apoyo incondicional.

A todo el personal del CEFYBO, por haberme dado la bienvenida al Instituto y hacerme sentir parte de él.

Al Ministerio de Salud de la Nación por haberme otorgado la Beca "Ramón Carrillo-Arturo Oñativia" y al CONICET por la Beca Doctoral tipo II, las que me permitieron realizar esta Tesis Doctoral.

Quiero agradecer enormemente a toda mi familia y especialmente a mis padres quienes me alentaron siempre a seguir adelante, me mostraron siempre con el ejemplo, el camino de la honestidad, la solidaridad y el valor del esfuerzo.

A Pablo, mi hermano, que a pesar de la lejanía siempre está presente.

A mis amigas, por estar siempre dispuestas a escuchar.

Y un agradecimiento muy especial a mi hija, quien me enseña todos los días que vale la pena seguir luchando.

A todos ellos, muchas gracias.

**Los resultados de este trabajo de tesis forman parte de las siguientes publicaciones:**

1. Gorelik G., Barreiro Arcos M.L., Klecha A.J. and Cremaschi G.A. Differential expression of protein kinase C isoenzymes related to high nitric oxide synthase activity in a T lymphoma cell line. *Biochim. Biophys. Acta*, 1588 (2): 179-188, 2002. Elsevier Science B. V., Amsterdam, Holanda.
2. Barreiro Arcos M.L., Gorelik G., Klecha A.J., Goren N., Cerquetti C. and Cremaschi G.A. Inducible nitric oxide synthase-mediated proliferation of a T lymphoma cell line. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 8 (2): 111-118, 2003. Elsevier Science, Academic Press, San Diego, USA.
3. Barreiro Arcos M.L., Gorelik G., Klecha A.J., Genaro A.M. and Cremaschi G.A. Thyroid hormones increase inducible oxide synthase gene expression down-stream PKC $\zeta$  in tumor murine T lymphocytes. *American Journal of Physiology - Cellular Physiology*, en prensa, 2006. American Physiological Society, USA.

## INDICE

<b>5. RESUMEN.....</b>	<b>2</b>
<b>6. INTRODUCCIÓN</b>	
2.1 Control neuroendócrino de la funcionalidad linfocitaria.....	7
2.2 Transducción de señales en linfocitos T.....	8
2.3 La proteína quinasa C .....	9
5.1.1 Isoenzimas de PKC.....	9
5.1.2 Estructura de las isoenzimas de PKC.....	11
5.1.3 Mecanismos de activación de PKC.....	12
5.1.4 Expresión diferencial de isoenzimas de PKC y su rol en las respuestas biológicas .....	14
5.1.5 Rol de las isoenzimas de PKC sobre la funcionalidad del sistema inmune.....	17
2.4 La óxido nítrico sintasa .....	19
2.4.1 Clasificación y estructura de las isoenzimas de NOS.....	19
2.4.2 Papel fisiológico del óxido nítrico y su acción como agente citoprotector o citotóxico.....	21
2.5 Asociación entre las actividades de PKC y NOS.....	23
2.6 El rol del factor de transcripción NF- $\kappa$ B.....	24
2.7 Hormonas tiroideas.....	26
2.7.1 Síntesis y regulación.....	26
2.7.2 Mecanismos de acción.....	27
2.7.3 Interacción entre el sistema inmune y el eje tiroideo.....	29
2.7.4 Participación del eje tiroideo en procesos neoplásicos.....	31
<b>3. HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
<b>5. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>37</b>
4.1 Suspensiones celulares y condiciones de cultivo.....	37

4.2 Ensayos de proliferación.....	38
4.3 Inhibidores empleados.....	39
4.4 Determinación de la actividad enzimática de PKC.....	39
4.5 Introducción intracelular de anticuerpos anti-PKC $\zeta$ en linfocitos T normales y tumorales .....	40
4.6 Ensayos de transfección transiente.....	41
4.7 Determinación de la actividad de NOS.....	42
4.8 Determinación de la concentración de nitritos.....	42
4.9 Expresión proteica de isoenzimas de PKC y NOS. Ensayos de inmunoblot..	43
4.10 Expresión genómica de isoenzimas de PKC y NOS.....	44
4.10.1 Extracción de ARN total.....	44
4.10.2 Ensayo de transcripción reversa (RT).....	44
4.10.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	44
4.11 Cuantificación del número de divisiones celulares (Marcación con CFSE).	46
4.12 Activación de NF- $\kappa$ B.....	47
4.12.1 Preparación de extractos citosólicos y nucleares.....	47
4.12.2 Análisis por western blot de la presencia del I $\kappa$ B en citoplasma.....	47
4.12.3 Ensayo de retardo en la movilidad electroforética (EMSA).....	48
4.13 Cuantificación del grado de apoptosis.....	48
4.13.1 Tinción con Hoechst.....	48
4.13.2 Determinación de la presencia de fragmentos de ADN apoptóticos (Técnica “DNA ladder”).....	49
5.1 Análisis estadístico.....	49
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
5.1 Caracterización de las respuestas proliferativas de linfocitos T normales y tumorales.....	51
5.1.1 Estudio de la cinética de proliferación en linfocitos T normales y células de la línea BW 5147. Participación de la activación de PKC..	51
5.1.2 Identificación de los intermediarios enzimáticos involucrados en la proliferación de linfocitos T tumorales y normales.....	53

5.1.3 Expresión de isoformas de PKC en linfocitos T normales y células BW 5147.....	53
5.1.4 Participación de la isoforma atípica PKC $\zeta$ en la proliferación de linfocitos T tumorales.....	56
5.1.8 Actividad de NOS en células T normales y tumorales y su participación en la proliferación celular.....	58
5.1.9 Caracterización de la actividad de NOS en linfocitos T tumorales....	58
5.1.7 Identificación de la isoforma inducible de NOS en células T tumorales.....	58
5.1.1 Expresión proteica y genómica de iNOS en linfocitos T normales y tumorales.....	62
5.1.2 Importancia de la actividad enzimática de NOS sobre la proliferación de linfocitos T normales y células BW 5147.....	63
5.1.10 Actividad de NOS dependiente de PKC en las células BW 5147.....	64
5.2 Efecto de las hormonas tiroideas (HTs) sobre la proliferación de células T normales y tumorales.....	66
5.2.1 Caracterización de las respuestas proliferativas inducidas por HTs...	66
5.2.2 Efecto de diferentes bloqueantes de PKC y NOS sobre la estimulación de la proliferación de linfocitos T normales y tumorales mediada por hormonas tiroideas.....	70
5.2.3 Participación de PKC y sus isoenzimas en las acciones ejercidas por HTs en linfocitos T normales y tumorales.....	70
5.2.3.1 Las HTs incrementan la actividad de PKC en linfocitos T normales y células BW 5147.....	70
5.2.3.2 Las hormonas tiroideas inducen la modulación diferencial de isoenzimas de PKC en linfocitos T normales y tumorales.....	75
5.2.4 Estimulación de la actividad de NOS en linfocitos T tumorales mediada por HTs.....	75
5.1.1 Las HTs ejercen la modulación de la actividad de NOS a través de la isoenzima $\zeta$ de PKC.....	79
5.2.5.1. Efecto sobre la actividad enzimática.....	79

5.2.5.2 Efecto sobre expresión proteica y genómica de la isoforma inducible de NOS.....	79
5.1.2 La PKC $\zeta$ induce la expresión y activación de iNOS a través de la vía de señalización del NF-kB.....	82
5.1.3 Activación por HTs de la fosfatil inositol-3-quinasa (PI3-K) río arriba de PKC $\zeta$ .....	82
5.2 Acción de hormonas tiroideas sobre las células BW 5147 a tiempos prolongados de cultivo.....	84
5.3.1 Efectos sobre la proliferación celular e inducción de apoptosis.....	84
5.3.2 Modulación de la actividad de NOS en las células BW mediada por el tratamiento prolongado con HTs.....	86
5.3.3 Efectos sobre la expresión proteica y genómica de iNOS y de PKC $\zeta$ ..	87
<b>6. DISCUSION</b> .....	92
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	110
<b>8. REFERENCIAS</b> .....	114
<b>9. ABREVIATURAS</b> .....	145

## **1. RESUMEN**

# **“EFECTO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS SOBRE EL BALANCE ENTRE LA PROLIFERACION Y LA APOPTOSIS CELULAR EN LINFOCITOS T NORMALES Y TUMORALES. PARTICIPACION DIFERENCIAL DE ISOENZIMAS DE PROTEINA QUINASA C Y DE OXIDO NITRICO SINTASA”**

## **RESUMEN**

Una compleja red de señales intracelulares conduce a la diferenciación, proliferación y apoptosis de linfocitos T. En esta tesis se caracterizaron los eventos bioquímicos implicados en la proliferación del linfoma T murino BW 5147 (BW) en comparación con linfocitos T normales en reposo o estimulados mitogénicamente y se analizó el efecto de las hormonas tiroideas (HTs) sobre las enzimas involucradas en las cascadas de señalización.

En las células BW la proliferación celular resultó dependiente de la actividad de la proteína quinasa C  $\zeta$  (PKC  $\zeta$ ), una isoenzima atípica calcio-independiente, así como también de la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS). En estas células estudios de western blot y PCR mostraron la expresión constitutiva de la isoforma inducible de NOS (iNOS), con niveles y actividad enzimática mayores en células en crecimiento respecto de las quiescentes. Por el contrario, la proliferación de los linfocitos T normales fue modulada por las isoenzimas de PKC clásicas dependientes de calcio, con una expresión mayoritaria de la isoenzima  $\beta$ , y una baja actividad de NOS no modificable por el estímulo mitogénico.

Respecto de las acciones de las HTs, éstas indujeron a tiempos cortos de cultivo (hasta 72 horas) un aumento de la proliferación de ambos tipos celulares, con un incremento en el contenido total de PKC y de la enzima translocada a membrana plasmática. Además elevaron los niveles de PKC  $\zeta$  en las células tumorales y de PKC  $\alpha$  y  $\beta$  en linfocitos T normales y fueron capaces de incrementar la actividad de NOS y la expresión de iNOS únicamente en las células BW. En dichas células, las HTs indujeron la activación de iNOS vía PKC  $\zeta$  involucrando río arriba de PKC a la enzima fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3-K) y río abajo a la activación del factor nuclear de transcripción kappa B (NF- $\kappa$ B).

A diferencia de lo observado a tiempos cortos de cultivo, el tratamiento prolongado de células BW con HTs (mayor a 5 días) indujo la disminución de las respuestas proliferativas y la muerte celular por apoptosis. Estos efectos se vieron acompañados por un aumento exacerbado de la actividad de NOS y de la expresión proteica y genómica de iNOS que fue independiente de PKC  $\zeta$  ya que, en estas condiciones, su expresión se encontró reducida.

Teniendo en cuenta las evidencias experimentales podemos concluir que las HTs son capaces de modular el balance entre proliferación y apoptosis linfocitarias involucrando diferencialmente a las isoenzimas de PKC y a la iNOS, dependiendo del tiempo de acción y del tipo celular en estudio.

### **Palabras Claves**

Hormonas tiroideas, linfoma T, linfocitos T, proliferación, apoptosis, proteína quinasa C, óxido nítrico sintasa, factor nuclear de transcripción kappa B, fosfatidilinositol-3-quinasa.

## **“THYROID HORMONE EFFECT ON THE BALANCE BETWEEN CELLULAR PROLIFERATION AND APOPTOSIS IN NORMAL AND TUMOR T LYMPHOCYTES. DIFFERENTIAL INVOLVEMENT OF PROTEIN KINASE C AND NITRIC OXIDE SYNTHASE ISOENZYMES”**

### **SUMMARY**

A complex net of intracellular signals leads to T lymphocyte differentiation, proliferation and apoptosis. In this work, the biochemical events involved in the proliferation of the murine T lymphoma BW5147 (BW) were studied in comparison to quiescent and mitogen stimulated normal T lymphocytes. Also the effect of thyroid hormones (THs) on these cell types and on the participating intracellular signals were analyzed.

BW cell proliferation was found to be dependent on both the atypical calcium-independent protein kinase C (PKC)  $\zeta$  and on nitric oxide synthase (NOS) activities. In these cells western blot and PCR studies demonstrated that they constitutively expressed the inducible NOS isoform (iNOS), with higher enzymatic level and activity in growing than in quiescent cells. On the contrary, normal T lymphocyte proliferation was modulated by classic calcium-dependent PKC isoenzymes with a major expression of the  $\beta$  isoform. Also normal T cells displayed low NOS activity that was not modified by mitogen stimulation.

Respect to THs actions, at short time of culture (up to 72 hours) both triiodothyronine (T3) and thyroxine (T4) were able to increase both BW and mitogen-induced T cell proliferation, effects that were accompanied by an increment in total PKC content and membrane associated PKC activity. Also THs increased PKC  $\zeta$  levels in BW cells, but PKC  $\alpha$  and  $\beta$  in normal T lymphocytes. Furthermore, THs were able to increase NOS activity and iNOS expression only in BW cells. In these cells THs induced iNOS activation via PKC  $\zeta$ , involving phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) and nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) up stream and down stream PKC, respectively.

However, longer time of culture with THs (more than 5 days) lead to a decrease in proliferative responses and induced apoptosis of BW cells. These effects were accompanied by an exacerbate increase in NOS activity and in iNOS protein and

ARN levels that were independent of PKC  $\zeta$  as this isoenzyme is drastically diminished in this culture conditions.

Taking into account the experimental evidences it can be concluded that THs are able to modulate the balance between lymphoid proliferation and apoptosis involving different PKC isoenzymes and iNOS and depending on both the cell type and the time of action.

### **Key words**

Thyroid hormones, T cell lymphoma, T lymphocyte, proliferation, apoptosis, protein kinase C, nitric oxide synthase, nuclear factor-kappa B, phosphatidylinositol 3-kinase

## **2. INTRODUCCION**

### 2.1 Control neuroendocrino de la funcionalidad linfocitaria

Los linfocitos son las células responsables de las respuestas inmunitarias (inmune, del latín, 'estar libre de carga'). Se desarrollan a partir de progenitores linfoides inmaduros y se dividen en dos grandes grupos, linfocitos B y linfocitos T, según que estos progenitores linfoides maduren en la médula ósea o en el timo, respectivamente. Los linfocitos B están especializados en la producción de anticuerpos. Los linfocitos T son responsables de las respuestas inmunes mediadas por células y dirigen la actuación de los otros componentes del sistema de defensa. Así, por ejemplo, cooperan con los linfocitos B en la síntesis de anticuerpos dirigidos específicamente contra antígenos timodependientes.

Los linfocitos cumplen sus funciones en estrecha comunicación con el microambiente con el que interactúan y con mecanismos regulatorios neuroendócrinos. Es decir que el sistema inmune y por ende sus componentes linfocitarios, además de sus mecanismos autorregulatorios, están influenciados por el sistema neuroendócrino. Existe entre ambos sistemas un verdadero circuito de control que comprende distintos niveles: el cerebro, la hipófisis, el sistema nervioso periférico y las células que participan en las respuestas inmunológicas (Mc Cann S, 1998; Turrin y Rivest, 2004; Toni R, 2004). Dicha interacción, en la que participan receptores celulares y sus señales de transducción, es bidireccional y estaría involucrada en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica y fisiológica (Downing y Miyan, 2000; Wrona D, 2006). Numerosas evidencias experimentales lo avalan:

- 1) La lesión de estructuras cerebrales disminuye la respuesta inmunológica (Labeur y col, 1991; Ghoshal y col, 1998; Wrona y col, 2003; Hefco y col, 2004).
- 2) Las citoquinas liberadas durante la respuesta inmune pueden actuar sobre el sistema nervioso central (SNC), inhibiendo o activando la liberación de péptidos hipotalámicos y por ende, modificando el patrón de secreción hormonal a nivel hipofisario (Mc Cann S, 1998; Rivest S, 2001; Kelley KW, 2004)
- 3) El sistema neuroendócrino es capaz de producir linfo y monoquinas (Downing y Miyan, 2000; Friedman WJ, 2005; Dafny y Yang, 2005)
- 4) Tanto neuropéptidos como hormonas y neurotransmisores pueden actuar modulando la funcionalidad de células inmunológicas (Mc Cann S, 1998; Krueger y col, 2002; Savino y col, 2003; Harbuz y col, 2003; Wrona D, 2006).

## 2. INTRODUCCION

- 5) Las células del sistema inmune son capaces de producir hormonas peptídicas y neurotransmisores (Mc Cann S, 1998; Wrona D, 2006).
- 6) A nivel molecular se ha descrito la presencia de receptores de alta afinidad para moléculas mutuamente reactivas. Así, las células del sistema nervioso poseen receptores para sustancias bioactivas del sistema inmune (Ireland y Reiss, 2004; Banisadr y col, 2005; Dafny y Yang, 2005) y, a su vez, las células inmunes presentan receptores para neuropéptidos, neurotransmisores y hormonas (Cazaux y col, 1995; Cremaschi y col, 2000; Boldyrev y col, 2005; Wheway y col, 2005)

Los linfomas constituyen un grupo heterogéneo y amplio de síndromes linfoproliferativos tumorales, con expansión clonal de una línea o sublínea linfoide, alterada por mecanismos que inciden en la transformación neoplásica de estas células. Los linfomas tienen una gran diversidad clínico-evolutiva, con formas de comienzo ganglionar o extraganglionar, así como diferentes criterios pronósticos. La clasificación de los linfomas se basa fundamentalmente en la naturaleza de la célula linfoide proliferante. En base a las evidencias descritas arriba, que avalan indiscutiblemente la existencia de una delicada red de control neuroendócrino de la funcionalidad linfocitaria, resulta de suma importancia tener en cuenta su potencial participación en cualquier aberración funcional o enfermedad del sistema inmunológico incluyendo los síndromes linfoproliferativos (Krueger y col, 2002).

### 2.2 Transducción de señales en linfocitos T

Una compleja serie de eventos intracelulares lleva a la proliferación y diferenciación de células T a células efectoras maduras. Estos procesos son dependientes de dos señales exógenas principales, una es la estimulación del complejo TCR/CD3 por antígenos o mitógenos y la otra depende de la acción de la interleuquina 2 (IL-2) sobre receptores específicos en la membrana celular. Ambos caminos desencadenan una serie de eventos secuenciales coordinados entre los que se incluyen, la activación de proteínas tirosina quinasa (TPK), la activación de fosfolipasa C (PLC) con la consiguiente hidrólisis de fosfolípidos de membrana que resulta en la formación de dos segundos mensajeros, el inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y el diacilglicerol (DAG). Estas señales de transducción

## 2. INTRODUCCION

involucran además la activación de otras proteínas quinasas y de varios factores de transcripción.

El IP3 (**Esquema 1**), aumenta el calcio intracelular a través de la liberación de sus depósitos citoplasmáticos. Dicho  $\text{Ca}^{2+}$  se une a la calmodulina, que es una quinasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , la que, a su vez, activa a la calcineurina, una proteína fosfatasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina. El NFAT (Factor Nuclear de células T Activadas), que es un regulador transcripcional de la expresión del gen de IL-2, es un *target* directo de la calcineurina. Esta última desfosforila al NFAT el que migra al núcleo e induce la transcripción del gen de IL-2.

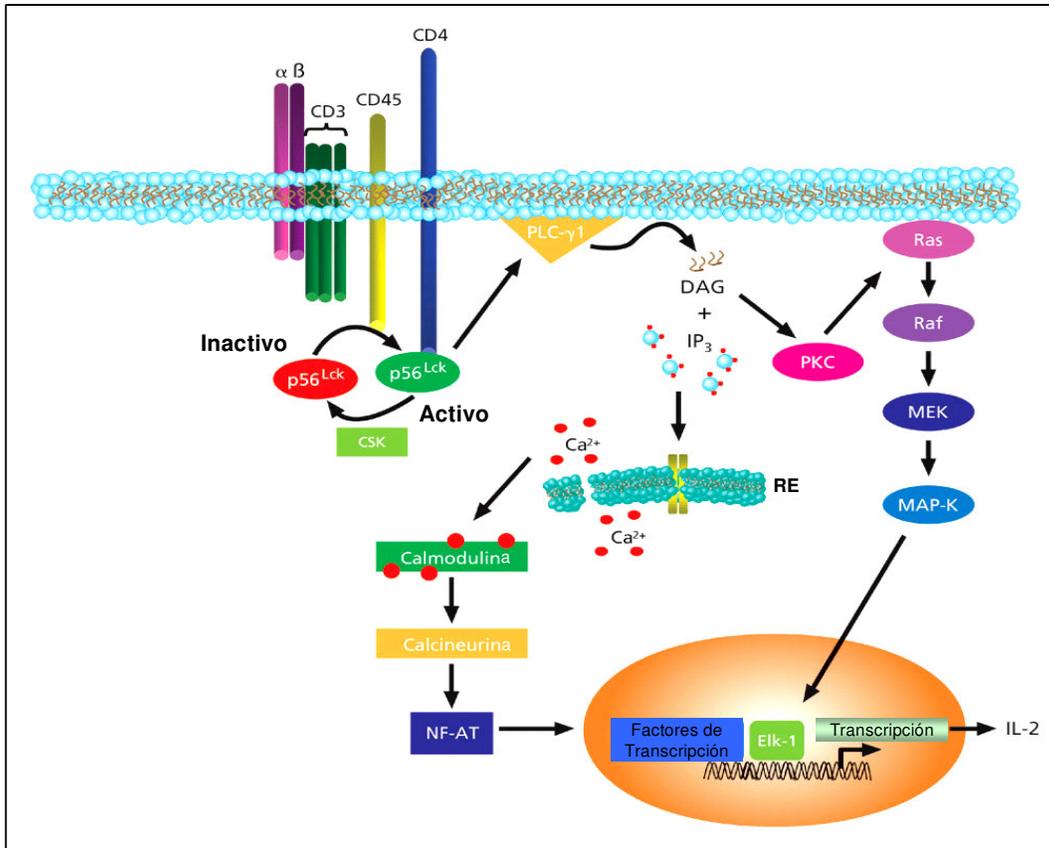
El DAG (**Esquema 1**), a su vez, activa a la proteína quinasa C (PKC). La PKC cumple un rol principal en el camino de señalización de células T a través de la interacción antígeno-receptor. La activación de PKC desencadena una cascada de señales intracelulares que incluye la fosforilación de Ras, una GTPasa que activa Raf, con la consiguiente estimulación de la cascada de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y la fosforilación de la maquinaria transcripcional y transduccional.

Estos efectos provocan la amplificación de la señal inicial que resulta en cambios en la expresión genética, que conducen a eventos de diferenciación celular, inducción de respuestas proliferativas o activan mecanismos de muerte celular (Isakov y col., 1992; Graves y col, 1995; Samelson y col, 1995; Hama y col 1995; Germain y Stefanova; 1999).

### 2.3 La proteína quinasa C

#### 2.3.1 Isoenzimas de PKC

La proteína quinasa C (PKC) es una familia de proteínas quinasas que fosforilan específicamente a los aminoácidos serina y treonina en una gran variedad de proteínas. Por clonado molecular se ha demostrado que la PKC es una familia de 12 isoenzimas codificadas por distintos genes que se diferencian en sus estructuras y requerimientos de sustrato (Tan y Parker, 2003).



**Esquema 1:** Señalización por el receptor de células T (TCR). Uno de los primeros eventos bioquímicos que tiene lugar luego de la activación del complejo TCR/CD3 es la activación de la familia Src de tirosina quinasas (p56<sup>Lck</sup>) que a su vez fosforila a la PLC $\gamma$ 1 que hidroliza al fosfatidilinositol 4, 5-bifosfatofato (PIP<sub>2</sub>), generando DAG e IP<sub>3</sub> y dando lugar a los eventos bioquímicos descritos en el texto. RE: retículo endoplásmico.

Las isoformas de PKC se han agrupado en tres subfamilias basándose en la homología de secuencias y en sus propiedades bioquímicas:

1. Las PKC convencionales o clásicas (cPKC) que incluyen las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II y  $\gamma$ . Las isoformas  $\beta$ I y  $\beta$ II son productos del mismo gen generados por *splicing* alternativo. Las cPKC son activadas por fosfolípidos y Ca<sup>2+</sup> y su unión al DAG incrementa la afinidad de la enzima por ambos. Las cPKC también unen ésteres de forbol.
2. Las PKC noveles (nPKC) que incluyen las isoformas  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  y  $\theta$ , son independientes de Ca<sup>2+</sup> y activadas por DAG o ésteres de forbol en presencia de fosfolípidos.

3. Las PKC atípicas (aPKC) incluyen las isoformas  $\zeta$  y  $\iota/\lambda$ , son independientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y no requieren DAG o ésteres de forbol para su activación, aunque su actividad es regulada por fosfolípidos.

### 2.3.2 Estructura de las isoenzimas de PKC

La estructura proteica de las isoformas de PKC muestra un dominio regulatorio N-terminal y un dominio catalítico C-terminal con regiones altamente conservadas (C1-C4) y regiones variables (V1-V5).

El dominio regulatorio de las isoenzimas de PKC presenta regiones de interacción para cofactores y el dominio catalítico, regiones de unión para el ATP y para los sustratos específicos de la enzima (Coussens y col., 1986; Newton, 1995). La estructura de las isoenzimas de PKC se encuentra representada en el **Esquema 2**.

La región regulatoria posee una secuencia denominada pseudosustrato (PS), similar a la secuencia consenso de fosforilación para PKC, pero con el residuo no fosforilable alanina, así, esta región al interaccionar con el dominio catalítico reprime la actividad de la enzima. En presencia de activadores y cofactores, la enzima sufre un cambio conformacional que impide al PS interaccionar con el dominio catalítico, activando de esta forma a la enzima (Orr y col., 1992).

El dominio C1 de las isoformas cPKCs y nPKCs presenta dos regiones ricas en cisteína que unen DAG y ésteres de forbol y preservan la estructura tridimensional de la enzima. Las aPKC poseen un solo dominio rico en cisteína incapaz de unir estos cofactores.

Los ésteres de forbol se unen a la enzima dejando los residuos hidrofóbicos hacia afuera de la estructura, facilitando la inserción de la PKC a la membrana celular.

La región C2 presente sólo en las cPKC, es la responsable de la unión al  $\text{Ca}^{2+}$  y al fosfolípido de membrana, fosfatidilserina (FS). Las nPKCs, si bien presentan una región homóloga al dominio C2 (C2'), carecen de los residuos de aspartato necesarios para la unión al  $\text{Ca}^{2+}$ .

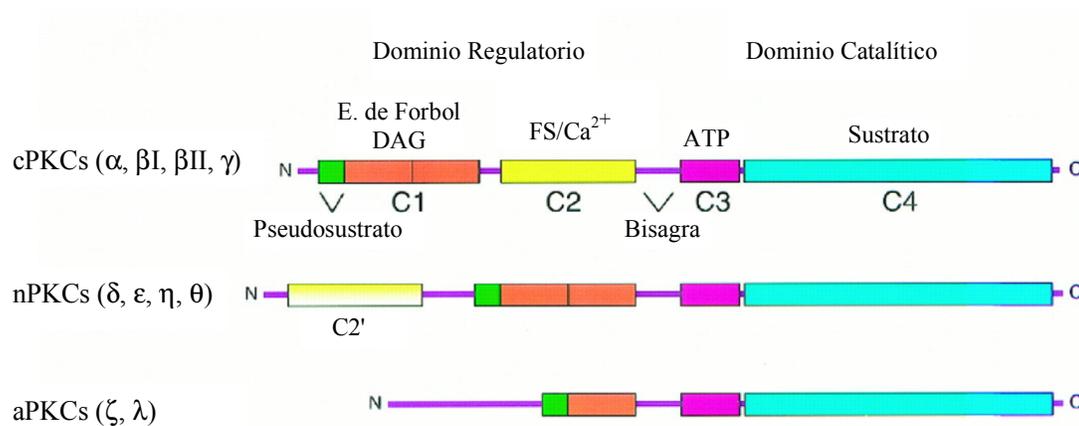
El dominio catalítico presenta una región C3 que une ATP y una región C4 que interacciona con el PS cuando la enzima está inactiva y con los sustratos celulares cuando está activa.

Los dominios regulatorio y catalítico se encuentran unidos a través de una región bisagra que le confiere flexibilidad a la enzima y permite que ambos dominios

## 2. INTRODUCCION

interaccionen. Esta región es sensible a la acción de proteasas que la pueden clivar liberando el dominio catalítico.

Los distintos miembros de la familia de PKC presentan una alta homología, principalmente en la región catalítica. A pesar de ello, está demostrado que cada isoenzima tiene distintos modos de regulación y desencadena distintas respuestas biológicas.



**Esquema 2:** Estructura primaria de los distintos miembros de la familia de PKC, donde se muestran las regiones constantes (C1-C4) del dominio regulatorio y catalítico, con las zonas de interacción con ésteres de forbol, con fosfatidilserina (FS), con Ca<sup>2+</sup>, con ATP y con los sustratos específicos. Intercaladas entre estas regiones se encuentran las regiones variables. También se encuentra señalado el dominio inhibitorio pseudosustrato y la región de bisagra que le otorga flexibilidad a la molécula.

### 2.3.3 Mecanismos de activación de PKC

La familia de PKC puede ser activada por una amplia variedad de estímulos, como ser factores de crecimiento, neurotransmisores y hormonas. La PKC es sintetizada como una quinasa inactiva y procesada a la forma madura tras sufrir una transfosforilación y dos autofosforilaciones. En estos eventos, se encuentran involucradas varias enzimas, entre ellas, la enzima fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3-K).

La PI3-K es un heterodímero compuesto por una subunidad regulatoria y una subunidad catalítica de 85 y 110 kDa, respectivamente.

La PI3-K se une a través de un dominio SH2 de la subunidad regulatoria, a residuos específicos de fosfotirosina presentes en receptores con actividad de tirosina-quinasa, lo cual provoca la fosforilación de la subunidad regulatoria y posteriormente la activación alostérica de la subunidad catalítica (Fresno Vara y col., 2004). La enzima activada

## 2. INTRODUCCION

fosforila a su vez al lípido de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) para dar fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>). El PIP<sub>3</sub> recluta hacia la membrana plasmática a la quinasa dependiente de fosfoinosítidos 1 (PDK1), que fosforila a sus sustratos en residuos serina y treonina.

La quinasa PDK1 es la responsable de la transfosforilación de la PKC. Luego, la PKC sufre dos autofosforilaciones, la primera estabiliza la conformación de la enzima y la segunda provoca la liberación de la PKC al citosol, por lo que sería importante para regular la localización intracelular de la enzima.

La forma madura con tres fosforilaciones es todavía inactiva puesto que el PS ocupa el dominio catalítico, pero está lista para ser activada alostéricamente por DAG y fosfolípidos (Newton, 1995).

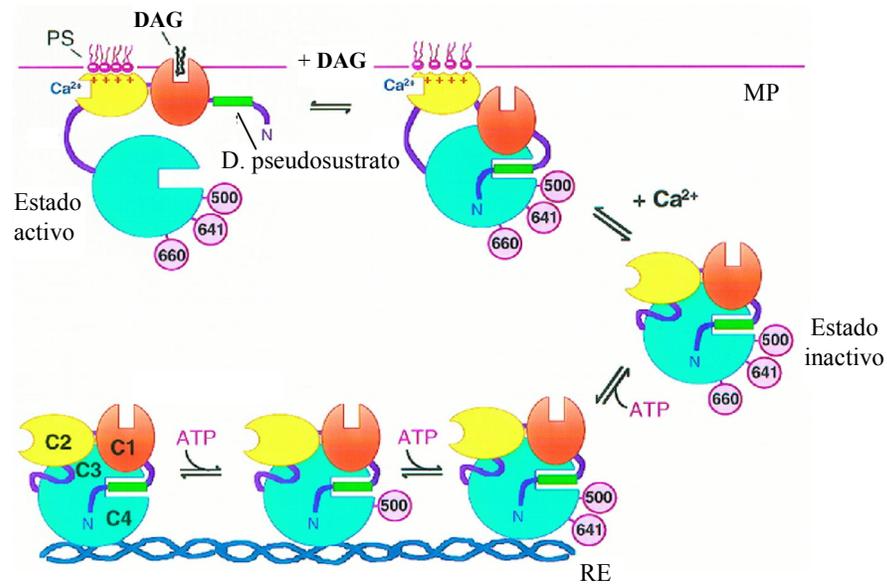
El principal activador fisiológico de PKC es el segundo mensajero DAG. Los ésteres de forbol son activadores no fisiológicos de PKC que pueden simular la acción del DAG dentro de las células. Tanto el DAG como los ésteres de forbol, actúan como anclas hidrofóbicas que reclutan a la PKC hacia la membrana celular, aumentando considerablemente su afinidad por la misma (Newton, 1995).

La unión del DAG a las cPKCs y nPKCs aumenta la afinidad de estas isoenzimas por la FS, lo cual estabiliza su unión a la membrana plasmática. Dicha interacción provoca un cambio conformacional en la enzima que libera al dominio PS de su unión al dominio catalítico, permitiendo de esta forma, la unión a sustratos celulares para fosforilarlos. Por lo tanto, la activación de PKC requiere de un evento conocido como “translocación” de PKC a la membrana plasmática (Nishizuka 1995). Los eventos de activación de PKC se encuentran representados en el **Esquema 3**.

El DAG producido por la acción de fosfolipasas específicas, y el Ca<sup>2+</sup> liberado de los depósitos intracelulares por acción del IP<sub>3</sub>, actúan sinérgicamente para activar a las cPKC. El Ca<sup>2+</sup> aumenta considerablemente la afinidad de estas isoenzimas por lípidos cargados negativamente, lo cual implica un aumento en la afinidad de PKC por las membranas celulares.

La estimulación de receptores que aumentan los niveles de DAG en la membrana provoca la translocación rápida de PKC, que se revierte en segundos dado que la vida media del DAG es muy corta. El mecanismo de activación por ésteres de forbol es similar al del DAG, pero éstos son más potentes y metabólicamente más estables que el DAG, lo cual resulta en una activación prolongada de la PKC en la célula, que conduce a una regulación negativa dado que la PKC es degradada por la acción de proteasas.

## 2. INTRODUCCION



**Esquema 3:** La PKC tras sufrir una transfosforilación y dos autofosforilaciones es reclutada a la membrana plasmática (MP), en donde el DAG producido por fosfolipasas específicas aumenta la afinidad de las cPKCs y nPKCs por fosfatidilserina (FS). En la membrana plasmática la PKC sufre un cambio conformacional que provoca el desplazamiento del pseudosustrato de la región catalítica, estimulando la actividad quinasa de la enzima. En el caso de las cPKCs la activación de las mismas requiere a su vez de la presencia de  $Ca^{2+}$ . Al igual que las otras isoenzimas, las aPKCs son activadas en la membrana plasmática y aunque no requieren  $Ca^{2+}$  ni DAG para su activación, presentan afinidad por los fosfolípidos de membrana. RE: retículo endoplásmico.

### 2.3.4 Expresión diferencial de isoenzimas de PKC y su rol en las respuestas biológicas

Las isoenzimas de PKC pueden fosforilar a un gran número de proteínas, tales como receptores, proteínas del citoesqueleto, canales iónicos, proto-oncogenes, proteínas nucleares, etc, participando así en procesos celulares muy variados, tales como la regulación del crecimiento y la diferenciación celular, la desensibilización de receptores, la remodelación del citoesqueleto, la modulación de canales iónicos, la regulación de la transcripción y la respuesta inmune, entre otros (Newton, 1997; Mellor y Parker, 1998; Ron y Kazanietz, 1999; Tan y Parker, 2003).

En un principio, se pensó que la PKC mediaba estímulos proliferativos (Dicker y Rozengurt, 1978; Zhou y col., 1993) dado que es el principal receptor intracelular de los ésteres de forbol, los cuales actúan como potentes promotores tumorales (Castagna y col., 1982). Actualmente se piensa que la PKC se encuentra involucrada tanto en efectos proliferativos como anti-proliferativos. Se han reportado en bibliografía evidencias que

## 2. INTRODUCCION

describen la participación de PKC en el proceso de tumorigénesis, invasión y metástasis (Podar y col., 2002; Qiang y col., 2005; Hans y col., 2005; Lahn y col., 2006), así como también estudios que sugieren que algunas isoenzimas de PKC antagonizan el proceso tumorigénico en lugar de promoverlo (Kamimura y col., 2004; Wheeler y col., 2002).

Zhuang y col. (2001) han descrito en células de leucemia mieloide humanas, HL-60, que las isoenzimas de PKC inhiben la apoptosis inducida por especies reactivas de oxígeno mediante la inhibición de la actividad de caspasa-8. Esto a su vez impide el clivaje de Bid, la activación de caspasa-3, y disminuye el potencial transmembrana y la liberación de citocromo C de la mitocondria. Adicionalmente, Leroy y col. (2005) han encontrado una regulación negativa, mediada por PKC $\zeta$ , de la apoptosis inducida por el ligando Fas en células de linfoma T humanas, Jurkat. La isoenzima PKC $\zeta$  previene la apoptosis celular interfiriendo en la formación del complejo de señalización inductor de apoptosis y el subsecuente procesamiento de la caspasa-8.

En cuanto a las isoenzimas clásicas  $\alpha$  y  $\beta$ , en la literatura han sido descritos numerosos ejemplos que señalan a estas isoenzimas como proteínas principalmente anti-apoptóticas. Spitaler y col. (1999) han descrito que la regulación negativa de la isoenzima PKC $\alpha$  mediante el empleo de oligonucleótidos antisentido, induce la apoptosis de las células HeLa. También han descrito en células NIH3T3 la disminución de la proliferación celular y la inducción de la apoptosis por el bloqueo de PKC $\alpha$  con inhibidores específicos. Asimismo, las células que sobreexpresan PKC $\alpha$  son más resistentes a la inducción de la apoptosis por cisplatino que aquellas que sobreexpresan la PKC $\epsilon$  o la PKC $\zeta$ . Nakajima y col. (2004) han hallado que la estimulación de las PKCs  $\alpha$  y  $\beta$  previene la apoptosis inducida por radiación en células de linfoma tímico murino, 3SBH5.

Las isoenzimas de PKC clásicas se encuentran asociadas principalmente a procesos proliferativos. Así, Isakov y col. (1992) han descrito en linfocitos T humanos estimulados mitogénicamente con fitohemaglutinina, una inducción en los niveles de ARN mensajero de las isoenzimas convencionales de PKC  $\alpha$  y  $\beta$ , vía el complejo TCR/CD3

La isoenzima PKC $\epsilon$  también tiene efectos anti-apoptóticos en varios tipos celulares. La sobreexpresión de PKC $\epsilon$  en fibroblastos resulta en la estimulación del crecimiento celular y en transformación maligna (Tachado y col., 2002). En las células de cáncer de

## 2. INTRODUCCION

mama MCF-7, la sobreexpresión de PKC $\epsilon$  retrasó el efecto apoptótico inducido por TNF- $\alpha$  (Basu, 2002).

La isoenzima  $\zeta$  ha sido implicada en los caminos de señalización que regulan la mitogénesis y la supervivencia celular. La sobreexpresión de PKC $\zeta$  en la línea de células tiroideas de rata, WRT, promueve la proliferación independiente de tirotrófina (TSH) a través de la activación de MAPKs (Fernandez y col., 2000). La sobreexpresión de PKC $\zeta$  en células de leucemia mieloide humana, U-937 protege de la apoptosis inducida por daunorrubicina (Bezombes y col., 2002) y su inactivación acelera la apoptosis de estas células sometidas a tratamiento con el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) (Filomenko y col., 2002). En linfocitos B, la PKC $\zeta$  interviene en la cascada que media el efecto protector del factor de crecimiento nervioso (NGF) contra la apoptosis (Kronfeld y col., 2002).

Un gran número de evidencias experimentales señalan a la PKC $\delta$  como una isoenzima principalmente apoptótica. En tal sentido, Panaretakis y col. (2005) han demostrado que la inducción de la apoptosis por doxorrubicina requiere de la activación de la PKC $\delta$  en células linfocíticas inmaduras. En las células de leucemia mieloide humana, U-937, la translocación de PKC $\delta$  desde citosol a la mitocondria induce la liberación de citocromo C y provoca la apoptosis celular (Majumder y col., 2000). En esta línea celular está demostrado que un fragmento clivado por la caspasa-3 perteneciente a la región catalítica de PKC $\delta$ , posee actividad constitutiva de quinasa y que la sola sobreexpresión de este fragmento es capaz de inducir apoptosis (Emoto y col., 1995; Ghayur y col., 1996). La cinaropicrina inhibe la proliferación celular e induce la apoptosis de células U937 y Jurkat por inducción del clivaje proteolítico de PKC $\delta$  (Cho y col., 2004). En células HeLa, un inhibidor de PKC $\delta$  previene el clivaje de esta isoenzima y la activación de caspasas inducida por agentes que dañan el ADN (Basu, 2001). Kanthasamy y col. (2003) demostraron que la activación proteolítica de PKC $\delta$  dependiente de caspasa 3 en células dopaminérgicas PC 12 conduce a la apoptosis celular y que la función proapoptótica de PKC $\delta$  podría estar regulada por la sobreexpresión de la proteína mitocondrial anti-apoptótica Bcl-2.

Las isoenzimas de PKC también se encuentran involucradas en los procesos de diferenciación celular. Así, células promielocíticas de ratón 32D que sobreexpresan PKC  $\alpha$  o PKC  $\delta$  se diferencian a macrófagos maduros cuando se incuban con ésteres de forbol (Mischak y col., 1993).

## 2. INTRODUCCION

Esta variedad de efectos sobre la proliferación y la supervivencia celular puede ser explicada por la existencia de las distintas isoformas de PKC que regulan diferencialmente dichos efectos biológicos a través de la activación de distintas rutas de señalización. Cada isoenzima de PKC posee una especificidad de sustrato diferente, una distribución específica dentro del tejido y una localización subcelular determinada (Blumberg y col., 1994, Dekker y Parker 1994, Pongracz y col., 1995). A su vez, cada tipo celular expresa un conjunto de isoenzimas de PKC característico, de modo que dentro de una misma célula la activación con ésteres de forbol puede resultar en varios efectos simultáneos, dependiendo de la isoenzima que se activa. Algunas isoenzimas son expresadas prácticamente en todos los tejidos mientras que otras se expresan en unos pocos, por ejemplo, el cerebro contiene todas las isoenzimas, mientras que otros como la piel y el músculo liso y cardíaco sólo tienen algunas. En el cerebelo se expresan las isoenzimas PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ I y  $\beta$ II,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$ , pero PKC  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$  están en las células de Purkinje, PKC  $\beta$ I está en la capa granular y PKC  $\beta$ II está en la capa de la corteza cerebelar. El hecho que las isoformas descritas exhiban diferentes distribución tisular, localización subcelular y propiedades bioquímicas sugiere que las isoenzimas individuales pueden desempeñar roles especializados en las funciones celulares. La mayoría de las células expresan al menos 5 isoenzimas distintas, incluso una misma isoforma puede tener efectos distintos dependiendo del contexto celular en el que se encuentra. Por ejemplo, la sobreexpresión de PKC $\beta$ I en la línea celular R6 de fibroblastos de rata provoca un aumento en la proliferación de estas células (Housey y col., 1988), mientras que en células de cáncer de colon humanas HT29 conduce a la inhibición de la proliferación y supresión tumoral (Choi y col., 1990). Además la PKC $\alpha$  sobreexpresada en la línea R6 ejerce efectos opuestos a la PKC $\beta$ I, disminuyendo la velocidad de proliferación (Borner y col., 1995). Esto sugiere que no puede existir un efecto generalizado de PKC, sino que por el contrario, depende de la activación diferencial de las distintas isoenzimas y del tipo celular que se estudie.

### 2.3.5 Rol de las isoenzimas de PKC sobre la funcionalidad del sistema inmune

Estudios recientes realizados en ratones transgénicos y *knockout* para isoenzimas de PKC indican que las isoformas individuales presentan diferentes funciones sobre el

## 2. INTRODUCCION

sistema inmune regulando los caminos de señalización que conducen al desarrollo, diferenciación, activación y supervivencia de las células inmunes (Tan y Parker, 2003).

En timocitos se expresa predominantemente la PKC $\alpha$ . La sobreexpresión de esta isoenzima induce la hiperproliferación de las células T y una elevada producción de IL-2 en respuesta a la estimulación del TCR. La expresión de PKC $\theta$  está restringida a los linfocitos T y colocaliza con el TCR en la sinapsis inmunológica. Está descrito que PKC $\alpha$  actúa río arriba de PKC $\theta$  para activar a la quinasa de I $\kappa$ B y al NF- $\kappa$ B en linfocitos T (Trushin, 2003). Evidencias experimentales con transfecciones transientes de dominantes negativos de PKC $\theta$  en células del linfoma T humano, L-MAT indican que esta isoenzima protege a las células de la apoptosis inducida por dioxinas (Ahmed y col., 2005).

También se ha demostrado que la PKC $\beta$  interviene en la migración de células T a través del endotelio vascular en procesos inflamatorios. Esta isoforma es activada luego de la interacción de las integrinas LFA-1 presentes en las células T y las moléculas de adhesión ICAM-1 expresadas por el endotelio (Volkov y col., 1998, Fanning y col., 2005). La PKC $\beta$  también ha sido asociada a la supervivencia de linfocitos B mediando señales intracelulares desencadenadas a través de la activación de su receptor antigénico. Ratones *knockout* para la isoenzima PKC $\beta$  presentaron un bajo número de células B en el bazo con una disminuida proliferación celular, sin embargo mostraron una activación normal de las células T (Tan y Parker, 2003). Estudios en ratones *knockout* para PKC $\zeta$  indican que esta isoforma dentro del sistema inmune es específica para el funcionamiento de las células B (Martin, 2002). Linfocitos B que no expresan PKC $\zeta$  muestran una incrementada apoptosis espontánea y la disminución de la proliferación y supervivencia en respuesta al *cross-linking* de IgM, mientras que las células T y los timocitos parecen proliferar normalmente (Tan y Parker, 2003). La isoenzima PKC $\lambda$  interviene en la activación del NF- $\kappa$ B durante el desarrollo temprano de las células B (Saijo y col., 2003). La isoforma PKC $\delta$  está asociada al control de la respuesta proliferativa de los linfocitos B y al estado de anergia en estas células. Ratones deficientes en PKC $\delta$  presentan esplenomegalia y linfadenopatía debido al exacerbado aumento de células B periféricas, sin observarse anomalías en células T (Miyamoto y col., 2002). Estos ratones mueren prematuramente por enfermedades autoinmunes. Aunque estos estudios sugieren que la PKC $\delta$  cumple un rol como regulador negativo de la proliferación, aún no se conoce su mecanismo de acción.

## 2. INTRODUCCION

Varias evidencias experimentales involucran a la PKC $\epsilon$  como un importante mediador en la funcionalidad del macrófago. En estas células, la isoenzima PKC $\epsilon$  interviene en la transducción de señales en el macrófago inducida por lipopolisacárido (LPS) posiblemente a través de la inducción de la cascada de MAPK (Valledor y col., 2000). La pérdida de PKC $\epsilon$  no afecta la diferenciación de monocitos a macrófagos en la médula ósea, ni la migración hacia zonas de inflamación, pero los ratones *knockout* para esta isoenzima presentan reducidos niveles de óxido nítrico, debido a una disminución en la expresión de la iNOS, y bajos niveles de prostaglandina E2, TNF $\alpha$  y IL-1 $\beta$  luego de la estimulación por LPS e IFN $\gamma$ . A pesar de que estos ratones aparentaban estar sanos, tenían disminuido el período de supervivencia dado que eran incapaces de eliminar las infecciones bacterianas (Tan y Parker, 2003).

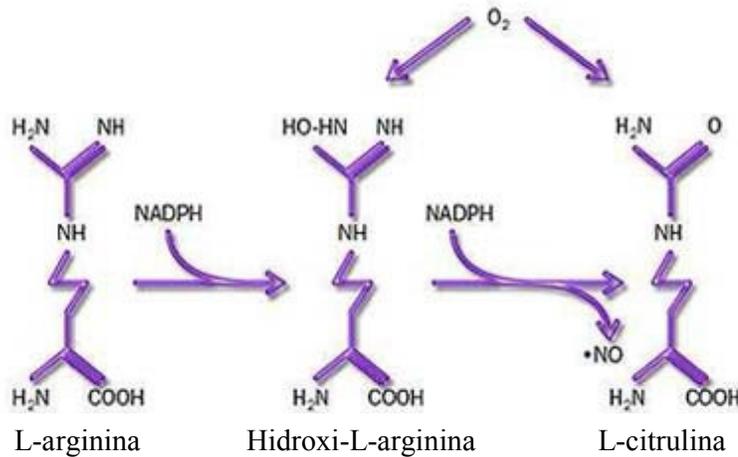
### 2.4 La óxido nítrico sintasa

#### 2.4.1 Clasificación y estructura de las isoenzimas de NOS.

La biosíntesis de NO en mamíferos involucra dos pasos de oxidación por acción catalítica de las isoenzimas de la óxido nítrico sintasa (NOS) que transforman al aminoácido esencial L-arginina en citrulina y NO. Las isoenzimas de NOS catalizan la oxidación de uno de los dos nitrógenos guanidínicos equivalentes de la L-arginina, formando hidroxil-L-arginina que luego por clivaje oxidativo, se convierte en L-citrulina y NO (Mansuy y Boucher, 2004). En esta reacción se produce la oxidación de cinco electrones de la L-arginina, dos electrones son provistos por el NADPH para producir hidroxil-L-arginina, seguida de una oxidación de tres electrones del nitrógeno hidroxilado para formar NO. La conversión de L-arginina a L-citrulina se encuentra representada en el **Esquema 4**.

Para poder concretar la actividad catalítica, la NOS requiere como sustratos al oxígeno molecular (O $_2$ ) y a la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). La tetrahidrobiopterina (BH $_4$ ) aumenta la velocidad inicial de síntesis del NO estabilizando la enzima. Otros cofactores importantes son la flavina adenina dinucleótido (FAD), la flavina mononucleótido (FMN) y el grupo hemo (hierro protoporfirina IX) (Stuehr y col., 2004).

## 2. INTRODUCCION



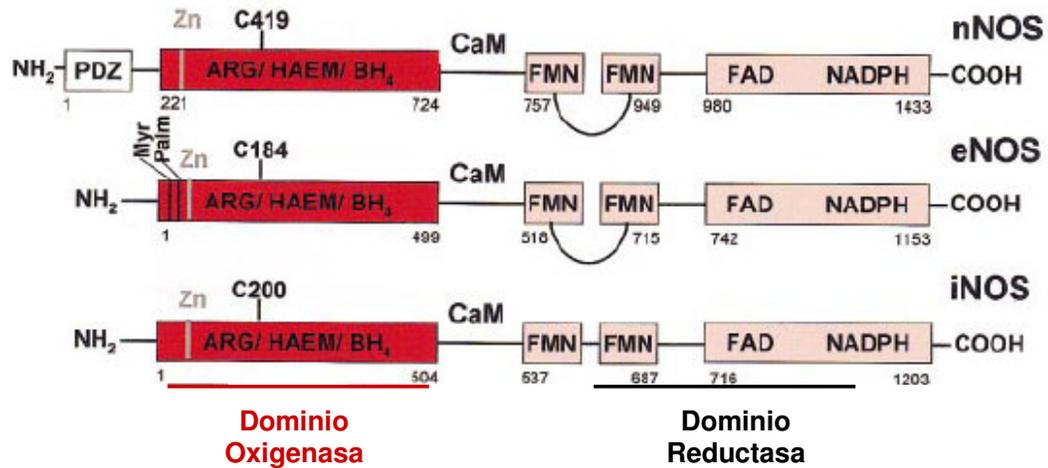
**Esquema 4:** Las isoenzimas de NOS catalizan la hidroxilación del grupo guanidina de la L-arginina formando hidroxi-L-arginina que luego por clivaje oxidativo forma los productos L-citrulina y NO. Se muestran los requerimientos de oxígeno y de NADPH de cada reacción.

Se han identificado tres isoenzimas de NOS, a saber:

- 1- La NOS I o NOS neuronal (nNOS), posee un peso molecular (PM) de 160 kDa. Se expresa constitutivamente en células neuronales tanto centrales como periféricas, y en ciertas células epiteliales. Esta isoenzima es regulada por Ca<sup>2+</sup> y calmodulina.
- 2- La NOS II o NOS inducible (iNOS), posee un PM de 130 kDa. Se expresa en una gran variedad de células en respuesta a diversas señales que actúan sinérgicamente, incluyendo citoquinas y productos microbianos. Su activación resulta en la producción de grandes cantidades de NO. Esta NOS es calcio-calmodulina independiente. La calmodulina está presente como una subunidad fuertemente ligada a la enzima y, a diferencia de las otras isoformas, no se requieren niveles altos de calcio para su unión con la iNOS, posiblemente debido a una interacción irreversible entre ambas.
- 3- La isoforma III o NOS endotelial (eNOS), posee un PM de 135 kDa. Se expresa constitutivamente en células endoteliales, pudiendo su expresión ser incrementada bajo ciertas condiciones como el “*shear stress*”. Su actividad está modulada por Ca<sup>2+</sup> y calmodulina.

Las tres isoformas de NOS exhiben una estructura en la que se distinguen dos dominios. El dominio oxigenasa N-terminal, que contiene los sitios de unión para el hemo, la BH<sub>4</sub> y la L-arginina y el dominio reductasa C-terminal, que contiene los sitios de unión para FAD, FMN y NADPH. Ambos dominios se encuentran unidos por el sitio de reconocimiento de Ca<sup>2+</sup>-calmodulina (Bredt y col., 1991; Alderton y col., 2001).

## 2. INTRODUCCION



**Esquema 5:** Estructura primaria de las distintas isoenzimas de NOS, donde se muestran los dominios Oxigenasa y Reductasa. También se encuentra indicado para cada isoforma, los sitios de unión al sustrato, al hemo (HAEM), a Ca<sup>2+</sup>-calmodulina y los cofactores necesarios.

### 2.4.2 Papel fisiológico del óxido nítrico y su acción dual como agente citoprotector o citotóxico

El óxido nítrico (NO) es un gas biológicamente activo, producido por casi todos los tipos celulares del organismo y que participa en muy diversos procesos, tales como la neurotransmisión, la vaso/broncodilatación en los sistemas cardiovascular y respiratorio, el aumento de la actividad inmune contra patógenos invasores, el control de la termorregulación, la función renal, la motilidad gastrointestinal, la función endócrina, así como también varias funciones del sistema urogenital, como ser la secreción de renina, la espermatogénesis, la ovulación, la implantación y el parto. Debido a su bajo peso molecular (30 Da) y a su naturaleza lipofílica, el NO difunde rápidamente a través de las membranas lipídicas. El NO ha sido involucrado tanto en estados fisiológicos como patológicos (Thippeswamy y col., 2006), dependiendo esto de la magnitud y de la duración de la síntesis de NO por las células. Así, las acciones fisiológicas son mediadas por pulsos de pequeñas cantidades de NO, las cuales pueden aumentar los niveles de cGMP a través de la nitrosilación del hemo de la guanilato ciclasa, produciendo la dilatación de los vasos sanguíneos, la desagregación plaquetaria y la apertura y cierre de algunos canales iónicos. Las actividades patológicas son el resultado de la producción sostenida de altos niveles de NO, que pueden inactivar enzimas dependientes de hierro,

## 2. INTRODUCCION

involucradas en la respiración mitocondrial, en la producción de energía y en la replicación celular. Numerosas evidencias señalan al NO como una molécula con acciones contrapuestas, protegiendo en ciertos casos a las células de mecanismos apoptóticos y en otros, promoviendo la apoptosis. Este efecto dual del NO depende de diversos factores, como ser su velocidad de síntesis y su concentración, las isoenzimas de NOS que lo producen, el tipo celular y el ambiente intra y extracelular en el cual el NO es liberado (Mendes y col., 2001; Thippeswamy y col., 2006).

Particularmente en el sistema inmune, y tal como lo habíamos referido anteriormente, la estimulación de la producción de NO derivado de macrófagos activados actúa de manera tóxica participando en la defensa del huésped contra tumores y procesos infecciosos (Stuehr y Nathan, 1989; Nathan y Hibbs, 1991). Los altos niveles de NO producidos por la iNOS macrofágica inducen la muerte por apoptosis de una gran variedad de células (Albina y col, 1993; Bonham y col, 1996) y se ha propuesto que altera las respuestas antigénicas y mitogénicas de linfocitos T como B (Hoffman y col, 1993). Evidencias recientes, sin embargo, señalan que los mismos linfocitos pueden producir bajos niveles de NO de forma autócrina que pueden modular diversos eventos celulares (Liew, 1995). Así, Taylor-Robinson y col. (1994) han demostrado que clones murinos de linfocitos T activados por el antígeno específico, pueden incrementar los niveles de NO a través de la expresión de iNOS. Otros estudios han demostrado la detección de la eNOS en células T humanas (Reiling y col, 1996; Sciorati y col, 1997), mientras que Williams y col (1998) demostraron que la activación del TCR induce la producción de NO a través de la expresión de la isoforma neuronal de la NOS. Adicionalmente, varios estímulos diferentes pueden activar el camino de señalización del NO en líneas celulares de linfomas T y B a través de las isoformas inducible (Mannick y col, 1994) y endotelial (Murphy y col, 2001) de la NOS. Como puede deducirse de las evidencias experimentales, el papel que las isoenzimas individuales juegan a nivel linfocitario no ha sido completamente esclarecido.

El NO cumple un importante rol en el control de la apoptosis en varios tipos celulares, incluyendo células tumorales. En muchos tumores humanos y experimentales, el NO derivado del tumor parece estimular su progresión e inclusive la formación de metástasis, ya que aumenta la capacidad invasiva, angiogénica y migratoria de las

## 2. INTRODUCCION

células tumorales. Sin embargo en otros casos se han reportado efectos opuestos, llevando la sobreproducción de NO, al arresto del ciclo celular y a la apoptosis. Estas discrepancias podrían ser explicadas por diferentes susceptibilidades de las células tumorales a la apoptosis mediada por NO o al posible surgimiento de clones resistentes o inclusive dependientes de NO. La resistencia al NO podría estar mediada por la inactivación de p53 y por la regulación negativa de la ciclooxigenasa-2 y de la proteína de shock térmico-70 (Jadeski y col., 2002).

La apoptosis es un importante factor biológico que se da en bajo grado en los linfomas, siendo el NO en algunos casos, capaz de prevenir o promover dicho proceso. En varios tumores malignos se ha demostrado la expresión de NOS y se ha asociado el incremento en la síntesis de NO con una alta tasa proliferativa. En tal sentido, Mendes y col., (2001) han encontrado en células del linfoma B no-Hodgkin NHL, la expresión de las isoenzimas neuronal e inducible de NOS. Por otro lado, Reveneau y col. (1999), han descrito que una alta actividad de iNOS inducida por el tratamiento con citoquinas en células cancerosas de pulmón humanas, MCF-7, llevó a la inhibición de la proliferación celular.

El NO producido por macrófagos a través de la iNOS, actúa como un mediador de los efectos citostáticos y citotóxicos del mismo (Reveneau y col., 1999), sin embargo la neovascularización, un paso esencial para la progresión tumoral y el desarrollo de metástasis, puede ser modulada por la presencia de macrófagos en el microambiente tumoral. Así, Davel y col. (2002), han descrito que los macrófagos peritoneales de animales portadores de tumores LMM3 potenciaron *in vivo* la angiogénesis y el crecimiento tumoral por la acción de la NOS.

Oates y Gilkeson (2004) han descrito en un modelo murino de lupus eritematoso sistémico con expresión defectiva del receptor Fas, la apoptosis espontánea de linfocitos en el bazo, provocada por la sobreproducción de NO. Ensayos de administración *in vitro* de NO mostraron una reducción en la actividad de PKC y la inducción de la apoptosis.

### 2.5 Asociación entre las actividades de PKC y NOS

Numerosas evidencias señalan la existencia de una estrecha relación entre las actividades de PKC y NOS hallada en distintos tipos celulares incluyendo células tumorales (Hirose y col., 2001; Sodhi y Biswas, 2002; Poljakovic y col., 2003). Así,

## 2. INTRODUCCION

Dixit y col. (2003), encontraron en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) que la estimulación por leptina induce la secreción de la hormona de crecimiento por un mecanismo que involucra la activación de PKC y NOS.

Paul y col. (1997) han descrito en macrófagos murinos RAW 264.7, la estimulación de la expresión de iNOS por LPS solo o en combinación con IFN $\gamma$ . Dicha inducción fue inhibida un 20-30% por el tratamiento crónico con PMA que regula negativamente la expresión de las isoformas de PKC  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\epsilon$  en éstas células, demostrando que la activación de determinadas isoenzimas de PKC es necesaria para la inducción de iNOS. En células mesangiales de rata se ha descrito un aumento de iNOS relacionado con la sobreexpresión de la isoforma  $\zeta$  de PKC (Miller y col., 1997).

La PKC $\epsilon$  ha sido involucrada en la activación de macrófagos durante la defensa contra infecciones bacterianas. Los macrófagos de animales *knockout* para PKC $\epsilon$  presentaban una respuesta atenuada a LPS e IFN $\gamma$ , caracterizada por la reducción de la producción de NO, TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y mostraron una disminución en la activación de la quinasa de I $\kappa$ B y en la translocación nuclear del factor NF $\kappa$ B, lo cual provocó deficiencias en la inducción de iNOS (Castrillo y col., 2001).

En macrófagos, la expresión del ARNm de iNOS inducida por LPS o citoquinas es dependiente de la activación de NF $\kappa$ -B y de AP-1, lo cual es regulado en parte por PKC. El LPS regula negativamente a la isoenzima PKC $\delta$ , la cual reprime la expresión de iNOS, e induce la regulación positiva de las MEKK/MAP quinasas, la actividad oxidasa de NADPH y la formación de radicales libres de oxígeno necesarios para la activación de NF $\kappa$ -B y AP-1. Greenberg y col. (1998) han demostrado que el etanol inhibe la inducción de iNOS por LPS previniendo la disminución de PKC $\delta$  por interferir con el proceso de fosforilación involucrado en la activación de NF- $\kappa$ B y AP-1.

### 2.6 El rol del factor de transcripción NF- $\kappa$ B

El factor nuclear de transcripción kappa B (NF- $\kappa$ B) fue identificado en 1986 como un factor nuclear que regulaba la expresión del gen de la cadena liviana ( $\kappa$ ) de las inmunoglobulinas. En la actualidad se conoce que numerosos genes se encuentran bajo su control, como ser proteínas asociadas a procesos proliferativos, inhibidores de la apoptosis, mediadores de la respuesta inmune, citoquinas, moléculas de adhesión, etc.

## 2. INTRODUCCION

Diversos estímulos pueden activar al NF- $\kappa$ B, entre ellos, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , LPS, infecciones virales, condiciones de estrés, etc.

El NF- $\kappa$ B comprende un grupo de proteínas diméricas, las cuales están compuestas por varias combinaciones de miembros de la familia de proteínas NF- $\kappa$ B/Rel. En mamíferos hay al menos 5 miembros de esta familia de proteínas a saber, NF- $\kappa$ B1 (p50 y su precursor p105), NF- $\kappa$ B2 (p52 y su precursor p100), c-Rel, RelA (p65) y RelB.

Todos los miembros de la familia NF- $\kappa$ B/Rel contienen un dominio de homología Rel responsable de la dimerización, de la localización nuclear y de la unión al ADN.

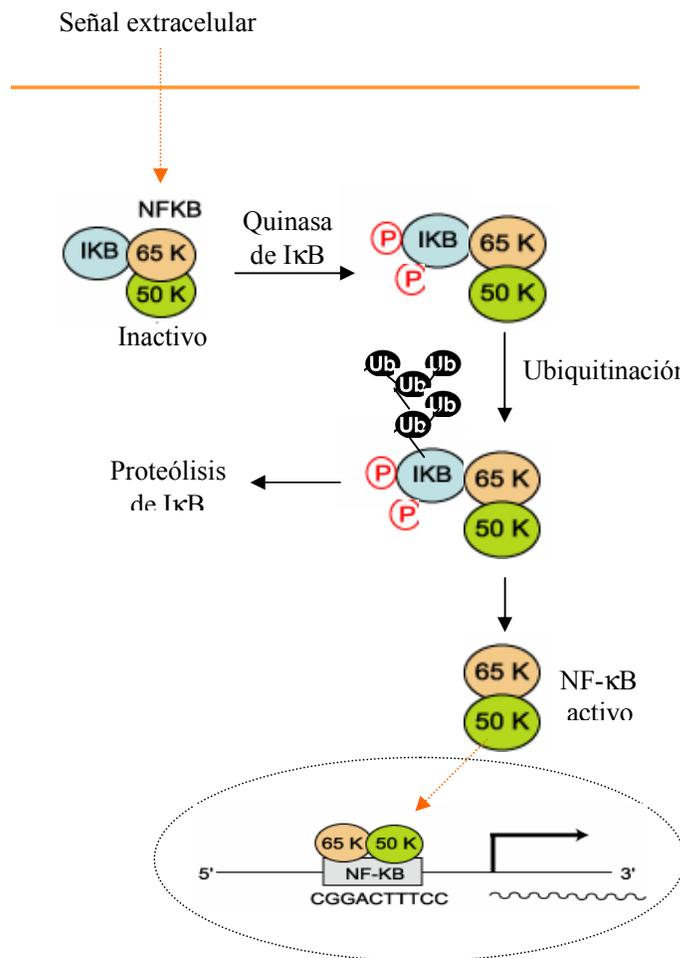
Los miembros de la familia NF- $\kappa$ B son sintetizados como productos precursores (p105, NF- $\kappa$ B1 y p100, NF- $\kappa$ B2) y luego procesados a la forma madura p50 (NF- $\kappa$ B1) y p52 (NF- $\kappa$ B2). Estas proteínas contribuyen a la especificidad de unión al ADN y a la regulación transcripcional, a pesar de que ellas por sí mismas no presentan dominios de activación transcripcional. Las proteínas RelA (p65), RelB y c-Rel presentan regiones de activación transcripcional y sólo los dímeros que contienen estas proteínas son potenciales activadores de la transcripción. Homodímeros compuestos por las subunidades de NF- $\kappa$ B1 (p50) no pueden activar la transcripción e incluso podrían actuar como represores dado que se unen al ADN. El dímero más abundante en mamíferos es p50/p65.

Bajo condiciones de quiescencia celular, los miembros de la familia NF- $\kappa$ B/Rel son secuestrados en el citoplasma en un estado inactivo a través de la interacción con miembros de la familia I $\kappa$ B, (I $\kappa$ B- $\alpha$  e I $\kappa$ B- $\beta$ , I $\kappa$ B- $\gamma$ , I $\kappa$ B- $\epsilon$ ), Bcl-3 y de los precursores de NF- $\kappa$ B, p105 y p100. Dicha interacción enmascara la secuencia de localización nuclear, lo cual impide la translocación del NF- $\kappa$ B al núcleo. El evento de translocación ocurre cuando el NF- $\kappa$ B/Rel se libera de su inhibidor I $\kappa$ B. Para ello I $\kappa$ B- $\alpha$  debe ser fosforilado por el complejo quinasa IKK en los residuos serina 32 y 36, fosforilación que provoca que el inhibidor se poliubiquitine y sea degradado en el proteosoma 26S. Los eventos de señalización que conducen a la activación del factor NF- $\kappa$ B se encuentran indicados en el **Esquema 6**.

La regulación de la transcripción del NF- $\kappa$ B por I $\kappa$ B provee un mecanismo para limitar su propia actividad (Rabson y Weissmann, 2005). Los caminos de señalización del NF- $\kappa$ B cumplen un rol crítico en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos. La inapropiada regulación de la actividad del NF- $\kappa$ B puede conducir a enfermedades

## 2. INTRODUCCION

neurodegenerativas, cáncer, artritis, asma, y enfermedades inflamatorias. El NF- $\kappa$ B es capaz de promover la supervivencia celular a través de la inducción de genes cuyos productos inhiben a los componentes de la maquinaria apoptótica en células normales y cancerosas. Particularmente, en células linfocíticas la inapropiada activación del NF- $\kappa$ B resulta en la continua estimulación de la proliferación e inhibición de la muerte celular (Rabson y Weissmann, 2005). En varios tejidos sin embargo se ha descrito también su participación como inductor de procesos apoptóticos (Perkins, 2004; Aggarwal y Takada, 2005).



**Esquema 6:** El factor NF- $\kappa$ B en estado inactivo se encuentra retenido en el citoplasma por su inhibidor I $\kappa$ B, el cual al ser fosforilado, se poliubiquitina y luego es degradado liberando al NF- $\kappa$ B. De esta forma el factor de transcripción puede translocar al núcleo y ejercer su función sobre genes específicos.

### 2.7 Hormonas tiroideas

#### 2.7.1 Síntesis y regulación

La síntesis y la secreción de HTs está regulada por un sistema de retroalimentación negativo que involucra al hipotálamo, la pituitaria y la glándula tiroidea. La hormona liberadora de tirotrófina (TRH) es un tripéptido sintetizado por el hipotálamo que induce en células de la pituitaria la secreción de la hormona tirotrófina (TSH). Las secreciones de TRH y TSH son reguladas negativamente por HTs. La TSH unida a su receptor específico estimula a una variedad de genes tiroideos incluyendo el simporter  $\text{Na}^+ / \text{I}^-$  (NIS), la tiroglobulina (Tg) y la peroxidasa tiroidea (TPO), los productos de estos genes promueven la síntesis de THs.

Las HTs, 3,3',5-Triiodo-L-Tironina (T3) y L-Tiroxina (T4) son sintetizadas en la glándula tiroidea. El yodo es activamente transportado y concentrado en la tiroides por el NIS, oxidado por la TPO e incorporado al residuo tirosina de la Tg. Esta iodación conduce a especies mono y di-iodadas que son acopladas enzimáticamente para formar T4 y T3. La mayor liberación de HTs se da en la forma de T4, la concentración de T4 en suero es 40 veces mayor que la de T3 (90 vs 2 nM), pero sólo el 0.03% de T4 y 0.3% de T3 en suero está como forma libre, siendo éstas las que pueden entrar en la célula y ejercer los efectos biológicos. El resto de las HTs en suero se encuentran unidas a proteínas transportadoras.

El camino principal para la producción de T3 es a través de la 5'-deiodinación del anillo externo de la T4 por deiodinasas. La deiodinasa de tipo I se encuentra en tejidos periféricos como el hígado y el riñón y es responsable de la conversión de la mayor parte de T4 a T3 en circulación. La deiodinasa de tipo II se encuentra en cerebro, pituitaria y tejido adiposo y tiene como función la conversión de T4 a T3 para uso intracelular (Yen, 2001).

#### 2.7.2 Mecanismos de acción de las hormonas tiroideas

Las HTs ejercen un importante rol en la diferenciación, el crecimiento y el metabolismo (Yen, 2001). Las primeras evidencias acerca de la función de las HTs (Tata y col., 1960) sugerían que estas podrían estar involucradas en la regulación transcripcional de genes.

## 2. INTRODUCCION

El modelo clásico de acción genómica de las HTs involucra la unión de éstas a receptores nucleares (TRs). Dichos TRs, considerados como factores de transcripción regulables por ligando, unen HTs con alta afinidad y especificidad provocando un cambio conformacional que resulta en el intercambio de cofactores y proteínas accesorias. En el núcleo, el complejo HT-TR se une al ADN en secuencias denominadas elementos de respuesta a THs (TRE) existentes en las regiones promotoras de genes específicos. La unión de estos complejos provoca la modificación de la cromatina y la regulación de la transcripción genética (Aranda y Pascual, 2001; Yen, 2001). La formación del complejo HT-TR-TRE es el primer paso crítico para la regulación positiva o negativa de dichos genes con la consecuente regulación de la síntesis proteica. Estos efectos genómicos generan respuestas biológicas que llevan desde horas a días (Yen, 2001).

El estado de fosforilación del TR podría modular positivamente la unión del complejo HT-TR a las secuencias TRE del ADN. Varias evidencias experimentales indican que las HTs podrían inducir la fosforilación de su receptor en sitios específicos. En tal sentido, Davis y col. (2000) han demostrado que la T4 promueve la asociación entre la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) y el TR, causando su fosforilación en residuos de serina específicos.

Leitman y col., (1996) han encontrado que la transcripción mediada por T3 es potenciada por la estimulación de las vías de señalización a través de PKA, sugiriendo una modulación de la actividad transcripcional del TR a través de múltiples caminos que involucran a quinasas.

Si bien la mayoría de los efectos de la T3 están mediados por la acción de su receptor sobre la transcripción de genes específicos, en la actualidad se conoce que las HTs ejercen además acciones rápidas, es decir que se producen en solo pocos minutos. Dichos efectos no son afectados por inhibidores de la transcripción y traducción, lo cual es incompatible con un modelo de acción genómica (Losel y Wehling, 2003, Bassett y col., 2003). Las acciones no genómicas de las HTs han sido descritas en numerosos tejidos y tipos celulares, incluyendo tejido adiposo, corazón y glándula pituitaria. Los sitios de acción no genómica de las HTs han sido localizados en la membrana plasmática, en el citoplasma y en organelas celulares. Las acciones no genómicas incluyen la regulación de canales iónicos, la fosforilación oxidativa, la transcripción de genes mitocondriales, la activación de la fosfolipasa C (PLC) que conduce a la generación de segundos mensajeros intracelulares, como así también, el aumento de

## 2. INTRODUCCION

$\text{Ca}^{2+}$  intracelular y de AMP cíclico y la activación de la cascada de señalización de proteínas quinasas (Bassett y col., 2003, Losel y Wehling, 2003).

Las HTs pueden ingresar a la célula y atravesar la membrana nuclear por difusión pasiva dada sus características lipofílicas. Sin embargo existen evidencias de la existencia de transportes facilitados y sitios de unión de alta afinidad por HTs en la membrana plasmática de diferentes células. Así, Friesema y col. (1999) han reportado que el ingreso de las HTs y sus metabolitos a hepatocitos estaría mediado por las proteínas transportadoras de aniones orgánicos Ntcp y oatp1. Asimismo, varias evidencias sugieren que las acciones no genómicas de HTs, podrían ser mediadas por isoformas de receptores nucleares clásicos asociados a la membrana plasmática o bien por otros tipos de receptores de membrana de alta afinidad para HTs (Bassett y col., 2003). Davis y col., (2006) han postulado la existencia de efectos genómicos y no genómicos de las HTs que actuarían en forma cooperativa para la activación de la cascada de las MAPK. La T4 parece ejercer acciones que son independientes de su entrada a la célula y postulan a la integrina  $\alpha\text{V}\beta3$ , presente en la membrana plasmática, como la molécula receptora de T4 a través de la cual se transducen señales que pueden modular el tráfico intracelular de proteínas y la actividad de los canales iónicos en la membrana plasmática.

### 2.7.3 Interacción entre el sistema inmune y el eje tiroideo

Una serie de evidencias experimentales señalan que las hormonas tiroideas son capaces de ejercer el control neuroendócrino de la función linfocitaria. Los primeros hallazgos sobre la modulación de la función inmune por HTs se basaron principalmente en la existencia de receptores para dichas hormonas en linfocitos normales y células linfoblásticas y en las alteraciones del sistema inmune encontradas durante el curso de fluctuaciones fisiológicas y patológicas de HTs (Fabris y col., 1995).

También se ha demostrado la existencia de una comunicación bidireccional entre el sistema inmune y el eje tiroideo. En tal sentido, Klecha y col. (2000) han comprobado que los niveles de HTs se incrementan luego de una inmunización alogénea. Asimismo, el tratamiento *in vivo* con T4 aumenta el título de aloanticuerpos durante los primeros estadios de la aloinmunización. Contrariamente la disminución de los niveles

## 2. INTRODUCCION

de HTs por el tratamiento con el agente anti-tiroideo propiltiouracilo, modula negativamente la respuesta aloimmune humoral y celular.

Están claramente descritos los efectos del hipotiroidismo sobre el sistema inmunológico. Así, se ha descrito que en condiciones de hipotiroidismo experimental se produce la involución del bazo y de los nódulos linfáticos, así como también la depresión de la respuesta inmune humoral y celular (Chatterjee y Chandel, 1983; Ohashi y Itoh, 1994; Klecha y col., 2000). También, Schoenfeld y col. (1995) han descrito en humanos con hipotiroidismo severo la supresión de la respuesta inmune celular, que es revertida por la terapia de reemplazo hormonal.

Sin embargo, existen resultados contradictorios sobre los efectos del hipertiroidismo en la inmunidad humoral y celular. Ha sido descrito tanto el incremento como la supresión de la respuesta inmune humoral primaria (Fabris y col., 1995; Klecha y col., 2000) y de la proliferación linfocitaria T y B (Chatterjee y Chandel, 1983; Klecha y col., 2000). Estos datos contradictorios podrían reflejar diferencias entre las especies estudiadas, del tratamiento hormonal realizado y/o de los niveles hormonales de cada componente de eje hipotálamo-pituitaria-tiroides. De hecho en estos estudio mencionados no se ha realizado un estudio integrativo que relacione los niveles de los mencionados componentes con los efectos sobre la funcionalidad linfocitaria. Recientemente, Klecha y col (2006) trabajando con modelos murinos de hipo e hipertiroidismo realizaron un estudio completo de todas las hormonas del eje y demostraron la modulación positiva de las HTs sobre la proliferación celular inducida por mitógenos, relacionada con la actividad de PKC.

Adicionalmente, el análisis del desarrollo y la función linfocitaria en ratones con defectos genéticos en la expresión de HTs o de sus receptores, sugieren que estas hormonas no serían indispensables para el desarrollo de una respuesta inmune normal. Foster y col. (2000) han demostrado que ratones con defectos en genes que codifican para varias hormonas anabólicas (incluyendo las HTs) o en ratones *knockout* para dichas hormonas presentan una respuesta inmune humoral y celular normal.

Sin embargo, varias evidencias confirman la hipótesis de que las HTs están involucradas en el mantenimiento de la homeóstasis del sistema inmune en respuesta a cambios ambientales o a la inmunosupresión mediada por el estrés (Davis, 1998; Dorshkind y Horseman, 2000 y 2001).

Además, a pesar de que los estudios realizados en ratones *knockout* han demostrado que la deficiencia de HTs no es incompatible con la vida (aunque todos estos animales requieren ser mantenidos en flujos laminares, en condiciones de esterilidad microbiana), algunos efectos sobre los tejidos periféricos fueron más leves que los observados en el hipotiroidismo congénito (Yen, 2001). Estas evidencias hacen que resulte indispensable estudiar el efecto directo que tiene las HTs sobre la actividad de las células que participan en las respuestas inmunológicas.

### 2.7.4 Participación del eje tiroideo en procesos neoplásicos

Existe un gran número de evidencias que sugieren la modulación por hormonas tiroideas de múltiples mecanismos dependientes de procesos neoplásicos (Hercbergs, 1996).

Se han sugerido alteraciones en el eje tiroideo durante el curso de enfermedades neoplásicas, pero también se ha analizado la acción de las hormonas tiroideas en el desarrollo o crecimiento tumoral. Los resultados hasta la fecha no son concluyentes. En este sentido, Franklyn y col. (1999) han demostrado una menor o mayor incidencia de cáncer en pacientes hipertiroideos o hipotiroideos respectivamente, respecto de los valores correspondientes a sujetos eutiroideos, probablemente relacionada con el aumento de la función inmunológica del huésped ejercido por las HTs, las que facilitarían la resistencia tumoral. Pero también se ha descrito una menor incidencia y mortalidad en pacientes tratados con radioiodo por su hipertiroidismo.

Por otra parte, con respecto al crecimiento tumoral, se ha visto que este se exagera en individuos hipertiroideos mientras que en los hipotiroideos se enlentece. Así por ejemplo, en ratones hipotiroideos se inhibió el crecimiento local y metastásico de líneas de hepatomas, mientras que el estado hipertiroideo acelera el crecimiento del hepatoma de Morris en ratas y el de dos fibrosarcomas en ratón (Hercbergs, 1996). También se comprobó que el crecimiento de tumores humanos de próstata y pulmonar está enlentecido en ratones atímicos o tratados con propiltiouracilo. Este efecto fue revertido por el tratamiento con T3 (Theodossiou y col., 1999).

Se ha demostrado *in vitro*, un incremento del crecimiento de una línea celular leucémica por acción de T3 (Brtko y col., 1992). Sin embargo, el tratamiento crónico con T4 indujo la apoptosis de linfocitos normales y tumorales (Mihara y col., 1999).

## 2. INTRODUCCION

En concordancia con esto, varias evidencias indican que el cáncer puede ocasionalmente permanecer en estadio “dormido” por tiempos prolongados y que la normalización del estado tiroideo mediante la terapia de reemplazo hormonal conduce a la reactivación de la enfermedad (Theodossiou y Schwarzenberge, 2000). Asimismo, el hipotiroidismo clínico ha sido asociado con una mayor sobrevida en varios tipos de procesos malignos aunque los mecanismos involucrados son desconocidos (Toms y col., 1998). Herbergs (1999) ha sugerido que el estado hipotiroideo, incrementaría la predisposición de los neoplasmas a la regresión, tanto espontánea como inducida por terapia, a través de un mecanismo apoptótico. Otro posible mecanismo implicado en los efectos inhibitorios del hipotiroidismo sobre el crecimiento tumoral, sería el arresto celular en G1 causado por la inducción de p21, conocido inhibidor de ciclina quinasa (Toms y col., 1998). En base a esto, se ha propuesto recientemente como coadyuvante, el uso del propiltiouracilo en pacientes oncológicos, asociado a las terapias clásicas (Theodossiou y Schwarzenberger, 2000).

Con respecto a las alteraciones inducidas en el eje tiroideo durante el curso de la enfermedad neoplásica, se ha descrito la disminución de los niveles séricos de hormonas tiroideas en animales singeneicos transplantados con linfomas (Besedovsky y col., 1989). También existe una correlación positiva entre el cáncer de mama y el desarrollo de alteraciones tiroideas de origen autoinmune (Giani y col., 1996).

Teniendo en cuenta estas evidencias, se puede deducir la existencia de un fenómeno bidireccional en el que los niveles de hormonas tiroideas pueden afectar el balance entre la proliferación y la muerte de las células tumorales y por otro lado, el tumor puede afectar la función tiroidea.

### **3. HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**

### **3. HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**

#### **3.1 HIPOTESIS DE TRABAJO**

Es importante el control que ejerce el sistema neuroendocrino sobre la funcionalidad linfocitaria y su potencial implicancia en estados patológicos. Las hormonas tiroideas, por su parte, ejercen importantes efectos sobre el desarrollo, el crecimiento y el metabolismo y son capaces de regular las respuestas inmunológicas. La hipótesis de trabajo de esta Tesis es que las hormonas tiroideas regulan el balance entre la proliferación y la apoptosis celular de linfocitos T normales y tumorales, involucrando diferentes señales de transducción que incluirían la activación de isoenzimas específicas de PKC y de NOS, señales cruciales en estos eventos celulares.

#### **3.2 OBJETIVOS GENERALES**

Para la validación de la hipótesis propuesta, este trabajo tiene como objetivo general:

- 3.2.1 Analizar comparativamente en linfocitos T normales y células del linfoma T murino BW 5147 (BW) los eventos bioquímicos involucrados en la proliferación linfocitaria, estudiando en particular la participación de las isoenzimas de PKC y de NOS, a fin de establecer diferencias en las cascadas de señalización implicadas en la modulación de la respuesta proliferativa de ambos tipos celulares y el grado de participación en el establecimiento y/o evolución de los procesos tumorales.
- 3.2.2 Estudiar la acción de las hormonas tiroideas sobre la modulación de las respuestas proliferativa y apoptótica en los tipos celulares mencionados, analizando su efecto sobre la actividad y expresión de las enzimas implicadas en los caminos de señalización participantes.

### 3. HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

#### 3.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Los objetivos específicos propuestos son los siguientes:

3.3.1 Caracterizar los eventos bioquímicos implicados en la proliferación de linfocitos T normales y de células del linfoma T murino BW, para lo cual se procederá a:

3.3.1.1 Estudiar la cinética de proliferación de linfocitos T normales y de células de la línea BW 5147.

3.3.1.2 Estudiar la actividad enzimática de PKC y su participación en las respuestas proliferativas de ambos tipos celulares.

3.3.1.3 Analizar la expresión proteica y genómica de isoenzimas de PKC en linfocitos T normales y en células BW 5147

3.3.1.4 Evaluar la actividad enzimática de NOS y su participación en la proliferación de ambos tipos celulares.

3.3.1.5 Analizar la expresión proteica y genómica de las isoformas de NOS

3.3.1.6 Estudiar la interrelación entre la actividad enzimática de PKC y de NOS, a fin de establecer si participan de la misma cascada de señalización.

3.3.2 Estudiar la modulación ejercida por las HTs sobre la respuesta proliferativa de linfocitos T normales y células BW, así como también sobre los intermediarios enzimáticos involucrados, para lo cuál se propone:

3.3.2.1 Evaluar el efecto de las HTs sobre la proliferación y/o apoptosis de células T normales y tumorales a diferentes tiempos de cultivo.

3.3.2.2 Evaluar la participación de las actividades enzimáticas de PKC y NOS en la modulación de la respuesta proliferativa mediada por HTs y analizar el efecto de dichas hormonas sobre ambas actividades enzimáticas.

3.3.2.3 Analizar el efecto de las HTs sobre el patrón de expresión proteico y genómico de isoenzimas de PKC y NOS a diferentes tiempos de cultivo.

3.3.2.4 Evaluar la participación de intermediarios enzimáticos involucrados en la cascada de señalización activada por HTs que actúan río arriba o río abajo de PKC y NOS.

## **4. MATERIALES Y METODOS**

## 4. MATERIALES Y METODOS

### 4.1 Suspensiones celulares y condiciones de cultivo

La línea celular murina BW5147, gentilmente donada por la Dra. A. Schimpl (Institute für Virologie und Immunobiologie, Univesitat Würzburg, Alemania), es un linfoma T, CD3<sup>+</sup> que expresa el receptor de células T  $\alpha\beta$ . Estos marcadores de superficie fueron testeados rutinariamente por citometría de flujo con los anticuerpos correspondientes. Las células fueron cultivadas en una concentración óptima de  $1-5 \times 10^5$  células/ml en medio RPMI 1640 (GIBCO BRL) suplementado con 10% de SFB, 2mM de glutamina, 100  $\mu\text{g/ml}$  de penicilina y 150  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomina. El medio de cultivo fue renovado diariamente una vez que las células alcanzaron el crecimiento exponencial. Cuando se indica en los resultados, también se emplearon células BW 5147 sincronizadas o quiescentes por deprivación del SFB en el medio de cultivo durante 24 hs.

Para las células normales, se obtuvieron asépticamente suspensiones celulares a partir de ganglios linfáticos de ratones hembra de la cepa BALB/c (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA). Cabe señalar que los animales fueron utilizados entre los 60 a 90 días de edad. Brevemente, los órganos linfáticos fueron removidos y disgregados a través de un filtro de metal de 1mm. Las células fueron lavadas y resuspendidas en RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM glutamina y antibióticos. Para la obtención de poblaciones enriquecidas de células T, las suspensiones celulares fueron pasadas por columnas de lana de nylon según protocolos descritos previamente (Cazaux y col., 1995). Mediante este procedimiento se obtuvo una pureza mayor al 97%, chequeada por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos anti-CD3. La viabilidad celular fue estimada mediante el colorante de exclusión Azul Tripán. Los linfocitos T normales ( $1 \times 10^6$  células/ml) fueron estimulados *in vitro* con Concanavalina A (Con A, SIGMA Chemical Co) 2 $\mu\text{g/ml}$ , una lectina mitogénica selectiva para poblaciones T, en medio RPMI 1640 suplementado como fuera indicado anteriormente.

Ambos tipos celulares fueron cultivados en microplacas de 96 pocillos de fondo plano (Nunc<sup>TM</sup>) o fueron mantenidos como macrocultivos en frascos de cultivo T-25 o T-75 (Corning, NY) para los ensayos enzimáticos, para la obtención de extractos celulares para los ensayos de Western blot o para la extracción de ARN.

## 4. MATERIALES Y METODOS

En ambos casos las células fueron cultivadas por diferentes tiempos en presencia o ausencia de hormonas tiroideas, 3,3',5-Triiodo-L-Tironina (T3) y L-Tiroxina T4 (SIGMA Chemical Co) las que fueron adicionadas al comienzo del cultivo en los experimentos indicados

Para evitar la influencia de las hormonas presentes en el SFB también se realizaron cultivos en un medio libre de suero pero enriquecido en su contenido proteico, a saber, el medio HyQ® CCM1 (HyQ, HyClone Co) frecuentemente empleado para el cultivo de hibridomas y apto también para el cultivo de linfomas. Para el cultivo de la línea BW, las células fueron adaptadas al medio sin suero por el método de inmersión, mientras que en el caso de la estimulación mitogénica de linfocitos T normales, las células purificadas fueron resuspendidas directamente en este medio y se siguieron los pasos ya descritos para el medio de cultivo suplementado con SFB. Los niveles de T3 y T4 en el SFB fueron determinados por un kit comercial de RIA (Diagnostic Products Corporation) y dieron los valores de  $117.3 \pm 12.4$  ng/dl y  $8.0 \pm 1.0$  µg/dl, respectivamente.

Para la evaluación de la acción de diversos inhibidores farmacológicos (ver detalle de los mismos en el ítem 4.3) éstos fueron agregados al comienzo del cultivo celular y 90 minutos previo a la adición de las hormonas tiroideas.

### 4.1 Ensayos de proliferación

La proliferación fue evaluada en microplacas de cultivo de 96 pocillos y también se realizaron controles en alícuotas de 0.2 ml de los macrocultivos establecidos para los ensayos enzimáticos. Las células fueron pulsadas con [<sup>3</sup>H]-timidina ([<sup>3</sup>H]-TdR, NEN, 20 Ci/mmol) durante las últimas 6 horas de incubación de los cultivos (Cazaux y col., 1995). Los resultados se expresaron como los valores de dpm obtenidos en las diferentes condiciones experimentales a los que se les sustrajo el correspondiente valor de dpm control obtenido con las células BW sincronizadas. El porcentaje de inhibición (% inh) para los cultivos realizados en presencia de inhibidores fue calculado como:

$$\% \text{ inh} = \left[ 1 - \frac{\text{dpm cel BW en presencia del inhibidor} - \text{dpm control}}{\text{dpm cel BW en ausencia del inhibidor} - \text{dpm control}} \right] \times 100$$

## 4. MATERIALES Y METODOS

Para los linfocitos T normales estimulados con Con A los cultivos fueron pulsados con [<sup>3</sup>H]-TdR como se indicó para las BW por un periodo de 16 horas y se emplearon como controles cultivos de células no estimuladas. La acción de los inhibidores sobre las células T estimuladas con Con A fue evaluada como se indicó para las células BW.

### 4.3 Inhibidores empleados

Las siguientes drogas fueron usadas en los cultivos celulares a las concentraciones finales indicadas en la sección de resultados: los inhibidores de PKC, a saber la staurosporina y el inhibidor selectivo (bisindolil-maleimida) GF-109203X; el bloqueante de fosfolipasa C (PLC), 2-nitro-4-carboxifenil-N,N-difenilcarbamato (NCDC); el inhibidor de tirosina-quinasa (TPK), genisteína; el bloqueante irreversible de NOS y de oxidasas de NADPH, el difenileneiodonio (DPI); el bloqueante de Ca<sup>2+</sup> intracelular BAPTA-AM y el extracelular verapamil y el inhibidor de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3-K), la wortmanina. Todos estos inhibidores fueron adquiridos en SIGMA Chemical Co y fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO).

También se emplearon: el inhibidor no selectivo y competitivo de NOS N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina monoacetato (L-NMMA) (RBI, USA); los inhibidores selectivos de iNOS, la aminoguanidina (AG) y la S-metilisotiourea (SMT); el inhibidor de arginasas L-valina; el pseudosustrato permeable miristoilado de PKC $\zeta$  (Ps-Myr PKC $\zeta$ ); el bloqueante de la actividad del NF- $\kappa$ B, la sulfasalazina y el bloqueante extracelular de Ca<sup>2+</sup> verapamil (todos ellos de SIGMA Chemical Co) los que fueron disueltos en buffer fosfato salino (PBS). Todas las soluciones utilizadas fueron preparadas en el momento de usar. Las drogas disueltas en DMSO fueron diluidas 1/1000 o más en medio RPMI 1640 para alcanzar las concentraciones indicadas en Resultados.

### 4.4 Determinación de la actividad enzimática de PKC

Las células BW sincronizadas ( $0.5 \times 10^7$  células/muestra) fueron re-cultivadas por diferentes tiempos en medio rico con SFB, en ausencia o presencia de las HTs y fueron inmediatamente congeladas en N<sub>2</sub> líquido. Las células T normales en reposo o

## 4. MATERIALES Y METODOS

estimuladas con Con A ( $1 \times 10^7$  células/muestra) fueron incubadas solas o en presencia de HTs por los tiempos indicados y procesadas como las células tumorales. La PKC fue purificada de los extractos totales o de las fracciones citosólica y particulada como fuera descrito previamente (Genaro y Boscá, 1993) y su actividad fue determinada a través de la fosforilación de histona H<sub>1</sub> (H1) en presencia del [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (NEN) con la consiguiente incorporación de <sup>32</sup>P a la misma. Las incubaciones fueron realizadas en un volumen final de 85  $\mu$ l a 30° C por 30 min. En la mezcla final, el ensayo contenía 25  $\mu$ M ATP (0.4  $\mu$ Ci), 10 mM acetato de Mg, 5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 50  $\mu$ g de histona H<sub>1</sub>, 20 mM HEPES, pH=7.5, 10  $\mu$ g/ml de vesículas de fosfatidilserina. Estas mediciones fueron realizadas en ausencia o presencia de 0.2 mM de CaCl<sub>2</sub>. La incorporación de [<sup>32</sup>P]-fosfato a la histona fue lineal hasta los 30 minutos. La reacción fue detenida por el agregado de 2 ml de ácido tricloroacético al 5% con 10 mM de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y luego de la filtración, la radioactividad retenida en filtros de fibra de vidrio Whatmann GF/C fue cuantificada en un contador de centelleo líquido. La actividad de PKC fue determinada luego de sustraer a la actividad total, la correspondiente a la incorporación de <sup>32</sup>P a la H1 en ausencia de Ca<sup>2+</sup> y fosfolípidos. Los datos fueron expresados como pmol de fosfato incorporado al sustrato por minuto y por 10<sup>7</sup> células (pmol/min x 10<sup>7</sup> cel).

En algunos experimentos también se empleó el sustrato selectivo de PKC, el MBP[4-14] (GIBCO BRL) (Yasuda y col., 1990) o alternativamente se utilizó el sistema de ensayo para medir actividad de PKC comercial (Amersham Pharmacia Biotech) de acuerdo a las recomendaciones de sus proveedores. En este último caso el contenido de PKC en las muestras fue calculado por interpolación de la velocidad de fosforilación (pmol/min) de las muestras, en una curva dosis-respuesta obtenida con PKC purificada de cerebro de rata. La velocidad de fosforilación tuvo un rango lineal hasta una concentración de PKC agregada de 10 ng/tubo.

### 4.5 Introducción intracelular de anticuerpos anti-PKC $\zeta$ en linfocitos T normales y tumorales.

El anticuerpo anti-PKC $\zeta$ , dirigido contra la región carboxi-terminal (GIBCO BRL o SIGMA Chemical Co.) fue introducido en células normales o tumorales después de su

## 4. MATERIALES Y METODOS

permeabilización con lisolecitina. Brevemente, las células BW o los linfocitos normales fueron equilibrados en medio conteniendo 7% de SFB por 24 h. Posteriormente fueron lavadas en un medio libre de suero y se les agregó 0.1 ml de glicerol en PBS a 37°C. Luego de 6 min en hielo, se les agregó 4 µl de una solución acuosa de 1 mg/ml de lisolecitina (SIGMA Chemical Co.) y se continuó la incubación por otros 5 minutos. Las células fueron luego colocadas a 37°C y se les añadió 0.1 ml de la dilución del anticuerpo. Después de 10 minutos adicionales a 37°C, se agregó 0.1 ml de medio conteniendo 21% de SFB para favorecer el cierre de los poros en las membranas, o sea para que las celulares vuelvan a sellarse. Las células fueron nuevamente llevadas a una concentración de 7% de SFB en el medio de cultivo y las incubaciones se continuaron por 72 h en presencia de Con A (2 µg/ml) para las células normales, o por 24 h para las células BW. Igual procedimiento fue realizado en aquellos ensayos en los cuales las células fueron tratadas con hormonas tiroideas. Células controles sin tratar con el anticuerpo fueron permeabilizadas con el mismo esquema y adicionalmente en algunos experimentos también se empleó la introducción de un anticuerpo no relevante, a saber el anti-PKCγ (SIGMA Chemical Co.) dado que esta isoenzima está ausente en las células linfocitarias estudiadas.

### 4.6 Ensayos de transfección transiente

El plásmido de expresión pHACE-PKC-DN gentilmente donado por el Dr. Jae-Won Soh (Herbert Irving Comprehensive Cancer Center, Columbia University, USA), contiene la secuencia codificante para la dominante negativa de PKCζ que presenta una mutación puntual en el sitio de unión del ATP, lo cual la hace inactiva. Este vector de expresión contiene además la secuencia codificante para la proteína fluorescente verde (GFP) y el gen de resistencia al antibiótico ampicilina. Todas las secuencias codificantes se encuentran bajo la actividad del promotor del citomegalovirus (CMV). El plásmido pHACE, carece de la secuencia codificante para la dominante negativa de PKCζ. El ADN plasmídico fue amplificado en E. Coli DH 5α en presencia del antibiótico Ampicilina. La extracción del plásmido fue realizada usando el kit QIAGEN Maxiprep kit (QIA-GEN, Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del mismo. El ADN fue

## 4. MATERIALES Y METODOS

purificado con fenol-cloroformo, luego precipitado con isopropanol y lavado con etanol al 70% y finalmente resuspendido en Tris 10mM (Ruybal y col., 2005).

Un total de  $1 \times 10^7$  células BW 5147 fueron transfectadas por electroporación con 50  $\mu\text{g}$  de cada ADN plasmídico, empleando 450 Volts, 960  $\mu\text{F}$  y  $\infty \Omega$  en un “BioRad Gene Pulser” (BioRad, Hercules, CA). Después del pulso eléctrico, las células fueron resuspendidas en 10 ml de RPMI 1640 suplementado con 10% SFB e incubadas a 37°C y 5%  $\text{CO}_2$ . La actividad del gen reportero fue ensayada a las 8 hs post-transfección por microscopía de fluorescencia (Ruybal y col., 2005).

### 4.7 Determinación de la actividad de NOS

La actividad de NOS fue medida por la producción de [ $^{14}\text{C}$ ]-citrulina a partir de [ $^{14}\text{C}$ ]-arginina (Hortelano y col., 1993). Las células obtenidas bajo las diferentes condiciones de cultivo fueron incubadas en 500  $\mu\text{l}$  de buffer Krebs, en presencia de [ $^{14}\text{C}$ ]-arginina (0.5  $\mu\text{Ci}$ ). Las mismas concentraciones de bloqueantes utilizadas en los cultivos fueron agregadas a las incubaciones con arginina radioactiva. Después de la incubación las células fueron disgregadas por sonicación en un medio conteniendo 10 mM EGTA, 0.1 mM de citrulina, 0.1 mM de ditiotreitól y 20 mM de HEPES, pH 7.5. Después de la centrifugación a 20000 x g por 10 minutos, los sobrenadantes fueron colectados y eluidos a través de columnas de resina de intercambio iónico Dowex AG 50WX-8 (Bio Rad) y la [ $^{14}\text{C}$ ]-citrulina eluida con 3 ml de agua fue cuantificada en un contador de centelleo líquido.

La especificidad de la actividad de NOS fue evaluada por ensayos realizados en presencia del bloqueante de NOS, el L-NMMA (500  $\mu\text{M}$ ) y el inhibidor de arginasas L-valina (50 mM).

### 4.8 Determinación de la concentración de nitritos

Para cuantificar la producción de óxido nítrico (NO), se midió la concentración de nitritos, producto final estable del NO en solución, empleando un ensayo colorimétrico basado en la reacción de Griess (Granger y col., 1990). Para ello,  $1 \times 10^6$  células BW

## 4. MATERIALES Y METODOS

fueron cultivadas en RPMI suplementado sin el indicador de pH rojo fenol, en placas de 24 pocillos, en presencia o ausencia de bloqueantes y/o de hormonas tiroideas. La producción de nitritos formada en 24 h, fue evaluada a partir de los sobrenadantes de estos cultivos. Para ello se agregaron 100  $\mu$ l de cada uno de estos sobrenadantes en placas de 96 pocillos y se les adicionaron 100  $\mu$ l de la solución de Griess que contiene 1% sulfanilamida, 0.1% cloruro de N-(1-naftil) etilenendiamina con 25% de HCl 0.4 M (concentración final). La curva de calibración fue construida usando standards de nitrito de sodio diluido en medio incoloro. Las densidades ópticas fueron medidas a 540 nm usando un lector de ELISA (Uniskan Labssystem).

### 4.9 Expresión proteica de isoenzimas de PKC y NOS. Ensayos de inmunoblot

Muestras de lisados de  $0.5-1 \times 10^7$  linfocitos T normales o células BW, incubados en ausencia o presencia de inhibidores y/o de HTs fueron obtenidos por disolución de los pellets celulares en buffer muestra (2% SDS, 10% (v/v) glicerol, 62.5 mM Tris-ClH, pH=6.8, 0.2% azul de bromofenol, 10 mM 2-Mercaptoetanol) a una concentración final de 10 mg/ml. La concentración proteica de los lisados fue cuantificada por el método de Bradford. Cantidades equivalentes de proteína fueron separadas electroforéticamente por SDS-PAGE en geles de 10% de poliacrilamida y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Los sitios de unión inespecíficos fueron bloqueados mediante la incubación de las membranas con buffer de bloqueo (5% leche descremada conteniendo 0.1% Tween-20 en 100 mM Tris-ClH, pH=7.5 y 0.9% NaCl) por 1 hora. Posteriormente las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas por 18 horas con anticuerpos específicos para las isoenzimas de PKC o de NOS, a saber, anti- PKC  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$  de SIGMA Chemical Co., anti-PKC  $\gamma$  y  $\delta$  de Pharmingen BRL, anti-PKC $\theta$ , anti-iNOS y anti- $\beta$ 2-microglobulina o anti-actina (como control de la cantidad de proteína sembrada) de Santa Cruz Biotechnologies Inc. En paralelo se realizaron controles de especificidad usando los correspondientes péptidos inmunogénicos para cada isoenzima con una relación de 2  $\mu$ g/ml de anticuerpo por cada 1  $\mu$ g/ml de péptido. Las membranas fueron entonces incubadas con un segundo anticuerpo monoclonal conjugado con fosfatasa alcalina (SIGMA Chemical Co.) por 1 hora. Las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas usando Nitroblue tetrazolium (NBT) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato

## 4. MATERIALES Y METODOS

(BCIP). Como marcador de peso molecular se empleó el Full Range Rainbow (Amersham Pharmacia). Los análisis densitométricos fueron realizados usando el software UN-SCAN-IT (versión 5.1, Silk Scientific Corporation) o el ImageJ (V 1.35p).

### 4.10 Expresión genómica de isoenzimas de PKC y NOS

#### 4.10.1 Extracción de ARN total

El ARN total fue extraído de los linfocitos T normales y células BW 5147 usando el kit Aquapure (Bio-Rad). Brevemente,  $1 \times 10^6$  células fueron centrifugadas a  $15000 \times g$  por 15 segundos y el pellet celular fue resuspendido en 300  $\mu$ l de solución de lisis de ARN. Posteriormente se agregaron 100  $\mu$ l de la solución precipitante de ADN y proteínas y, luego de centrifugar las muestras a  $15000 \times g$  por 3 minutos se obtuvo el ARN en el sobrenadante. El ARN así obtenido, fue precipitado con isopropanol y luego de varios lavados con etanol al 70% fue resuspendido en una solución de hidratación y congelado a  $-70^\circ\text{C}$ . Empleando este protocolo se obtuvieron entre 5-10  $\mu$ g de ARN total.

#### 4.10.2 Ensayo de transcripción reversa (RT)

La RT fue realizada usando el Omniscript kit (QIAGEN). Brevemente, 2  $\mu$ g de ARN total desnaturalizados a  $65^\circ\text{C}$  durante 5 minutos y agregados a un volumen final (20  $\mu$ l) que contiene 1  $\mu$ M de oligodeoxitimidina<sub>12-18</sub> (Biodynamics), 0.5 mM de dNTPs (Promega), 4 unidades de Omniscript Transcriptasa reversa y 2  $\mu$ l de buffer de RT 10 X provisto por el kit. La mezcla es incubada a  $37^\circ\text{C}$  por 1 hora. El ADN complementario (ADNc) así obtenido es congelado a  $-20^\circ\text{C}$  o usado para una posterior amplificación por PCR.

#### 4.10.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A partir de 2  $\mu$ g de ADN molde obtenido por RT se realizaron las amplificaciones por PCR utilizando 1.5 U de Taq polimerasa (Promega), 25 mM de dNTPs (Promega), 25 mM de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  y 20  $\mu$ M de los primers correspondientes (TIB Molbiol LLC) en un

#### 4. MATERIALES Y METODOS

ciclador térmico (Progene, Techne). La PCR semicuantitativa fue realizada utilizando 3 diluciones seriadas del templado de ADN (Omori y col., 2003).

En siguiente la tabla se describen los programas de amplificación utilizados:

Programa	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 min	1
Desnaturalización	95°C	1 min	32
Hibridización	62°C	1 min	
	55°C		
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	10 min	1
Enfriamiento	4°C	Indeterminado	1

La secuencia de los primers utilizados para las reacciones de PCR fueron obtenidas a partir de la bibliografía (Freire-Moar y col., 1991; Goren y col., 2000; Schmittgen and Zakrajsek, 2000) y fueron corroboradas usando el programa Gen Bank/Nucleotide. La  $\beta$ 2-microglobulina fue usada como control de la cantidad de templado de ADN sometido a PCR, dado que ésta no es modificable por el tratamiento con hormonas tiroideas.

Los primers utilizados para la amplificación de los ARN mensajeros específicos para cada isoenzima fueron los siguientes:

##### **PKC $\alpha$**

5'- TGAATCCTCAGTGGAATGAGT-3'

5'- GGTTGCTTTCTGTCTTCTGAA-3'

### **PKC $\zeta$**

5'- CGATGGGGTGGATGGGATCAAAA-3'

5'- GTGTTTCATGTCAGGGTTGTCCG-3'

### **iNOS**

5'-TCAGACATGGCTTGCCCCTGGA-3'

5'-TGCCCCAGTTTTTGATCCTCACA-3'

### **$\beta$ 2-microglobulina**

5'- GCTATCCAGAAAACCCCTCAA -3'

5'- CATGTCTCGATCCCAGTAGACGGT-3'

Dichos primers generan productos de 325, 680, 262 y 300 pares de bases de longitud para PKC $\alpha$ , PKC $\zeta$ , iNOS y  $\beta$ 2-microglobulina, respectivamente. Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa 2% y teñidos con bromuro de etidio para su visualización. Se utilizó el marcador de ADN de 100 pb provisto por Biodinamics.

#### **4.11 Cuantificación del número de divisiones celulares (Marcación con CFSE)**

Las células BW5147 fueron marcadas con diacetato de carboxifluoresceína succimidil ester (CFSE) usando el kit de marcado celular Vybrant<sup>TM</sup> CFDA SE (Molecular Probes) de acuerdo a las instrucciones del proveedor para células en suspensión. Brevemente, un total de  $1 \times 10^7$  células quiescentes (por cultivo en medio carente de SFB, tal como se indicó anteriormente) fueron lavadas dos veces con PBS y luego resuspendidas suavemente en PBS pre-calentado conteniendo el *probe* (5  $\mu$ M CFSE). Las células fueron luego incubadas por 15 min a 37°C, centrifugadas y resuspendidas en medio pre-calentado fresco. Se incubaron por otros 30 min para asegurar la completa modificación del *probe*, se lavaron nuevamente y se cultivaron en medio RPMI 1640 sin SFB en presencia o ausencia de T3 ( $10^{-9}$  M). A los tiempos indicados, se tomaron muestras de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células y se fijaron por 15 min a temperatura ambiente con 3.7% de formaldehído. Después de la fijación, las células fueron analizadas por citometría de flujo. El número de eventos versus la intensidad de fluorescencia para

## 4. MATERIALES Y METODOS

cada muestra se obtuvo usando el programa WinMDI 2.8. El número de divisiones celulares fue calculado como fuera descrito por Cooperman y col. (2004).

### 4.12 Activación de NF- $\kappa$ B

#### 4.12.1 Preparación de extractos citosólicos y nucleares

Las células BW sincronizadas ( $1 \times 10^7$  cél/ml) fueron estimuladas por 15 min con T4 ( $10^7$  M) o preincubadas con staurosporina (1nM) o con el Ps-Myr PKC $\zeta$  (100  $\mu$ M) y luego con T4. Posteriormente las células fueron centrifugadas y congeladas a  $-70^\circ\text{C}$ . Los pellets celulares fueron homogeneizados en 200  $\mu$ l de buffer A (10 mmol/l HEPES, pH=7.9, 1 mmol/l EDTA, 1 mmol/l EGTA, 10 mmol/l KCl, 1 mmol/l DTT, 0,5 mmol/l PMSF, 40  $\mu$ g/ml leupeptina, 2 $\mu$ g/ml TLCK, 5 mmol/l NaF, 1mmol/l NaVO $_4$ , 10 mmol/l Na $_2$ MoO $_4$ ), conteniendo 0.5% (v/v) de NP-40. Después de 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , los tubos fueron mezclados suavemente mediante vortex por 15 segundos, y los núcleos fueron colectados por centrifugación a 8000 x g por 15 minutos. Los sobrenadantes (extractos citosólicos) fueron congelados a  $-70^\circ\text{C}$ . Los pellets fueron resuspendidos en 50  $\mu$ l de buffer A suplementado con 20% (v/v) de glicerol y 0.4 M KCl, y mezclado por 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Las proteínas nucleares fueron obtenidas por centrifugación a 13000 x g por 15 minutos y los sobrenadantes (extractos nucleares) fueron fraccionados en alícuotas y congelados a  $-70^\circ\text{C}$  (Goren y col., 2004). La concentración de proteínas fue determinada usando el método de Bradford (Bio-Rad).

#### 4.12.2 Análisis por western blot de la presencia del I $\kappa$ B en citoplasma

Las muestras citosólicas obtenidas tal como se describió en el ítem 4.12.1, fueron calentadas en buffer Laemmli y, cantidades equivalentes de proteína (15  $\mu$ g), fueron separadas electroforéticamente por SDS-PAGE en geles de 10% de poliacrilamida. Los niveles de I $\kappa$ B- $\alpha$  y I $\kappa$ B- $\beta$  fueron determinados usando anticuerpos específicos (Santa Cruz Biotechnologies Inc). Se empleó un anticuerpo anti- $\beta$ -actina como control de la cantidad de proteína sembrada. Las bandas obtenidas fueron reveladas por quimioluminiscencia (ECL, Amersham). A fin de asegurar la linealidad de las

## 4. MATERIALES Y METODOS

intensidades de las bandas, se realizaron diferentes tiempos de exposición para cada blot. Las intensidades de las bandas fueron cuantificadas por densitometría tal como se describió anteriormente.

### 4.12.3 Ensayo de retardo en la movilidad electroforética (EMSA)

Se marcaron las secuencias de oligonucleótidos conteniendo la región consenso para NF- $\kappa$ B (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'), en el extremo final, con la enzima Klenow en presencia de 50  $\mu$ Ci de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP y de los otros dNTPs no marcados y en un volumen final de 50  $\mu$ l.

Para los ensayos de unión se utilizaron 5  $\mu$ g de proteínas nucleares obtenidas como se describió en el punto 4.12.1, las cuales fueron incubadas por 15 minutos a 4°C en presencia de la secuencia de oligonucleótidos marcada (5 x 10<sup>4</sup> dpm), 1  $\mu$ g de poly (dI-dC), 5% glicerol, 1 mmol/l EDTA, 10 mmol/l KCl, 5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/l DTT y 10 mmol/l Tris-HCl (pH 7.8), en un volumen final de 20  $\mu$ l. Los complejos ADN-proteína formados fueron sometidos a electroforesis en geles nativos de 6% de poliacrilamida con 0.5% de buffer Tris-borato-EDTA (Goren y col., 2004). Posteriormente los geles fueron secados y expuestos a -70°C en una película Kodak.

### 4.13 Cuantificación del grado de apoptosis

#### 4.13.1 Tinción con Hoechst

Las células BW 5147 fueron incubadas por diferentes tiempos en medio RPMI 1640 en ausencia o presencia de HTs. Posteriormente alícuotas de 10  $\mu$ l provenientes de éstos cultivos (a proxímadamente 1x10<sup>6</sup> células/ml) fueron fijadas en etanol y teñidas en oscuridad con el reactivo de Hoechst 33258 (0.5  $\mu$ g/ml, SIGMA Chemical Co) por 10 minutos y lavadas 3 veces con PBS. La morfología nuclear fue observada por microscopía de fluorescencia con un aumento de 1000 X.

## 4. MATERIALES Y METODOS

### 4.13.2 Determinación de la presencia de fragmentos de ADN apoptóticos (Técnica del “DNA ladder”)

El aislamiento de los fragmentos de ADN fue realizado en base al protocolo descrito por Herrmann y col. (1994). Brevemente,  $5 \times 10^6$  células BW 5147 fueron colectadas, lavadas en PBS y centrifugadas a 1600 x g. Los pellets celulares fueron tratados por 10 segundos con 50  $\mu$ l buffer de lisis (1% NP-40 en 20 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5). Luego de centrifugar por 5 minutos a 1600 x g, se colectaron los sobrenadantes y se repitió la extracción con igual cantidad de buffer de lisis. Los sobrenadantes fueron incubados 2 hs a 56°C en una solución de SDS 1% y RNasa A (concentración final 5  $\mu$ g/ $\mu$ l) y luego digeridos con proteinasa K (concentración final 2.5  $\mu$ g/ $\mu$ l) por 2 hs a 37°C. Después de la adición con  $\frac{1}{2}$  volumen de 10 M de acetato de amonio, el ADN es precipitado con 2.5 volúmenes de etanol. Los fragmentos de ADN fueron separados por electroforesis en geles de 1% de agarosa y teñidos con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ml) para su visualización.

### 4.14 Análisis estadístico

Para determinar los niveles de significación de muestras no pareadas fue utilizado el test t de Student. En los casos en los que fue necesario analizar las diferencias entre tres o más grupos de datos se empleó el análisis de varianza (ANOVA), seguido de múltiples comparaciones utilizando el test Student-Newman-Keuls. Los datos fueron expresados como los valores promedios  $\pm$  error estándar ( $X \pm ES$ ). Las diferencias entre las medias fueron consideradas significativas cuando  $p < 0.05$ .

## **5. RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Caracterización de las respuestas proliferativas de linfocitos T normales y tumorales

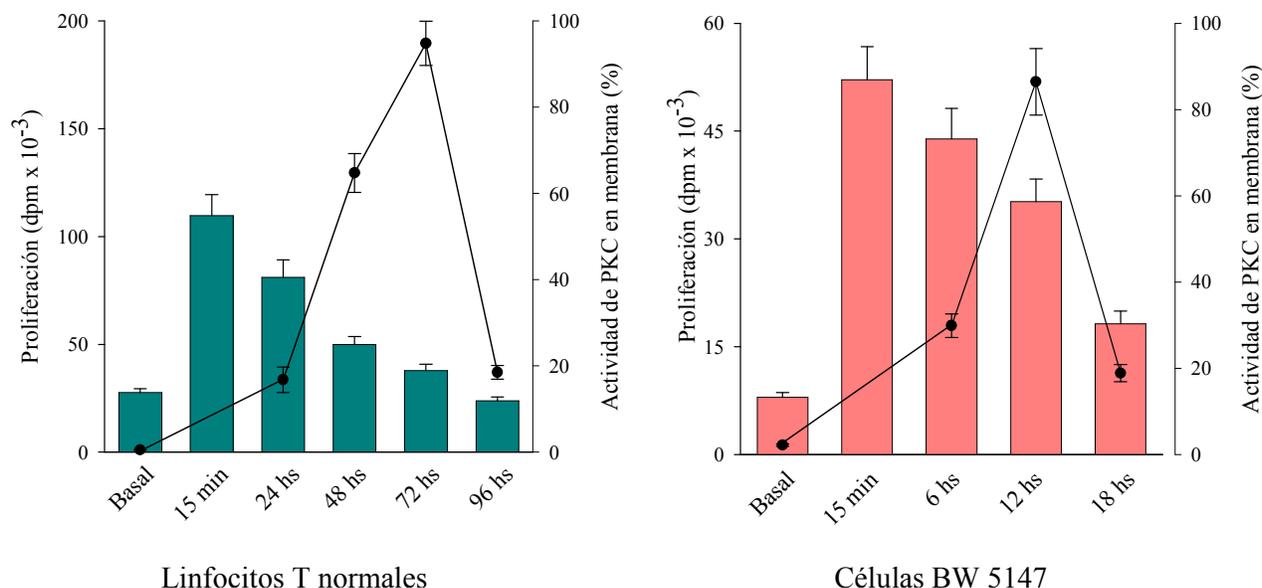
#### 5.1.1 Estudio de la cinética de proliferación en linfocitos T normales y células de la línea BW 5147. Participación de la activación de PKC.

Para caracterizar la cinética de la respuesta proliferativa a estímulos mitogénicos correspondiente a ambos tipos celulares, se realizaron cultivos en microplacas de linfocitos T normales obtenidos asépticamente como fuera descrito en Materiales y Métodos y de células del linfoma T murino BW 5147 (BW) arrestadas por privación de SFB durante 24 hs. Para ello los linfocitos T normales fueron incubados en presencia del mitógeno T-selectivo Con A y las células BW sincronizadas fueron re-cultivadas en un medio rico en SFB. Como se muestra en la **Figura 1** los linfocitos T normales presentaron su pico proliferativo característico a las 72 hs de cultivo, mientras que las tumorales mostraron la mayor incorporación de timidina tritiada a las 12 hs de re-cultivo en medio con 10% de SFB.

Dada la importancia de la activación de PKC como señal temprana de la proliferación linfocitaria y desencadenante de otros eventos intracelulares, analizamos comparativamente su translocación a la membrana plasmática conjuntamente con la proliferación celular. La **Figura 1** muestra el porcentaje de actividad enzimática de PKC asociada a membrana de células normales estimuladas mitogénicamente y tumorales a diferentes tiempos de la cinética proliferativa. En todos los casos la actividad total de PKC no se modificó y sus valores, junto con la relación de actividades citosol:membrana 15 minutos post-inducción con el estímulo mitogénico, se detallan en la Tabla adjunta. Se observa que luego de 15 minutos de exposición al SFB, las células BW sincronizadas mostraron un temprano y significativo incremento de la actividad de PKC en membrana plasmática. Dicha actividad si bien disminuyó después del pico de proliferación, arrojó valores más altos que los correspondientes a los basales. Por otro lado, la estimulación mitogénica de los linfocitos T normales también indujo una temprana translocación de PKC (dentro de los 15 minutos) pero mucho menor a la hallada en células tumorales. La PKC en membrana volvió a los niveles basales después del pico de proliferación. Es decir, la translocación de PKC con su consecuente activación es un evento temprano y, tal como era de esperar, antecedió a la generación del pico proliferativo en ambos tipos celulares. También cabe señalar que tanto la actividad total de PKC como su translocación fueron significativamente mayores en las células tumorales que en los linfocitos T normales estimulados (Tabla en Figura 1).

## 5. RESULTADOS

**Figura 1: Asociación entre la proliferación celular y la actividad enzimática de PKC en linfocitos T normales y células BW 5147.**



Tipo Celular	Estímulo	Actividad Total de PKC (pmol / min x 10 <sup>7</sup> cel)	Actividad de PKC (pmol / min x 10 <sup>7</sup> cel) CITOSOL / MEMBRANA
LT normales	Sin Con A	15.1 ± 0.9	12.7 ± 0.8 / 2.3 ± 0.3
	Con A	13.5 ± 0.8	6.1 ± 0.7 / 7.4 ± 0.7 *
BW	Sin SFB	34.0 ± 2.1 #	29.4 ± 2.9 / 4.5 ± 0.5
	SFB	30.7 ± 1.8 #	4.0 ± 0.4 / 26.7 ± 1.8 *#

Se determinó la actividad de PKC y la cinética de proliferación en linfocitos T normales estimulados con Con A (2 µg/ml) y en células BW sincronizadas y estimuladas por la adición de SFB a los tiempos indicados. Los resultados muestran la media ± ES de n = 3 experimentos independientes realizados por triplicado para los ensayos de proliferación celular y por duplicado para la actividad de PKC. Un resumen de la actividad total y de las fracciones citosólica y particulada se muestran en la **Tabla** adjunta. Los valores corresponden al basal (sin estímulo) o a los 15 minutos de tratamiento con Con A (LT normales) o con SFB (BW). \* Difieren significativamente de sus valores basales con p < 0.01. # Difieren respecto de los correspondientes valores de LT normales con p < 0.01.

### 5.1.2 Identificación de los intermediarios enzimáticos involucrados en la proliferación de linfocitos T tumorales y normales.

A fin de identificar los caminos intracelulares enzimáticos involucrados diferencialmente en la proliferación de células T tumorales o normales inducidas mitogénicamente, estudiamos los efectos ejercidos por inhibidores selectivos de PKC, inhibidores de las enzimas TPK y PLC que actúan río arriba de PKC, así como también de bloqueantes de calcio.

Como se muestra en la **Figura 2** el bloqueo de TPK por genisteína, de PLC por NCDC y de PKC por staurosporina, en concentraciones que no afectaron la viabilidad celular ( $\geq 87\%$ ), inhibieron en forma similar la proliferación de linfocitos T tumorales y normales. El inhibidor selectivo de PKC, el GF109203X, utilizado en concentración de  $0.1\ \mu\text{M}$  solo inhibió significativamente la proliferación de células normales, aunque en concentraciones mucho mayores ( $10\ \mu\text{M}$ ) ejerció efectos inhibitorios similares sobre ambos tipos celulares. Dado que el GF109203X es un potente inhibidor de cPKC ( $\text{IC}_{50} \cong 0.01\text{-}0.02\ \mu\text{M}$ ), pero un débil inhibidor de nPKC ( $\text{IC}_{50} \cong 0.1\text{-}0.2\ \mu\text{M}$ ) o de aPKC ( $\text{IC}_{50}$  para PKC $\zeta \cong 6.0\ \mu\text{M}$ ), los resultados hallados sugieren que las isoenzimas de PKC cumplen un rol diferencial en la proliferación de los tipos celulares estudiados. Además, tanto el bloqueante extracelular de calcio, Verapamil, como el quelante intracelular, BAPTA, inhibieron eficientemente la proliferación de las células normales estimuladas con Con A, pero no afectaron la proliferación de las células de linfoma, indicando que la activación de las enzimas involucradas en los efectos proliferativos de las células tumorales sería independiente de calcio.

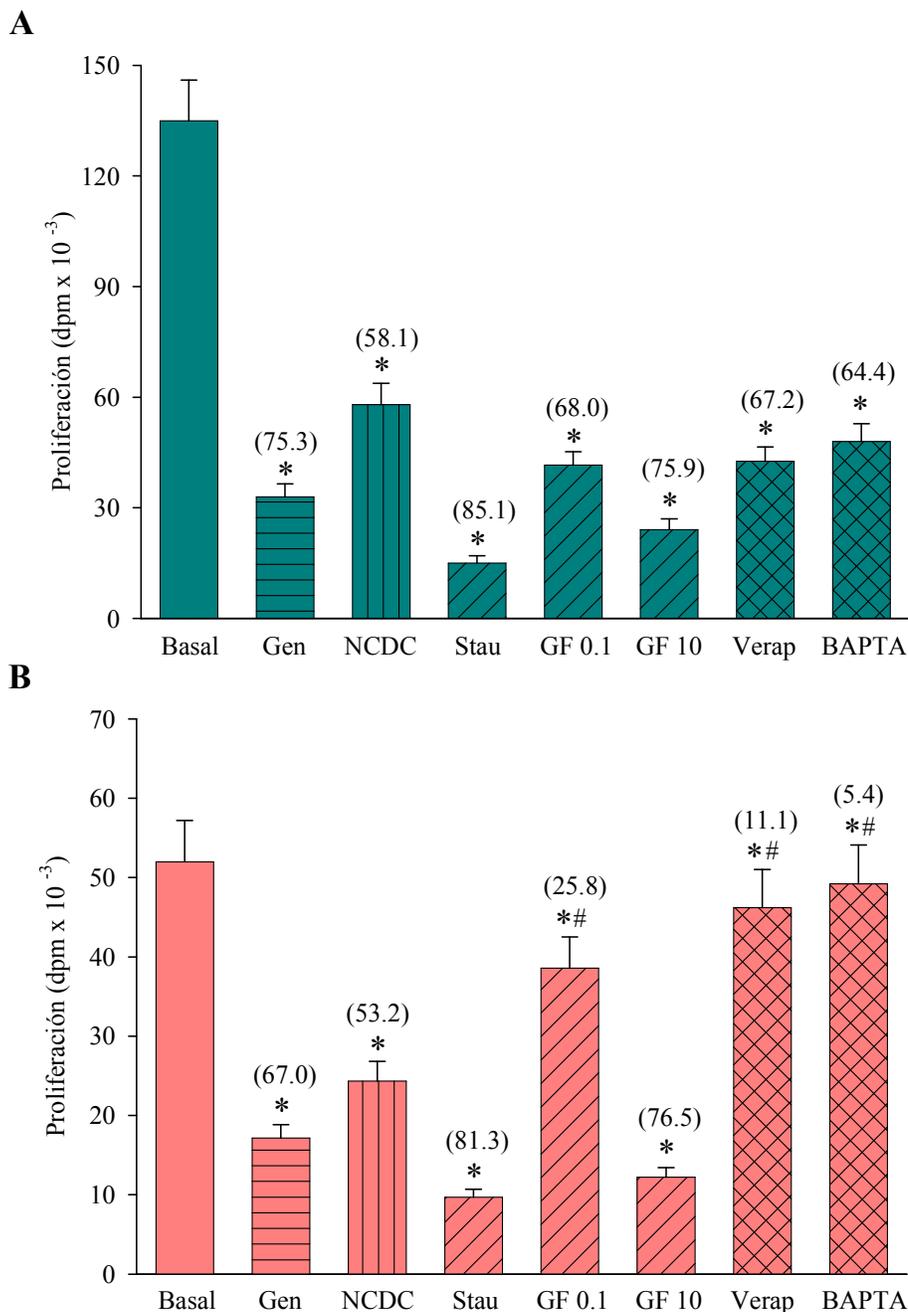
Para estudiar la influencia del calcio sobre la actividad enzimática de PKC, se determinó su actividad total en presencia o ausencia del mismo, en extractos celulares de linfocitos T normales o tumorales y empleando el sustrato específico de PKC, el péptido MBP [4-14]. Como se muestra en la **Figura 3** la actividad total de PKC fue más alta en las células tumorales que en las normales y la misma no se vio afectada por la ausencia de calcio. Sin embargo en las células normales la falta de calcio redujo dicha actividad en un 43%.

### 5.1.3 Expresión de isoformas de PKC en linfocitos T normales y células BW5147

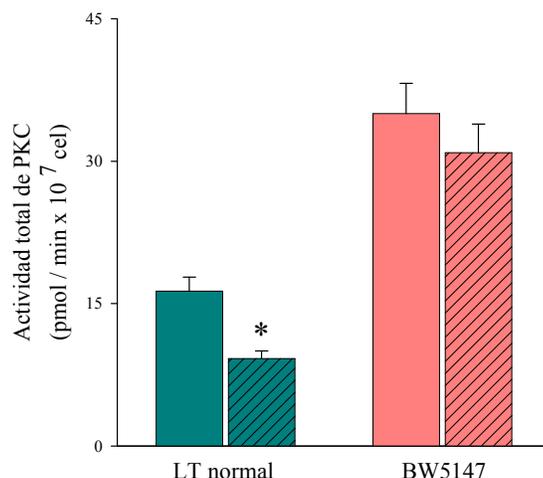
Para determinar si las diferencias en la actividad de PKC se relacionaban con la presencia diferencial de distintas isoenzimas, estudiamos mediante western blot el patrón de expresión

## 5. RESULTADOS

**Figura 2: Proliferación celular de linfocitos T normales y de células BW en presencia de inhibidores enzimáticos de los caminos intracelulares**



Los linfocitos T normales (**Panel A**) fueron estimulados por Con A (2  $\mu\text{g/ml}$ ) por 72 hs y las células BW (**Panel B**) fueron sincronizadas y luego estimuladas con SFB por 24 hs. Los cultivos se llevaron a cabo en ausencia (Basales) o presencia de los siguientes bloqueantes agregados al comienzo del cultivo: genisteína (Gen) 30  $\mu\text{g/ml}$ , NCDC 10  $\mu\text{M}$ , staurosporina (Stau) 1 nM, GF 109203X (GF) 0.1 o 10  $\mu\text{M}$ , verapamil (Verap) 0.1 mM. Entre paréntesis se indica el porcentaje de inhibición respecto de los valores basales. Los resultados muestran la media  $\pm$  ES de n=3 experimentos independientes realizados por triplicado. \*Difieren significativamente de los correspondientes basales con  $p < 0.01$ . #Difieren significativamente de los correspondientes valores de LT normales con al menos  $p < 0.05$ .

**Figura 3: Influencia del calcio sobre la actividad de PKC**

La PKC total fue purificada de linfocitos T normales y células BW 5147 y su actividad enzimática fue medida en ausencia (barras lisas) o presencia (barras rayadas) de calcio. Los resultados muestran la media  $\pm$  ES de  $n = 4$  experimentos independientes realizados por duplicado. \*Difieren significativamente de los correspondientes valores basales con  $p < 0.01$ .

de isoenzimas de PKC a partir de lisados de células T normales, incubadas en ausencia o presencia del estímulo mitogénico y de células BW5147 en crecimiento exponencial. En la **Figura 4 (Panel A)** se muestra la expresión de isoformas halladas y su cuantificación por densitometría. Los resultados muestran que los linfocitos T en reposo expresan predominantemente las isoformas clásicas de PKC  $\alpha$  y  $\beta$  y las isoformas noveles  $\theta$  y  $\delta$ , pero no expresan la isoforma  $\gamma$  (dato no mostrado) y sólo tienen bajos niveles de  $\epsilon$  y de la isoforma atípica  $\zeta$ . Luego de 72 hs de estimulación mitogénica con Con A se observó un significativo incremento en los niveles de las isoformas clásicas  $\alpha$  y  $\beta$ . Por el contrario las células BW 5147 mostraron mínimos niveles de la isoforma  $\beta$  y una incrementada expresión de la isoforma atípica  $\zeta$ . Los niveles de las isoformas  $\alpha$ ,  $\epsilon$  y  $\delta$  fueron idénticos a los hallados en linfocitos T normales sin estimular. Las isoformas  $\theta$  y  $\gamma$  no fueron encontradas en las células BW. Para demostrar la especificidad de los anticuerpos utilizados, se realizaron en paralelo idénticos ensayos pero empleado los péptidos bloqueantes pertinentes, contra los cuáles se obtuvieron los anticuerpos dirigidos contra las distintas isoformas de PKC.

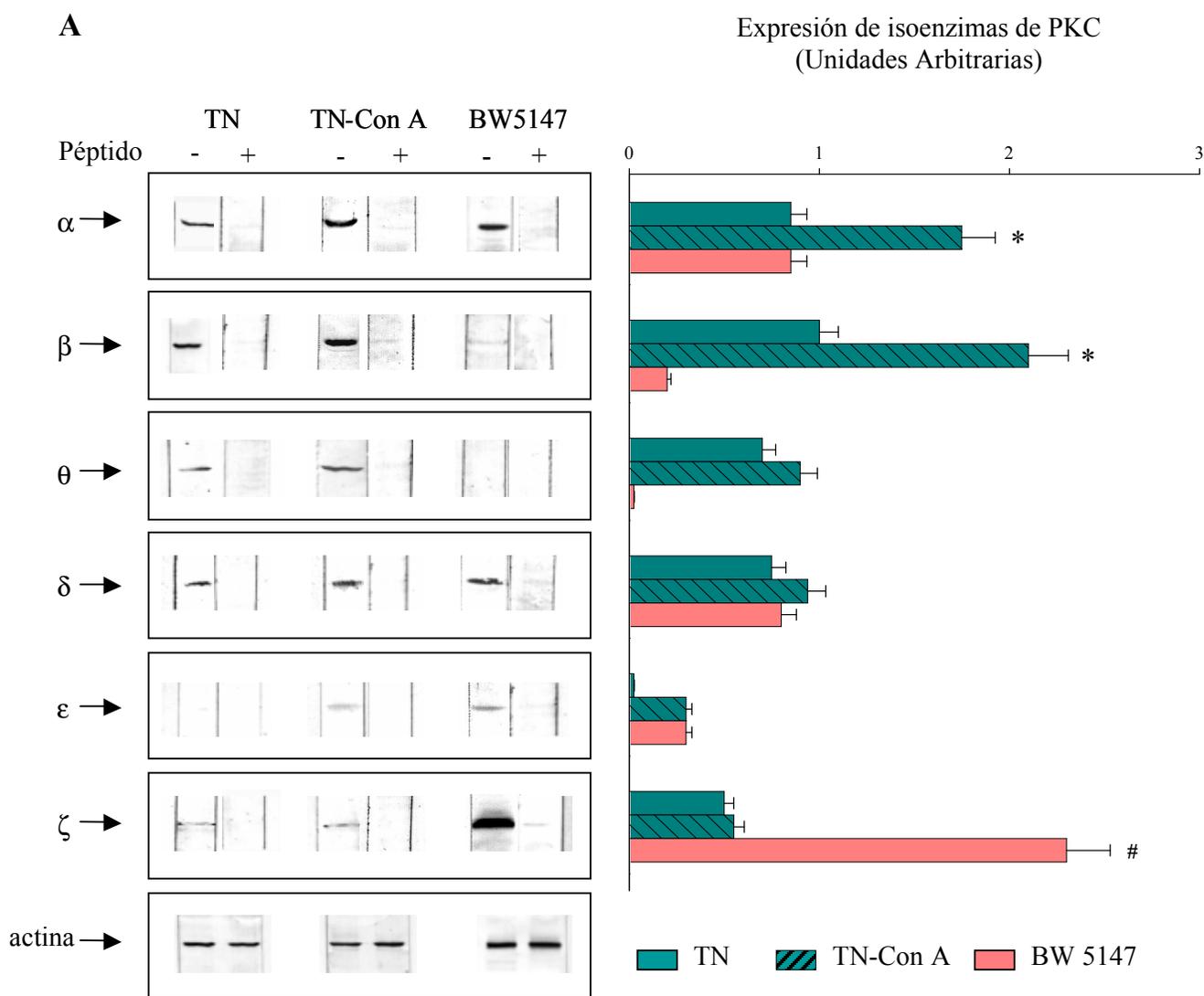
La estimulación mitogénica de linfocitos T con Con A o de las células BW arrestadas e inducidas por SFB provocó la rápida translocación (15 minutos) de las principales isoenzimas expresadas en cada tipo celular, tal como muestran los blots representativos del **Panel B** de la **Figura 4**.

## 5. RESULTADOS

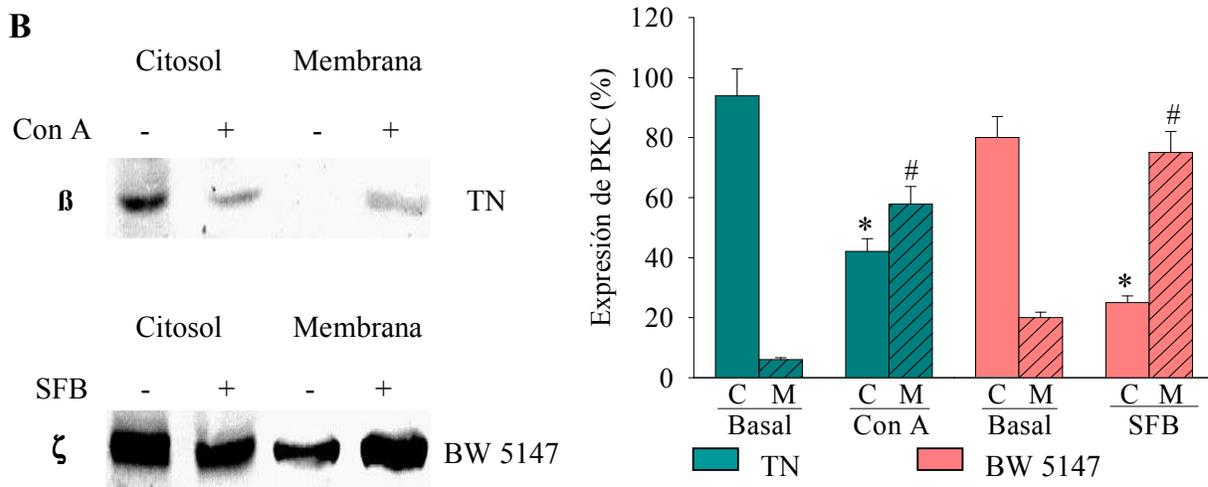
### 5.1.4 Participación de la isoforma atípica PKC $\zeta$ en la proliferación de linfocitos T tumorales.

Para determinar la participación de PKC $\zeta$  en la proliferación de células BW, inhibimos su actividad mediante la introducción intracelular de un anticuerpo dirigido contra la región carboxi-terminal de PKC $\zeta$ , anticuerpo bloqueante de su actividad catalítica (Leli et al, 1992).

**Figura 4: Expresión de isoenzimas de PKC en linfocitos T normales y tumorales**



## 5. RESULTADOS



**Panel A:** Expresión de isoenzimas de PKC en linfocitos T normales en reposo (TN), estimulados por 72 hs con Con A (TN-Con A) o células BW 5147. La especificidad de los anticuerpos empleados fue confirmada realizando los análisis de Western blot en ausencia (-) o presencia (+) del correspondiente péptido bloqueante. Las bandas mostradas son representativas de 7 experimentos independientes. También se muestra el análisis densitométrico en relación con la expresión de los niveles de actina en las mismas muestras. El análisis estadístico se realizó para cada isoenzima individual. \*Difieren significativamente de los valores de TN con  $p < 0.01$ . # Difiere de los valores de TN y TN-Con A con  $p < 0.001$ .

**Panel B:** Distribución subcelular de PKC  $\beta$  y  $\zeta$  en linfocitos T normales o células BW sincronizadas, respectivamente. Las células fueron incubadas por 15 minutos en ausencia (-) o presencia (+) de Con A (2  $\mu\text{g/ml}$ ) o SFB, respectivamente. La presencia de PKC  $\beta$  y  $\zeta$  en las fracciones de citosol (C) y membrana (M) fue analizada por western blot con los anticuerpos específicos. Se muestran las bandas representativas de  $n = 3$  experimentos. La intensidad relativa de las diferentes bandas fue cuantificada por densitometría y los porcentajes de PKC para cada fracción fueron calculados respecto de la PKC total (C + M), los mismos se muestran en el gráfico de barras. \*Difieren de los correspondientes basales de citosol con  $p < 0.01$ . #Difieren de los correspondientes basales de membrana con  $p < 0.01$ .

También empleamos el péptido miristoilado pseudosustrato de la PKC $\zeta$  (Ps-Myr PKC $\zeta$ ) capaz de atravesar la membrana celular y de bloquear su actividad (Parmentier et al., 2003). La **Figura 5** muestra el efecto de diluciones crecientes del anticuerpo anti-PKC $\zeta$  sobre la proliferación de células BW y su comparación con linfocitos T normales. Como puede observarse, dicho anticuerpo fue capaz de bloquear la proliferación de células BW sin alterar la proliferación de LT normales activados. Cabe señalar que diluciones del anticuerpo iguales o mayores a 1:500 no tuvieron efecto (dato no mostrado). De igual forma, se observa en la **Figura 5** que el tratamiento con el Ps-Myr PKC $\zeta$  a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  no afectó la proliferación de linfocitos T normales en activa división, pero si inhibió la proliferación de células tumorales en un 90%.

### 5.1.5 Actividad de NOS en células T normales y tumorales y su participación en la proliferación celular

Dado que PKC es capaz de regular la actividad de NOS en varios tipos celulares, incluyendo los linfocitos, estudiamos la participación de NOS en la proliferación celular de linfocitos T normales y tumorales. Como puede observarse en la **Figura 6** los linfocitos T normales, tanto en condiciones basales como estimulados mitogénicamente, muestran bajos niveles de actividad enzimática de NOS que no son incrementados por el estímulo mitogénico.

Por su parte, las células BW 5147 sincronizadas presentan mayores niveles de actividad de NOS que las células T normales, y esta actividad fue significativamente incrementada por la estimulación de la proliferación inducida con SFB. Cabe señalar que dicha actividad no difiere de la determinada en células BW en crecimiento exponencial y que estos resultados se correlacionaron con la respuesta proliferativa únicamente en células BW (**Tabla en Figura 6**).

### 5.1.6 Caracterización de la actividad de NOS en linfocitos T tumorales

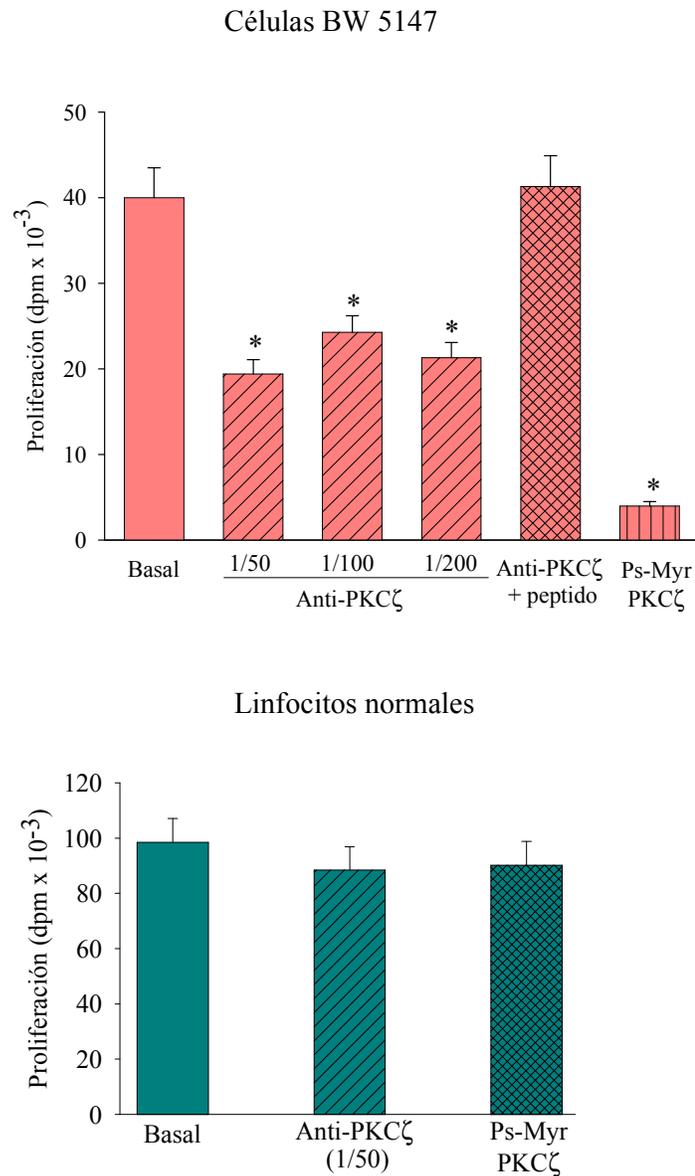
La actividad de NOS fue medida en células BW a través de la formación de [ $^{14}\text{C}$ ]-citrulina a partir de [ $^{14}\text{C}$ ]-arginina. Para descartar la formación de L-citrulina marcada radioactivamente a través de vías metabólicas alternativas que involucran a las arginasas, se efectuaron determinaciones en ausencia o presencia del inhibidor de arginasas, la L-valina. Como se muestra en la **Figura 7** la L-valina (50 mM) no tuvo efecto sobre la formación de [ $^{14}\text{C}$ ]-L-citrulina demostrando que su síntesis es mediada principalmente por la NOS. Adicionalmente la especificidad de la reacción fue evaluada usando el bloqueante competitivo de NOS, el L-NMMA (500  $\mu\text{M}$ ), el que inhibió casi completamente su actividad. Para estudiar si la actividad de NOS era dependiente de calcio, se realizaron mediciones en presencia de quelantes intra- y extracelulares de calcio. La **Figura 7** muestra que la eliminación del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular por EGTA (2 mM) o el intracelular por BAPTA (25  $\mu\text{M}$ ) afectó la actividad de NOS tan sólo un 26 %, indicando que la misma es principalmente independiente de calcio.

### 5.1.7 Identificación de la isoforma inducible de NOS en células T tumorales

Dado que la actividad de NOS es principalmente independiente de calcio en las células BW, se estudió la participación de la isoforma inducible de NOS, iNOS o NOS II, que es calcio - independiente.

## 5. RESULTADOS

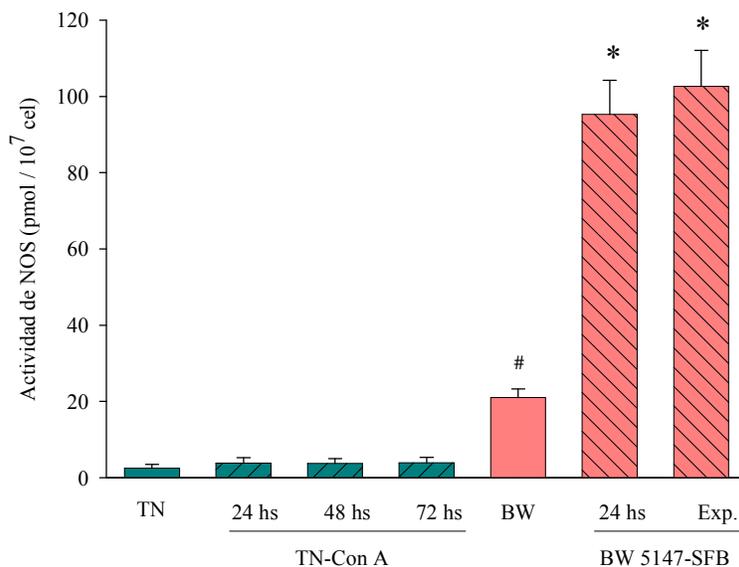
**Figura 5: Efecto de la introducción intracelular de un anticuerpo anti-PKC $\zeta$  y del pseudosustrato miristoilado de PKC $\zeta$  en linfocitos T normales y células BW 5147.**



Los linfocitos T normales y las células BW fueron permeabilizadas con lysolecitina e incubadas en ausencia (Basal) o presencia de diluciones crecientes del anticuerpo anti-PKC $\zeta$  por 10 minutos y reselladas. La especificidad de la acción del anticuerpo fue evaluada con la dilución 1:200 en presencia del péptido bloqueante de PKC $\zeta$  en una relación (1:3). La proliferación celular fue evaluada luego de 24 hs de incubación para las células BW y 72 hs con Con A para los LT. Adicionalmente, ambos tipos celulares fueron preincubados con el Ps-Myr PKC $\zeta$  (100  $\mu$ M) y la proliferación celular fue evaluada tal como se indicó anteriormente. Los resultados muestran la media  $\pm$  ES de n=3 experimentos independientes. \*Difieren significativamente de los correspondientes valores basales con  $p < 0.05$ .

## 5. RESULTADOS

**Figura 6: Actividad enzimática de NOS en linfocitos T normales y células BW 5147 en respuesta a estímulos mitogénicos**



Tipo celular	Condiciones de cultivo	Proliferación celular (dpm x 10 <sup>-3</sup> )
LT normales	Basal	1635 ± 170
	Con A 24 hs	15852 ± 1599*
	Con A 48 hs	219526 ± 8883*
	Con A 72 hs	209302 ± 8304*
BW 5147	Sincronizadas	1120 ± 193
	SFB 24 hs	22356 ± 2015*
	Crecimiento exponencial	37243 ± 2924*

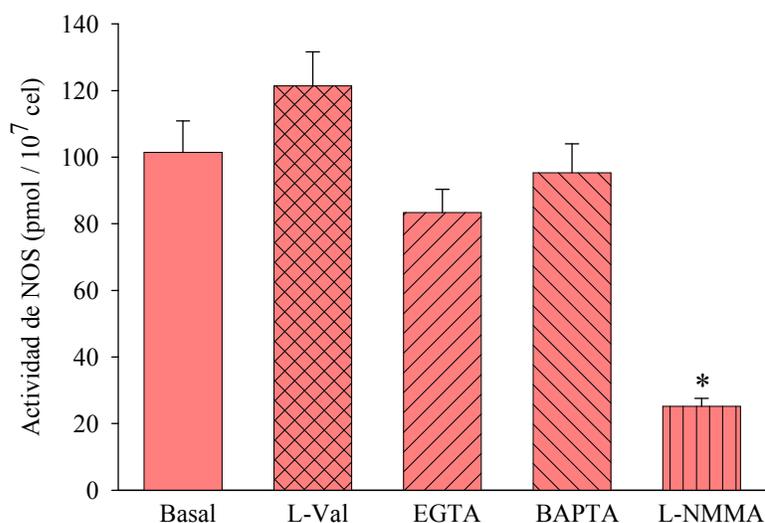
La actividad enzimática de NOS fue determinada en linfocitos T normales en reposo (TN) o estimulados con Con A (2 µg/ml) por los tiempos indicados (TN-Con A) y en células BW sincronizadas (BW), recultivadas en medio con SFB (BW5147-SFB) por 24 hs o en crecimiento exponencial (Exp). Los resultados mostrados representan la media ± ES de n=4 experimentos realizados por duplicado. #Difieren significativamente de los valores de TN y TN-Con A con p<0.01. \*Difieren significativamente de los valores de BW sincronizadas con p<0.001.

La **Tabla** adjunta muestra la respuesta proliferativa obtenida en ambos tipos celulares bajo las mismas condiciones de cultivo indicadas para las determinaciones de actividad enzimática. Los resultados mostrados corresponden a la media ± ES de n=3 experimentos independientes realizados por triplicado.

\*Difieren significativamente de los correspondientes valores basales y de células sincronizadas con p<0.01.

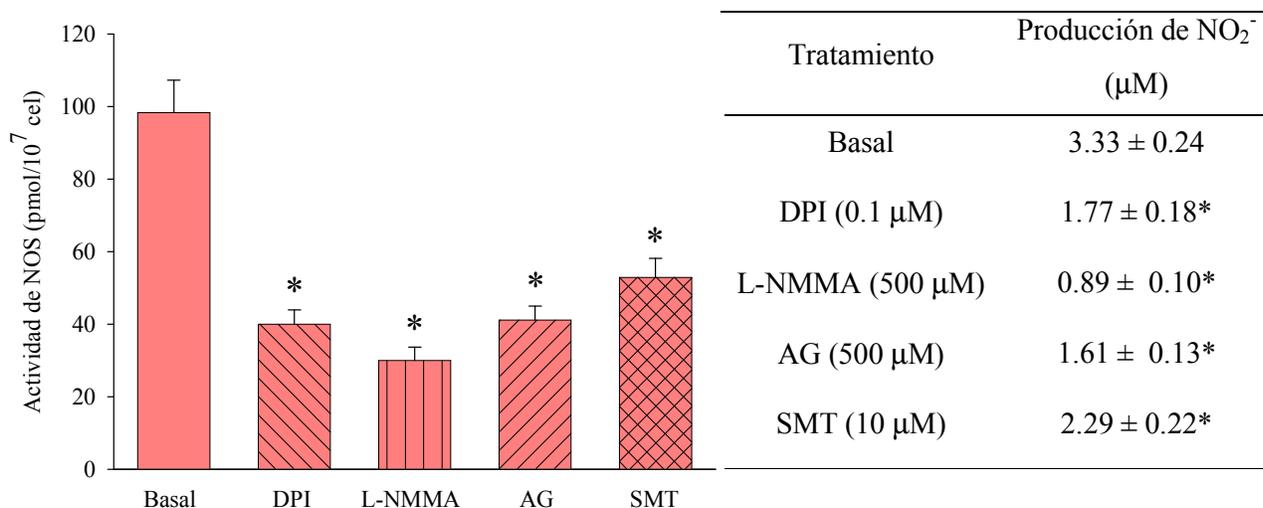
## 5. RESULTADOS

**Figura 7: Actividad de NOS y su independencia del calcio en células BW5147**



Evaluación de la actividad de NOS en células BW 5147 en crecimiento exponencial cultivadas por 24 hs en ausencia (Basal) o en presencia de EGTA (2mM), BAPTA (25μM) o L-NMMA (500μM). La actividad de NOS también fue cuantificada en presencia de L-Valina (L-Val, 50 mM). Los resultados muestran la media ± ES de n=5 experimentos realizados por triplicado. \*Difiere significativamente del basal con p<0.01.

**Figura 8: Efecto de diferentes bloqueantes de NOS sobre la actividad enzimática**



El gráfico muestra la actividad de NOS determinada en células BW en crecimiento exponencial incubadas por 24 hs en ausencia (Basal) o presencia de los siguientes bloqueantes de NOS: DPI (0.1 μM), L-NMMA (500 μM), AG (500 μM) y SMT (10 μM). Los resultados muestran la media ± ES de n = 4 experimentos realizados por duplicado. \* Difieren significativamente de los valores basales con p<0.05. La producción de nitritos en los sobrenadantes de cultivos establecidos en medio RPMI sin rojo fenol e incubados con los bloqueantes mencionados se muestra en la tabla adjunta. Los resultados mostrados son el promedio ± ES de n = 5 experimentos realizados por triplicado. \*Difieren significativamente del valor basal con p<0.05.

## 5. RESULTADOS

Para ello se analizó el efecto de los inhibidores selectivos para la isoforma inducible, AG (500  $\mu\text{M}$ ) y SMT (10  $\mu\text{M}$ ) y lo comparamos con aquellos obtenidos con bloqueantes no selectivos de NOS, DPI (0.1  $\mu\text{M}$ ) y L-NMMA (500  $\mu\text{M}$ ), que inhiben la actividad de todas las isoformas presentes en la célula. Como se muestra en la **Figura 8**, tanto AG como SMT inhibieron la actividad de NOS en un 50-60 %. Por su parte, de los inhibidores no selectivos, el DPI bloqueó en forma similar a los selectivos, la actividad enzimática, aunque el L-NMMA indujo una inhibición de aproximadamente el 70%. Similares resultados se obtuvieron cuando se determinó la producción de nitritos en presencia de estos inhibidores, tal como puede observarse en la **Tabla** adjunta a la **Figura 8**. Dado que los porcentajes de inhibición de la actividad enzimática de NOS obtenidos tanto en presencia de inhibidores no selectivos como selectivos para la isoforma inducible son similares podemos sugerir que las células BW expresan mayoritariamente esta isoenzima calcio-independiente.

### 5.1.8 Expresión proteica y genómica de iNOS en linfocitos T normales y tumorales.

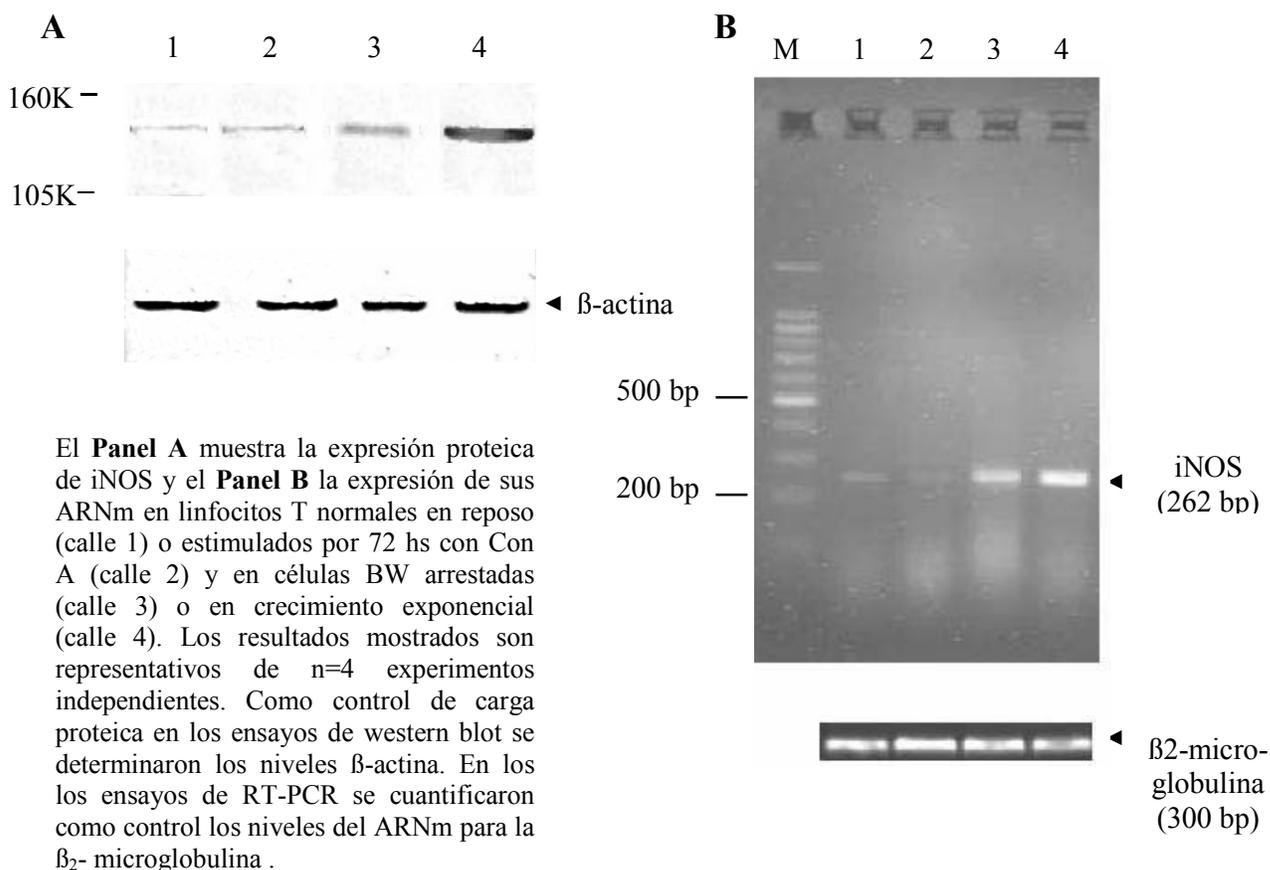
Dado que la actividad de NOS es principalmente independiente de calcio y es inhibida en gran medida por bloqueantes selectivos de la isoforma inducible de NOS en las células BW, se estudió la expresión de iNOS en dichas células y comparativamente en linfocitos T normales. Para ello, se obtuvieron extractos celulares de células BW arrestadas e inducidas a proliferar por el agregado de SFB al cultivo por 24 hs y luego dichos extractos fueron analizados por western blot. Similares ensayos fueron realizados con linfocitos T normales en reposo o estimulados con Con A por 72 hs. En la **Figura 9 (Panel A)** se observa que las células tumorales estimuladas con SFB muestran una incrementada expresión proteica de iNOS. Los linfocitos T normales en reposo o estimulados con Con A muestran niveles mínimos de expresión de iNOS.

Se analizó entonces, si el incremento en la expresión proteica de la isoforma iNOS en las células BW creciendo exponencialmente, se debía a una mayor actividad traduccional del ARNm correspondiente a esa isoforma o a un aumento de su transcripción. Para ello, realizamos ensayos de RT a partir de ARN total purificado de células tumorales los que posteriormente fueron amplificados por PCR con primers específicos para la isoforma de iNOS, y los productos así obtenidos fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa. En la **Figura 9 (Panel B)** se observa que las células tumorales estimuladas con SFB muestran un prominente aumento en la expresión del ARN mensajero de iNOS siendo menor la expresión en las células arrestadas. Los linfocitos T normales muestran niveles levemente detectables de

## 5. RESULTADOS

dicho ARNm que no se modifican por el tratamiento mitogénico. A partir de las mismas muestras de RT, se realizó la PCR usando primers específicos para la  $\beta_2$ -microglobulina, la que se empleó como gen “housekeeping” dado que su expresión no es modificada por el tratamiento de las células con SFB o Con A (Schmittgen y Zakrajsek, 2000)

**Figura 9: Expresión proteica y genómica de iNOS en linfocitos T normales y en células BW**



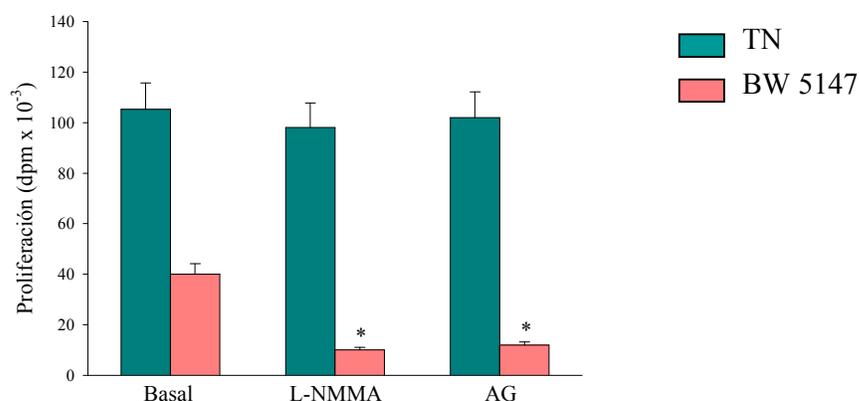
### 5.1.9 Importancia de la actividad enzimática de NOS sobre la proliferación de linfocitos T normales y células BW 5147

Para estudiar la importancia de la actividad de NOS y de su isoforma inducible en la proliferación de las células BW 5147, analizamos el efecto de diferentes bloqueantes enzimáticos de NOS sobre la proliferación de las células BW 5147 y los resultados hallados

## 5. RESULTADOS

fueron comparados con los obtenidos en células T normales estimuladas con Con A. Sólo la proliferación de las células tumorales se vio afectada por los bloqueantes de NOS y los selectivos de iNOS (**Figura 10**), indicando que esta isoforma está involucrada en las vías de señalización que conducen a la proliferación de las células tumorales.

**Figura 10: Efecto del bloqueo de la actividad enzimática de NOS sobre la proliferación de linfocitos T normales y células BW 5147**



Las células BW en crecimiento exponencial o los linfocitos T normales estimulados mitogénicamente con Con A (2 µg/ml) fueron cultivados por 24 o 72 hs respectivamente en ausencia (Basal) o en presencia de L-NMMA (500 µM) o AG (500 µM). Los resultados mostrados son el promedio ± ES de n = 4 experimentos realizados por triplicado. \*Difieren significativamente del valor basal con p<0.05.

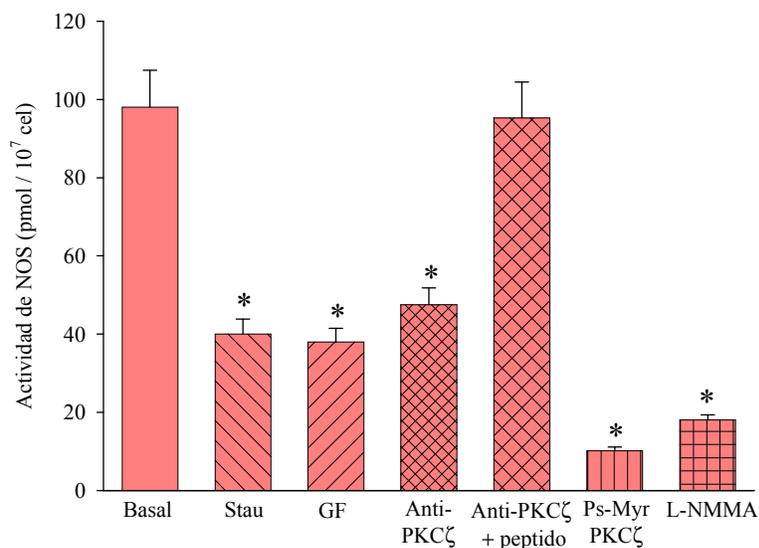
### 5.1.10 Actividad de NOS dependiente de PKC en las células BW 5147

Para analizar la existencia de una correlación entre la alta actividad de PKC y NOS en las células BW determinamos el efecto de diferentes bloqueantes de PKC sobre la actividad de NOS. Como se observa en la **Figura 11**, los bloqueantes de PKC, Staurosporina y GF109203X, (este último empleado en una concentración de 10 µM) fueron capaces de inhibir la actividad de NOS. Adicionalmente el bloqueo específico de la isoforma atípica PKCζ, mediante el empleo del anticuerpo anti-PKCζ o por el tratamiento con el Ps-Myr PKCζ también condujo a la inhibición de la actividad de NOS en las células tumorales.

## 5. RESULTADOS

Cabe señalar que fue nuestra intención corroborar estos resultados mediante la transfección transiente de las células BW con plásmidos que sobreexpresan la dominante negativa de isoforma PKC $\zeta$ . Veinticuatro horas post-transfección se observó que el porcentaje de viabilidad de estas células fue menor al 97%, lo que evidenció la importancia de esta isoforma en la proliferación y supervivencia celular. Por este motivo para analizar la participación de esta isoenzima, de aquí en más empleamos la introducción intracelular del anticuerpo bloqueante o del pseudosustrato específico.

**Figura 11: Efecto de bloqueantes enzimáticos de PKC sobre la actividad de NOS**



La actividad enzimática de NOS fue cuantificada en células BW incubadas por 24 hs en ausencia (Basal) o presencia de Staurosporina (Stau, 1 nM) y GF 109203X (GF, 10 $\mu$ M) o los bloqueantes específicos para la isoforma atípica PKC $\zeta$ , el anticuerpo anti PKC $\zeta$  solo (dilución 1:50) o en combinación con su péptido específico y el pseudopéptido miristoilado PKC $\zeta$  (Ps-Myr PKC $\zeta$ , 100 $\mu$ M). Como control, la actividad enzimática de NOS también fue determinada a partir de células BW 5147 incubadas por 24 hs con el bloqueante L-NMMA (500 $\mu$ M). Los resultados muestran la media  $\pm$  ES de n=3 experimentos realizados por duplicado. \*Difieren significativamente del valor basal con p<0.05.

### 5.2 Efecto de las hormonas tiroideas (HTs) sobre la proliferación de células T normales y tumorales

#### 5.2.1 Caracterización de las respuestas proliferativas inducidas por HTs

A fin de evaluar la acción de las HTs sobre la proliferación de los linfocitos T normales y tumorales, se realizaron curvas dosis-respuesta a tiempos cortos de cultivo. Los efectos hormonales sobre linfocitos T normales fueron estudiados tanto en células en reposo como en aquellas estimuladas mitogénicamente. La **Figura 12** muestra que ni T3 (**Panel A**) ni T4 (**Panel B**) indujeron la proliferación de las células en reposo, pero sí incrementaron en forma dosis dependiente la estimulación de la proliferación inducida por Con A, a las 72 hs de cultivo. Estos efectos fueron observados en medio de cultivo RPMI 1640 con 10% de SFB usualmente empleado en cultivos de células linfocitarias. Es importante señalar que el dosaje de las concentraciones de T3 y T4 en dicho medio indicó que los valores de estas HTs estaban en por lo menos un orden de magnitud por debajo del rango fisiológico. También se realizaron estos estudios en un medio libre de SFB pero enriquecido en su contenido proteico, a saber el medio HyQ. En dicho medio la Con A no fue capaz de inducir la respuesta mitogénica, sin embargo se encontró un significativo efecto del mitógeno en presencia de HTs, aunque menor que el observado en RPMI.

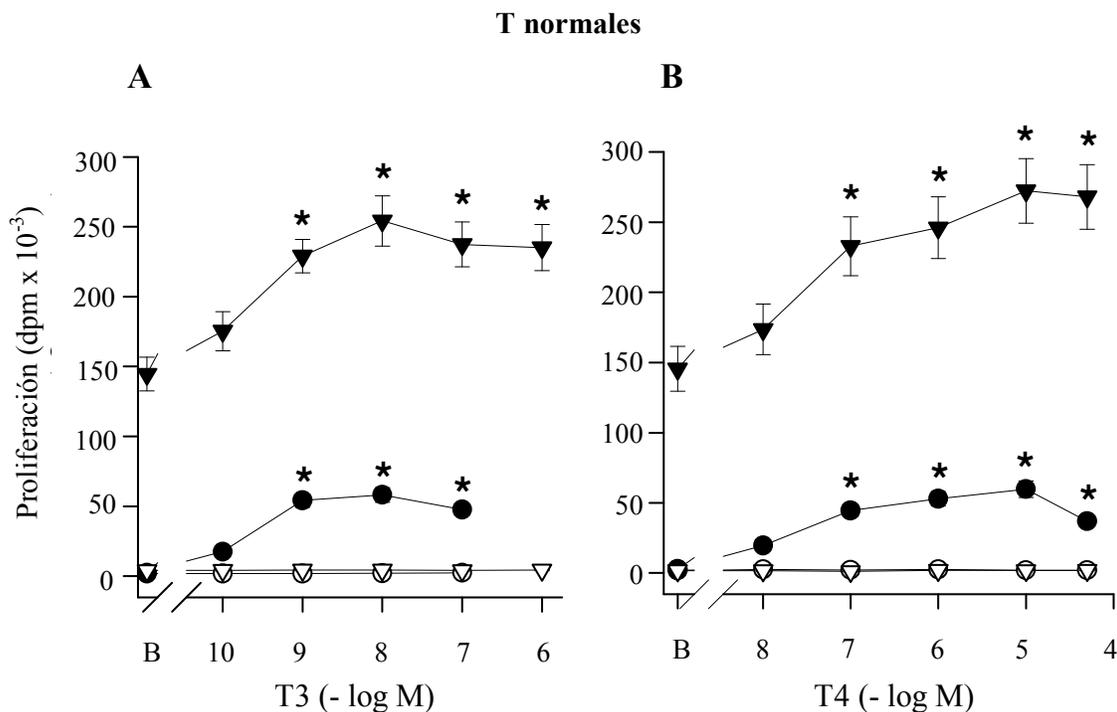
Sobre las células del linfoma T BW, las HTs también fueron capaces de incrementar el crecimiento celular en medio HyQ, dependiendo de las concentraciones de T3 y T4 agregadas (**Figura 13, panel A**). Los efectos de HTs fueron también significativos entre las 24 y 72 hs de cultivo de células BW arrestadas en medio RPMI sin SFB y mantenidas en ese medio (**Figura 13, panel B**). Las acciones proliferativas comienzan a ser significativas con  $10^{-9}$  M de T3 o  $10^{-7}$  M de T4 en ambos tipos celulares, concentraciones incluidas en el rango de valores séricos normales para T3 y T4 en seres humanos y en roedores.

Por otra parte, en células BW en crecimiento exponencial en medio RPMI suplementado con 10% de SFB, los efectos de las HTs no fueron evidentes probablemente porque que en estas condiciones las células se encuentran en su máxima capacidad proliferativa (datos no mostrados). A fin de confirmar la habilidad de las HTs de inducir la proliferación de las células BW y para corroborar los resultados obtenidos con los ensayos de incorporación de [ $^3$ H]-TdR, dichas células fueron arrestadas y teñidas con CDFA-SE (CFSE). Este colorante, que se une espontánea e irreversiblemente a las proteínas intracelulares, durante la división celular se distribuye en cantidades iguales entre las células hijas, las cuáles contienen la mitad

## 5. RESULTADOS

del CFSE que tenían las células madre (Lyons, 2000). Como puede verse en la **Figura 14**, en presencia de T3 se indujo la proliferación de las células BW dado que los picos de fluorescencia media disminuyeron progresivamente con el tiempo de cultivo. La T3 indujo una disminución de la señal del CFSE de 2,5 veces en 12 hs, lo que corresponde a aproximadamente 2,7 divisiones celulares por día. Durante las siguientes 36 y 72 horas, la señal disminuyó por otras 4,3 y 6,7 veces, lo que se corresponde con 2,2 y 1,9 divisiones por día respectivamente. La pequeña diferencia entre estos últimos resultados se debe probablemente a la inhibición por contacto, característica de las células hiperproliferativas. Es importante destacar que las células arrestadas cultivadas en ausencia de HTs u otro factor de crecimiento aportado por el SFB, mostraron señales de CFSE de intensidad similar a las 12 hs de cultivo (tiempo 0, IFM=3429; tiempo 12 hs, IFM=3220), pero a tiempos mayores se observó una pérdida importante de fluorescencia debido a una rápida y progresiva muerte celular. De hecho en esas condiciones a las 72 horas de cultivo sólo se encontró un 50% o menos de células viables.

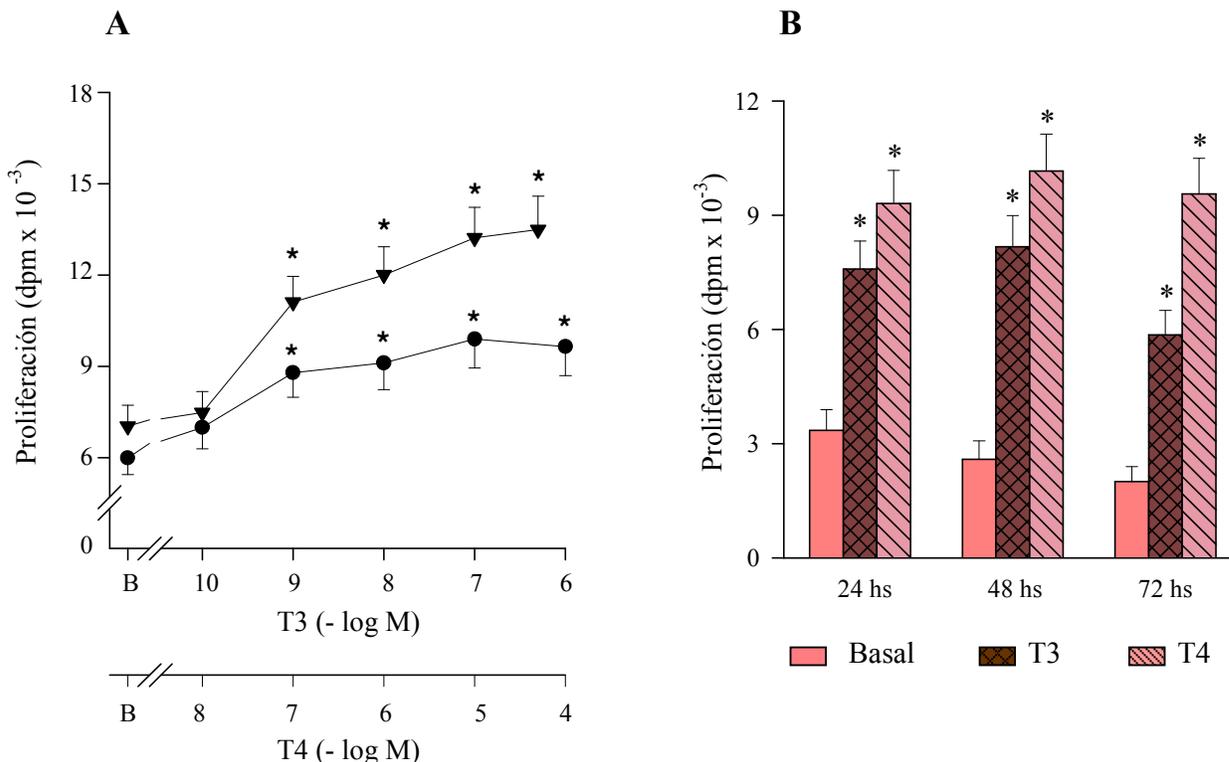
**Figura 12: Efecto de las hormonas tiroideas sobre la proliferación celular de linfocitos**



La proliferación celular fue evaluada sobre linfocitos T normales incubados por 72 hs en ausencia (símbolos blancos) o en presencia (símbolos negros) de Con A (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y solas (Basal, B) o con concentraciones crecientes de T3 (A) o de T4 (B). Las células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB (triángulos) o en medio HYQ (círculos). Se muestra la media  $\pm$  ES de  $n=5$  experimentos realizados por triplicado. \* Difieren del correspondiente valor basal con  $p < 0.05$ .

## 5. RESULTADOS

**Figura 13: Efecto de las HTs sobre la proliferación de células BW 5147**

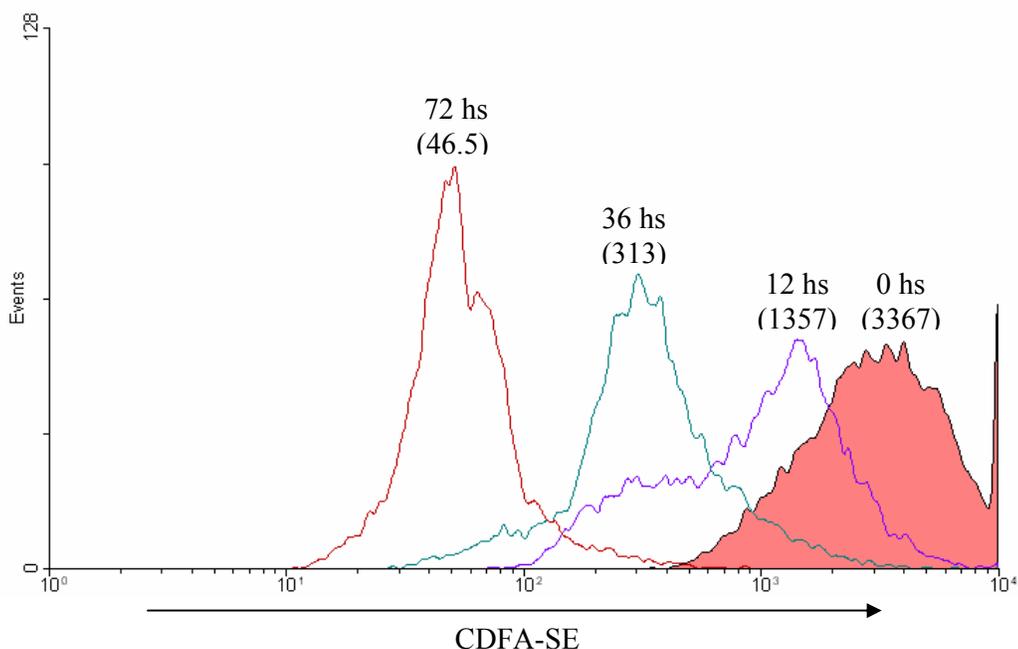


**Panel A:** Las células BW fueron cultivadas en medio HYQ en ausencia (basal, B) o en presencia de concentraciones crecientes de T3 (círculos) o de T4 (triángulos) por 24 hs. Los datos representan la media  $\pm$  ES de  $n = 4$  experimentos realizados por triplicado. \*Difieren significativamente del valor basal correspondiente con  $p < 0.05$ . **Panel B:** El efecto de las HTs también fue estudiado en las células BW sincronizadas y cultivadas por los tiempos indicados en medio RPMI 1640 sin SFB en ausencia o presencia de T3 ( $10^{-9}$  M) o de T4 ( $10^{-7}$  M). Los resultados representan la media  $\pm$  ES de  $n = 6$  experimentos independientes realizados por triplicado. \*Difieren significativamente del correspondiente basal con  $p < 0.01$ .

Por otro lado, el efecto de TH sobre la proliferación linfocitaria fue principalmente mediado por T3, dado que el tratamiento con propiltiouracilo (PTU) que inhibe la conversión de T4 a T3, a una dosis que no afecta el crecimiento celular, disminuyó las acciones de T4 sobre la proliferación de células BW y de linfocitos T normales estimulados mitogénicamente. El tratamiento con PTU en ambos tipos celulares en condiciones basales (sin tratamiento hormonal) no modificó los niveles de proliferación celular, los resultados pueden ser observados en la **Figura 15**.

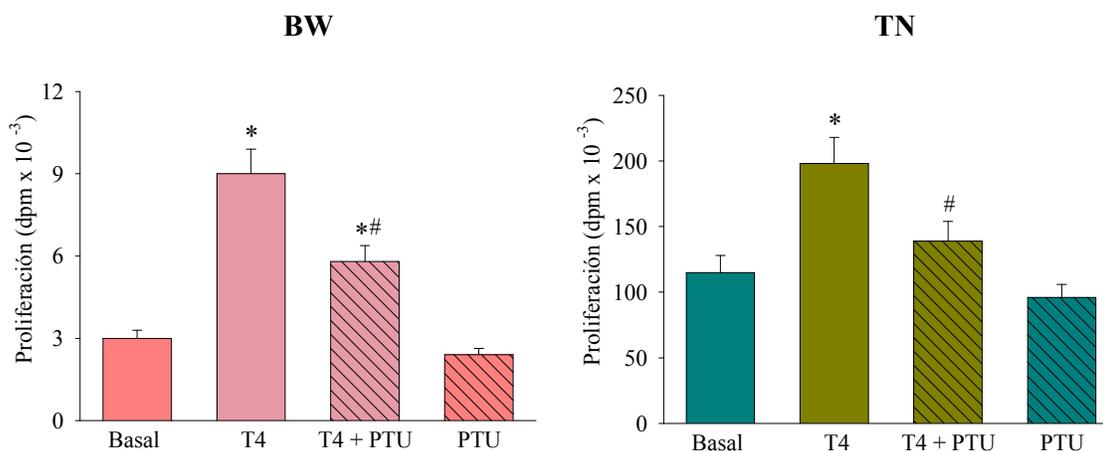
## 5. RESULTADOS

**Figura 14: Efecto de las HTs sobre el crecimiento celular por coloración con CFSE.**



Las células BW arrestadas fueron teñidas con CFSE y cultivadas en medio sin SFB en presencia de T3 ( $10^{-9}$  M). Se obtuvieron muestras celulares a los tiempos indicados y se cuantificó la fluorescencia por citometría de flujo. Entre paréntesis se indica la intensidad de la fluorescencia promedio (IFM) correspondiente a cada pico. Los resultados mostrados son representativos de  $n = 4$  muestras experimentales de 2 experimentos independientes.

**Figura 15: Efecto de PTU sobre la proliferación de células BW inducida por T4**



Las células BW y los linfocitos T normales (TN) estimulados con Con A fueron cultivados por 24 o 72 hs respectivamente, en ausencia (Basal) o presencia de T4 ( $10^{-7}$  M), T4 + PTU ( $10^{-3}$  M) o PTU. Los resultados representan la media  $\pm$  ES de  $n = 4$  experimentos independientes realizados por triplicado. \*Difiere significativamente del correspondiente valor Basal con  $p < 0.01$ . #Difiere del valor obtenido para T4 con al menos  $p < 0.05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.2.2 Efecto de diferentes bloqueantes de PKC y NOS sobre la estimulación de la proliferación de linfocitos T normales y tumorales mediada por hormonas tiroideas.

Dada la participación diferencial de PKC y NOS en la proliferación de células normales y tumorales descrita anteriormente, se estudió si estas señales se encontraban involucradas en las acciones mediadas por HTs. Para ello, con concentraciones hormonales que se encuentran dentro del rango fisiológico y que tienen efecto sobre el crecimiento de ambos tipos celulares, a saber  $10^{-9}$  M de T3 o  $10^{-7}$  M de T4, se analizó la acción de inhibidores de PKC, de NOS y quelantes de calcio. Como se muestra en la **Figura 16**, el bloqueo de PKC por staurosporina o por 10  $\mu$ M de GF109203X, inhibió la proliferación de ambos tipos celulares. Es importante señalar que el GF empleado en una concentración 0.1  $\mu$ M, que sólo es eficiente en el bloqueo de las isoformas de PKC clásicas, fue efectivo en inhibir las acciones proliferativas mediadas por HTs sólo en los linfocitos T normales. Por otra parte se evaluó también el efecto con el PS-Myr PKC $\zeta$ , el cual sólo inhibió la proliferación mediada por las HTs en las células BW. El bloqueante de calcio extracelular verapamil, así como el bloqueante de calcio intracelular BAPTA, inhibieron eficientemente la proliferación celular inducida por HTs únicamente en los linfocitos T normales con un mínimo efecto sobre las células tumorales.

Asimismo, en la **Figura 16** se puede observar que el bloqueante competitivo de NOS, el L-NMMA fue capaz de inhibir el efecto de las HTs únicamente sobre las células tumorales, sin afectar las acciones de las HTs sobre los linfocitos T normales.

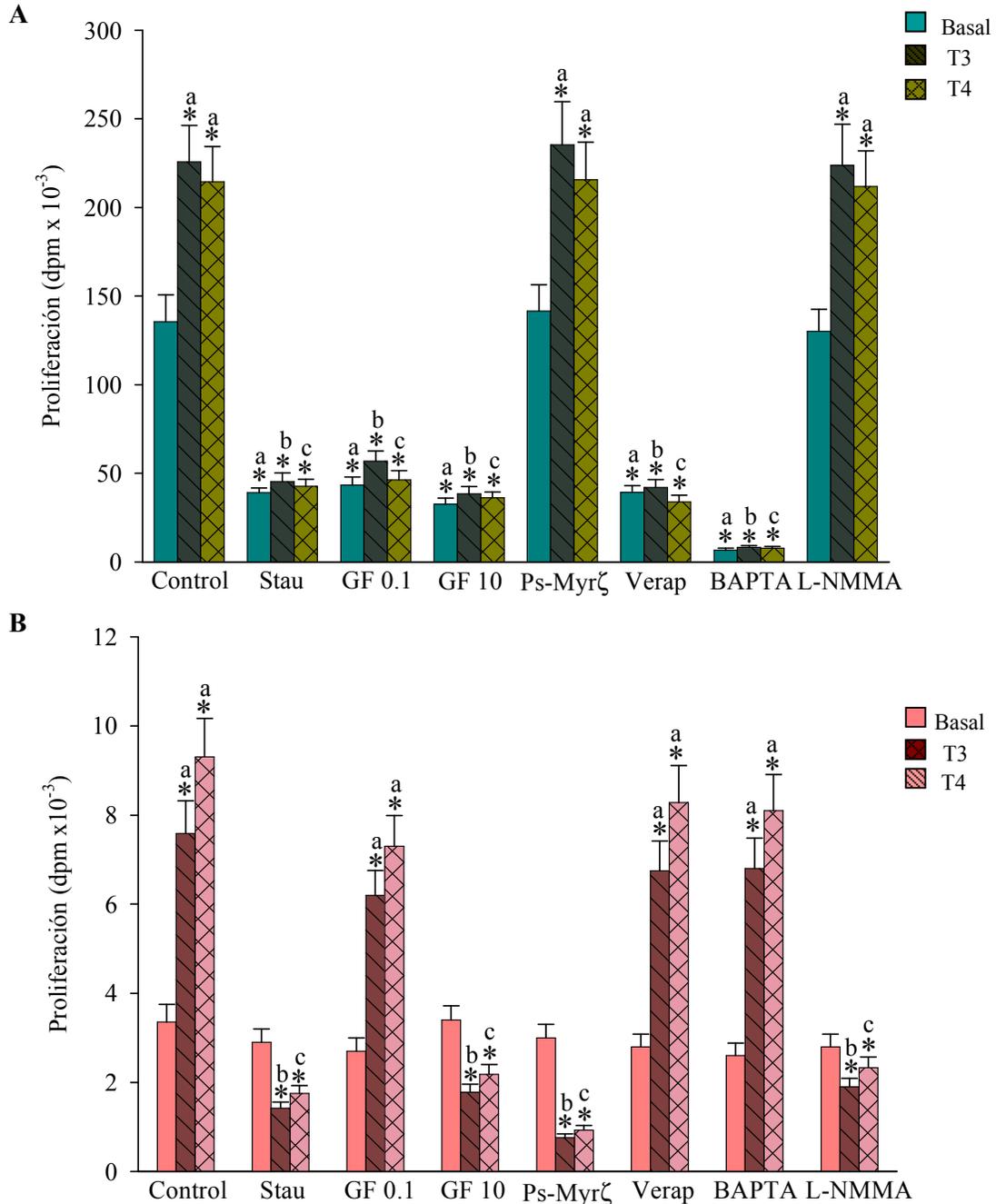
### 5.2.3 Participación de PKC y sus isoenzimas en las acciones ejercidas por HTs en linfocitos T normales y tumorales.

#### 5.2.3.1 Las HTs incrementan la actividad de PKC en linfocitos T normales y células BW

Para caracterizar los posibles caminos intracelulares involucrados en las acciones de las HTs sobre la proliferación de los linfocitos T normales y tumorales, se determinó el contenido total de PKC y la actividad de PKC asociada a membrana. Como se muestra en la **Figura 17**, la incubación por 24-72 hs con T3 o T4, produce un incremento significativo en el contenido total de PKC (**Panel A**), así como también una mayor actividad de PKC asociada a

## 5. RESULTADOS

**Figura 16: Efecto de diferentes bloqueantes de PKC y NOS sobre la estimulación de la proliferación de linfocitos T normales y células BW mediada por HTs**



Linfocitos T normales fueron estimulados mitogénicamente por 72 hs (**Panel A**) o células BW sincronizadas se cultivaron por 24 hs (**Panel B**), solos (Basal), con T3 ( $10^{-9}$  M) o con T4 ( $10^{-7}$  M), en ausencia (Control) o en presencia de los siguientes bloqueantes: Staurosporina (Stau, 0.1  $\mu$ M), GF109203X (GF 0.1  $\mu$ M o 10  $\mu$ M), el pseudopeptido miristoilado PKC $\zeta$  (Ps-Myr $\zeta$ , 100  $\mu$ M), Verapamil (Verap, 100  $\mu$ M), BAPTA (25  $\mu$ M) o L-NMMA (500  $\mu$ M). Se muestra la media  $\pm$  ES de n=3 experimentos realizados por triplicado. \*<sup>a</sup> Difieren del correspondiente valor control sin estimular con  $p < 0.01$ . \*<sup>b</sup> Difieren del correspondiente valor control+T3 con  $p < 0.01$ . \*<sup>c</sup> Difieren significativamente del correspondiente valor control+T4 con  $p < 0.01$ .

## 5. RESULTADOS

membrana (**Panel B**), tanto en células normales como tumorales, pero sin modificación en la relación de actividades citosol / membrana.

Adicionalmente se analizaron los efectos de HTs a tiempos cortos. Para ello, se incubaron linfocitos T normales y células BW solas o en presencia de T3 o de T4 durante 3 a 15 minutos. Luego de la purificación de PKC de las fracciones citosólica y particulada, se cuantificó su actividad tal como se describe en Materiales y Métodos.

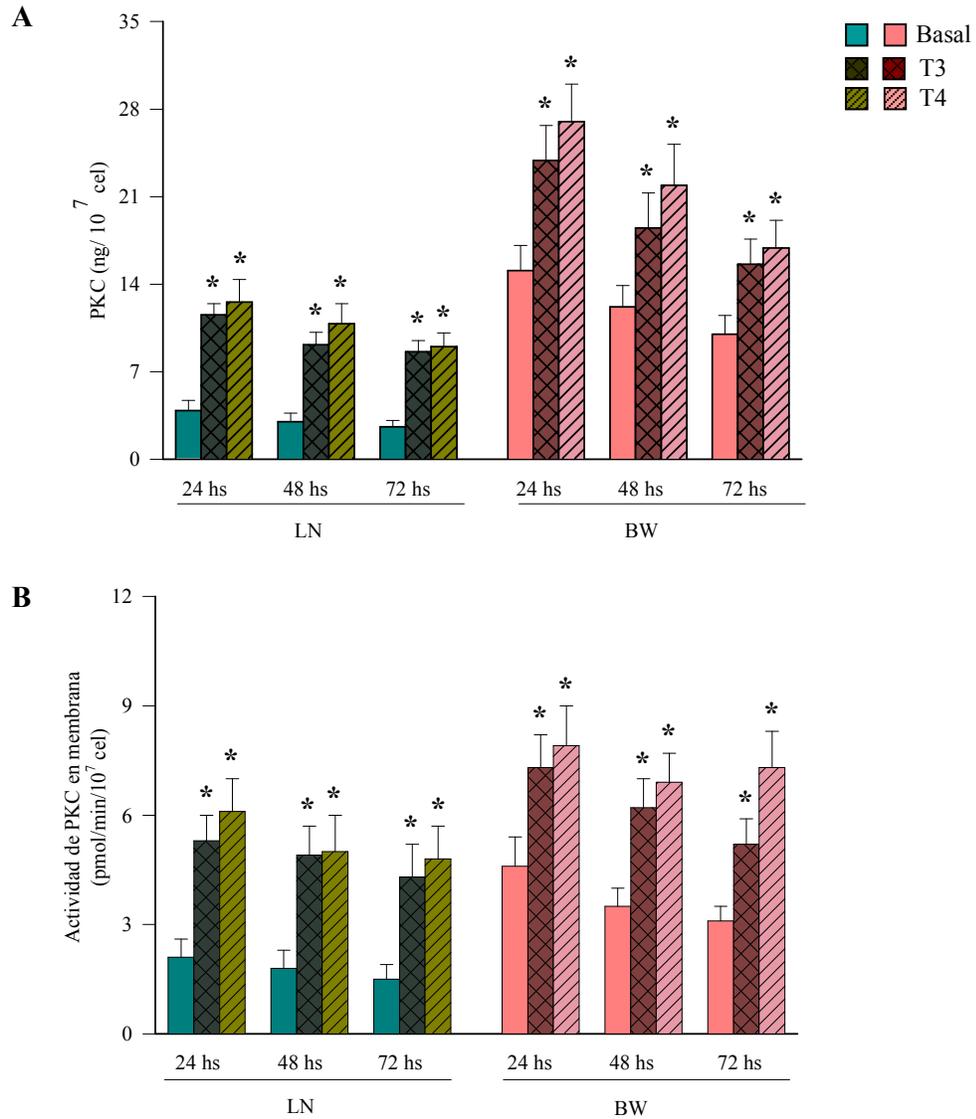
La **Figura 18** muestra que el tratamiento con HTs indujo una translocación rápida y transiente de PKC a membrana en las células BW. Dicha translocación ocurre entre los 3 a 5 minutos. Las HTs no fueron capaces de inducir este evento temprano en linfocitos T normales (datos no mostrados).

Los resultados obtenidos sobre linfocitos T normales indican que si bien las HTs median un incremento en el contenido total de PKC y en la actividad asociada a membrana, esto no es suficiente para estimular la proliferación celular en ausencia del estímulo adicional del mitógeno, dado que las HTs no son capaces de estimular la proliferación de las células normales en reposo. De hecho la Con A fue capaz de inducir una translocación mayor de la actividad de PKC a la fracción particulada en células previamente incubadas por 24-48 hs en presencia de T3 que la observada sobre células mantenidas en ausencia de la hormona (**Tabla 1**). Estos resultados son concordantes con lo observado en la **Figura 17**, e indicarían que como respuesta al tratamiento con HTs, habría un aumento en la síntesis proteica de PKC la cuál explicaría la mayor translocación inducida por el estímulo mitogénico.

Por otra parte, en los linfocitos T tumorales, las HTs inducen una translocación rápida de PKC a la membrana celular, así como también un aumento en el contenido de PKC y de su actividad asociada a membrana, efectos que estarían relacionados con el crecimiento celular, no siendo necesario un estímulo adicional para estimular la proliferación.

## 5. RESULTADOS

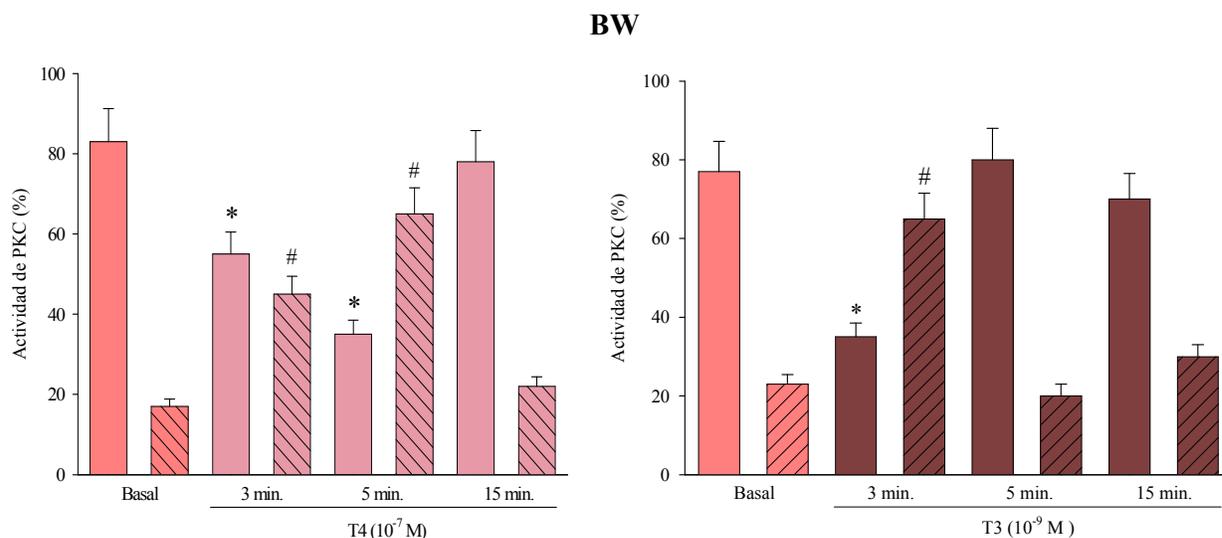
**Figura 17: Efecto de las HTs sobre el contenido total y la actividad de PKC asociada a membrana en linfocitos T normales y células BW.**



El contenido total de PKC (**Panel A**) y su actividad asociada a membrana (**Panel B**) fueron cuantificadas en linfocitos T normales (LN) y en células BW 5147 sincronizadas (BW), cultivados en ausencia (Basal) o presencia de T3 ( $10^{-9}$  M) o T4 ( $10^{-7}$  M) por los tiempos indicados. Los datos mostrados representan la media  $\pm$  ES de n = 3 experimentos realizados por duplicado. \*Difieren significativamente de los correspondientes valores basales con  $p < 0.01$ .

## 5. RESULTADOS

**Figura 18: Efecto de HTs sobre la traslocación de PKC a membrana en las células**



Células BW sincronizadas se cultivaron en ausencia (Basal) o presencia de T4 ( $10^{-7}$  M) o T3 ( $10^{-9}$  M) por los tiempos indicados y se cuantificó la actividad de PKC en citosol (barras lisas) y membrana (barras rayadas). Se muestra la media  $\pm$  ES de n = 3 experimentos realizados por duplicado. \*Difieren significativamente del basal de citosol. #Difieren significativamente del basal de membrana.

**Tabla 1: Efecto de T3 sobre la actividad de PKC en linfocitos T normales inducidos mitogénicamente**

Tiempo	Tratamiento	Adición	Actividad de PKC (pmol/min/ $10^7$ cel)		PKC en Membrana (% de actividad total)
			Citosol	Membrana	
24 hs	Basal	---	14.1 $\pm$ 0.9	2.4 $\pm$ 0.3	14.5 $\pm$ 1.5
		Con A	7.1 $\pm$ 0.4	9.9 $\pm$ 0.7	58.2 $\pm$ 4.1*
	T3	---	46.4 $\pm$ 3.2	7.1 $\pm$ 0.6	13.2 $\pm$ 1.1
		Con A	14.4 $\pm$ 0.7	40.6 $\pm$ 3.1	75.9 $\pm$ 6.0*#
48 hs	Basal	---	8.9 $\pm$ 0.8	1.5 $\pm$ 0.1	14.4 $\pm$ 0.7
		Con A	4.1 $\pm$ 0.3	6.7 $\pm$ 0.4	62.0 $\pm$ 4.7*
	T3	---	27.6 $\pm$ 2.5	4.4 $\pm$ 0.5	13.8 $\pm$ 1.0
		Con A	6.1 $\pm$ 0.5	26.4 $\pm$ 1.8	78.8 $\pm$ 6.2*#

Linfocitos T normales fueron preincubados en ausencia (Basal) o presencia de T3 ( $10^{-9}$  M) por 24 o 48 hs y estimulados por 15 min con Con A (2  $\mu$ g/ml). Se cuantificó la actividad de PKC en las fracciones citosólica y particulada y se calculó el porcentaje de actividad de PKC en membrana a partir de la actividad total (citosol + membrana). Los resultados representan la media  $\pm$  ES de n = 3 experimentos realizados por duplicado. \*Difieren del correspondiente control (sin Con A) con  $p < 0.01$ . #Difieren de la translocación inducida por Con A en células no tratadas con T3 con  $p < 0.05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.2.3.2 Las hormonas tiroideas inducen la modulación diferencial de isoenzimas de PKC en linfocitos T normales y tumorales.

Para caracterizar la participación diferencial de isoenzimas de PKC en las acciones de HTs sobre linfocitos T normales y células BW 5147, analizamos su patrón de expresión proteico y genómico. Para ello, linfocitos T normales estimulados mitogénicamente con Con A y células BW 5147 sincronizadas, fueron cultivados por 72 y 24 hs respectivamente, en ausencia o presencia de T3 o T4 y luego los extractos proteicos de ambos tipos celulares fueron analizados por western blot con anticuerpos específicos para las isoenzimas de PKC. Adicionalmente, a partir de ARN total purificado de ambos tipos celulares cultivados en las condiciones mencionadas anteriormente, realizamos ensayos de RT-PCR con primers específicos para las distintas isoenzimas de PKC.

Como se muestra en la **Figura 19 (A y B)**, ambas hormonas son capaces de incrementar el nivel proteico de las distintas isoenzimas de PKC en células T tumorales y comparativamente en linfocitos T normales, sin modificar el patrón de expresión normalmente hallado en ausencia de HTs. Así, sobre los linfocitos T normales, las HTs aumentaron la expresión de las isoformas convencionales  $\alpha$  y  $\beta$ , mientras que en las células tumorales incrementaron únicamente la expresión de la isoforma atípica PKC $\zeta$ .

Cabe señalar que el tratamiento con HTs no produjo cambios en la expresión de otras isoenzimas ( $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\theta$ ), ni indujo la expresión proteica de la isoenzima PKC $\gamma$ , ausente en ambos tipos celulares (datos no mostrados).

Como puede observarse en la **Figura 19 (C y D)**, las HTs también incrementaron los niveles de expresión del ARN mensajero de las isoenzimas PKC $\alpha$  y PKC $\zeta$ , en los linfocitos T normales y tumorales, respectivamente. También las HTs fueron capaces de aumentar la expresión del ARNm de la isoenzima PKC $\beta$  en las células normales (datos no mostrados).

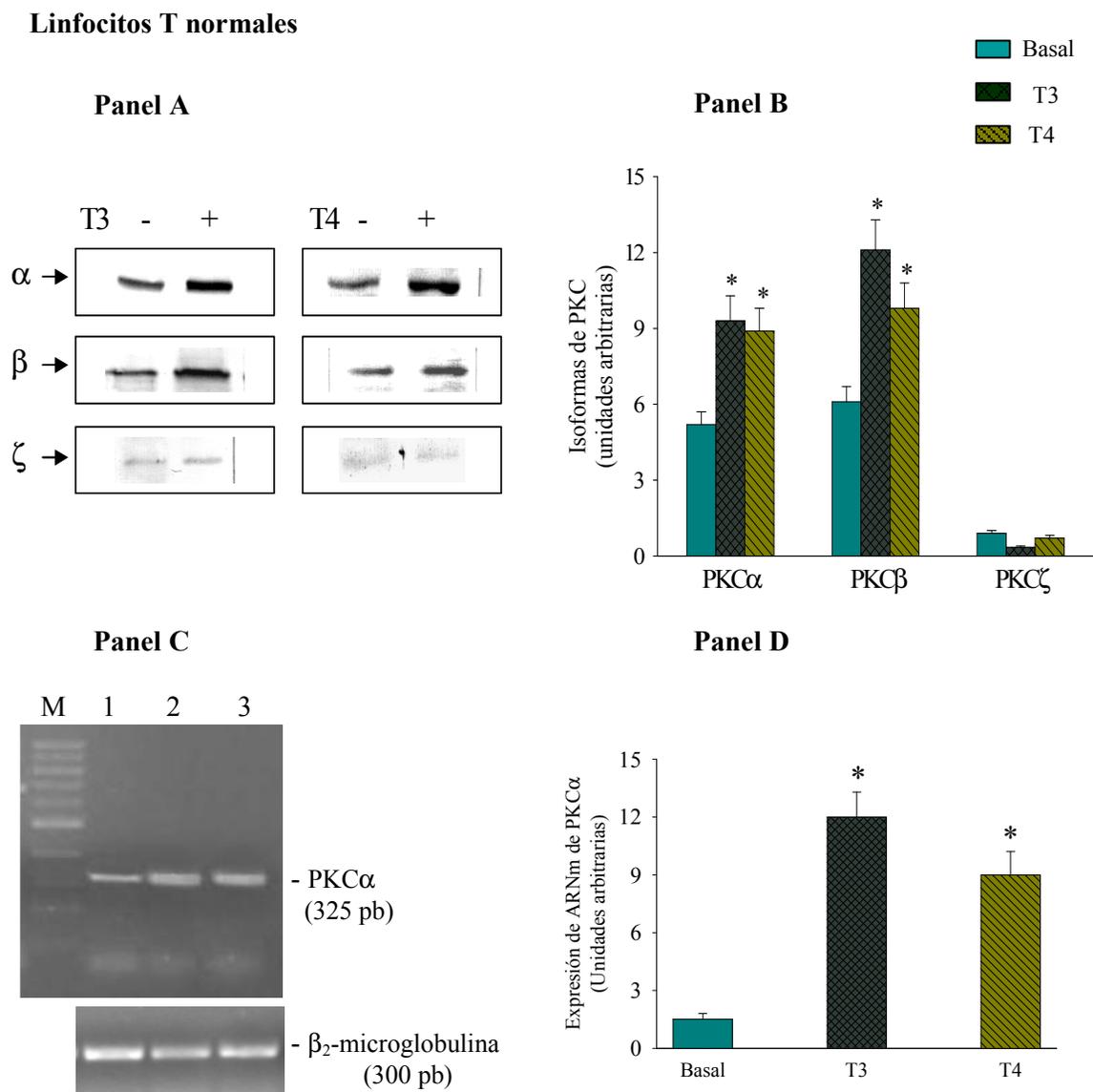
### 5.2.4 Estimulación de la actividad de NOS en células BW 5147 mediada por HTs.

La actividad de NOS es crucial para la proliferación de células BW y ocurre río abajo de PKC, por el contrario, los linfocitos T normales presentan una actividad de NOS casi indetectable. Teniendo esto presente, quisimos estudiar si las HTs eran capaces de modular la actividad enzimática de NOS en las células BW y si podían incrementar los niveles mínimos presentes en los linfocitos T normales.

## 5. RESULTADOS

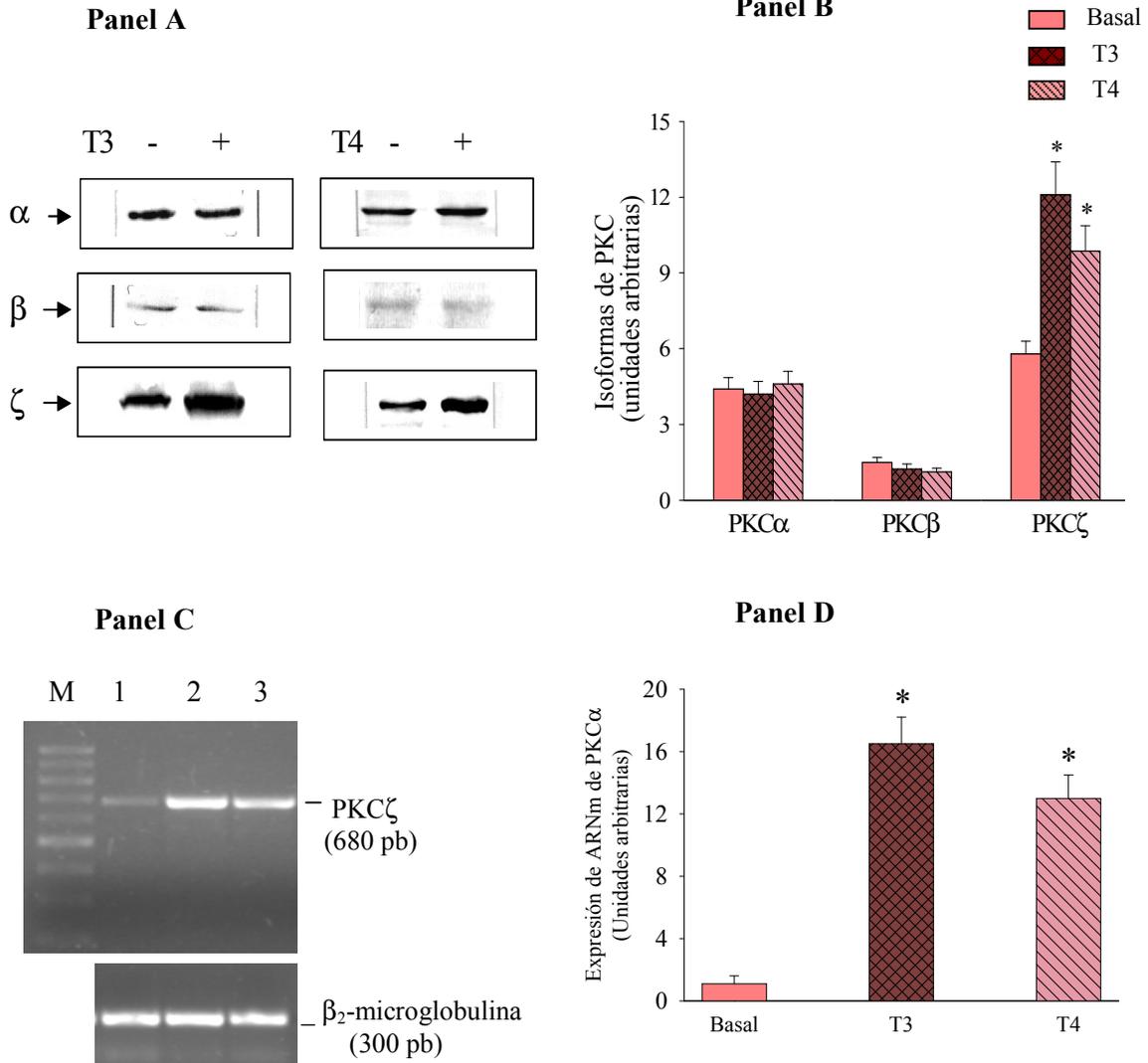
Como se muestra en la **Figura 20**, en las células BW, el tratamiento por 24 o 48 hs con HTs, produjo un aumento de la actividad enzimática de NOS mayor al 50 %. Este incremento en la formación de [<sup>14</sup>C]-citrulina a partir de [<sup>14</sup>C]-arginina no fue mediado por arginasas, ya que las mediciones efectuadas en presencia (**Figura 20**) o ausencia (datos no mostrados) de L-valina, arrojaron valores similares. Sobre las células T normales en reposo o estimuladas mitogénicamente, las HTs no fueron capaces de incrementar la actividad enzimática de NOS.

**Figura 19: Efecto de las HTs sobre la expresión de isoenzimas de PKC en linfocitos T normales y células BW**



## 5. RESULTADOS

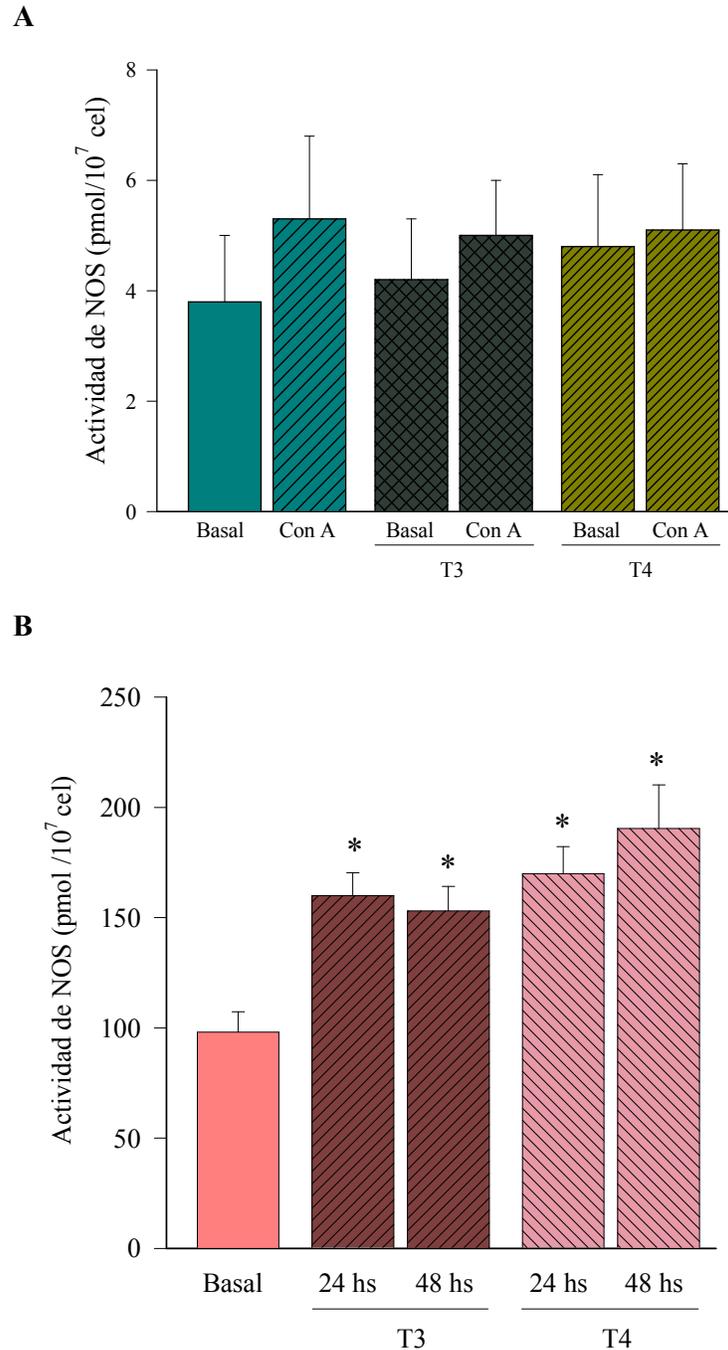
### Células BW 5147



**Panel A:** Análisis por Western-blot de isoenzimas de PKC expresadas en linfocitos T normales estimulados con Con A y células BW5147 sincronizadas, cultivadas en ausencia (-) o presencia (+) de T3 ( $10^{-9}$  M) o T4 ( $10^{-7}$  M), por 72 o 24 hs, respectivamente. La especificidad de los anticuerpos anti-PKC fue verificada por la preincubación de cada anticuerpo con el correspondiente péptido bloqueante (datos no mostrados). Los resultados son representativos de  $n = 4$  experimentos independientes. **Panel B:** Análisis densitométricos (en unidades arbitrarias) de las bandas obtenidas relativizadas a los valores correspondientes de  $\beta_2$ -microglobulina usada como control de la carga de proteína en el gel. \*Difieren significativamente de sus correspondientes basales con  $p < 0.05$ . **Panel C:** Análisis por RT-PCR de la expresión de los ARN mensajeros de PKC $\alpha$  para linfocitos T normales y de PKC $\zeta$  para células BW, cultivados como se indicó arriba, en ausencia (**calle 1**) o presencia de T3 (**calle 2**) o de T4 (**calle 3**). Los resultados son representativos de  $n = 5$  experimentos independientes. **Panel D:** Análisis densitométricos de las bandas obtenidas relativizadas a los valores correspondientes de  $\beta_2$ -microglobulina usada como “housekeeping” \*Difieren significativamente de sus correspondientes basales con  $p < 0.05$ .

## 5. RESULTADOS

**Figura 20: Efecto de las HTs sobre la actividad enzimática de NOS en linfocitos T normales y células BW.**



**Panel A:** Cuantificación de la actividad enzimática de NOS en linfocitos T normales en reposo (Basal) o estimulados mitogénicamente con Con A (2 µg/ml) por 72 hs, en ausencia o presencia de T3 ( $10^{-9}$  M) o T4 ( $10^{-7}$  M). **Panel B:** Determinación de la actividad de NOS en células BW cultivadas en ausencia (Basal) o presencia de T3 o T4 por 24 o 48 hs. Los resultados obtenidos son el promedio  $\pm$  ES de n = 4 experimentos independientes realizados por duplicado. \*Difieren de sus correspondientes valores basales con  $p < 0.01$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.2.5 Las HTs ejercen la modulación de la actividad de NOS a través de la isoenzima $\zeta$ de PKC.

#### 5.2.5.1 Efecto sobre la actividad enzimática

De acuerdo a los resultados obtenidos en el ítem 3.1.10 que indican que en las células BW, la isoforma atípica PKC $\zeta$  está asociada a la regulación de la expresión y actividad de NOS. Se analizó entonces si esta isoforma era capaz de regular la actividad de NOS inducida por HTs. En la **Tabla 2** se muestra que el bloqueo de PKC por staurosporina o por GF109203X a una concentración 10  $\mu$ M, pero no de 0.1  $\mu$ M, fue capaz de inhibir tanto los niveles basales de NOS como el incremento mediado por T4. Similares resultados se obtuvieron con T3.

Adicionalmente, la introducción a las células de un anticuerpo anti-PKC $\zeta$ , pero no la de un anticuerpo irrelevante anti-PKC $\gamma$  empleado como control de la permeabilización, así como también el péptido Ps-Myr PKC $\zeta$ , fueron capaces de inhibir los niveles basales y la estimulación de la actividad de NOS mediada por HTs (**Tabla 2**). Es importante señalar que el Ps-MyrPKC $\zeta$  fue capaz de inhibir la proliferación basal ( $87.5 \pm 8$  %) y la inducida por HTs en las células BW 5147 ( $87 \pm 9$  y  $95 \pm 8$  % de inhibición para T3 y T4 respectivamente).

#### 5.2.5.2 Efecto sobre expresión proteica y genómica de la isoforma inducible de NOS

En base a los resultados anteriores y a la relación encontrada entre la expresión de iNOS y la proliferación de las células BW, se estudió la expresión proteica y genómica de esta isoforma así como su relación con la isoforma  $\zeta$  de PKC. Para ello, se cultivaron las células BW, en ausencia o presencia de T4, y se analizó la expresión proteica de la isoforma iNOS en estas condiciones. Adicionalmente se extrajeron los ARN totales y se analizó por RT-PCR la expresión de los ARN mensajeros para dicha isoforma. En la **Figura 21 (Panel A y B)** se observa que el tratamiento con T4 por 24 hs indujo un incremento en la expresión de la isoforma iNOS de aproximadamente un 50 %. Similares resultados se obtuvieron cuando las células BW fueron incubadas por 24 hs en presencia de T3 (datos no mostrados). En la **Figura 21 (Panel C y D)** se observa que el tratamiento con T4 en las células BW 5147, indujo un significativo incremento en los niveles transcripcionales de iNOS. Dicho aumento es dependiente de la actividad enzimática de PKC, dado que la preincubación de las células BW tanto con el bloqueante de PKC staurosporina (1 nM, datos no mostrados), como con el

## 5. RESULTADOS

inhibidor selectivo de PKC $\zeta$ , el Ps-Myr PKC $\zeta$ , disminuyó la expresión del ARN mensajero de iNOS en las células tumorales cultivadas en ausencia o presencia de T4 (**Panel D**).

**Tabla 2: Efecto del bloqueo de la actividad enzimática de PKC sobre la actividad de NOS inducida por T4**

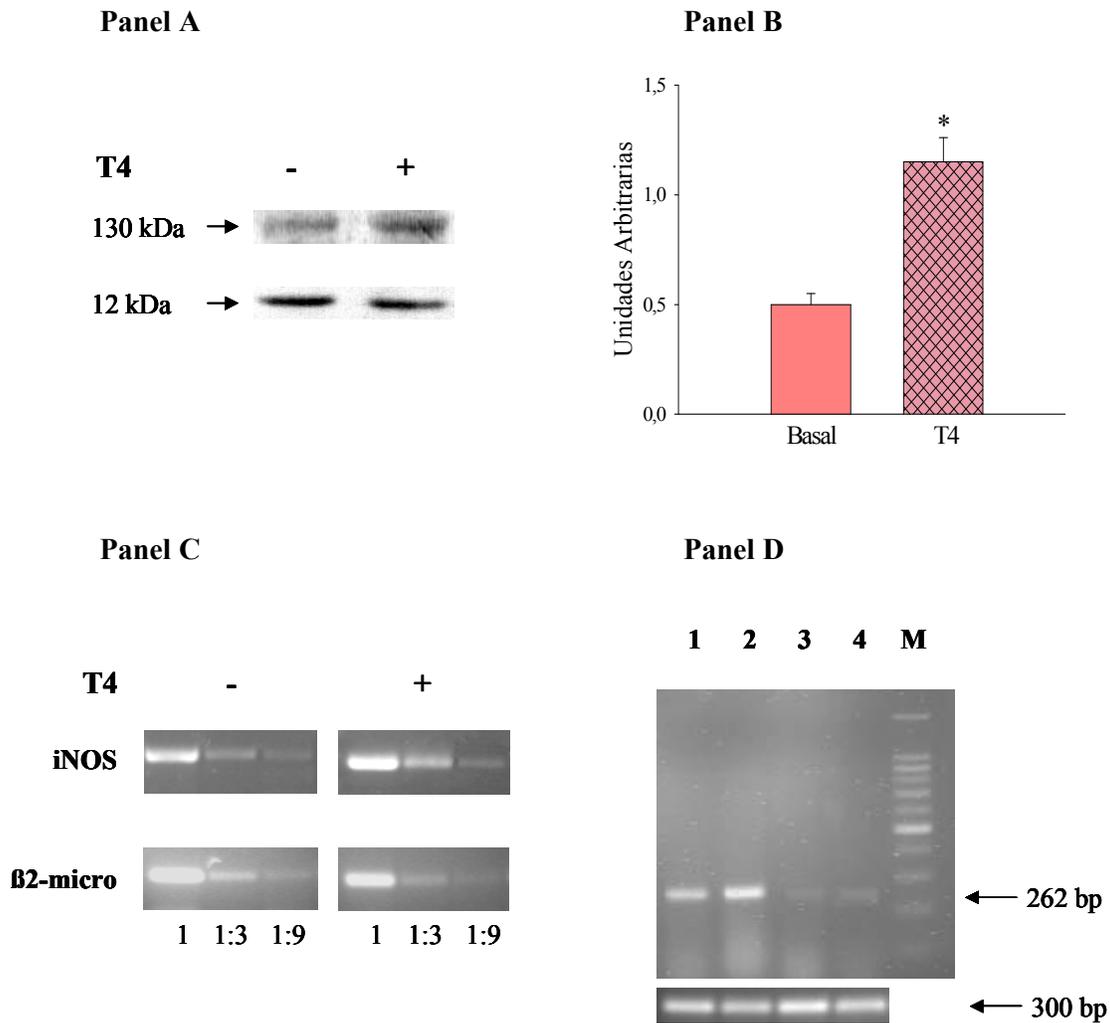
Tratamiento <sup>a</sup>	Actividad de NOS (pmol/10 <sup>7</sup> cel) <sup>b</sup>	
	Basal	Presencia de T4
Ninguno (Control)	95 ± 8	147 ± 15 *
STAU	33 ± 3 #	42 ± 3 #
GF 0.1 μM	86 ± 8	132 ± 12 *
GF 10 μM	31 ± 4 #	46 ± 5 #
Anti-PKC $\zeta$	40 ± 4 #	49 ± 5 #
Anti-PKC $\gamma$	114 ± 10	165 ± 15 *
Ps-MyrPKC $\zeta$	47 ± 5 #	54 ± 6 #

<sup>a</sup> Las células BW 5147 fueron cultivadas en ausencia (Basal) o presencia de T4 (10<sup>-7</sup> M) por 24 hs. Los siguientes bloqueantes de PKC fueron agregados a los cultivos 90 minutos antes de la adición de T4: staurosporina (STAU, 1 nM), GF109203X (GF, 0.1 o 10 μM) y el pseudosustrato miristoilado de PKC $\zeta$  ( Ps-MyrPKC $\zeta$ , 100 μM). Además las células fueron permeabilizadas y tratadas con una dilución 1:100 de los anticuerpos anti-PKC $\zeta$  o anti-PKC $\gamma$  como se indica en Materiales y Metodos.

<sup>b</sup>La actividad de NOS fue cuantificada al final de la incubación en presencia del bloqueante de arginasas L-valina (50 mM). Los resultados que se muestran son el promedio ± ES de n = 3 experimentos independientes. \*Difieren de los correspondientes valores basales (en ausencia de T4) con p < 0.01. # Difiere significativamente de los correspondientes valores controles con p < 0.01.

## 5. RESULTADOS

**Figura 21: Regulación por T4 de la expresión proteica y genómica de iNOS. Efecto del bloqueo de PKC $\zeta$**



**Panel A:** Análisis por Western-blot de la isoforma inducible de NOS en células BW cultivadas por 24 hs en ausencia (-) o presencia (+) de T4 ( $10^{-7}$  M). La especificidad del anticuerpo anti-iNOS, que reveló una banda de 130 kDa, fue verificada por la preincubación del mismo con su correspondiente péptido bloqueante (datos no mostrados). Como control de la cantidad de proteína sembrada, se revelaron las mismas muestras con un anticuerpo anti  $\beta_2$ -microglobulina que reveló una banda de 12 kDa. **Panel B:** Análisis densitométrico en unidades arbitrarias de los niveles de expresión de iNOS relativizados a los valores de  $\beta_2$ -microglobulina correspondientes. Los resultados son representativos de n = 4 experimentos independientes. \*Difiere significativamente del basal con p < 0.001. **Panel C:** Se midieron los niveles de ARNm de iNOS y de  $\beta_2$ -microglobulina en células BW cultivadas en ausencia (-) o presencia (+) de T4 por RT-PCR semicuantitativa con 3 diluciones seriadas del templado de ADN. Los resultados mostrados son representativos de n = 3 experimentos independientes. **Panel D:** Determinación de los ARNm para iNOS en células BW cultivadas en ausencia (calles 1 y 3) o presencia (calles 2 y 4) de T4 o en presencia del bloqueante de PKC $\zeta$ , el Ps-Myr PKC $\zeta$  (100  $\mu$ M) (calles 3 y 4). M: marcador de peso molecular. Los resultados mostrados son representativos de n = 3 experimentos independientes. Las bandas de 262 pb y 300 pb de longitud corresponden a la isoforma iNOS y a la  $\beta_2$ -microglobulina respectivamente.

## 5. RESULTADOS

### 5.2.6 La PKC $\zeta$ induce la expresión y activación de iNOS a través de la vía de señalización del NF- $\kappa$ B

Con el fin de profundizar los conocimientos sobre los mecanismos de señalización mediados por HTs que conducen a la expresión y activación de iNOS vía PKC $\zeta$ , se estudió la posible participación del factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B en dicho camino de señalización. Para ello, se analizó la acción de la sulfasalazina (20  $\mu$ M), un inhibidor de la quinasa responsable de la fosforilación del I $\kappa$ -B, sobre la proliferación y la actividad de NOS en las células BW tratadas con T4. Como se observa en la **Figura 22 (Panel A y B)**, la sulfasalazina inhibió tanto la proliferación de las células tumorales como la actividad de NOS en las mismas, demostrando indirectamente la posible activación del NF- $\kappa$ B en las vías de señalización inducidas por HTs y su implicancia en las acciones biológicas inducidas por dichas hormonas. Adicionalmente evaluamos la activación de NF- $\kappa$ B mediada por HTs y la participación de la PKC $\zeta$  en estos efectos. Para ello estudiamos la translocación al núcleo del NF- $\kappa$ B y la presencia de su inhibidor en citoplasma por ensayos de EMSA y western blot respectivamente, en linfocitos T tumorales sincronizados y preincubados 45 minutos en ausencia o presencia de staurosporina (1nM) o del Ps-Myr PKC $\zeta$  (100  $\mu$ M) y posteriormente tratados con T4 por 15 minutos. En la **Figura 23 (Panel A y B)** se observa que ambos inhibidores disminuyeron la translocación del NF- $\kappa$ B al núcleo inducida por el tratamiento con T4.

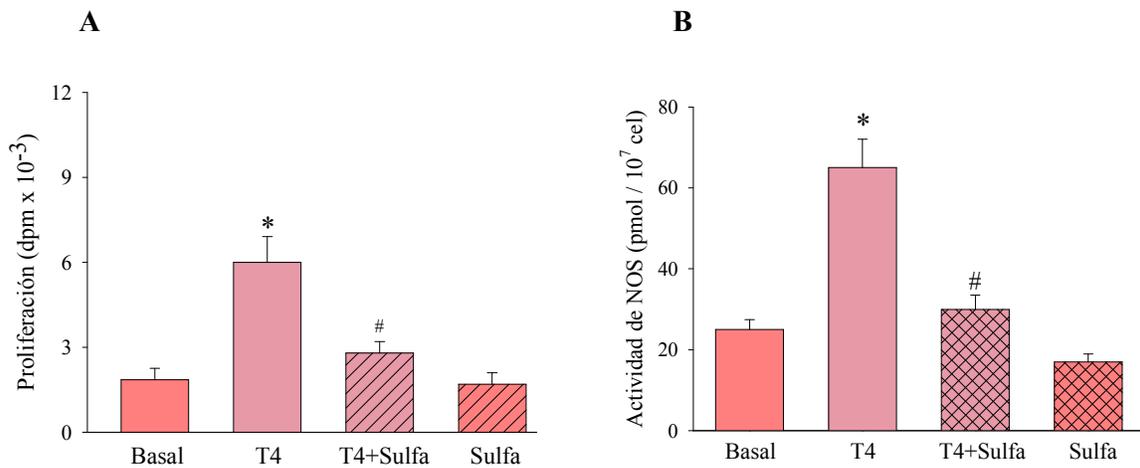
### 5.2.7 Activación por HTs de la fosfatidil inositol-3-quinasa (PI3-K) río arriba de PKC $\zeta$

A fin de analizar las señales intracelulares involucradas río arriba de PKC $\zeta$  en los efectos de HTs se estudió la posible participación de la enzima fosfatidil inositol-3-quinasa (PI3-K). Para ello se evaluó la acción de la wortmanina, un bloqueante de PI3-K sobre los efectos inducidos por HTs en las células BW. La wortmanina (1  $\mu$ M) inhibió la proliferación y la actividad de NOS de células BW cultivadas por 24 hs en presencia de T4. (**Figura 24**). Es importante señalar que la wortmanina en las concentraciones utilizadas fue capaz de inhibir la actividad de PKC en un  $78 \pm 9$  %.

Estos resultados indican que la vía de señalización implicada en la activación de iNOS a través de PKC $\zeta$ , involucra: “up-stream” PKC $\zeta$  a la PI3-K y “down-stream” PKC $\zeta$  a la activación del NF- $\kappa$ B.

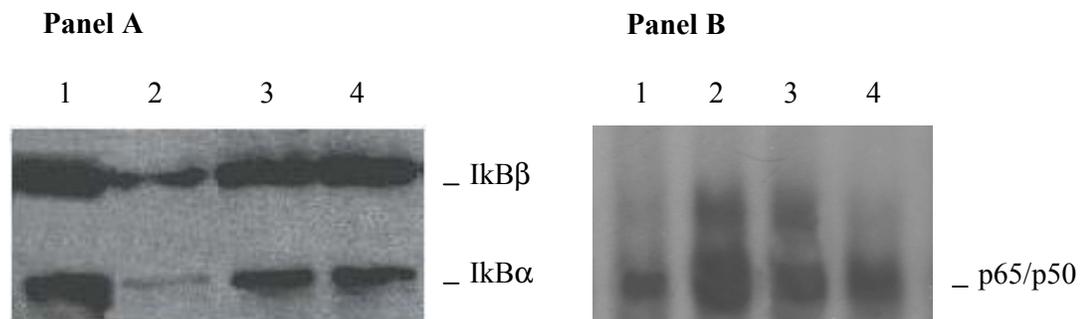
## 5. RESULTADOS

**Figura 22: Efecto de la sulfasalazina sobre la proliferación y la actividad de NOS inducida por T4 en las células BW**



**Panel A:** Cuantificación de la proliferación en células BW sincronizadas, preincubadas con sulfasalazina y cultivadas por 24 hs en ausencia (Basal) o presencia de T4. Los resultados que se muestran son el promedio  $\pm$  ES de  $n = 3$  experimentos realizados por triplicado. **Panel B:** La actividad de NOS fue evaluada en los cultivos descritos anteriormente en presencia de L-Valina (50 mM). Los resultados que se muestran son el promedio  $\pm$  ES de  $n = 3$  experimentos independientes. \*Difiere significativamente del correspondiente basal con  $p < 0.01$ . # Difiere significativamente de las células tratadas con T4 en ausencia de inhibidor con  $p < 0.01$ .

**Figura 23: Efecto de bloqueantes de PKC sobre la activación de NF $\kappa$ -B mediada por T4**

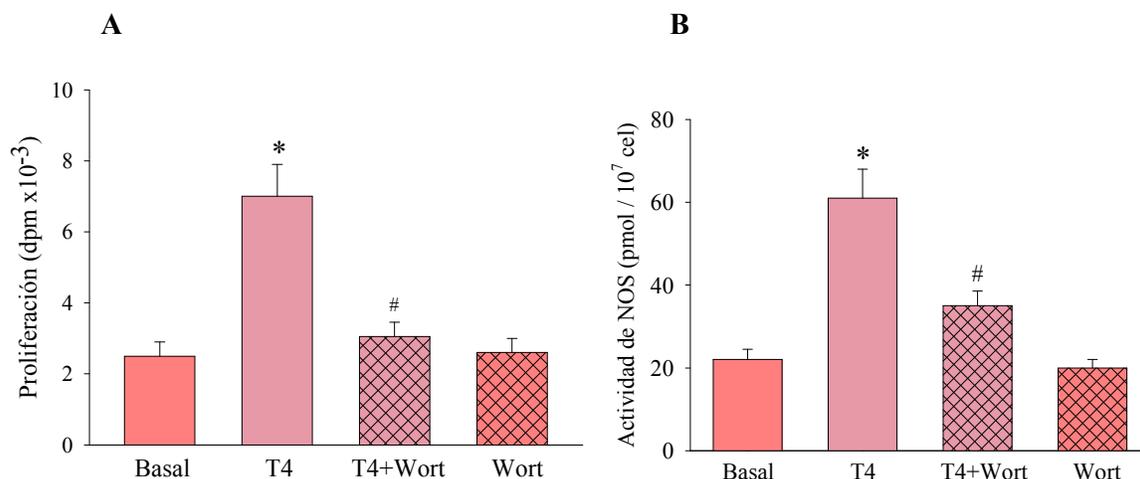


**Panel A:** Extractos citosólicos de células BW sincronizadas, basal (**calle 1**), incubadas por 15 min con T4 (**calle 2**), preincubadas con staurosporina (1nM) o con el PS Myr -PKC  $\zeta$  (100  $\mu$ M) y luego con T4 (**calles 3 y 4 respectivamente**) se analizaron por Western Blot usando anticuerpos específicos para las isoformas IκB $\alpha$  e IκB $\beta$

**Panel B:** Evaluación de la traslocación nuclear del NF- $\kappa$ B por EMSA a partir de extractos nucleares de las células BW5147 sometidos a los tratamientos mencionados. Los resultados mostrados son representativos de  $n = 4$  ensayos realizados en forma independiente.

## 5. RESULTADOS

**Figura 24: Efecto del bloqueo de PI3-K sobre la proliferación celular y la actividad de NOS inducida por T4**



**Panel A:** Evaluación de la proliferación de células BW sincronizadas preincubadas con wortmanina y cultivadas por 24 hs en ausencia (Basal) o presencia de T4. Los resultados que se muestran son el promedio  $\pm$  ES de  $n = 3$  experimentos realizados por triplicado. **Panel B:** La actividad de NOS fue determinada en los cultivos descritos anteriormente en presencia de L-Valina (50 mM). Los resultados que se muestran son el promedio  $\pm$  ES de  $n = 3$  experimentos independientes.

\*Difiere significativamente del correspondiente basal con  $p < 0.01$ . # Difiere significativamente de las células tratadas con T4 en ausencia de inhibidor con  $p < 0.01$ .

### 5.3 Acción de las hormonas tiroideas sobre las células BW 5147 a tiempos prolongados de cultivo.

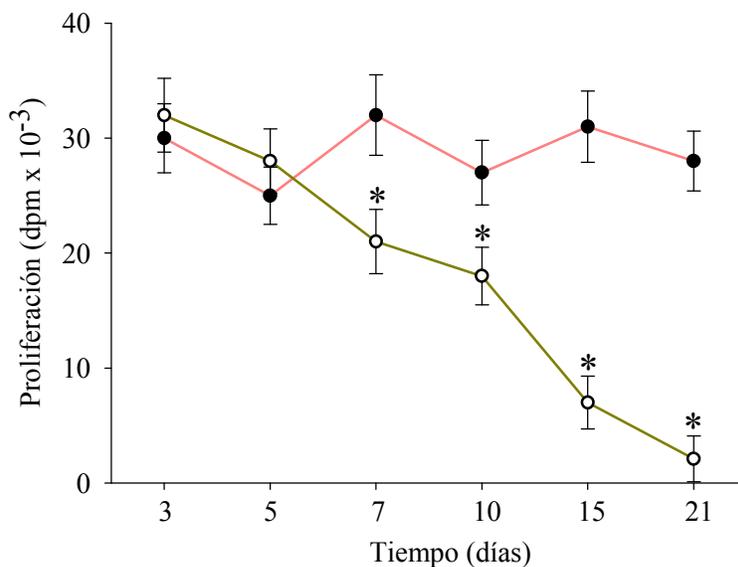
#### 5.3.1 Efectos sobre la proliferación celular e inducción de apoptosis

Como fuera descrito anteriormente, el tratamiento por 24 - 72 hs con HTs induce en las células BW, un incremento de la proliferación celular. Sin embargo, el cultivo de dichas células a tiempos mayores o iguales a 7 días, lleva a la inhibición del crecimiento celular. Como se observa en la **Figura 25**, a partir de los 7 días de cultivo con T4, las células muestran una disminución significativa de la proliferación que se hace máxima a los 15 días de cultivo. En base a estos resultados y a la morfología celular alterada que presentaban los cultivos en presencia de T4 a tiempos prolongados, se analizó por microscopía de fluorescencia la morfología nuclear mediante tinción con Hoescht. Como puede observarse en la **Figura 26 (Panel A)**, las células cultivadas por tiempos mayores a 7 días presentan una

## 5. RESULTADOS

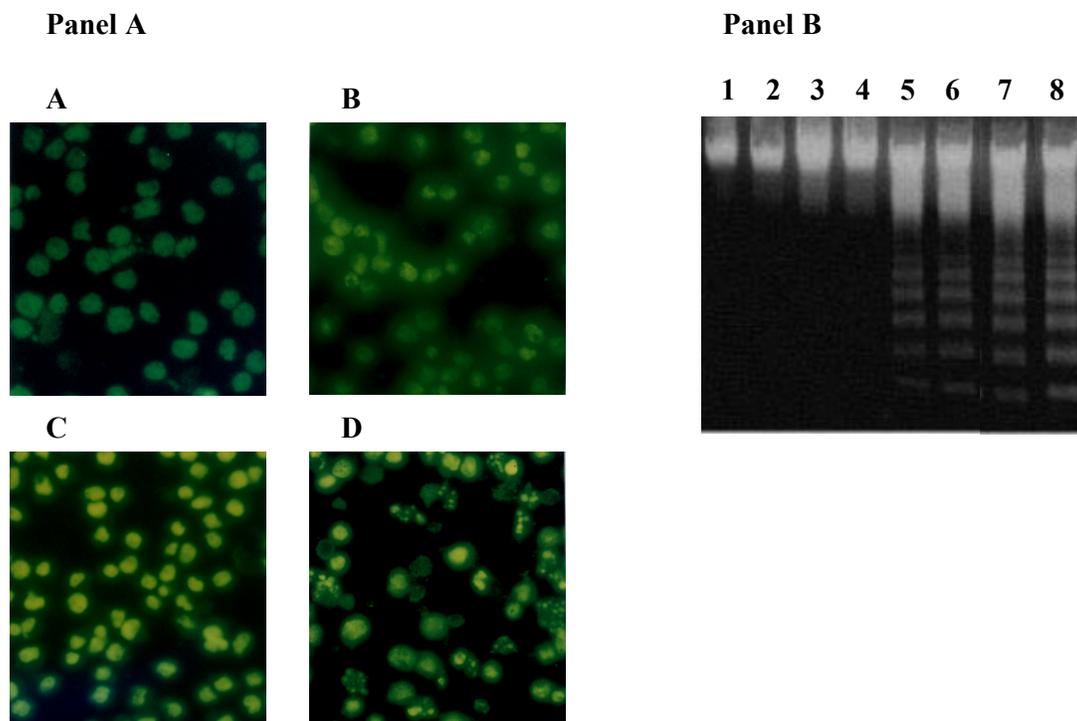
morfología nuclear compatible con el proceso apoptótico, es decir, presencia de cromatina nuclear condensada, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos. Este mecanismo fue confirmado mediante estudios de fragmentación de ADN (técnica de “DNA ladder”). En la **Figura 26 (Panel B)** se puede observar que a partir del día 7 de tratamiento con T4 las células sufren la fragmentación de su ADN nuclear característica de la muerte celular por apoptosis. Estas observaciones se correlacionan con la inhibición de la proliferación celular descrita anteriormente. Cabe señalar al día 20 de cultivo las células presentaban un porcentaje de viabilidad menor al 10%.

**Figura 25: Acción de las hormonas tiroideas sobre la proliferación de células BW a tiempos prolongados de cultivo**



Evaluación de la proliferación de células BW en crecimiento exponencial, cultivadas en ausencia (línea roja, círculos llenos) o presencia de T4 (línea verde, círculos vacíos) por los tiempos indicados. Los resultados representan el promedio  $\pm$  ES de  $n = 3$  experimentos realizados por triplicado. \*Difieren significativamente de los correspondiente basales con  $p < 0.01$ .

**Figura 26: Inducción de la apoptosis en células BW cultivadas en presencia de T4 por tiempos prolongados**



**Panel A:** Morfología nuclear de células BW incubadas en ausencia, basal (A) o presencia de T4 ( $10^{-7}$  M) por 7 días (B), 15 días (C) o 21 días (D) y posteriormente teñidas con Hoescht. Las microscopías de fluorescencia mostradas son representativas de  $n = 4$  ensayos independientes. Aumento 1000X  
**Panel B:** Análisis de la fragmentación del ADN nuclear en células BW cultivadas en ausencia (calle 1) o presencia de T4 ( $10^{-7}$  M) por 1, 2, 3, 5, 7, 15 y 21 días (calles 2 a 8 respectivamente). La electroforesis en gel de agarosa mostrada es representativa de  $n = 3$  experimentos independientes.

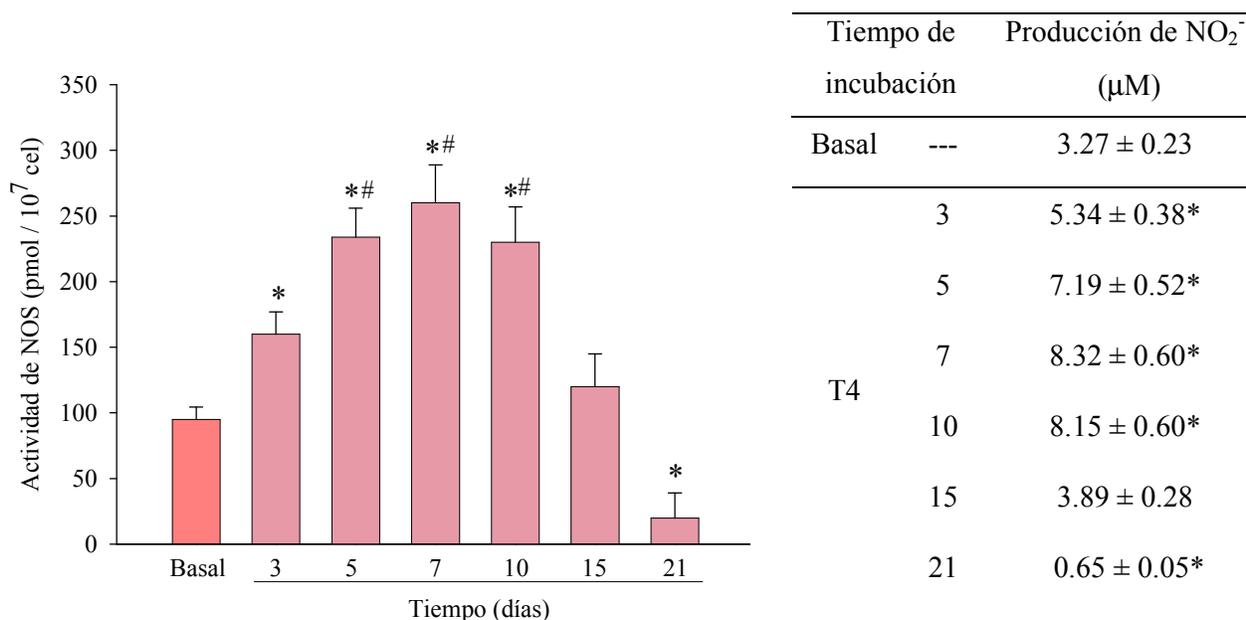
### 5.3.2 Modulación de la actividad de NOS en las células BW mediada por el tratamiento prolongado con HTs

Para estudiar el efecto dual de las HTs sobre la proliferación celular a tiempos cortos versus prolongados de cultivo y profundizar los mecanismos por los cuales el tratamiento prolongado con HTs induce un proceso apoptótico, analizamos la actividad de NOS. Como señalamos anteriormente (Figura 20, Panel B), el tratamiento con HTs por 24 - 48 hs, induce un aumento de la actividad de NOS, pero el cultivo con T4 por tiempos prolongados mostró un fuerte incremento entre los 5 y 10 días de cultivo, significativamente mayor al

## 5. RESULTADOS

inducido por HTs a tiempos cortos de cultivo (**Figura 27**). Similares resultados fueron observados cuando se evaluó la producción de nitritos (**Tabla en Figura 27**). A tiempos mayores, estos valores decaen acompañando la pérdida significativa de células viables, hasta alcanzar al día 21 de cultivo, cuando hay un porcentaje de viabilidad inferior al 10%, valores por debajo del control.

**Figura 27: Efecto del tratamiento prolongado con HTs sobre la actividad de NOS y la producción de nitritos.**



Cuantificación de la actividad de NOS en células BW en crecimiento exponencial, cultivadas en ausencia (Basal) o presencia de T4 por los tiempos indicados. Los resultados obtenidos son representativos de n = 4 experimentos independientes realizados por duplicado. \*Difieren del valor basal con p<0.01. #Difieren del tratamiento por 3 días con T4 con p<0.01. La producción de nitritos en los sobrenadantes de estos cultivos se muestra en la tabla adjunta. Los resultados mostrados son el promedio ± ES de n = 5 experimentos realizados por triplicado. \*Difiere significativamente del valor basal con p < 0.05.

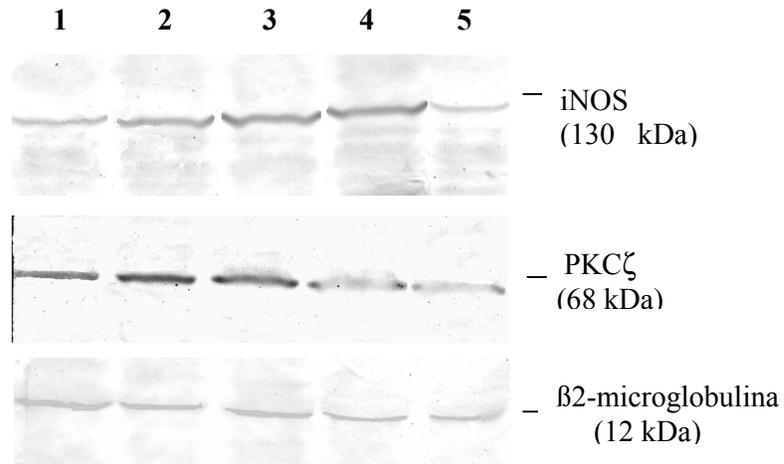
### 5.3.3 Efecto sobre la expresión proteica y genómica de iNOS y de PKCζ

Dada la estrecha relación entre las actividades de PKCζ e iNOS demostrada anteriormente y considerando que el tratamiento prolongado con T4 indujo un marcado aumento de la actividad de NOS, se estudió la expresión proteica y genómica de ambas isoenzimas.

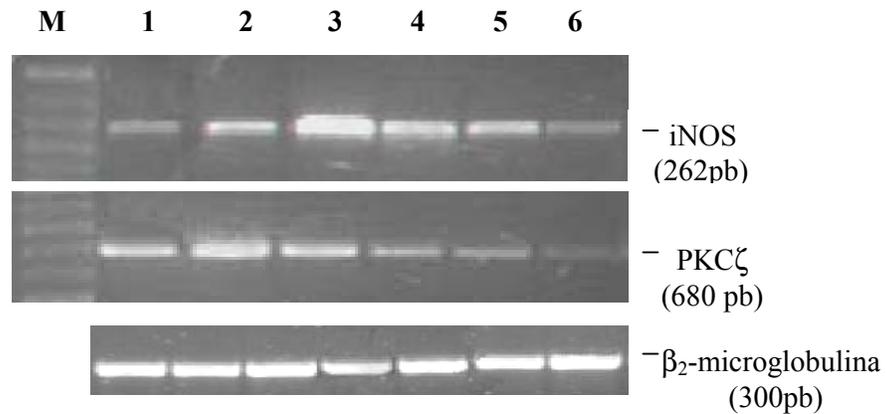
## 5. RESULTADOS

**Figura 28: Expresión proteica y genómica de iNOS y PKC $\zeta$  por el tratamiento prolongado con T4**

### Panel A



### Panel B



**Panel A:** Análisis por western blot de la expresión proteica de iNOS y PKC $\zeta$  en células BW en crecimiento exponencial, cultivadas en ausencia, basal (**calle 1**), o en presencia de T4 ( $10^{-7}$  M) por 1, 3, 7 y 15 días (**calles 2 a 5 respectivamente**). **Panel B:** Expresión genómica de iNOS y PKC $\zeta$  en células BW cultivadas en ausencia, basal (**calle 1**), o en presencia de T4 por 1, 3, 5, 7 y 15 días (**calles 2 a 6 respectivamente**). M: marcador de PM. En los paneles inferiores se muestran las correspondientes bandas de  $\beta$ 2-microglobulina. Los resultados son representativos de  $n = 4$  experimentos independientes.

## 5. RESULTADOS

Como puede observarse en la **Figura 28 (Panel A y B)** la incubación de las células BW con HTs por tiempos prolongados incrementó la expresión proteica y genómica de iNOS. Esta expresión se mantuvo elevada hasta los 7 días de cultivo para decaer al día 15 cuando comienza una franca pérdida de la viabilidad celular. Por el contrario, la expresión de PKC $\zeta$  se mantuvo elevada hasta el día 3 de cultivo, para luego disminuir considerablemente, aún a aquellos tiempos en los que se observa una alta expresión de iNOS.

## **6. DISCUSSION**

### 1. Papel diferencial de isoenzimas de PKC y NOS en la función de linfocitos T normales y tumorales:

Las actividades de PKC y NOS juegan importantes roles en la regulación de las funciones celulares. A nivel linfocitario, la PKC es una de las primeras señales bioquímicas que se pone en marcha durante la activación celular y conduce a la proliferación (Saijo y col., 2003; Baier, 2003; Lucas y col., 2004). Por su parte, la producción de NO inducida por una variedad de estímulos inmunológicos (tales como el  $TNF\alpha$ , el  $IFN\gamma$ , el LPS) en macrófagos y neutrófilos, entre otros tipos celulares, tiene acciones citotóxicas y es requerido para combatir infecciones y tumores (Liew, 1995; Lirk y col., 2002; Mori y Gotoh, 2004). Actualmente se sabe que los distintos componentes celulares del sistema inmune tienen una expresión diferencial de isoenzimas de PKC y NOS a los que se les han atribuido funciones determinadas (van der Veen, 2001; Tan y Parker, 2003). Sin embargo el rol exacto que las mismas cumplen en dichas células no ha sido aún completamente esclarecido.

Primeramente estudiamos el papel de estos caminos enzimáticos en la proliferación de células del linfoma T BW 5147 en comparación con linfocitos T normales en reposo o estimulados mitogénicamente. Las células del linfoma T murino BW exhibieron una incrementada actividad total de PKC y una mayor translocación de PKC a la membrana respecto de los valores hallados en linfocitos T normales inducidos mitogénicamente. En los linfocitos T normales se observó una disminución de la actividad de PKC en ausencia de calcio, mientras que este hecho prácticamente no modificó dicha actividad en las células BW, puntualizando en este tipo celular la prevalencia de isoformas de PKC independientes de calcio. Cabe destacar que la proliferación inducida por Con A en las células normales fue inhibida por bloqueantes de calcio (verapamil y BAPTA) que no afectaron el crecimiento de las células tumorales.

Adicionalmente, agentes bloqueantes de los caminos de señalización río arriba de PKC, tales como genisteína o NCDC que inhiben la acción de TPK y PLC respectivamente, inhibieron eficazmente la proliferación de ambos tipos celulares. Sin embargo, el GF109203X, un potente inhibidor de las isoenzimas clásicas de PKC, pero débil inhibidor de las isoformas atípicas calcio-independientes (Way y col., 2000), bloqueó eficientemente la proliferación de las células T normales a concentraciones de  $0.1 \mu M$ , mientras que inhibió la de las células tumorales a altas dosis ( $10 \mu M$ ). Estos resultados

## 6. DISCUSION

permiten inferir que las isoenzimas de PKC juegan un rol jerárquico diferencial en la activación de los linfocitos T normales y tumorales. Además la mayor translocación de PKC observada en las células BW respecto de la activación fisiológica inducida por el estímulo mitogénico en los linfocitos normales señalaría un mecanismo de transducción diferencial que contribuiría a la proliferación sostenida de las células BW. De hecho, se ha propuesto una correlación entre la actividad de PKC y la velocidad de crecimiento celular, como también un paralelismo entre la inhibición de PKC y la inducción de la diferenciación en células linfoides (Clemens y col., 1992; Baier, 2003).

Varias evidencias experimentales indican que las isoenzimas de PKC están localizadas en tejidos específicos y que las diferentes isoformas estarían relacionadas con la proliferación o diferenciación linfocitaria (Clemens y col., 1992; Saijo y col., 2003; del Rio y col., 2004). Por ende se estudió el perfil de las isoenzimas de PKC principalmente implicadas en estos procesos (Fulop y col., 1995; Cipriani y col., 2002). Se encontró que los linfocitos T normales en reposo o activados con Con A expresan las isoformas calcio dependientes  $\alpha$  y  $\beta$ , así como también la nPKC $\theta$ , y poseen niveles detectables de  $\epsilon$  y  $\zeta$ , pero no expresan la isoenzima  $\gamma$ . En concordancia con estos resultados y también en linfocitos T murinos en condiciones de reposo, Mischak y col. (1991) demostraron la expresión de los ARNm para las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ , con bajos niveles para los correspondientes de las isoenzimas  $\epsilon$  y  $\zeta$ , pero no para la isoforma  $\gamma$ . Además mostraron una estrecha correlación entre la expresión proteica y los niveles de los ARNm. Es conocido el importante papel que juegan las isoenzimas  $\alpha$  y  $\beta$  en la proliferación y diferenciación tanto de linfocitos T como B (Cipriani y col., 2002; Moreno-Garcia y col., 2005). Con respecto a la isoforma  $\theta$ , se conoce actualmente el papel preponderante que la misma cumple en la sinapsis inmunológica de los linfocitos T que lleva a su activación (Meller y col., 1999; del Rio y col., 2004). También se encontró que la expresión proteica de cPKC  $\alpha$  y  $\beta$  es regulada progresiva y positivamente por la estimulación con Con A y esto está correlacionado con el incremento en la proliferación celular. Está demostrado que varios estímulos, incluyendo los mitógenos, inducen cambios en la expresión proteica y genómica de isoenzimas de PKC en linfocitos T (Isakov y col., 1992; Tan y Parker 2003). Así, fue descrito en timocitos murinos una disminución en los niveles de proteína de PKC  $\beta$  dentro de las 24 hs de estimulación mitogénica con PMA y ionomicina (Strulovici y col., 1991) y una temprana pero transiente pérdida de los ARNm de PKC  $\beta$  y  $\alpha$  (Freire-Moar y col., 1991). Sin embargo

## 6. DISCUSION

y en concordancia con nuestros resultados, Isakov y col. (1992) demostraron que la estimulación mitogénica de células T humanas maduras está acompañada de un incremento de 4 a 5 veces en los niveles de ARNm de PKC  $\alpha$  y  $\beta$ , con un pico a las 48 hs y correlacionado con el aumento de la proliferación celular. Las diferencias entre estos resultados indican que estos cambios son dependientes del tiempo, del estímulo y del tipo celular.

Las células BW 5147, por su parte, tienen bajos niveles detectables de la isoforma  $\beta$ , con niveles mayores y similares de  $\alpha$  y  $\delta$ , y no expresan las isoenzimas  $\gamma$  y  $\theta$ . Es interesante destacar que en estas células se encontró una expresión aumentada de la isoenzima atípica, calcio independiente PKC $\zeta$ . Estos resultados son concordantes con el hecho de que en las células tumorales, tanto la actividad de PKC como la proliferación celular son principalmente independientes de calcio. Numerosos reportes en bibliografía asocian a la PKC $\zeta$  y a la PKC $\beta$  con procesos altamente proliferativos y de diferenciación celular respectivamente. En tal sentido Goodnight y col. (1994) han descrito una elevada expresión proteica y del ARNm de PKC $\zeta$  en neoplasias de linfocitos B. También se ha relacionado una alta expresión de la isoforma  $\beta$  con la acelerada diferenciación de células leucemicas (Melloni y col., 1990), mientras que la diferenciación final de linfocitos B a células plasmáticas secretoras de anticuerpos está acompañada de la pérdida de esta isoenzima (Mischak y col., 1991). Adicionalmente se ha descrito que la falta de PKC $\zeta$  impide selectivamente los caminos de señalización activados por el receptor de células B lo que resulta en la inhibición de la proliferación y de la supervivencia celular (Martín y col., 2002). Teniendo en cuenta estas evidencias y nuestros resultados, es posible que el incremento en la isoforma de PKC $\beta$  observado durante la estimulación mitogénica de las células T normales condujera a una activación eficiente pero limitada, que lleve a la diferenciación de células inmunes efectoras, mientras que los bajos niveles de esta isoenzima junto con los altos niveles de la isoforma  $\zeta$  fueran responsables del patrón hiperproliferativo de las células BW 5147. Es decir que estos resultados avalan la participación diferencial de las isoformas de PKC en la activación de células T normales y tumorales.

Por otra parte, el inhibidor de NOS, L-NAME, inhibió la proliferación de las células tumorales, pero no afectó la de las células normales. Se estudió entonces la actividad de

## 6. DISCUSION

NOS en ambos tipos celulares y se encontró que las células BW 5147 exhibían altos niveles de dicha actividad enzimática, a diferencia de las células normales que, en reposo, tienen niveles comparativamente mucho menores y que, además, no se modifican por estimulación mitogénica. Estos altos niveles de actividad endógena de NOS podrían contribuir a la sobrevivencia de las células tumorales, protegiéndolas de mecanismos apoptóticos (Lala y Chakraborty, 2001; Rao, 2004) o bien estar relacionados con su alta tasa proliferativa.

Aún no es completamente conocido el rol que el NO cumple en las funciones linfocitarias. De hecho su papel en el control del crecimiento celular es controversial, pues se ha demostrado que el NO puede inducir tanto la estimulación como la inhibición del crecimiento en varios tipos celulares (Sciorati y col., 1997). El NO tiene efectos anti-proliferativos para los linfocitos T (van der Veen y col., 2000; Macphail y col., 2003; Powell y col., 2003), aunque también en monocitos de sangre periférica humanos se ha reportado un efecto potenciador en la proliferación inducida por mitógenos (Efron y col., 1991). El pobre incremento en la actividad de NOS inducido por el estímulo mitogénico en células T normales podría estar relacionado con el efecto dual del NO. De esta forma, el NO a concentraciones fisiológicas sería necesario para una proliferación controlada durante el curso de la respuesta inmune, en la que se requiere tanto de la expansión como de la diferenciación celular. Sin embargo, en las células BW 5147, el panorama parece ser diferente por dos motivos, por un lado, la actividad de NOS es elevada aún en células arrestadas por privación de SFB y por otro, la inducción de la proliferación estuvo acompañada de un significativo incremento de dicha actividad. Se ha descrito que el NO regula positivamente el crecimiento de otros tipos celulares incluyendo fibroblastos (Sciorati y col., 1997), células endoteliales (Ziche y col., 1994), mesangiales (Sheu y col., 2005) y neuroblastos (Cayre y col., 2005). También se ha demostrado que la adición de arginina, sustrato de la NOS, incrementa significativamente la proliferación celular inducida por prolactina en células Nb2 del linfoma T de rata prolactina-dependiente (Dodd y col., 2000).

La L-arginina puede ser metabolizada por un camino alternativo que la convierte en L-ornitina y urea, reacción que es catalizada por la enzima arginasa y donde la L-ornitina es luego transformada en L-citrulina (Gouyao, 1998). La actividad de NOS fue cuantificada a través de la conversión de [ $^{14}\text{C}$ ]-arginina en [ $^{14}\text{C}$ ]-citrulina. Para descartar la formación de [ $^{14}\text{C}$ ]-citrulina por vías metabólicas alternativas los ensayos de actividad de NOS se realizaron en ausencia y presencia del inhibidor de arginasas, la L-

## 6. DISCUSION

valina. Este inhibidor no tuvo efecto sobre la formación de [<sup>14</sup>C]-citrulina. Esto, sumado al hecho de que dicha formación es inhibida por L-NMMA, indica que la misma es reflejo de la actividad de NOS en las células BW 5147.

Por otra parte, los quelantes de calcio EGTA y BAPTA no afectaron significativamente la actividad de NOS, lo que sugiere una importante participación de la isoenzima inducible de NOS, calcio-independiente. Para confirmar si esta isoenzima se encontraba involucrada en las vías de señalización que conducen a la proliferación de las células BW, se determinó su actividad en presencia de inhibidores selectivos de dicha isoenzima. Tanto la actividad enzimática como la producción de nitritos fueron inhibidas por AG y SMT a dosis que bloquean selectivamente la iNOS (Szabó y col., 1994) y de un modo similar al del inhibidor irreversible de NOS, el DPI, aunque en menor medida que el L-NMMA. El hecho de que el DPI sea menos efectivo en inhibir la NOS que el L-NMMA podría estar relacionado con su efecto sobre otras enzimas que actúan como donantes de electrones para el DPI (O'Donnell y col., 1993).

En este trabajo se confirmó la expresión proteica y del ARN mensajero de iNOS únicamente en las células BW tanto en condiciones de arresto celular como en crecimiento exponencial, existiendo una inducción de ambas expresiones en presencia del estímulo proliferativo del SFB. Estos resultados puntualizan la importancia de la isoforma inducible de NOS sobre el crecimiento de las células tumorales. Cabe señalar que se ha demostrado la presencia del ARNm para iNOS en clones de células Th1 específicos para malaria luego de la estimulación antigénica, pero no en clones Th2 (Taylor-Robinson y col., 1994). También se ha encontrado la expresión constitutiva del ARNm de iNOS en células ATL (leucemia T adulta humana) y en líneas celulares T infectadas con el virus de la leucemia de células T humana (Sonoki y col., 1999; Mori y col., 1999). Así mismo, en una línea de ATL positiva para iNOS (la K3T) se encontró que el inhibidor de NOS, L-NMMA, impide el crecimiento y fragmentación del ADN nuclear, sugiriendo que el NO podría estar involucrado en la naturaleza invasiva de las células ATL (Sonoki y col., 1999). La expresión constitutiva de iNOS se ha demostrado en células de leucemia linfocítica crónica de células B (Zhao y col., 1998), en linfomas B no-Hodgkin y en mielomas múltiples (Mendes y col., 2001). Esta expresión estaría relacionada con el fenotipo maligno, indiferenciado e hiperproliferativo de las células BW. De hecho se ha postulado la participación de la iNOS en la inducción *in vitro* de un fenotipo maligno e indiferenciado en queratinocitos humanos (Chunglok y col., 2004).

## 6. DISCUSION

Por otra parte, inhibidores de PKC bloquean parcialmente la alta actividad de NOS en las células BW, indicando que la misma ocurre río abajo de la activación de PKC. De hecho actualmente es conocido que la activación por ésteres de forbol de las isoenzimas cPKC y nPKC, pero no de las aPKC, incrementan la expresión de NOS y/o su actividad en varios tipos celulares (Hortelano y col., 1993; Momose y col., 2000; Hirose y col., 2001). Adicionalmente, la introducción de un anticuerpo anti-PKC $\zeta$ , la isoforma más abundante en las células tumorales, disminuyó tanto la proliferación celular como la actividad de NOS en las células tumorales y no tuvo efecto en los linfocitos T estimulados mitogénicamente. Otros autores han demostrado previamente, que la introducción intracelular de anticuerpos dirigidos contra la región carboxi-terminal de isoformas específicas de PKC, capaz de modificar las funciones fisiológicas de diferentes tipos celulares (Leli y col., 1992, Gollapudi y col., 1995), incluyendo a los linfocitos T (Szamel y col., 1997). En concordancia con nuestros resultados, estudios previos en células mesangiales de rata, demostraron que la sobreexpresión de la isoforma PKC $\zeta$  incrementa la expresión de la isoenzima inducible de NOS (Miller y col., 1997) y que en macrófagos, el incremento de la activación de PKC $\zeta$  sería uno de los mecanismos que lleva a la inducción de iNOS mediada por productos de glicosilación (Wu y col., 2003). El hecho de que el anticuerpo anti-PKC $\zeta$  no fuera capaz de inhibir completamente la actividad de NOS o la proliferación de las células BW indica que probablemente se encuentren presentes otras isoformas de PKC involucradas en estas funciones o bien que el bloqueo de la actividad de PKC $\zeta$  no es total. Cuando empleamos el inhibidor específico de PKC $\zeta$ , el Ps-Myr PKC $\zeta$ , encontramos una inhibición casi completa de la proliferación y de la actividad de NOS, lo que si bien no permite descartar completamente la contribución de otras isoformas, permite aseverar la importancia radical de la PKC $\zeta$  en estos eventos celulares.

Varias evidencias experimentales muestran que las aPKCs juegan un importante rol en el control del crecimiento y de la supervivencia celular (Moscat y Diaz-Meco, 2000). Así, está descrito que la PKC $\zeta$  es crítica en la transducción de señales mitogénicas en ovocitos (Berra y col., 1993), mientras que la aPKC $\tau$  protege a las células humanas leucémicas de la apoptosis inducida por drogas (Murray y Fields, 1997). Más aún, está descrito la inducción del arresto celular y la apoptosis de linfocitos B por el *cross-linking* de las inmunoglobulinas (Igs) de superficie, que lleva a la regulación negativa del ARN mensajero de PKC $\zeta$  (Tsutsumi y col., 1992; An y Knox, 1996).

Los resultados descritos en primer lugar evidencian la estrecha interrelación entre los caminos enzimáticos de PKC y NOS en células linfoides T tumorales, a diferencia de lo que ocurre en células normales, así como también su participación en la proliferación celular. La hiperproliferación de las células BW5147 estaría relacionada con una hiperactividad de PKC y con una mayor participación de las isoenzimas calcio-independientes, principalmente de la PKC $\zeta$ . Esta actividad es en particular responsable de la inducción de la actividad de NOS que podría proteger a las células BW de señales apoptóticas, contribuyendo de esta forma a la supervivencia celular y contribuyendo al fenotipo maligno de las células tumorales.

### **2. Acciones de las HTs sobre la funcionalidad de linfocitos T normales y tumorales.**

#### **2.1. Efectos sobre la proliferación**

Las hormonas tiroideas ejercen una amplia variedad de efectos sobre la funcionalidad linfocitaria, aunque su papel inmunoregulador, así como los mecanismos intervinientes, no han sido completamente esclarecidos. Además, existen evidencias que sugieren la modulación por hormonas tiroideas de diversos mecanismos que intervienen en procesos neoplásicos y se ha descrito la acción de estas hormonas en el desarrollo y crecimiento tumoral. Sin embargo, los resultados hasta la fecha no son concluyentes.

En este trabajo analizamos el efecto que las HTs ejercen sobre la proliferación de linfocitos T normales y tumorales y las cascadas intracelulares involucradas. Dada la importancia que las actividades de PKC y NOS presentan en la regulación de las funciones celulares y en el control de la proliferación celular, estudiamos la modulación mediada por HTs de ambas enzimas. A tiempos cortos de cultivo (hasta las 72 hs para las células tumorales y hasta los 5 días para las normales) encontramos que tanto la T3 como la T4 fueron capaces de estimular la proliferación de los linfocitos tumorales, pero no la de linfocitos T normales en reposo, aunque incrementaron la respuesta de células normales inducidas mitogénicamente tal como fuera descrito previamente (Keast y Taylor, 1982). Los efectos de las HTs fueron dependientes de la concentración hormonal tal como quedó evidenciado por las curvas dosis-respuesta evaluadas mediante incorporación de [ $^3$ H]-TdR. Cabe señalar que los efectos de las HTs no fueron

## 6. DISCUSION

evidentes en células BW en crecimiento exponencial en condiciones óptimas de cultivo (RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB), lo cual estaría relacionado con la presencia de otros factores de crecimiento presentes en el SFB que solapan las acciones de las HTs. Sin embargo la inducción de la proliferación celular en las células BW fue confirmada por los experimentos de marcación con CFSE que mostraron que las HTs fueron capaces de inducir la división de células arrestadas. En apoyo de estos resultados Alisi y col. (2004) demostraron que las HTs son capaces de controlar la progresión del ciclo celular principalmente durante la transición G1/S.

Es de destacar que las acciones proliferativas fueron mediadas por T3, dado que el PTU que inhibe la conversión de T4 en T3 (De Sandro y col., 1991) disminuyó los efectos inducidos por T4 en ambos tipos celulares.

Los inhibidores de PKC, staurosporina y GF109203X, este último en una concentración 10  $\mu\text{M}$ , fueron capaces de inhibir los efectos inducidos por HTs sobre la proliferación de ambos tipos celulares. Es importante señalar que concentraciones menores (0.1  $\mu\text{M}$ ) de GF109203X, sólo pudieron inhibir la proliferación de las células normales, sin afectar la de las tumorales. Estos resultados indican que diferentes isoformas de PKC podrían estar involucradas en los efectos mediados por HTs sobre la activación de células T normales y tumorales.

Adicionalmente, la incubación con T3 o T4 durante 24 a 72 hs indujo un incremento en el contenido total de PKC, y en la actividad de PKC asociada a membrana en ambos tipos celulares. En las células BW arrestadas, sólo el aumento en la actividad de PKC inducida por HTs es capaz de estimular su proliferación. En cuanto a los linfocitos T normales, el aumento de PKC mediado por HTs no es suficiente para estimular la proliferación de las células en reposo, ya que es sabido que para ello es necesario el incremento de calcio citosólico como señal adicional (Altman y col., 1992; Chakrabarti y col., 1999). En efecto, el bloqueante extracelular de calcio, verapamil, así como también el quelante intracelular de alta afinidad, BAPTA, inhibieron las acciones de HTs sobre la proliferación inducida por Con A en las células normales, pero no tuvieron un efecto significativo sobre la proliferación de las células BW 5147. Además, los linfocitos T normales pre-incubados por 24 o 48 hs con T4 y estimulados por 15 minutos con Con A, presentan una mayor translocación de PKC respecto de los controles pre-incubados en ausencia de HTs, sugiriendo que las HTs podrían regular positivamente la PKC a través de una acción genómica. En cambio, la translocación rápida y transitoria de PKC

## 6. DISCUSION

inducida por HTs, observada únicamente en las células BW, indicaría que las HTs ejercerían acciones tanto genómicas como no-genómicas en este tipo celular.

Las HTs son conocidos moduladores de las señales de transducción y varias evidencias experimentales demuestran que son capaces de inducir acciones genómicas y no-genómicas sobre la cascada bioquímica de PKC en varios tipos celulares. De hecho, Krasilnikova y col., (2002) mostraron en un modelo de hipotiroidismo inducido farmacológicamente que la disminución de los niveles séricos de T3 y T4 fue acompañada de una menor actividad total de PKC en hígado. En contraste y también en condiciones hipotiroideas, se describió la regulación positiva de la expresión y actividad de PKC en miocitos ventriculares de rata (Rybin y Sternberg, 1996; Shimoni, 1999). También se demostró que la T3 y la T4 regulan el crecimiento de hepatocitos de embriones de pollo a través de la activación de PKC $\alpha$  y MAPK (Alisi y col., 2004). Más aún en células HeLa en cultivo, la PKC es crítica para el mecanismo por el cual las HTs inducen la fosforilación rápida y la translocación nuclear de MAPK (Lin y col., 1999) y la subsiguiente potenciación de las acciones antivirales e inmunomodulatorias del IFN $\gamma$  (Lin y col., 1996).

Para caracterizar la modulación diferencial de PKC mediada por HTs y su papel en la proliferación de linfocitos T normales y tumorales, se analizó el patrón de isoenzimas en ambos tipos celulares antes y después del tratamiento con HTs. Se encontró que ni la T3 ni la T4 modificaron el perfil de expresión de PKC exhibidos por cada tipo celular. Sin embargo, en los linfocitos T normales tratados con Con A, ambas hormonas incrementaron los niveles de las isoformas de PKC calcio-dependientes,  $\alpha$  y  $\beta$ , mientras que en las células tumorales aumentaron la expresión de la isoforma atípica  $\zeta$ . Es importante remarcar que estas son las principales isoenzimas involucradas en la modulación de la proliferación de cada tipo celular. Además, vale recordar que la PKC  $\alpha$  y  $\beta$  son isoenzimas calcio-dependientes y esto refuerza el hecho de que sea necesario el aumento del calcio intracelular que tiene lugar en presencia de Con A para las acciones proliferativas de HTs en los linfocitos T normales. Por otra parte en las células BW, en las que la isoforma calcio-independiente  $\zeta$  es crucial para la proliferación, el estímulo HTs es suficiente para inducir la división celular. Se han descrito cambios en los niveles de expresión de isoenzimas de PKC inducidos por HTs en otros tipos celulares. Así, Rybin and Sternberg (1996) mostraron una reducción en los niveles de PKC  $\alpha$  y  $\epsilon$

## 6. DISCUSION

dependiente de T3 en miocitos de ratas neonatas y de PKC $\epsilon$  en miocitos de ratas adultas, sin modificaciones en las isoformas  $\delta$  o  $\zeta$ . También se encontraron diferencias en los niveles de PKC $\alpha$  inducidos por el hipotiroidismo y modificados por la terapia de reemplazo con T4 en hígado de rata (Meier y col., 1991). Se demostró que la T3 incrementa la PKC $\alpha$ , pero no la  $\beta_2$  o la  $\epsilon$ , en células endoteliales de vena umbilical humana (Baumgartner-Parzer y col., 1997). Teniendo en cuenta estas evidencias y nuestros resultados, se puede asignar un papel a las HTs como moduladoras de la expresión de isoenzimas de PKC en diferentes tipos celulares y tejidos.

Se han encontrado resultados diferenciales sobre la participación de NOS en las acciones mediadas por HTs en linfocitos normales y tumorales. Las acciones proliferativas de HTs fueron acompañadas de un incremento en la actividad de NOS en las células de linfoma, pero no en células T normales. La activación de NOS inducida por HTs en las células BW 5147 se correlacionó con un incremento en los niveles proteicos y de ARNm de iNOS. Datos de la bibliografía muestran que las HTs modulan la actividad de NOS en varios tejidos. Se ha encontrado el aumento de la liberación del NO por células fagocíticas de líquido bronco-alveolar en ratas adultas hipertiroideas, respecto de los valores hallados en controles eutiroides (Huffman y col., 2000). El tratamiento *in vivo*, por 3 días con T3, induce similares efectos sobre la actividad de NOS en hígado de rata, que fueron revertidos a los valores controles después de 3 días sin hormona (Fernandez y col., 1997). También McAllister y col. (2005) mostraron una marcada vasodilatación basal, producida por una excesiva producción de NO endotelial, en pacientes hipertiroideos, que fue corregida por el restablecimiento del estado eutiroides.

Para investigar la relación entre las actividades de PKC y NOS se analizó el efecto de bloqueantes de PKC. Tanto la staurosporina como el GF109203X a la concentración que bloquea todas las isoformas de PKC, fueron capaces de inhibir la activación de NOS basal y la inducida por HTs. Además, la preincubación de las células BW con el pseudosustrato específico de PKC $\zeta$ , Myr-PKC $\zeta$ PS a concentraciones que inhiben la actividad de PKC $\zeta$  (Dlugosz y col., 2002; Parmentier y col., 2003) así como también la introducción intracelular de un anticuerpo anti-PKC $\zeta$ , fueron capaces de bloquear tanto la actividad de NOS basal como la mediada por HTs. Estos resultados sugieren fuertemente el rol de la PKC $\zeta$  como un posible mediador río arriba de la activación de

## 6. DISCUSION

NOS inducida por las HTs. Esto fue confirmado pre-incubando a las células BW en condiciones basales o estimuladas con T4, con el Myr-PKC $\zeta$ PS o con la staurosporina, lo que provocó la reducción de los niveles del ARNm de iNOS. Se ha demostrado que la isoforma  $\zeta$  de la PKC está involucrada en la inducción de la expresión de iNOS en células murinas RAW264.7 (Wu y col., 2003). Más aún se ha comprobado la regulación positiva del gen de iNOS por otras isoenzimas de PKC. Por ejemplo, se ha descrito que la isoenzima  $\text{Ca}^{2+}$ -independiente, PKC $\epsilon$ , regula positivamente la expresión proteica y del ARNm de iNOS en el corazón (Bolli y col., 1998) y parece ser crítica para la inducción de iNOS en macrófagos murinos (Castrillo y col., 2001).

Se estudiaron entonces las cascadas bioquímicas inducidas por las HTs, en las que participa la PKC $\zeta$  y que conducen a la activación de NOS. Comprobamos que las HTs son capaces de activar al factor nuclear NF- $\kappa$ B, río abajo de PKC $\zeta$ , por inducción de la degradación del I $\kappa$ B- $\alpha$  e I $\kappa$ B- $\beta$  en citoplasma. Este efecto es bloqueado por staurosporina y por el pseudosustrato inhibitor específico de la PKC $\zeta$ . Los caminos intracelulares vía PKC $\zeta$  que llevan a la activación del NF- $\kappa$ B fueron investigados en varios tipos celulares. Así, la activación de receptores Toll en células epiteliales y monocíticas humanas lleva a la activación de PKC $\zeta$  y subsecuentemente a la transactivación de la subunidad p65/RelA del NF- $\kappa$ B (Teusch y col., 2004). También se ha descrito que la estimulación de células miometriales humanas por LPS lleva a la activación de PKC $\zeta$  y a la translocación nuclear de p65 del NF- $\kappa$ B (Dallot y col., 2005). Además se ha comprobado que la expresión de moléculas de adhesión está transcripcionalmente regulada por el factor NF- $\kappa$ B vía una cascada de reacciones que involucra a la PLC, a la PI3K y a las PKC  $\alpha$  y  $\zeta$  (Min y col., 2005). Precisamente, nuestros resultados señalarían que río arriba de PKC $\zeta$  participa la PI3-K, dado que el bloqueo de la misma por wortmanina llevó a la inhibición de la proliferación y de la actividad de NOS inducidos por HTs. Cabe señalar que la PI3-K es la vía de activación preferencial para la activación de isoforma atípica  $\zeta$  en varios tipos celulares incluyendo los linfocitos (Gomez y col., 1996 ; Martin y col., 2001; Hirai y Chida, 2003) y que la sulfasalazina, inhibidor de la quinasa que fosforila al I $\kappa$ B, también impidió el aumento mediado por HTs tanto de la proliferación como de la actividad de NOS.

Varias evidencias experimentales señalan la capacidad de las HTs de inducir la activación de NF- $\kappa$ B en diversas células y tejidos. Por ejemplo se vio que la T3

## 6. DISCUSION

administrada *in vivo*, en ratas, activa el NF- $\kappa$ B hepático y que esta respuesta coincide con el inicio de la calorigénesis y el incremento del consumo de O<sub>2</sub> hepática, es decir que está relacionado con las acciones biológicas de la T3 en hígado (Tapia y col., 2003; Fernandez y col., 2005). Se ha descrito una elevada respuesta inflamatoria pulmonar por exposición a ozono en el estado hipertiroideo, que incluye un aumento paralelo en la activación del NF- $\kappa$ B y en la regulación positiva de la producción de citoquinas (Huffman y col., 2002). Por otra parte también se ha descrito la inducción de iNOS mediada por NF- $\kappa$ B en varias situaciones experimentales (Aktan y col., 2003 ; He y Kogut, 2003).

Es decir, que el mecanismo involucrado en el aumento de la proliferación en las células BW incluiría, la activación de PI3-K con la consecuente estimulación de PKC $\zeta$  la que llevaría a la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B con la posterior inducción de la iNOS.

Finalmente, nosotros aquí mostramos en primer lugar una acción proliferativa de las HTs en linfocitos T normales y tumorales involucrando diferencialmente las actividades de PKC y NOS. En células normales los efectos están mediados vía activación de las isoformas de PKC convencionales y requieren la señal adicional dada por el estímulo mitogénico, sin tener efecto sobre la actividad de NOS. Esto podría ser traducido como una respuesta controlada y explicaría otros estudios que sostienen el incremento en la respuesta inmunológica en condiciones hipertiroideas (Klecha y col., 2000 y 2006). En las células BW, sin embargo, la aPKC $\zeta$  es la principal isoenzima involucrada en las acciones de las HTs y en las mismas cumple un papel importante la NOS. Más específicamente hemos encontrado una regulación positiva de la iNOS, isoforma que es crucial para la proliferación de estas células tumorales.

Pillay (1998) ha indicado que la administración de HTs en casos selectivos de hipotiroidismo congénito, que están acompañados de una severa inmunodeficiencia, permitirían corregir la falla inmunológica. También la deficiencia de HTs podría alterar significativamente el balance entre la viabilidad/crecimiento del tumor maligno versus la muerte celular (Hercberg, 1999).

El mejor entendimiento de los mecanismos bioquímicos inducidos por las HTs en el control de la proliferación linfocitaria podría ser útil para caracterizar su rol fisiopatológico sobre los procesos normales e hiperproliferativos que cursan con anormalidades inmunológicas y sentar las bases para su regulación.

### 2.2. Efectos sobre la apoptosis:

En las células BW el tratamiento *in vitro* a largo plazo con HTs, contrariamente a lo observado a tiempos cortos de cultivo, llevó a la disminución de la respuesta proliferativa que se vió acompañada por la inducción de la apoptosis celular. A partir del quinto día de cultivo las células comienzan a tener morfología nuclear compatible con el proceso apoptótico y fragmentación del ADN nuclear. Dicho proceso se incrementa progresivamente hasta que a tiempos más largos de cultivo (21 días) la viabilidad es menor al 10%. Cabe señalar que en linfocitos T normales estimulados mitogénicamente no fue posible realizar similares estudios *in vitro* dado que estas células, que presentan el pico proliferativo al tercer día de cultivo, evidencian un alto porcentaje de apoptosis ( $\geq 68\%$ ) luego del quinto día, aún en ausencia de HTs. Estos ensayos se han efectuado con T4 dado que es la hormona habitualmente empleada en las terapias de reemplazo en pacientes hipotiroideos por su mayor vida media en comparación con la de T3. La tiroxina presenta una potencia constante y una prolongada acción a través de su conversión a T3 en los tejidos periféricos. Por esta razón y a fin de conseguir en cultivo niveles más constantes de HTs se empleó sólo T4. En concordancia con nuestros resultados Mihara y col., 1999 demostraron que el cultivo por 15 días con HTs de células Jurkat, linfoma T humano, inducía la apoptosis celular y que linfocitos de pacientes con enfermedad de Graves mostraban una apoptosis mayor que aquellos correspondientes a individuos normales eutiroideos. Estos resultados y los nuestros sugieren que las HTs, tanto *in vivo* como *in vitro*, tienen la capacidad potencial de inducir la muerte celular por apoptosis de linfocitos sometidos a tratamiento prolongado con HTs.

Se ha reportado en bibliografía numerosos estudios que avalan la capacidad de las HTs de inducir apoptosis en diversos tipos celulares y tejidos (Varga y col., 1999; Varas y col., 2002; Jorns y col., 2002; Lee y col., 2002; Upadhyay y col., 2004) o de potenciar la apoptosis inducida por retinoides (Hara y col., 2000). También es conocido el papel protector de la apoptosis que las HTs cumplen en la neurogénesis por los importantes efectos deletereos del hipotiroidismo en el desarrollo neurológico (Ambrogini y col., 2005).

## 6. DISCUSION

El tratamiento prolongado con HTs incrementó fuertemente la expresión genómica y proteica de la isoforma iNOS, mostrando un máximo de expresión entre el tercer y séptimo día de cultivo. Este incremento en la expresión de iNOS se vio acompañado por un aumento marcado en la actividad de NOS y en la producción de nitritos. Por el contrario, la expresión de PKC $\zeta$  disminuyó significativamente con tiempos largos de tratamiento, aún a aquellos tiempos en los que la actividad de NOS permanecía elevada. Es importante señalar que la isoforma  $\zeta$  de la PKC se encuentra involucrada en mecanismos que protegen a las células de la apoptosis y es esencial para la supervivencia celular. En tal sentido Díaz-Meco y col. (1996), han demostrado que la PKC $\zeta$  interactúa con par-4 bloqueando su actividad y protegiendo así a las células de la apoptosis. Esto es concordante con nuestros resultados, dado que las transfecciones realizadas con una dominante negativa de PKC $\zeta$  disminuyeron la viabilidad celular a valores menores del 10 %. Los resultados obtenidos nos permiten sugerir que a tiempos cortos de cultivo, la PKC $\zeta$  estaría involucrada en la inducción de iNOS a través de la activación del factor nuclear NF- $\kappa$ B, pero a tiempos prolongados, el aumento en la expresión y actividad de NOS sería independiente de la actividad de PKC $\zeta$ . Sin embargo no descartamos la posibilidad de que el NF- $\kappa$ B esté mediando la inducción de iNOS utilizando otra vía de activación independiente de la PKC $\zeta$ , ya que existen en bibliografía numerosos reportes que señalan al NF- $\kappa$ B como partícipe necesario en mecanismos apoptóticos. En tal sentido Trubiani y col., 2005, han demostrado en células humanas de linfoma tímico, RPMI-8402, que la activación de NF- $\kappa$ B se encuentra asociada a la regulación positiva de la actividad de NOS y a la inducción de la apoptosis.

### 3. Consideraciones Finales

Teniendo en cuenta nuestros resultados y las evidencias experimentales reportadas en bibliografía, podemos concluir que las HTs son capaces de regular la funcionalidad linfocitaria modulando las cascadas bioquímicas implicadas en la respuesta biológica desencadenada en cada tipo celular. Así, sobre la proliferación del linfoma T BW 5147, las HTs ejercen un efecto dual, mostrando a tiempos cortos de cultivo una modulación positiva y a tiempos mayores un efecto negativo que conduce a la muerte celular por

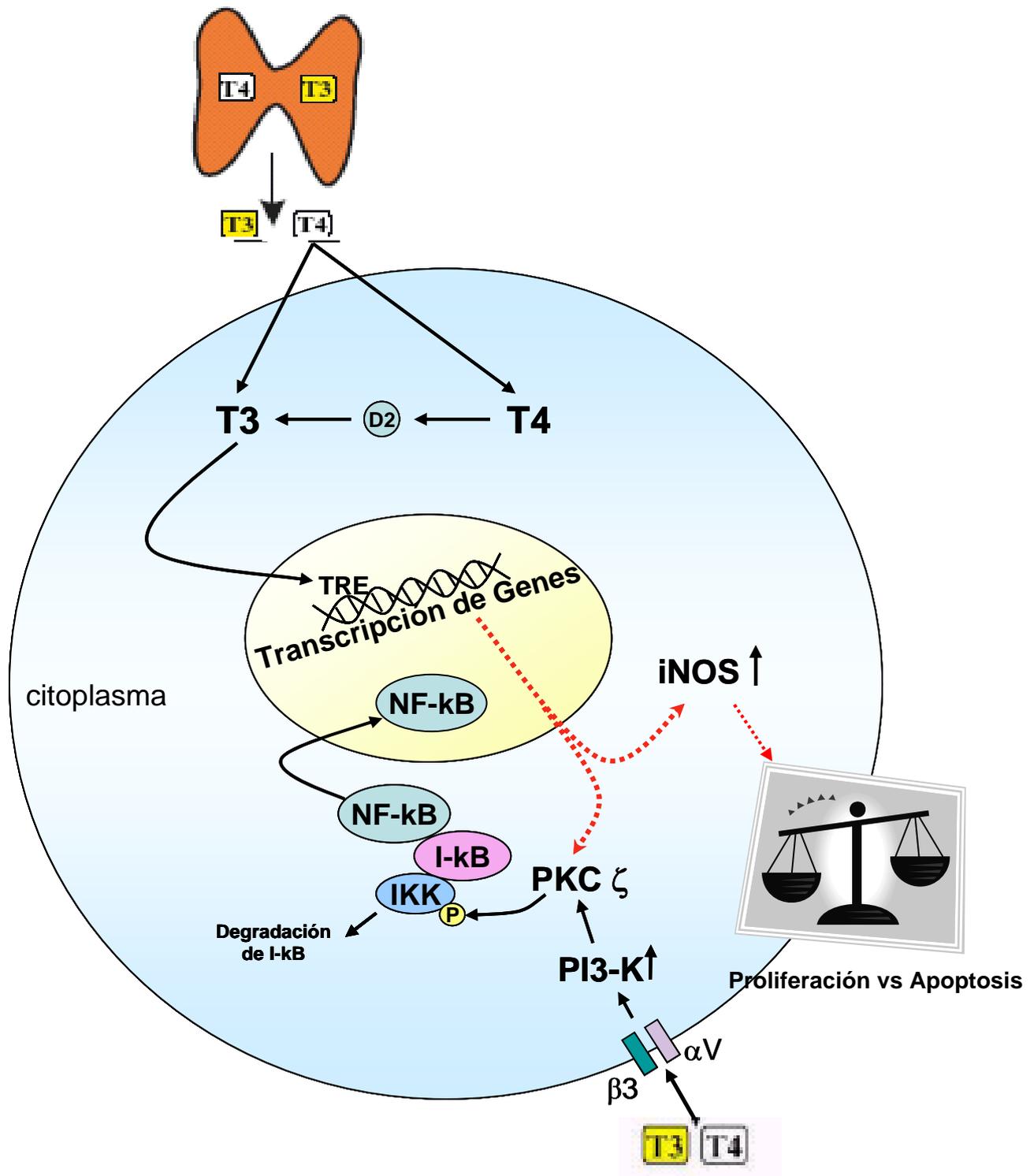
apoptosis. En la estimulación de la proliferación inducida por HTs observada hasta los 3 días de cultivo con dichas hormonas, participan mecanismos genómicos mediados por sus receptores nucleares que conducen al incremento del contenido y actividad total de PKC y de la expresión de la isoforma  $\zeta$  crucial para el crecimiento de esta línea celular. Adicionalmente en las células BW, las HTs pueden llevar a la activación no genómica de PKC y, a través de la PI3-K, a la activación de la isoforma PKC $\zeta$ . Esta isoenzima a su vez activa al factor nuclear NF- $\kappa$ B que interviene en la inducción transcripcional de la iNOS. El aumento limitado de la producción de NO generaría un efecto positivo sobre la proliferación y el incremento de la expresión de la PKC $\zeta$  contribuiría a la supervivencia celular favoreciendo el fenotipo maligno. Así, se ha comprobado una importante inhibición de mecanismos apoptóticos mediados por esta isoenzima en linfomas T humanos (Leroy y col., 2005). Este aumento de la proliferación llevaría con el tiempo a incrementar la probabilidad de que células individuales adquieran alteraciones genéticas que culminen con la incapacidad de reparación de dichos errores y conduzcan, por ende, a la muerte celular. De hecho, el cultivo con HTs por tiempos prolongados (mayores a 5 días) incrementa fuertemente la expresión y la actividad de NOS, independientemente de la expresión de PKC $\zeta$ , lo que lleva a un aumento exacerbado de NO responsable de la muerte por apoptosis de las células BW. Nuestros resultados son coincidentes con los que describen una fuerte correlación entre la producción de NO y la apoptosis de células T (Levytsky y col., 2004; Valenti y col., 2005; Nagy y Perl, 2006). Los mecanismos descritos están esquematizados en la Figura 29.

En los linfocitos T normales por otra parte, las HTs activan los caminos intracelulares que involucran las isoenzimas convencionales implicadas en la proliferación y diferenciación celular. Esto es compatible con la dependencia del calcio de los efectos inducidos por las HTs. Pero las acciones hormonales no involucran la actividad de NOS, por lo que parecería poco probable que, de inducirse apoptosis a largo plazo por HTs, efecto que no pudimos estudiar *in vitro*, se encuentre implicada dicha enzima. Esto se traduciría en una respuesta controlada y permitiría explicar los estudios que avalan el aumento de las respuestas inmunológicas en pacientes hipertiroideos (Fabris y col., 1995).

## **6. DISCUSION**

Los resultados obtenidos nos permiten puntualizar la importancia de las HTs en la modulación de la actividad linfocitaria regulando el balance entre la proliferación y la apoptosis celular que tendría un importante papel en el control neuroendócrino de la respuesta inmunológica y en la fisiopatología de células linfoides. Además, el mejor entendimiento sobre los mecanismos bioquímicos enzimáticos, inducidos por las HT en el control de la proliferación celular, tanto en las respuestas hiperproliferativas tumorales, como las que resultan del estado de activación celular fisiológico, permitirían comprender los eventos moleculares responsables del desarrollo y/o establecimiento de la transformación tumoral y abrir el camino para la propuesta del empleo de agentes tiroideos o anti-tiroideos en el tratamiento de patologías que afecten la funcionalidad de células linfocitarias.

**Figura 29: Esquema de los mecanismos genómicos y no-genómicos involucrados en los efectos de las HT en las células del linfoma T BW5147**



Las HTs pueden actuar a través de un hipotético receptor de membrana y activar por efecto no-genómico la cascada PI3-K, PKC $\zeta$  y NF- $\kappa$ B el que trasloca al núcleo y lleva a la inducción de la iNOS. Por otra parte pueden atravesar la membrana celular y en el interior, la T4 por acción de una dehidrogenasa (D2) es convertida a T3, la cual al unirse a su receptor nuclear lleva también al incremento de la iNOS vía PKC. Estos efectos modularían el balance entre la proliferación y la apoptosis celular.

## **7. CONCLUSIONES**

### **Caracterización de los eventos bioquímicos implicados en la proliferación linfocitaria normal y tumoral**

- La proliferación de las células BW es dependiente de la actividad de PKC y de NOS y no se ve afectada por la ausencia de calcio. Por el contrario, la proliferación de las células T normales es independiente de la actividad de NOS y si bien depende de PKC es necesaria la presencia de calcio para dicha actividad.
- Las células hiperproliferativas del linfoma T BW y los linfocitos T normales activados mitogénicamente presentan un patrón de expresión diferencial de isoenzimas de PKC, mostrando las células tumorales una mayor expresión de la isoforma atípica calcio independiente, PKC $\zeta$ , mientras que las células normales expresan principalmente isoenzimas de PKC clásicas.
- Las células tumorales en quiescencia presentan una importante actividad de NOS que es incrementada por la inducción mitogénica, a diferencia de los linfocitos T normales que presentan una pobre actividad de NOS no modificable por el estímulo mitogénico.
- La actividad de NOS en las células BW es independiente de calcio, pero dependiente de PKC y de su isoforma  $\zeta$ .
- En las células tumorales se detectó únicamente la expresión constitutiva de la isoforma inducible de NOS que se incrementa con la estimulación de la proliferación.

### **Modulación diferencial por HTs sobre el balance entre viabilidad y apoptosis celular en linfocitos T normales y células BW 5147**

#### **Efectos de las HTs a tiempos cortos (hasta 72 horas) de cultivo**

- Las HTs estimulan en forma concentración-dependiente la proliferación de las células BW e inducen la división celular de dichas células en estado de quiescencia. En linfocitos T normales en reposo, las HTs no son capaces de estimular la proliferación celular, sin embargo aumentan las respuestas proliferativas inducidas por el estímulo mitogénico.

## 7. CONCLUSIONES

- Los efectos de las HTs sobre la proliferación celular están mediados por PKC. El cultivo por 24-72 hs con HTs incrementa el contenido total y la actividad de PKC asociada a membrana en ambos tipos celulares.
- Las HTs son capaces de inducir la translocación rápida (15 minutos) de PKC únicamente en las células BW, mientras que en las células normales en reposo esto sólo es posible en presencia de un estímulo mitogénico. Además en linfocitos T normales, la preincubación por 24-48 hs con HTs provoca una mayor translocación rápida inducida por el mitógeno respecto de células preincubadas en ausencia de hormonas.
- Solamente en los linfocitos T normales, los efectos de las HTs sobre la proliferación celular, son dependientes de calcio. En estas células las HTs inducen un aumento en la expresión de las isoformas convencionales  $\alpha$  y  $\beta$ , mientras que en las células BW, incrementan la expresión de la isoforma atípica, calcio-independiente, PKC  $\zeta$ .
- En las células BW, es esencial la actividad de NOS para observar los efectos proliferativos mediados por HTs. Sólo en éstas células, las HTs incrementaron dicha actividad, así como también la expresión proteica y genómica de su isoforma inducible, iNOS.
- En las células BW, el efecto de las HTs sobre la estimulación de iNOS y sobre la proliferación celular es dependiente de la actividad de PKC  $\zeta$ .
- En las células BW, los eventos involucrados en los efectos mediados por HTs incluyen: la activación de PI3-K río arriba de PKC  $\zeta$  y la activación del factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B en la cascada río abajo de PKC  $\zeta$ . La activación de NF- $\kappa$ B conduce a la inducción de iNOS.

### **Efectos de las HTs sobre las células BW5147 a tiempos prolongados de cultivo**

- A partir del quinto día de cultivo con HTs se evidencia una disminución de las respuestas proliferativas y la inducción de la muerte celular por apoptosis.
- La apoptosis se vio acompañada por un mayor incremento exacerbado de la actividad de NOS y de la expresión proteica y genómica de iNOS que fue independiente de PKC  $\zeta$  ya que su expresión se encontró disminuida en estas condiciones de cultivo.

## 7. CONCLUSIONES

**En base a estas evidencias experimentales podemos concluir que las HTs modularían diferencialmente el balance entre viabilidad y apoptosis celular en linfocitos T normales y células BW5147 desencadenando diferentes señales intracelulares dependiendo del tiempo de acción y del tipo celular en estudio.**

## **8. REFERENCIAS**

## 8. REFERENCIAS

Aggarwal B.B., Takada Y. Pro-apoptotic and anti-apoptotic effects of tumor necrosis factor in tumor cells. Role of nuclear transcription factor NF-kappaB. *Cancer Treat Res.* **126**: 103-127, 2005.

Ahmed S., Shibasaki M., Takeuchi T., Kikuchi H. Protein kinase C theta activity is involved in the 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced signal transduction pathway leading to apoptosis in L-MAT, a human lymphoblastic T-cell line. *FEBS J.* **272**: 903-15, 2005.

Aktan F., Hennes S., Roufogalis B.D., Ammit A.J. Gypenosides derived from *Gynostemma pentaphyllum* suppress NO synthesis in murine macrophages by inhibiting iNOS enzymatic activity and attenuating NF-kB-mediated iNOS protein expression. *Nitric Oxide* **8**: 235–242, 2003.

Albina J.E., Cui S., Mateo R.B., Reichner J.S. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **150**: 5080-5085, 1993.

Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* **357**: 593-615, 2001.

Alisi A., Spagnuolo S., Napoletano S., Spaziani A., Leoni S. Thyroid hormones regulate DNA-synthesis and cell-cycle proteins by activation of PKC  $\alpha$  and p42/44 MAPK in chick embryo hepatocytes. *J. Cell. Physiol.* **201**: 259-265, 2004.

Altman A., Mally M.I., Isakov N. Phorbol ester synergizes with Ca<sup>2+</sup> ionophore in activation of protein kinase C (PKC) alpha and PKC beta isoenzymes in human T cells and in induction of related cellular functions. *Immunology* **76**: 465-471, 1992.

Ambrogini P., Cuppini R., Ferri P., Mancini C., Ciaroni S., Voci A., Gerdoni E., Gallo G. Thyroid hormones affect neurogenesis in the dentate gyrus of adult rat. *Neuroendocrinology* **81**: 244-253, 2005.

## 8. REFERENCIAS

- An S., Knox K.A. Ligation of CD40 rescues Ramos-Burkitt lymphoma B cells from calcium ionophore- and antigen receptor-triggered apoptosis by inhibiting activation of the cysteine protease CPP32/Yama and cleavage of its substrate PARP. *FEBS Lett.* **386**: 115-122, 1996.
- Aranda A., Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev.* **81**: 1269-304, 2001.
- Baier G. The PKC gene module: molecular biosystematics to resolve its T cell functions. *Immunol. Rev.* **192**: 64-79, 2003.
- Banisadr G., Rostene W., Kitabgi P., Parsadaniantz S.M. Chemokines and brain functions. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* **4**: 387-399, 2005.
- Bassett JH, Harvey CB, Williams GR. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Mol Cell Endocrinol.* **213**: 1-11, 2003.
- Basu A., Woolard M.D., Johnson C.L. Involvement of protein kinase C-delta in DNA damage-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* **8**:899-908, 2001.
- Basu A., Lu D., Sun B., Moor A.N., Akkaraju G.R. and Huang J. Proteolytic activation of protein kinase C-epsilon by caspase-mediated processing and transduction of antiapoptotic signals. *J Biol Chem.* **277**: 41850-41856, 2002.
- Baumgartner-Parzer S.M., Wagner L., Reining G., Sexl V., Nowotny P., Muller M., Brunner M., Waldhausl W. Increase by tri-iodothyronine of endothelin-1, fibronectin and von Willebrand factor in cultured endothelial cells. *J Endocrinol.* **154**: 231-239, 1997.
- Berra E., Diaz-Meco M.T., Dominguez I., Municio M.M., Sanz L., Lozano J., Chapkin R.S., Moscat J. Protein kinase C zeta isoform is critical for mitogenic signal transduction. *Cell.* **74**: 555-563, 1993.

## 8. REFERENCIAS

Besedovsky H., del Rey A. and Normann S. Host endocrine responses during tumor growth. *Prog. Clin. Biol. Res.* **288**: 203-213, 1989.

Bezombes C., de Thonel A., Apostolou A., Louat T., Jaffrezou J.P., Laurent G., Quillet-Mary A. Overexpression of protein kinase C $\zeta$  confers protection against antileukemic drugs by inhibiting the redox-dependent sphingomyelinase activation. *Mol Pharmacol.* **62**: 1446-1455, 2002.

Blumberg P.M., Acs G., Areces L.B., Kazanietz M.G., Lewin N.E., Szallasi Z. Protein kinase C in signal transduction and carcinogenesis. *Prog Clin Biol Res.* **387**: 3-19, 1994.

Boldyrev A.A., Carpenter D.O. and Johnson P. Emerging evidence for a similar role of glutamate receptors in the nervous and immune systems. *J Neurochem.* **95**: 913-918, 2005.

Bolli R., Dawn B., Tang X.L., Qiu Y., Ping P., Xuan Y.T., Jones W.K., Takano H., Guo Y., Zhang J. The nitric oxide hypothesis of late preconditioning. *Basic Res Cardiol.* **93**: 325-338, 1998.

Bonham C.A., Lu L., Li Y., Hoffman R.A., Simmons R.L., Thomson A.W. Nitric oxide production by mouse bone marrow-derived dendritic cells: implications for the regulation of allogeneic T cell responses. *Transplantation* **62**: 1871-1877, 1996.

Borner C, Ueffing M, Jaken S, Parker PJ, Weinstein IB. Two closely related isoforms of protein kinase C produce reciprocal effects on the growth of rat fibroblasts. Possible molecular mechanisms. *J. Biol. Chem.* **270**:78-86, 1995.

Bredt D.S., Huang P.M., Glatt C.E., Lowenstein C., Reed R.R., Snyder S.H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450. *Nature* **351**: 714-718, 1991.

## 8. REFERENCIAS

Brtko J., Filipcik P., Knopp J., Sedlakova V., Rauova L. Thyroid hormone responsiveness of the L1210 murine leukemia cell line. *Acta Endocrinol.* **126**: 374-377, 1992.

Castagna M., Takai Y., Kaibuchi K., Sano K., Kikkawa U., Nishizuka Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem.* **257**: 7847-5178, 1982.

Castrillo A., Pennington D.J., Otto F., Parker P.J., Owen M.J., Bosca L. Protein kinase Cepsilon is required for macrophage activation and defense against bacterial infection. *J Exp Med.* **194**: 1231-1242, 2001.

Castrillo A., Traves P.G., Martin-Sanz P., Parkinson S., Parker P.J., Bosca L. Potentiation of protein kinase C zeta activity by 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J induces an imbalance between mitogen-activated protein kinases and NF-kappa B that promotes apoptosis in macrophages. *Mol Cell Biol.* **23**:1196-208, 2003.

Cayre M., Malaterre J., Scotto-Lomassese S., Holstein G.R., Martinelli G.P., Forni C., Nicolas S., Aouane A., Strambi C., Strambi A.. A role for nitric oxide in sensory-induced neurogenesis in an adult insect brain. *Eur. J. Neurosci.* **21**: 2893-2902, 2005.

Cazaux C., Sterin-Borda L., Gorelik G., Cremaschi G.A. Down-regulation of  $\beta$  adrenergic receptors induced by mitogen activation of intracellular signaling events in lymphocytes. *FEBS Lett.* **364**: 120-124, 1995.

Chakrabarti R., Kumar S., Chakrabarti R. Relative roles of T-cell receptor ligands and interleukin-2 in driving T-cell proliferation. *J Cell Biochem* **76**: 37-43, 1999.

Chatterjee S., Chandel A.S. Immunomodulatory role of thyroid hormones: in vivo effect of thyroid hormones on the blastogenic response to lymphoid tissue. *Acta Endocrinologica Suppl.* **103**: 95-100, 1983.

## 8. REFERENCIAS

Cho J.Y., Kim A.R., Jung J.H., Chun T., Rhee M.H., Yoo E.S. Cytotoxic and pro-apoptotic activities of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, on the viability of leukocyte cancer cell lines. *Eur J Pharmacol.* **492**: 85-94, 2004.

Choi P.M., Tchou-Wong K.M., Weinstein I.B. Overexpression of protein kinase C in HT29 colon cancer cells causes growth inhibition and tumor suppression. *Mol Cell Biol.* **10**: 4650-4657, 1990.

Chunglok W., Ittarat W., Tomakidi P., Schmidt R., Stremmel W., Chamulitrat W. Human gingival mucosal keratinocytes exhibiting anchorage-independent growth express increased inducible nitric oxide synthase: regulation by MAP kinases. *Nitric Oxide* **11**: 237-246, 2004.

Cipriani B., Knowles H., Chen L., Battistini L., Brosnan C.F. Involvement of classical and novel protein kinase C isoforms in the response of human V gamma 9V delta 2 T cells to phosphate antigens. *J. Immunol.* **169**: 5761-5770, 2002.

Clemens MJ, Trayner I, Menaya J. The role of protein kinase C isoenzymes in the regulation of cell proliferation and differentiation. *J. Cell. Sci.* **103**: 881-887, 1992.

Cooperman J., Neely R., Teachey D.T., Grupp S., Choi J.K. Cell division rates of primary human precursor B cells in culture reflect in vivo rates. *Stem Cells.* **22**: 1111-1120, 2004.

Coussens L., Parker P. J., Rhee L., Yang-Feng T.L., Chen E., Waterfield M.D., Francke U., Ullrich A. Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science* **233**: 859-866, 1986.

Cremaschi G.A., Genaro A.M., Cazaux C.A., Anesini C., Wald M., Borda T, Sterin-Borda L. Altered  $\beta$ -adrenoceptor function associated to protein kinase C activation in hyperproliferative T lymphocytes. *J Neuroimmunol* **110**: 57-65, 2000.

## 8. REFERENCIAS

Dafny N., Yang P.B. Interferon and the central nervous system. *Eur J. Pharmacol.* **523**: 1-15, 2005.

Dallot E., Mehats C., Oger S., Leroy M.J., Breuiller-Fouche M. A role for PKCzeta in the LPS-induced translocation NF-kappaB p65 subunit in cultured myometrial cells. *Biochimie.* **87**: 513-521, 2005.

Davel L.E., Jasnis M.A., de la Torre E., Gotoh T., Diament M., Magenta G., Sacerdote de Lustig E., Sales M.E. Arginine metabolic pathways involved in the modulation of tumor-induced angiogenesis by macrophages. *FEBS Lett.* **532**: 216-220, 2002.

Davis P., Shih A., Lin H.Y., Martino L.J., Davis F.B. Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR. *J. Biol. Chem.* **275**: 38032-38039, 2000.

Davis P., Davis F.B., Lin H.Y. L-Thyroxine acts as a hormone as well as a prohormone at the cell membrane, enviado para su publicación, 2006.

Davis S.L. Environmental modulation of the immune system via the endocrine system. *Domestic Animal Endocrinology* **15**: 283-289, 1998.

De Sandro V., Chevrier M., Boddaert A., Melcion C., Cordier A., Richert L. Comparison of the effects of propylthiouracil, amiodarone, diphenylhydantoin, phenobarbital, and 3-methylcholanthrene on hepatic and renal T4 metabolism and thyroid gland function in rats. *toxicol Appl pharmacol.* **111**: 263-278, 1991.

Dekker L.V., Parker P.J. Protein kinase C--a question of specificity. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 73-77, 1994.

## 8. REFERENCIAS

Del Rio R., Rincon M., Layseca-Espinosa E., Fierro N.A., Rosenstein Y. and Pedraza-Alva G. PKC $\theta$  is required for the activation of human T lymphocytes induced by CD43 engagement. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **325**: 133-143, 2004.

Diaz-Meco M.T., Municio M.M., Frutos S., Sanchez P., Lozano J., Sanz L., Moscat J. The product of par-4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C. *Cell.* **86**: 777-786, 1996.

Dixit V.D., Mielenz M., Taub D.D., Parvizi N. Leptin induces growth hormone secretion from peripheral blood mononuclear cells via a protein kinase C- and nitric oxide-dependent mechanism. *Endocrinology* **144**: 5595-5603, 2003.

Dlugosz J.A., Munk S., Ispanovic E., Goldberg H.J., Whiteside C.I. Mesangial cell filamentous actin disassembly and hypocontractility in high glucose are mediated by PKC-zeta. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **282**: F151-163, 2002.

Dodd F., Limoges M., Boudreau R.T., Rowden G., Murphy P.R., Too C.K. L-arginine inhibits apoptosis via a NO-dependent mechanism in Nb2 lymphoma cells. *J. Cell Biochem.* **77**: 624-634, 2000.

Dorshkind K., Horseman N.D. The roles of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormones in lymphocyte development and function: insights from genetic models of hormone and hormone receptor deficiency. *Endocrine Reviews* **21**: 292-312, 2000.

Dorshkind K., Horseman N.D. Anterior pituitary hormones, stress, and immune system homeostasis. *Bioessays* **23**: 288-294, 2001.

Downing J.E., Miyan J.A. Neural immunoregulation: emerging roles for nerves in immune homeostasis and disease. *Immunol Today.* **21**: 281-289, 2000.

## 8. REFERENCIAS

Efron D.T., Kirk S.J., Regan M.C., Wasserkrug H.L., Barbul A. Nitric oxide generation from L-arginine is required for optimal human peripheral blood lymphocyte DNA synthesis. *Surgery*. **110**: 327-334, 1991.

Emoto Y., Manome Y., Meinhardt G., Kisaki H., Kharbanda S., Robertson M., Ghayur T., Wong W.W., Kamen R., Weichselbaum R. Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells. *EMBO J*. **14**: 6148-6156, 1995.

Fanning A., Volkov Y., Freeley M., Kelleher D., Long A. CD44 cross-linking induces protein kinase C-regulated migration of human T lymphocytes. *Int Immunol*. **17**: 449-458, 2005.

Fabris N., Mocchegiani E., Provinciali M. Pituitary-thyroid axis and immune system: a reciprocal neuroendocrine-immune interaction. *Horm Res*. **43**(1-3): 29-38, 1995.

Fernandez V., Cornejo P., Tapia G., Videla L.A. Influence of hyperthyroidism on the activity of liver nitric oxide synthase in the rat. *Nitric Oxide*. **1**:463-468, 1997.

Fernandez N., Caloca M.J., Prendergast G.V., Meinkoth J.L., Kazanietz M.G. Atypical protein kinase C-zeta stimulates thyrotropin-independent proliferation in rat thyroid cells. *Endocrinology* **141**:146-152, 2000.

Fernandez V., Tapia G., Varela P., Videla L.A. Redox regulation of thyroid hormone-induced Kupffer cell-dependent IkappaB-alpha phosphorylation in relation to inducible nitric oxide synthase expression. *Free Radic Res*. **39**: 411-418, 2005.

Filomenko R, Poirson-Bichat F, Billerey C, Belon JP, Garrido C, Solary E, Bettaieb A. Atypical protein kinase C zeta as a target for chemosensitization of tumor cells. *Cancer Res*. **62**:1815-1821, 2002.

## 8. REFERENCIAS

Foster M.P., Jensen E.R., Montecino-Rodriguez E., Leathers H., Horseman N., Dorshkind K. Humoral and cell-mediated immunity in mice with genetic deficiencies of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormone. *Clinical Immunology* **96** 140-149, 2000.

Franklyn J.A., Maisonneuve P., Sheppard M., Betteridge J., Boyle P. Cancer incidence and mortality after radioiodine treatment for hyperthyroidism: a population-based cohort study. *Lancet* **353**: 2111-2115, 1999.

Freire-Moar J., Cherwinski H., Hwang F., Ransom J., Webb D. Expression of protein kinase C isoenzymes in thymocyte subpopulations and their differential regulation. *J. Immunology* **147**: 405-409, 1991.

Fresno Vara J.A, Casado E., de Castro J., Cejas P., Belda-Iniesta C., Gonzalez-Baron M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat. Rev.* **30**:193-204, 2004.

Friedman W.J. Interactions of interleukin-1 with neurotrophic factors in the central nervous system: beneficial or detrimental? *Mol Neurobiol.* **32**: 133-44, 2005.

Friesema E.C., Docter R., Moerings E.P., Stieger B., Hagenbuch B., Meier P.J., Krenning E.P., Hennemann G., Visser T.J. Identification of thyroid hormone transporters. *Biochem Biophys Res Commun* **254**: 497-501, 1999.

Fulop T. Jr., Leblanc C., Lacombe G., Dupuis G. Cellular distribution of protein kinase C isozymes in CD3-mediated stimulation of human T lymphocytes with aging. *FEBS Lett.* **375**: 69-74, 1995.

Genaro A. M., Boscá L. Early signals in alloantigen induced B -cell proliferation. Comparison between B-cell triggering by intact allogeneic cells and solubilized alloantigen. *J. Immunol.* **151**(4): 1832-1843, 1993.

## 8. REFERENCIAS

Germain R.N., Stefanova I. The dynamics of T cell receptor signaling: complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation. *Annu Rev Immunol.* **17**: 467-522, 1999.

Ghayur T., Hugunin M., Talanian R.V., Ratnofsky S., Quinlan C., Emoto Y., Pandey P., Datta R., Huang Y., Kharbanda S., Allen H., Kamen R., Wong W., Kufe D. Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis. *J. Exp. Med.* **184**(6): 2399-2404, 1996.

Ghoshal D., Sinha S., Sinha A., Bhattacharyya P. Immunosuppressive effect of vestibulo-cerebellar lesion in rats. *Neurosci Lett.* **257**: 89-92, 1998.

Giani C., Fierabracci P., Bonacci R., Gigliotti A., Campani D., De Negri F., Cecchetti D., Martino E., Pinchera A.C. Relationship between breast cancer and thyroid disease: relevance of autoimmune thyroid disorders in breast malignancy. *J. Clin. Endocrinol. Meta.* **81**: 990-994, 1996.

Gollapudi S., Soni V., Thadepalli H., Gupta S.J. Role of protein kinase beta isozyme in multidrug resistance in murine leukemia P388/ADR cells. *Chemother.* **7**: 157-159, 1995.

Gomez J., Martinez C., Garcia A., Rebollo A. Association of phosphatidylinositol 3 kinase to protein kinase C zeta during interleukin-2 stimulation.. *Eur. J. Immunol.* **26**: 1781-1787, 1996.

Goodnight J., Mischak H., Mushinski J.F. Association of elevated levels of protein kinase C-zeta mRNA and protein with murine B-lymphocytic neoplasia. *Mol. Carcinog.* **11**: 131-137, 1994.

Goren N., Sterin-Borda L., Bartrons R., Gomez R., Borda E. Detection of mRNA encoding H receptor and iNOS by RT-PCR in autoimmune myocarditis with special reference to changes in heart contractility. *Int J Cardiol.* **76**: 165-172, 2000.

## 8. REFERENCIAS

Goren N., Cuenca J., Martin-Sanz P., Boscá L. Attenuation of NF-kappaB signalling in rat cardiomyocytes at birth restricts the induction of inflammatory genes. *Cardiovasc. Res.* **64**: 289-297, 2004.

Gouyao W.U. Arginine metabolism: Nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* **336**: 1-17, 1998.

Granger D.L., Kidds J.B., Perfect J.R., Durack D.T. Metabolic fate of L-arginine inhalation to microbiostatic capability of murine macrophages. *J. Clin. Invest.* **85**: 264-273, 1990.

Graves J.D., Campbell J.S., Krebs E.G. Protein serine/threonine kinases of the MAPK cascade. *Ann N. Y. Acad Sci.* **766**: 320-343, 1995.

Greenberg S.S., Jie O., Zhao X., Wang J.F. Role of PKC and tyrosine kinase in ethanol-mediated inhibition of LPS-inducible nitric oxide synthase. *Alcohol.* **16**:167-175, 1998.

Hama N., Paliogianni F., Fessler B.J., Boumpas D.T. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II downregulates both calcineurin and protein kinase C-mediated pathways for cytokine gene transcription in human T cells. *J Exp Med.* **181**: 1217-22, 1995.

Hans C.P., Weisenburger D.D., Greiner T.C., Chan W.C., Aoun P., Cochran G.T., Pan Z., Smith L.M., Lynch J.C., Bociek R.G., Bierman P.J., Vose J.M., Armitage J.O. Expression of PKC-beta or cyclin D2 predicts for inferior survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol.* **18**: 1377-1384, 2005.

Hara M., Suzuki S., Mori J., Yamashita K., Kumagai M., Sakuma T., Kakizawa T., Takeda T., Miyamoto T., Ichikawa K., Hashizume K. Thyroid hormone regulation of apoptosis induced by retinoic acid in promyeloleukemic HL-60 cells: studies with retinoic acid receptor-specific and retinoid x receptor-specific ligands. *Thyroid.***10**: 1023-1034, 2000.

## 8. REFERENCIAS

Harbuz M.S., Chover-Gonzalez A.J., Jessop D.S. Hypothalamo-pituitary-adrenal axis and chronic immune activation. *Ann N Y Acad Sci.* **992**: 99-106, 2003.

He H., Kogut M.H. CpG-ODN-induced nitric oxide production is mediated through clathrin-dependent endocytosis, endosomal maturation, and activation of PKC, MEK1/2 and p38 MAPK, and NF-kB pathways in avian macrophage cells (HD11). *Cellular Signalling* **15**: 911–917, 2003.

Hefco V., Olariu A., Hefco A., Nabeshima T. The modulator role of the hypothalamic paraventricular nucleus on immune responsiveness. *Brain Behav Immun.* **18**: 158-65, 2004.

Hercbergs A. The thyroid gland as an intrinsic biologic response-modifier in advanced neoplasia. A novel paradigm. *In Vivo* **10**: 245-247, 1996.

Hercbergs A. Spontaneous remission of cancer. A thyroid hormone dependent phenomenon? *Anticancer Res.* **19**: 4839-4844, 1999.

Herrmann M., Lorenz H. M., Voll R., Grunke M., Woith W., Kalden J.R. A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. *Nucleic Acids Res.* **22**: 5506-5507, 1994.

Hirai T., Chida K. Protein kinase Czeta (PKCzeta): activation mechanisms and cellular functions. *J. Biochem.* **133**: 395, 2003.

Hirose Y., Rao C.V., Reddy B.S. Modulation of inducible nitric oxide synthase expression in rat intestinal cells by colon tumor promoters. *Int. J. Oncol.* **18**: 141-146, 2001.

Hoffman R.A., Langrehr J.M., Wren S.M., Dull K.E., Ildstad S.T., McCarthy S.A., Simmons R.L. Characterization of the immunosuppressive effects of nitric oxide in graft vs host disease. *J. Immunol.* **151**: 1508-1518, 1993.

## 8. REFERENCIAS

Hortelano S., Genaro A.M., Boscá L. Phorbol esters induce nitric oxide synthase and increase arginine influx in cultured peritoneal macrophages. *FEBS Lett.* **320**: 135-139, 1993.

Housey G.M., Johnson M.D., Hsiao W.L., O'Brian C.A., Murphy J.P., Kirschmeier P., Weinstein I.B. Overproduction of protein kinase C causes disordered growth control in rat fibroblasts. *Cell.* **52**: 343-354, 1988.

Huffman L.J., Judy D.J., Rao K.M., Frazer D.G., Goldsmith W.T. Lung responses to hypothyroidism, hyperthyroidism, and lipopolysaccharide challenge in rats. *J. Toxicol. Environ Health A.* **61**: 623-639, 2000.

Huffman L.J., Prugh D.J., Brumbaugh K., Ding M. Influence of hyperthyroidism on rat lung cytokine production and nuclear factor-kappaB activation following ozone exposure. *Inhal Toxicol.* **14**:1161-1174, 2002.

Ireland D.D., Reiss C.S. Expression of IL-12 receptor by neurons. *Viral Immunol.* **17**: 411-422, 2004.

Isakov N., Mally M.I., Altman A. Mitogen-induced human T cell proliferation is associated with increased expression of selected PKC genes. *Mol Immunol.* **29**(7-8): 927-933, 1992.

Jadeski L.C., Chakraborty C., Lala P.K. Role of nitric oxide in tumour progression with special reference to a murine breast cancer model. *Can J Physiol Pharmacol.* **80**: 125-135, 2002.

Jorns A., Tiedge M., Lenzen S. Thyroxine induces pancreatic beta cell apoptosis in rats. *Diabetologia* **45**:851-855, 2002.

## 8. REFERENCIAS

Kamimura Y., Fujii T., Kojima H., Nagano T., Kawashima K. Nitric oxide (NO) synthase mRNA expression and NO production via muscarinic acetylcholine receptor-mediated pathways in the CEM, human leukemic T-cell line. *Life Sci.* **72**(18-19): 2151-2154, 2003.

Kamimura K., Hojo H., Abe M. Characterization of expression of protein kinase C isozymes in human B-cell lymphoma: Relationship between its expression and prognosis. *Pathol Int.* **54**(4): 224-230, 2004.

Kanthasamy A.G., Kitazawa M., Kaul S., Yang Y., Lahiri D.K., Anantharam V., Kanthasamy A. Proteolytic activation of proapoptotic kinase PKCdelta is regulated by overexpression of Bcl-2: implications for oxidative stress and environmental factors in Parkinson's disease. *Ann N. Y. Acad. Sci.* **1010**: 683-686, 2003.

Keast D., Taylor K. The effect of tri-iodothyronine on the phytohaemagglutinin response of T lymphocytes. *Clin Exp Immunol.* **47**: 217-220, 1982.

Kelley K.W. From hormones to immunity: the physiology of immunology. *Brain Behav Immun.* **18**: 95-113, 2004.

Klecha A.J., Genaro A.M., Lysionek A.E., Caro R.A., Coluccia G.A., Cremaschi G.A. Experimental evidence pointing to the bidirectional interaction between the immune system and the thyroid axis. *International Journal of Immunopharmacology* **22**: 491-500, 2000.

Klecha A.J., Genaro A.M., Gorelik G., Barreiro Arcos M.L., Silberman D.M. Schuman M., Garcia S.I., Pirola C., Cremaschi G.A. Integrative study of hypothalamus-pituitary-thyroid-immune system interaction. Thyroid hormone mediated-modulation of lymphocyte activity through protein kinase C signaling pathway. *J. Endocrinol.*, 2006 en prensa.

## 8. REFERENCIAS

Krasilnikova O.A., Kavok N.S., Babenko N.A. Drug-induced and postnatal hypothyroidism impairs the accumulation of diacylglycerol in liver and liver cell plasma membranes. *BMC Physiol.* **2**: 12-16, 2002.

Kronfeld I, Kazimirsky G, Gelfand EW, Brodie C. NGF rescues human B lymphocytes from anti-IgM induced apoptosis by activation of PKCzeta. *Eur. J. Immunol.* **32**: 136-143, 2002.

Krueger G.R., Marshall G.R., Junker U., Schroeder H., Buja L.M., Wang G. Growth factors, cytokines, chemokines and neuropeptides in the modeling of T-cells. *In Vivo* **16**: 365-386, 2002.

Labeur M., Nahmod V.E., Finkielman S., Arzt E. Lesions of the medial septal nucleus produce a long-lasting inhibition of T lymphocyte proliferation. *Neurosci Lett.* **125**: 129-132, 1991.

Lahn M., Sundell K., Kohler G. The role of protein kinase C-alpha in hematologic malignancies. *Acta Haematol.* **115**: 1-8, 2006.

Lala P.K., Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *Lancet Oncol.* **2**: 149-156, 2001.

Lee J.W., Chen J.Y., Yang C.S., Doong S.L. Thyroid hormone receptor alpha 1 (c-erb A alpha 1) suppressed transforming phenotype of nasopharyngeal carcinoma cell line. *Cancer Lett.* **184**:149-156, 2002.

Lee K.Y., D'Acquisto F., Hayden M.S., Shim J.H., Ghosh S. PDK1 nucleates T cell receptor-induced signaling complex for NF-kappaB activation. *Science* **308**(5718): 114-118, 2005.

## 8. REFERENCIAS

Leitman D.C., Costa C.H.R.M., Graf H., Baxter J.D., Ribeiro R.C.J. Thyroid hormone activation of transcription is potentiated by activators of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **271**: 21950-21955, 1996.

Leli U., Parker P.J., Shea T.B. Intracellular delivery of protein kinase C-alpha or-epsilon isoform-specific antibodies promotes acquisition of a morphologically differentiated phenotype in neuroblastoma cells. *FEBS Lett.* **297**: 91-94, 1992.

Leroy I., de Thonel A., Laurent G., Quillet-Mary A. Protein kinase C zeta associates with death inducing signaling complex and regulates Fas ligand-induced apoptosis. *Cell Signal.* **17**: 1149-57, 2005.

Levytsky R.M., Filyak Y. Z., Stoika R.S. Correlation between generation of nitric oxide and cell viability in human peripheral blood mononuclear cells and leukemic Jurkat T-cell line. *Exp Oncol.* **26**: 217-220, 2004.

Liew F.Y. Regulation of lymphocyte functions by nitric oxide. *Curr. Opinion Immunol.* **7**: 396-399, 1995.

Lin H.Y., Thacore H.R., Davis F.B., Davis P.J. Potentiation by thyroxine of interferon-gamma-induced antiviral state requires PKA and PKC activities. *Am. J. Physiol.* **271**: 1256-1261, 1996.

Lin H.Y., Davis F.B., Gordinier J.K., Martino L.J., Davis P.J. Thyroid hormone induces activation of mitogen-activated protein kinase in cultured cells. *Am. J. Physiol.* **276**: 1014-1024, 1999.

Lirk P., Hoffmann G., Rieder J. Inducible nitric oxide synthase-time for reappraisal. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* **1**: 89-108, 2002.

## 8. REFERENCIAS

Losel R, Wehling M. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**: 46-56, 2003.

Lucas P.C., McAllister-Lucas L.M., Nunez G.J. NF-kappaB signaling in lymphocytes: a new cast of characters. *Cell. Sci.* **1**: 31-39, 2004.

Macphail S.E., Gibney C.A., Brooks B.M., Booth C.G., Flanagan B.F., Coleman J.W. Nitric Oxide Regulation of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Critical Time Dependence and Selectivity for Cytokine versus Chemokine Expression 1. *The Journal of Immunology* **171**: 4809-4815, 2003.

Majumder PK, Pandey P, Sun X, Cheng K, Datta R, Saxena S, Kharbanda S, Kufe D. Mitochondrial translocation of protein kinase C delta in phorbol ester-induced cytochrome c release and apoptosis. *J. Biol. Chem.* **275**: 21793-21796, 2000.

Mannick J.B., Asano K., Izumi K., Kieff E., Stamler J.S. Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell* **79**: 1137-1146, 1994.

Mansuy D., Boucher J.L. Alternative nitric oxide-producing substrates for NO synthases. *Free Radic Biol Med.* **37**: 1105-1121, 2004.

Martin A.G., San-Antonio B., Fresno M. Regulation of nuclear factor kappa B transactivation. Implication of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C zeta in c-Rel activation by tumor necrosis factor alpha. *J. Biol. Chem.* **276**(19): 15840-15849, 2001.

Martin P., Duran A., Minguet S., Gaspar M.L., Diaz-Meco M.T., Rennert P., Leitges M., Moscat J. Role of  $\zeta$  PKC in B-cell signaling and function. *EMBO J.* **21**(15): 4049-57, 2002.

## 8. REFERENCIAS

McAllister R.M., Albarracin I., Price E.M., Smith T.K., Turk J.R., Wyatt K.D. Thyroid status and nitric oxide in rat arterial vessels. *J Endocrinol.* **185**: 111-119, 2005.

Mc Cann S. Neuroimmunomodulation. Molecular aspects, integrative systems and clinical advances. *Annals N. Y. Acad. Sci.* **840**: 1-14, 1998.

Meier C.A., Fabbro D., Meyhack I., Hemmings B., Olbrecht U., Jakob A., Walter P. Effect of hypothyroidism and thyroid hormone replacement on the level of protein kinase C and protein kinase A in rat liver. *FEBS Lett.* **282**: 397-400, 1991.

Meller N, Elitzur Y, Isakov N. Protein kinase C-theta (PKCtheta) distribution analysis in hematopoietic cells: proliferating T cells exhibit high proportions of PKCtheta in the particulate fraction. *Cell Immunol.* **193**: 185-193, 1999.

Melloni E., Pontremoli S., Sparatore B., Patrone M., Grossi F., Marks P.A., Rifkind R.A. Introduction of the beta isozyme of protein kinase C accelerates induced differentiation of murine erythroleukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **87**: 4417-4420, 1990.

Mellor H., Parker P.J. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* **332**: 281-292, 1998.

Mendes R.V., Martins A.R., de Nucci G., Murad F., Soares F.A. Expression of nitric oxide synthase isoforms and nitrotyrosine immunoreactivity by B-cell non-Hodgkin's lymphomas and multiple myeloma. *Histopathology* **39**: 172-178, 2001.

Mihara S., Suzuki N., Wakisaka S., Suzuki S., Sekita N., Yamamoto S., Saito N., Hoshino T., Sakane T. Effects of thyroid hormones on apoptotic cell death of human lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* **84**(4):1378-1385, 1999.

## 8. REFERENCIAS

Miller B.W., Baier L.D., Morrison A.R. Overexpression of protein kinase C-zeta isoform increases cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. *Am J Physiol.* **273**: C130-136, 1997.

Min J.K., Kim Y.M., Kim S.W., Kwon M.C., Kong Y.Y., Hwang I.K., Won M.H., Rho J., Kwon Y.G. TNF-related activation-induced cytokine enhances leukocyte adhesiveness: induction of ICAM-1 and VCAM-1 via TNF receptor-associated factor and protein kinase C-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells. *J. Immunol.* **175**: 531-540, 2005.

Mischak H., Kolch W., Goodnight J., Davidson W.F., Rapp U., Rose-John S., Mushinski J.F. Expression of protein kinase C genes in hemopoietic cells is cell-type- and B cell-differentiation stage specific. *J. Immunol.* **147**: 3981-3987, 1991.

Mischak H., Pierce J.H., Goodnight J., Kazanietz M.G., Blumberg P.M., Mushinski J.F. Phorbol ester-induced myeloid differentiation is mediated by protein kinase C-alpha and -delta and not by protein kinase C-beta II, -epsilon, -zeta, and -eta. *J Biol Chem.* **268**: 20110-20115, 1993.

Miyamoto A., Nakayama K., Imaki H., Hirose S., Jiang Y., Abe M., Tsukiyama T., Nagahama H., Ohno S., Hatakeyama S., Nakayama K.I. Increased proliferation of B cells and auto-immunity in mice lacking protein kinase C delta. *Nature.* **416**: 865-869, 2002.

Momose I, Terashima M, Nakashima Y, Sakamoto M, Ishino H, Nabika T, Hosokawa Y, Tanigawa Y. Phorbol ester synergistically increases interferon regulatory factor-1 and inducible nitric oxide synthase induction in interferon-gamma-treated RAW 264.7 cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1498**: 19-31, 2000.

Moreno-Garcia M.E., Lopez-Bojorques L.N., Zentella A., Humphries L.A., Rawlings D.J., Santos-Argumedo L. CD38 signaling regulates B lymphocyte activation via a phospholipase C (PLC)-gamma 2-independent, protein kinase C, phosphatidylcholine-PLC, and phospholipase D-dependent signaling cascade. *J. Immunol.* **174**: 2687-2695, 2005.

## 8. REFERENCIAS

Mori N., Nunokawa Y., Yamada Y., Ikeda S., Tomonaga M., Yamamoto N. Expression of human inducible nitric oxide synthase gene in T-cell lines infected with human T-cell leukemia virus type-I and primary adult T-cell leukemia cells. *Blood*. **94**: 2862-2870, 1999.

Mori M., Gotoh T. Arginine metabolic enzymes, nitric oxide and infection. *J Nutr*. **134**: 2820-2825, 2004.

Moscat J., Diaz-Meco M.T. The atypical protein kinase Cs. Functional specificity mediated by specific protein adapters. *EMBO Rep*. **1**: 399-403, 2000.

Murphy P.R., Limoges M., Dodd F., Boudreau R.T., Too C.K. Fibroblast growth factor-2 stimulates endothelial nitric oxide synthase expression and inhibits apoptosis by a nitric oxide-dependent pathway in Nb2 lymphoma cells. *Endocrinology* **142**: 81-88, 2001.

Murray N.R., Fields A.P. Atypical protein kinase C iota protects human leukemia cells against drug-induced apoptosis. *J. Biol. Chem*. **272**: 27521-27524, 1997.

Nagy G., Perl A. The role of nitric oxide in abnormal T cell signal transduction in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*. 2006, en prensa.

Nakajima T., Yukawa O., Azuma C., Ohyama H., Wang B., Kojima S., Hayata I., Hama-Inaba H. Involvement of protein kinase C-related anti-apoptosis signaling in radiation-induced apoptosis in murine thymic lymphoma(3SBH5) cells. *Radiat Res*. **161**: 528-534, 2004.

Nathan C.F., Hibbs J.B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol*. **3**: 65-70, 1991.

Newton A.C. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem*. **270**: 28495-28498, 1995.

## 8. REFERENCIAS

Newton AC. Regulation of protein kinase C. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**: 161-167, 1997.

Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses.

*FASEB J.* **9**: 484-496, 1995.

Oates J.C., Gilkeson G.S. Nitric oxide induces apoptosis in spleen lymphocytes from MRL/lpr mice. *J Investig Med.* **52**: 62-71, 2004.

O'Donnell B.V., Tew D.G., Jones O.T., England P.J. Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochem J.* **290**: 41-49, 1993.

Ohashi H., Itoh M. Effects of thyroid hormones on lymphocyte phenotypes in rats: changes in lymphocyte subsets related to thyroid function. *Endocrine Regulations* **28**: 117-123, 1994.

Omori M., Yamashita M., Inami M., Ukai-Tadenuma M., Kimura M., Nigo Y., Hosokawa H., Hasegawa A., Taniguchi M., Nakayama T. CD8 T Cell-Specific Downregulation of Histone Hyperacetylation and Gene Activation of the IL-4 Gene Locus by ROG, Repressor of GATA. *Immunity* **19**: 281-294, 2003.

Orr J.W., Keranen L.M., Newton A.C. Reversible exposure of the pseudosubstrate domain of protein kinase C by phosphatidylserine and diacylglycerol. *J. Biol. Chem.* **267**(22):15263-15266,1992.

Panaretakis T., Laane E., Pokrovskaja K., Bjorklund A.C., Moustakas A., Zhivotovsky B., Heyman M., Shoshan M.C., Grander D. Doxorubicin requires the sequential activation of caspase-2, protein kinase Cdelta, and c-Jun NH2-terminal kinase to induce apoptosis. *Mol. Biol. Cell.* **16**: 3821-3831, 2005.

## 8. REFERENCIAS

Park Y.C., Jun C.D., Kang H.S., Kim H.D., Kim H.M., Chung H.T. Role of intracellular calcium as a priming signal for the induction of nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages. *Immunology*. **87**: 296-302, 1996.

Parmentier J.H., Smelcer P., Pavicevic Z., Basic E., Idrizovic A., Estes A., Malik K.U. PKC-zeta mediates norepinephrine-induced phospholipase D activation and cell proliferation in VSMC. *Hypertension* **41**: 794-800, 2003.

Paul A., Doherty K., Plevin R. Differential regulation by protein kinase C isoforms of nitric oxide synthase induction in RAW 264.7 macrophages and rat aortic smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*. **120**: 940-946, 1997.

Pawlikowski M., Stepien H., Komorowski J. Hypothalamic-pituitary-thyroid axis and the immune system. *Neuroimmunomodulation* **1**: 149-152, 1994.

Perkins N.D. Regulation of NF-kappaB by atypical activators and tumour suppressors. *Biochem Soc Trans*. **32**: 936-939, 2004.

Pillay K. Congenital hypothyroidism and immunodeficiency: evidence for an endocrine-immune interaction. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab*. **11**: 757-761, 1998.

Podar K., Tai Y.T., Lin B.K., Narsimhan R.P., Sattler M., Kijima T., Salgia R., Gupta D., Chauhan D., Anderson K.C. Vascular endothelial growth factor-induced migration of multiple myeloma cells is associated with beta 1 integrin- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent PKC alpha activation. *J Biol Chem*. **277**: 7875-7881, 2002.

Poljakovic M., Nygren J.M., Persson K. Signalling pathways regulating inducible nitric oxide synthase expression in human kidney epithelial cells. *Eur. J. Pharmacol*. **469**(1-3): 21-28, 2003.

## 8. REFERENCIAS

Pongracz J., Clark P., Neoptolemos J.P., Lord J.M. Expression of protein kinase C isoenzymes in colorectal cancer tissue and their differential activation by different bile acids. *Int J Cancer*. **61**: 35-39, 1995.

Powell T.J., Jenkins C.D., Hattori R., MacPherson G.G. Rat bone marrow-derived dendritic cells, but not ex vivo dendritic cells, secrete nitric oxide and can inhibit T-cell proliferation. *Immunology* **109**:197-208, 2003.

Qiang Y.W., Walsh K., Yao L., Kedei N., Blumberg P.M., Rubin J.S., Shaughnessy J. Jr., Rudikoff S. Wnts induce migration and invasion of myeloma plasma cells. *Blood*. **106**: 1786-1793, 2005.

Rabson A.B., Weissmann D. From microarray to bedside: targeting NF-kappaB for therapy of lymphomas. *Clin Cancer Res*. **11**: 2-6, 2005.

Rao C.V. Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention. *Mutat. Res*. **555**: 107-119, 2004.

Reiling N., Kroncke R., Ullmer A.J., Gerdes J., Flad H.D., Hauschildt S. Nitric oxide synthase: expression of the endothelial Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent isoform in human B and T lymphocytes. *Eur. J. Immunol*. **26**: 511-516, 1996.

Reveneau S., Arnould L., Jolimoy G., Hilpert S., Lejeune P., Saint-Giorgio V., Belichard C., Jeannin J.F. Nitric oxide synthase in human breast cancer is associated with tumor grade, proliferation rate, and expression of progesterone receptors. *Lab Invest*. **79**: 1215-1225, 1999.

Rivest S. How circulating cytokines trigger the neural circuits that control the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology*. **26**: 761-788, 2001.

## 8. REFERENCIAS

Ron D., Kazanietz M.G. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J.* **13**: 1658-1676, 1999.

Dicker P., Rozengurt E. Stimulation of DNA synthesis by tumour promoter and pure mitogenic factors. *Nature.* **276**: 723-726, 1978.

Ruybal P., Gravisaco M.J., Barcala V., Escalada A., Cremaschi G., Taboga O., Waldner C. Mongini C. Transgene expression enhancement in T-lymphoma cell lines. *Int Immunopharmacol.* **5**:1685-1692,2005.

Rybin V., Sternberg S.F. Thyroid hormone represses protein kinase C isoform expression and activity in rat cardiac myocytes. *Circ. Res.* **79**: 388-398, 1996.

Saijo K., Mecklenbrauker I., Schmedt C., Tarakhovsky A. B cell immunity regulated by the protein kinase C family. *Ann. N Y Acad. Sci.* **987**: 125-134, 2003.

Saijo K., Schmedt C., Su I.H., Karasuyama H., Lowell C.A., Reth M., Adachi T., Patke A., Santana A., Tarakhovsky A. Essential role of Src-family protein tyrosine kinases in NF-kappaB activation during B cell development. *Nat Immunol.* **4**: 274-279, 2003.

Samelson L.E., Donovan J.A., Isakov N., Ota Y., Wange R.L. Signal transduction mediated by the T-cell antigen receptor. *Ann N. Y. Acad Sci.* **766**: 157-172, 1995.

Savino W., Smaniotto S., Binart N., Postel-Vinay M.C., Dardenne M. In vivo effects of growth hormone on thymic cells. *Ann N. Y. Acad Sci.* **992**: 179-85, 2003.

Schmittgen T.D., Zakrajsek B.A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Biochem Biophys Methods* **46**: 69-81, 2000.

Schoenfeld P.S., Myers J.W., Myers L., LaRocque J.C. Suppression of cell-mediated immunity in hypothyroidism. *Southern Medical Journal* **88**: 347-349, 1995.

## 8. REFERENCIAS

Sciorati C., Rovere P., Ferrarini M., Heltai S., Manfredi A.A., Clementi E. Autocrine nitric oxide modulates CD95-induced apoptosis in gd T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **272**: 23211-23215, 1997.

Sheu M.L., Chao K.F., Sung Y.J., Lin W.W., Lin-Shiau S.Y., Liu S.H. Activation of phosphoinositide 3-kinase in response to inflammation and nitric oxide leads to the up-regulation of cyclooxygenase-2 expression and subsequent cell proliferation in mesangial cells. *Cell. Signal.* **17**:975-984, 2005.

Shimoni Y. Protein kinase C regulation of K<sup>+</sup> currents in rat ventricular myocytes and its modification by hormonal status. *J. Physiol.* **520**: 439-449, 1999.

Sodhi A., Biswas S.K. fMLP-induced in vitro nitric oxide production and its regulation in murine peritoneal macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **71**: 262-270, 2002.

Sonoki T., Matsuzaki H., Nagasaki A., Hata H., Yoshida M., Matsuoka M., Kuribayashi N., Kimura T., Harada N., Takatsuki K., Mitsuya H., Mori M. Detection of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA by RT-PCR in ATL patients and HTLV-I infected cell lines: clinical features and apoptosis by NOS inhibitor. *Leukemia.* **13**: 713-718, 1999.

Spitaler M., Wiesenhofer B., Biedermann V., Seppi T., Zimmermann J., Grunicke H., Hofmann J. The involvement of protein kinase C isoenzymes alpha, epsilon and zeta in the sensitivity to antitumor treatment and apoptosis induction. *Anticancer Res.* **19**(5B): 3969-3976, 1999.

Stuehr D.J., Nathan C.F. Nitric oxide: a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J.Exp.Med.* **169**: 1543-1545, 1989.

Stuehr D.J. Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway. *J. Nutr.* **134**: 2748S-2751S, 2004.

## 8. REFERENCIAS

Strulovici B., Daniel-Issakani S., Baxter G., Knopf J., Sultzman L., Cherwinski H., Nestor J. Jr., Webb D.R., Ransom J. Distinct mechanisms of regulation of protein kinase C epsilon by hormones and phorbol diesters. *J. Biol. Chem.* **266**: 168-173, 1991.

Szabó C., Southanm G.J., Thiemermann C. Beneficial effects and improved survival in rodent models of septic shock with S-methylisothiourea sulfate, a potent and selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 12472-12476, 1994.

Szamel M., Ebel U., Uciechowski P., Kaefer V., Resch K. T cell antigen receptor dependent signalling in human lymphocytes: cholera toxin inhibits interleukin-2 receptor expression but not interleukin-2 synthesis by preventing activation of a protein kinase C isotype, PKC-alpha. *Biochim. Biophys. Acta.* **1356**: 237-248, 1997.

Tachado S.D., Mayhew M.W., Wescott G.G., Foreman T.L., Goodwin C.D., McJilton M.A., Terrian D.M. Regulation of tumor invasion and metastasis in protein kinase C epsilon-transformed NIH3T3 fibroblasts. *J. Cell Biochem.* **85** (4): 785-797, 2002.

Tan S.L., Parker P.J. Emerging and diverse roles of protein kinase C in immune cell signalling. *Biochem. J.* **376**: 545-552, 2003.

Tapia G., Fernandez V., Varela P., Cornejo P., Guerrero J., Videla A. Thyroid Hormone-Induced Oxidative Stress Triggers Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation And Cytokine Gene Expression In Rat Liver. *Free Radical Biology and Medicine* **35**: 257-265, 2003.

Tata J.R. Biochemical applications of a newly discovered property of throxine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **86**: 469-83, 1960.

## 8. REFERENCIAS

- Taylor-Robinson A.W., Liew F.Y., Severn A., Xu D., McSorley S.J., Garside P., Padron J., Phillips R.S. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. *Eur. J. Immunol.* **24**: 980-984, 1994.
- Teusch N., Lombardo E., Eddleston J., Knaus U.G. The low molecular weight GTPase RhoA and atypical protein kinase Czeta are required for TLR2-mediated gene transcription. *J. Immunol.* **173**:507-514, 2004.
- Theodossiou C., Schwarzenberger P. Propylthiouracil reduces xenograft tumor growth in an athymic nude mouse prostate cancer model. *Am. J. Med. Sci.* **319**: 96-99, 2000.
- Theodossiou C., Skrepnik N., Robert E.G., Prasad C., Axelrad T.W., Schapira D.V., Hunt J.D. Propylthiouracil-induced hypothyroidism reduces xenograft tumor growth in athymic nude mice. *Cancer.* **86**:1596-601, 1999.
- Thippeswamy T., McKay J.S., Quinn J.P., Morris R. Nitric oxide, a biological double-faced janus--is this good or bad?. *Histol Histopathol.* **21**(4): 445-458, 2006.
- Toms S.A., Hercbergs A., Liu J., Kondo S., Barnett G.H., Casey G., Barna B.P. Thyroid hormone depletion inhibits astrocytoma proliferation via a p53-independent induction of p21 (WAF1/CIP1). *Anticancer Res.* **18**: 289-293, 1998.
- Toni R. The neuroendocrine system: organization and homeostatic role. *J Endocrinol Invest.* **27**: 5-47, 2004.
- Trubiani O., Salvolini E., Vignini A., D'Arcangelo C., Di Primio R., Mazzanti L. NF-kappaB and NOS may play a role in human RPMI-8402 cell apoptosis. *Cell Biol Int.* **29**: 529-536, 2005.
- Trushin S.A., Pennington K.N., Carmona E.M., Asin S., Savoy D.N., Billadeau D.D., Paya C.V. Protein kinase Calpha (PKCalpha) acts upstream of PKCtheta to activate IkappaB kinase and NF-kappaB in T lymphocytes. *Mol Cell Biol.* **23**(19): 7068-7081, 2003.

## 8. REFERENCIAS

Tsutsumi A., Freire-Moar J., Ransom J.T. Transient down-regulation of PKC-zeta RNA following crosslinking of membrane IgM on WEHI-231 B lymphoma cells. *Cell Immunol.* **142**: 303-312, 1992.

Turrin N.P, Rivest S. Unraveling the molecular details involved in the intimate link between the immune and neuroendocrine systems. *Exp. Biol. Med.* **229**: 996-1006, 2004.

Upadhyay G., Singh R., Kumar A., Kumar S., Kapoor A., Godbole M.M. Severe hyperthyroidism induces mitochondria-mediated apoptosis in rat liver. *Hepatology* **39**(4):1120-1130, 2004.

Valenti L.M., Mathieu J., Chancerelle Y., De Sousa M., Levacher M., Dinh-Xuan A.T., Florentin I. High levels of endogenous nitric oxide produced after burn injury in rats arrest activated T lymphocytes in the first G1 phase of the cell cycle and then induce their apoptosis. *Exp Cell Res.* **306**: 150-167, 2005.

Valledor A.F., Xaus J., Comalada M., Soler C., Celada A. Protein kinase C epsilon is required for the induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J. Immunol.* **164**: 29-37, 2000.

van der Veen R.C., Dietlin T.A., Pen L., Gray J.D., Hofman F.M. Antigen presentation to Th1 but not Th2 cells by macrophages results in nitric oxide production and inhibition of T cell proliferation: interferon- is essential but insufficient. *Cell. Immunol.* **20**:125, 2000.

van der Veen R.C. Nitric oxide and T helper cell immunity. *Int. Immunopharmacol.* **1**: 1491-1500, 2001.

Varas S.M., Munoz E.M., Hapon M.B., Aguilera Merlo C.I., Gimenez M.S., Jahn G.A. Hyperthyroidism and production of precocious involution in the mammary glands of lactating rats. *Reproduction* **124**: 691-702, 2002.

## 8. REFERENCIAS

Varga F., Luegmayr E., Fratzl-Zelman N., Glantschnig H., Ellinger A., Prinz D., Rumpler M., Klaushofer K. Tri-iodothyronine inhibits multilayer formation of the osteoblastic cell line, MC3T3-E1, by promoting apoptosis. *J Endocrinol.* **160**: 57-65, 1999.

Volkov Y., Long A., Kelleher D. Inside the crawling T cell: leukocyte function-associated antigen-1 cross-linking is associated with microtubule-directed translocation of protein kinase C isoenzymes  $\beta$  (I) and  $\delta$ . *J. Immunol.* **161**: 6487-6495, 1998.

Wang H.C., Klein J.R. Immune function of thyroid stimulating hormone and receptor. *Critical Reviews in Immunology* **21**: 323-337, 2001.

Way K.J., Chou E., King G.L. Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends Pharmacol Sci.* **21**: 181-187, 2000.

Wheeler D.L., Reddig P.J., Dreckschmidt N.E., Leitges M., Verma A.K. Protein kinase Cdelta-mediated signal to ornithine decarboxylase induction is independent of skin tumor suppression. *Oncogene.* **21**(22): 3620-3630, 2002.

Wheway J., Mackay C.R., Newton R.A., Sainsbury A., Boey D., Herzog H., Mackay F. A fundamental bimodal role for neuropeptide Y1 receptor in the immune system. *J. Exp Med.* **202**: 1527-1538, 2005.

Williams M.S., Noguchi S., Henkart P.A., Osawa Y. Nitric oxide synthase plays a signaling role in TCR-triggered apoptotic death. *J. Immunol.* **161**: 6526-6531, 1998.

Wrona D., Jurkowski M., Luszawska D., Tokarski J., Trojnar W. The effects of lateral hypothalamic lesions on peripheral blood natural killer cell cytotoxicity in rats hyper- and hyporesponsive to novelty. *Brain Behav Immun.* **17**: 453-461, 2003.

Wrona D. Neural-immune interactions: An integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. *J. Neuroimmunol.* **172**:38-58, 2006.

## 8. REFERENCIAS

Wu C.H., Chang C.H., Lin H.C., Chen C.M., Lin C.H., Lee H.M. Role of protein kinase C in BSA-AGE-mediated inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. *Biochem. Pharmacol.* **66**: 203-212, 2003.

Yasuda I., Kishimoto A., Tanaka S., Tominaga M., Sakurai A., Nishizuka Y. A synthetic peptide substrate for selective assay of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun.* **166**: 1220-1227, 1990.

Yen P.M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological Reviews* **81**: 1097-1141, 2001.

Zhao H., Dugas N., Mathiot C., Delmer A., Dugas B., Sigaux F., Kolb J.P. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a functional inducible nitric oxide synthase displaying anti-apoptotic activity. *Blood.* **92**:1031-1043, 1998.

Ziche M., Morbidelli L., Masini E., Amerini S., Granger H.J., Maggi C.A., Geppetti P., Ledda F. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J Clin Invest.* **94**: 2036-2044.

Zhou W., Takuwa N., Kumada M., Takuwa Y. Protein kinase C-mediated bidirectional regulation of DNA synthesis, RB protein phosphorylation, and cyclin-dependent kinases in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* **268**: 23041-23048, 1993.

Zhuang S., Demirs J.T., Kochevar I.E. Protein kinase C inhibits singlet oxygen-induced apoptosis by decreasing caspase-8 activation. *Oncogene* **20**: 6764-6776, 2001.

## **9. ABREVIATURAS**

## 9. ABREVIATURAS

AG	Aminoguanidina
aPKC	Proteína quinasa C atípica
ARNm	ARN mensajero
BAPTA-AM	1,2-Bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N' -ácido tetraacético tetrakis (acetoximetil ester)
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterina
BW	Línea celular BW5147
CFSE	Carboxifluoresceína succimidil ester
Con A	Concanavalina A
cPKC	Proteína quinasa C clásica
DAG	Diacilglicerol
DPI	Difenileneiodonio
EGTA	Etilenglicol-O, O'-bis (2-aminoetil)-N,N,N', N'-ácido tetraacético
eNOS	Oxido nítrico sintasa endotelial
FAD	Flavina adenina dinucleótido
FMN	Flavina mononucleótido
FS	Fosfatidilserina
GF-109203X	3-[1-[3-(Dimetilamino)propil]-1H-indol-3-yl]-4-(1H-indol-3-yl)-1H-pirrol-2,5-diona .
HTs	Hormonas tiroideas
I $\kappa$ B- $\alpha$ y $\beta$	Inhibidor del factor de transcripción nuclear kappa B
IKK	Complejo quinasa de I $\kappa$ B
IL	Interleuquina
INF $\gamma$	Interferón $\gamma$
iNOS	Oxido nítrico sintasa inducible
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
L-NMMA	N <sup>G</sup> -monometil-L-arginina monoacetato
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NCDC	2-nitro-4-carboxifenil-N,N-Difenilcarbamato
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear de transcripción kappa B
NIS	Simporter Na <sup>+</sup> / I <sup>-</sup>

## 9. ABREVIATURAS

nNOS	Oxido nítrico sintasa neuronal
NO	Oxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintasa
nPKC	Proteína quinasa C novel
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDK1	Quinasa dependiente de fosfoinosítidos 1
PI3-K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP <sub>3</sub>	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PM	Peso molecular
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
PS	Pseudosustrato
Ps-Myr PKC $\zeta$	Pseudosustrato permeable miristoilado de PKC $\zeta$
PTU	Propiltiouracilo
RT	Transcripción reversa
SFB	Suero fetal bovino
SMT	S-metilisotiourea
T3	3 3' 5-Triiodo-L-Tironina
T4	L-Tiroxina
Tg	Tiroglobulina
[ <sup>3</sup> H]- TdR	Timidina tritiada
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
TPK	Proteína tirosina quinasa
TPO	Peroxidasa tiroidea
TREs	Elementos de respuesta a hormonas tiroideas
TRH	Hormona liberadora de tirotrófina
TRs	Receptores nucleares para hormonas tiroideas
TSH	Tirotrófina