

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**TESIS**

**REGULACION MOLECULAR DE LA MUERTE  
CELULAR  
PROGRAMADA EN LINFOMA FOLICULAR**

**PRESENTA:**

**YOLANDA GUTIERREZ PUENTE**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
MICROBIOLOGÍA**

**MONTERREY, N. L.**

**DICIEMBRE DEL 2000**

**REGULACION MOLECULAR DE LA MUERTE  
CELULAR  
PROGRAMADA EN LINFOMA FOLICULAR**

TD  
QH671  
.G8  
2000  
c.1



1080124479

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



REGULACION MOLECULAR DE LA MUERTE CELULAR  
PROGRAMADA EN LINFOMA FOLICULAR

COMISION DE EXAMEN

REGULACION MOLECULAR DE LA MUERTE  
CELULAR  
PROGRAMADA EN LINFOMA FOLICULAR

Dr. [Faded Name]  
Co-Director Excmo.

Dr. [Faded Name]  
Co-Director Excmo.

Dr. Reyes S. Torres Guevara  
Co-Director Excmo.

Dr. Carolina Rodríguez Padilla  
Comisión de Tesis

Dr. Juan M. [Faded Name]  
Comisión de Tesis

PRESENTA:

YOLANDA GUTIERREZ PUENTE

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

DOCTORADO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
MICROBIOLOGIA

Monterrey, Nuevo León.

MONTERREY, N. L.

DICIEMBRE DEL 2000



D  
LH671  
.68  
2000



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**REGULACION MOLECULAR DE LA MUERTE CELULAR  
PROGRAMADA EN LINFOMA FOLICULAR**

**COMISION DE EXAMEN**

**Dr. Gabriel López Berestein**  
Director de Tesis

**Ph D. Ana M. Tari**  
Co-Director Externo

**Dr. Reyes S. Tamez Guerra**  
Co-Director Interno

**Dra Cristina Rodríguez Padilla**  
Comisión de Tesis

**Dr. Juan Manuel Alcocer González**  
Comisión de Tesis

Four handwritten signatures are written on horizontal lines. The first signature is for Gabriel López Berestein, the second for Ana M. Tari, the third for Reyes S. Tamez Guerra, and the fourth for Juan Manuel Alcocer González. The signatures are written in black ink.

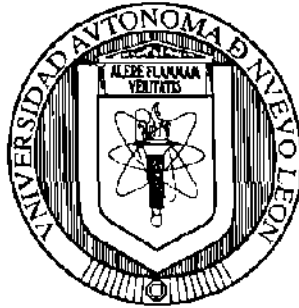
**Monterrey, Nuevo León.**

**Diciembre del 2000**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**REGULACION MOLECULAR DE LA MUERTE CELULAR  
PROGRAMADA EN LINFOMA FOLICULAR**

COMISION DE APROBACION DE TESIS

Dr. Gabriel López Berestein  
Director de Tesis

Ph D. Ana M. Tari  
Co-Director de Tesis

Dr. Reyes S. Tamez Guerra  
Co-Director de Tesis

Dra Julia Verde Star  
Subdirectora de Postgrado

Monterrey, Nuevo León.

Diciembre del 2000

## **LOCALIZACION**

**EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLO EN EL LABORATORIO DE ACARREADORES DE DROGAS DEL DEPARTAMENTO DE BIOINMUNOTERAPIA, DEL M.D. ANDERSON CANCER CENTER, EN LA CIUDAD DE HOUSTON, TX. BAJO LA DIRECCION DEL DR. GABRIEL LOPEZ BERESTEIN Y LA CO-DIRECCION EXTERNA DE LA Ph D. ANA M. TARI Y LA CO-DIRECCION INTERNA DEL DR. REYES TAMEZ GUERRA.**



## **DEDICATORIA**

**A mis padres:**

**Rubén y María de los Angeles**

**Por todo el amor, apoyo y confianza que me han brindado para llegar a esta etapa de mi carrera y por hacer de mi educación una prioridad.**

**A mis hermanos:**

**Alicia, Héctor, Rubén, Beatríz y Lourdes**

**Por su cariño y apoyo en esta fase de mi vida.**

**A:**

**Arturo**

**Por estar siempre conmigo**

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gabriel López Berestein por ser un verdadero maestro para mí, permitiéndome entrar en su línea de investigación. Gracias por su crítica y por ser un guía durante todo este tiempo y sobre todo un ejemplo a seguir.

To Dr. Ana Tari for her invaluable friendship and guidance. I am also in great debt for overseeing my progress with her professional experience and sensitive creativity. Thanks for everything.

Al Dr. Reyes Tamez Guerra por apoyarme nuevamente en esta aventura, por su continua motivación y todos los consejos que me ha brindado a través de todos estos años. Una vez más: muchas gracias maestro.

A la Dra Cristina Rodríguez por todos los consejos brindados y por la revisión del manuscrito de esta tesis.

Al Dr. Juan Manuel Alcocer González por el apoyo que me ha brindado y por su ayuda en la revisión de este manuscrito.

Al M.C. Arturo Chávez Reyes por toda su ayuda incondicional durante todos estos años y por la elaboración de las figuras y correcciones de la tesis.

Al Dr. Pablo Zapata Benavides por ayudarme en las largas jornadas de trabajo en el bioterio y por sus sugerencias en mi trabajo.

A Silvia Treviño Moreno por todo el apoyo que me ha brindado siempre, pero sobre todo por hacer posible que nuestra amistad sobreviva a la distancia. Gracias amiga por estar ahí.

A Cynthia García por su ayuda y por hacer más grata mi estancia en su país, también por todos los felices momentos compartidos y por su complicidad. Thanks my friend.

Al Dr. Richard Ford por su colaboración en los artículos y por facilitarme sus líneas celulares siempre que fué necesario.

A Magda y Lucy, por haberme aguantado todo este tiempo y por toda su ayuda a distancia, gracias!

A Jennie Schreyer por toda su ayuda y guía en los procesos administrativos.

Al Dr Roberto Mercado y la M.C. Martha Santoyo por su ayuda en el proceso estadístico de los resultados.

A Soo y Gamze, dondequiera que estén, por su amistad y todos los buenos recuerdos.

A mis compañeros del departamento de bioinmunoterapia: Sangeeta, Belisa, Alka, Jack, Doris, Bulent, Eswaran, Edgar y Christina por su ayuda y por todos los gratos momentos durante mi estancia.

A todas las personas del M.D. Anderson que de alguna forma han contribuido a que pueda terminar este trabajo, especialmente al personal de los departamentos de Medicina Veterinaria y Patología Molecular.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado.

A todas las personas que de alguna u otra forma contribuyeron a que la realización de este trabajo fuera posible, y que sin intención omito.

# INDICE GENERAL

	Página
LOCALIZACION	I
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
INDICE GENERAL	VI
INDICE DE FIGURAS	X
INDICE DE TABLAS	XII
ABREVIATURAS	XIV

## CAPITULO I: INTRODUCCION GENERAL

APOPTOSIS	2
Caspasas	5
La mitocondria	8
Proteínas pro-apoptóticas	9
Proteínas anti-apoptóticas	12
Mitocondria vs caspasas	13
LINFOMA FOLICULAR	15
Mecanismos generales de lesiones genéticas	15
Linfoma folicular	16
BCL-2	19
Localización y posibles funciones	20

<b>La familia de Bcl-2</b>	<b>20</b>
<b>Categorías en la familia de Bcl-2</b>	<b>22</b>
<b>Regulación de la muerte celular</b>	<b>24</b>
<b>Formación de canales iónicos</b>	<b>26</b>
<b>BAX</b>	<b>28</b>
<b>Estructura</b>	<b>28</b>
<b>Síntesis y localización</b>	<b>30</b>
<b>Función biológica</b>	<b>30</b>
<b>OLIGONUCLEOTIDOS ANTISENTIDO</b>	<b>32</b>
<b>Composición</b>	<b>32</b>
<b>Mecanismo de acción</b>	<b>34</b>
<b>Barreras de actividad</b>	<b>38</b>
<b>Sensitividad a las nucleasas</b>	<b>39</b>
<b>Captación celular</b>	<b>40</b>
<b>LIPOSOMAS</b>	<b>42</b>
<b>Estructura</b>	<b>42</b>
<b>Vesículas multilamelares</b>	<b>43</b>
<b>Vesículas unilamelares pequeñas</b>	<b>45</b>
<b>Vesículas unilamelares grandes</b>	<b>47</b>
<b>Factores claves en el transporte de drogas</b>	<b>47</b>
<b>OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION</b>	<b>51</b>
<b>ESTUDIOS PRELIMINARES</b>	<b>53</b>

**CAPITULO II: SEGURIDAD, FARMACOCINETICA Y DISTRIBUCION EN  
TEJIDOS DE P-ETOXY OLIGONUCLEOTIDOS ANTISENTIDOS  
INCORPORADOS EN LIPOSOMAS DIRIGIDOS HACIA BCL-2**

Resumen	56
Introducción	58
Materiales y Metodos	60
Resultados	64
Discusión	76
Conclusiones	79

**CAPITULO III: FARMACOLOGIA CELULAR DE P-ETOXY  
OLIGONUCLEOTIDOS ANTISENTIDOS ENCAPSULADOS EN LIPOSOMAS Y  
DIRIGIDOS A BCL-2**

Resumen	81
Introducción	83
Materiales y Métodos	85
Resultados	91
Discusión	101
Conclusiones	104

**CAPITULO IV: EFECTO DE P-ETOXY OLIGONUCLEOTIDOS  
ANTISENTIDOS ENCAPSULADOS EN LIPOSOMAS Y DIRIGIDOS A BCL-2  
EN MODELOS ANIMALES**

<b>Resumen</b>	106
<b>Introducción</b>	107
<b>Materiales y Métodos</b>	109
<b>Resultados</b>	112
<b>Discusión</b>	117
<b>Conclusiones</b>	120
<b>CAPITULO V: REFERENCIAS</b>	121



## INDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1.1	3
<i>Morfología de necrosis y apoptosis</i>	
FIGURA 1.2	18
Representación esquemática de las translocaciones cromosómicas que involucran al gene de Bcl-2	
FIGURA 1.3	23
Representación esquemática de Bcl-2 y proteínas relacionadas	
FIGURA 1.4	25
Modelo de la homodimerización y la heterodimerización de la familia de proteínas de Bcl-2	
FIGURA 1.5	29
Relación entre la estructura y función de la proteína Bax $\alpha$	
FIGURA 1.6	33
Inhibición de proteínas por los oligonucleótidos antisentido	
FIGURA 1.7	35
Mecanismos potenciales de los oligonucleótidos antisentido	
FIGURA 1.8	37
Modificaciones químicas de los oligonucleótidos antisentido	
FIGURA 1.9	44
Micrografías electrónicas de criofractura de diferentes tipos de vesículas	

<b>FIGURA 1.10</b>	<b>46</b>
<b>Representación esquemática del tamaño de los liposomas y su lamelaridad</b>	
<b>FIGURA 3.1</b>	<b>92</b>
<b>L-Bcl-2As inducen inhibición del crecimiento en células CJ</b>	
<b>FIGURA 3.2</b>	<b>96</b>
<b>Western Blot de las proteínas Bcl-2 y Bax</b>	
<b>FIGURA 3.3</b>	<b>98</b>
<b>Captación de L-Bcl-2 As radioactivos por células K562</b>	
<b>FIGURA 3.4</b>	<b>100</b>
<b>Retención de L-Bcl-2 As por células K562</b>	
<b>FIGURA 4.1</b>	<b>116</b>
<b>Efecto de la administración i.v. de L-Bcl-2 As, L-Bcl-2 control y liposomas vacíos en ratones SCID</b>	

## INDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 1.1	8
Nomenclatura de caspasas	
TABLA 1.2	10
Fases del proceso apoptótico	
TABLA 1.3	38
Factores para desarrollar oligos antisentido con fines terapéuticos	
TABLA 1.4	50
Propiedades de diferentes sistemas acarreadores de lípidos para el transporte de oligos antisentido	
TABLA 2.1	66
Efecto de una dosis simple de L-Bcl-2 As en ratones ICR una semana posterior a la inyección	
TABLA 2.2	68
Efecto de una dosis simple de L-Bcl-2 As en ratones ICR dos semanas posteriores a la inyección	
TABLA 2.3	70
Efecto de una dosis simple de L-Bcl-2 As en ratones ICR seis semanas posteriores a la inyección	
TABLA 2.4	72
Efecto de una dosis múltiple de L-Bcl-2 As en ratones ICR dos semanas	

	posteriores a la inyección	
TABLA 2.5	Efecto de una dosis múltiple de L-Bcl-2 As en ratones ICR seis semanas posteriores a la inyección	73
TABLA 2.6	Farmacocinética de una dosis sencilla de L-Bcl-2 en ratas Lewis	74
TABLA 2.7	Distribución en tejidos de L-Bcl-2 en ratones ICR	75
TABLA 3.1	Efecto de la longitud de los oligos en el crecimiento de una línea celular de LF	93
TABLA 3.2	Estadística descriptiva de la viabilidad celular para oligos de diferentes longitudes	94
TABLA 4.1	Efectos histopatológicos de los oligos en ratones desnudos	113
TABLA 4.2	Efecto de la administración de oligos en el peso de ratones SCID a las seis semanas de tratamiento	115

## ABREVIATURAS

$\Delta\Psi_m$	Gradiente de protones
ANOVA	Análisis de varianza
BH	Región homóloga a Bcl-2
CADV	Canal aniónico dependiente de voltaje
$Cp_0$	Concentración máxima al tiempo 0
Cxt	Area bajo la curva
D.O.	Densidad óptica
DEM	Dominios efectores de la muerte
DNA	Acido desoxiribonucleico
DRC	Dominios reclutadores de caspasas
i.p	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
ICE	Enzima que convierte a la interleucina-1 $\beta$
L-Bcl-2 As	P-ethoxy oligonucleótidos antisentido encapsulados en liposomas y dirigidos contra Bcl-2
L-Bcl-2 control	Mezcla de P-ethoxy oligos control encapsulados en liposomas y dirigidos contra Bcl-2
LFt	Linfoma folicular transformado
MBR	Región principal de rompimiento
MCP	Muerte celular programada
mRNA	Acido ribonucleico mensajero

NHL	Linfoma no-Hodgkin
Oligos	Oligonucleótidos
$t$	Tiempo de residencia
SCID	Inmunodeficiencia combinada severa
SGOT	Transaminasa glutámica oxalacética de suero
$T_{1/2}$	Vida media de la fase terminal
TM	Dominio hidrofóbico de inserción transmembranal
TNF	Factor de necrosis tumoral
TPM	Transición de la permeabilidad mitocondrial
$V_d$	Volúmen de distribución

# **CAPITULO I**

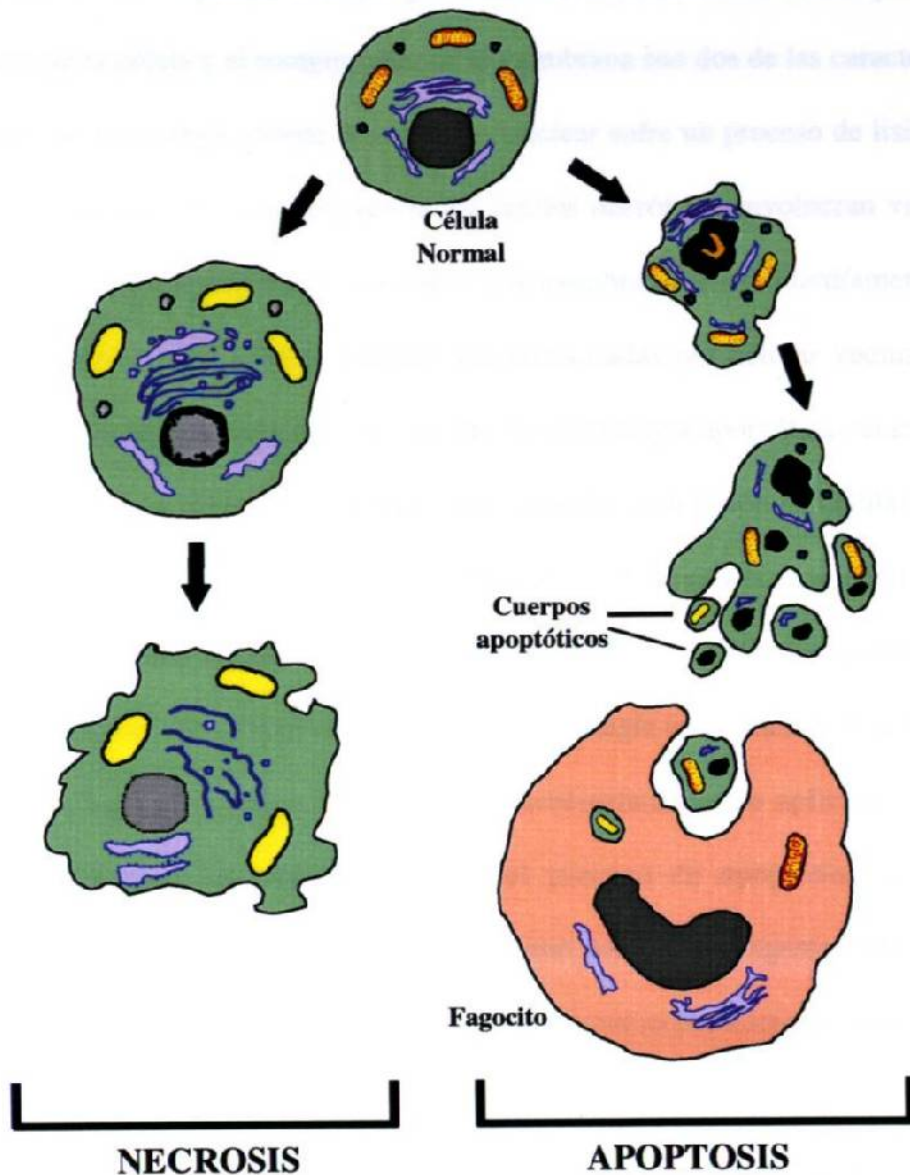
## **INTRODUCCION GENERAL**

## **APOPTOSIS**

El término apoptosis se refiere a las características morfológicas de la muerte celular programada (MCP), la cual es caracterizada por los fenómenos de contracción celular, condensación nuclear, formación de bolsas en la membrana, fragmentación de la membrana relacionada con cuerpos apoptóticos y cambios en la misma, que eventualmente llevan a la fagocitosis de la célula afectada (Figura 1.1). La MCP es requerida, tanto en el proceso del desarrollo animal, como en la vida adulta. En animales maduros, la muerte celular está en balance con la división celular, lo cual mantiene la constancia en la masa del tejido. El proceso de apoptosis hace posible remover de un organismo células dañadas por defectos genéticos, envejecimiento, enfermedades o exposición a agentes nocivos (Saikumar et al., 1999). Además, el proceso de respuesta inmune normal requiere la eliminación regulada de poblaciones celulares específicas, mediante este mecanismo de muerte celular. La apoptosis juega un papel biológico importante en el desarrollo y regulación de las poblaciones celulares, así como en la patogénesis y expresión de enfermedades. El exceso o la insuficiencia de apoptosis contribuye a la patogénesis de una amplia variedad de enfermedades relacionadas con neurodegeneración, autoinmunidad e infecciones virales, y esta también involucrada en el crecimiento y regresión de tumores (Cory, 1995) (Thompson, 1995). Aunque la apoptosis fue descrita hace casi tres décadas, los recientes avances del conocimiento de la misma se basan en gran parte en la identificación de los llamados “genes de la muerte” hace aproximadamente una década. (Ellis and Horvitz, 1986).



El proceso puede ser diferenciado de otra forma de muerte celular, la necrosis, por su respuesta a daños por toxinas, estímulos físicos o isquemia. El



**FIGURA 1.1. Morfología de necrosis y apoptosis.** Las células necróticas sufren un daño en la membrana, con la pérdida eventual de la integridad de la membrana plasmática y posteriormente la lisis de la cromatina nuclear. En contraste, durante el proceso de apoptosis no se pierde la integridad de la membrana, y la cromatina sufre un proceso de fragmentación y condensación.

La apoptosis puede ser diferenciada de otra forma de muerte celular, la necrosis, que puede ocurrir en respuesta a daños por toxinas, estímulos físicos o isquemia. El hinchamiento de la célula y el rompimiento de la membrana son dos de las características determinantes de la necrosis, donde la cromatina nuclear sufre un proceso de lisis, no de condensación (Figura 1.1). Con frecuencia los tejidos necróticos involucran vigorosos procesos inflamatorios. En contraste, los daños a la membrana ocurren tardíamente en el proceso de apoptosis y las células muertas son endocitadas por células vecinas o por fagocitos, con muy poca o nada de inflamación. La morfología apoptótica característica puede ser observada en diversas situaciones, por ejemplo, la delección de células durante el desarrollo, la regulación homeostática de poblaciones celulares y el envejecimiento. El estrés metabólico inducido por defectos genéticos específicos conlleva también a una muerte celular con las características típicas de la morfología apoptótica. Sin embargo, la clásica descripción del fenotipo apoptótico no necesariamente se aplica a todas las circunstancias durante las cuales prevalece el proceso de apoptosis. En ciertas condiciones que involucran el estrés celular impuesto por toxinas, agentes físicos o por isquemia, las células pueden morir tanto por apoptosis como por necrosis (Ferlini et al., 1999) (Papassotiropoulos et al., 1996) (Wyllie, 1997).

El proceso de MCP puede ser dividido en tres etapas principales: iniciación, reclutamiento y ejecución. Una gran cantidad de estímulos pueden servir como activadores del proceso de muerte celular, incluyendo esencialmente todas las drogas usadas en quimioterapia; radiaciones gama y ultravioleta; citocinas, incluyendo al factor de necrosis tumoral (TNF), linfotoxina- $\alpha$ , linfotoxina- $\beta$ , ligando Fas y factor de crecimiento transformante, hormonas esteroidales, tales como glucocorticoides y

retinoides; células T citotóxicas; privación de factores de crecimiento; algunos tipos de virus; agentes oxidantes; y factores que alteran la homeostasis del ión  $Ca^{2+}$ . La sobreexpresión de Bcl-2 puede proteger a las células de apoptosis, por lo tanto, las vías celulares afectadas aparentemente por estos iniciadores de la apoptosis convergen en lo que puede ser una vía común la cual es gobernada por Bcl-2 y sus homólogos. La vía de la muerte celular lleva a la activación de la familia de las proteasas de cisteína (llamadas caspasas), que tienen una con alta especificidad para el corte de los sustratos protéicos en los residuos de ácido aspártico.

### Caspasas

El descubrimiento de la homología entre la proteína CED-3 del nemátodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) y la enzima que convierte a la interleucina- $1\beta$  (ICE o caspasa-1) (Yuan et al., 1993) (Thornberry et al., 1992), una proteasa de células de mamífero, proporcionó la primera clave acerca de los mecanismos de la MCP en diversos organismos (Miura et al., 1993). Desde entonces, la gran complejidad de los mecanismos de la muerte celular en mamíferos ha sido reconocida por el impresionante número de moléculas involucradas, las cuales son homólogas a los productos de los genes *ced* en el nemátodo. Entre éstos se encuentran más de 13 proteasas de cisteína, homólogas a CDE-3. Estas proteasas de cisteína con especificidad para cortar después de residuos de ácido aspártico en la posición P1 de los sustratos son clasificadas como “caspasas” (Alnemri et al., 1996). Las caspasas comparten una gran homología y generalmente son sintetizadas como precursores inactivos (zimógenos) con cuatro dominios diferentes (Nicholson and Thornberry, 1997).

La activación de las caspasas involucra un corte proteolítico entre los dominios, resultando en la remoción de un pro-dominio y una región de unión; ensamblándose posteriormente como subunidades pequeñas y grandes en un complejo tetramérico activo, el cual posee dos sitios catalíticos que parecen funcionar independientemente (Walker et al., 1994) (Wilson et al., 1994) (Rotonda et al., 1996). Los precursores de las caspasas son activados siguiendo cortes internos de los sitios de reconocimiento llevados a cabo por otras caspasas, en una cascada proteolítica similar al proceso de coagulación sanguínea y a la activación del complemento. Además, contando con la asistencia de proteínas adaptadoras, que las llevan a una proximidad adecuada, las caspasas pueden modificarse a sí mismas, generando enzimas activas *in vivo* (Thornberry and Lazebnik, 1998). La cascada de caspasas juega un papel central en el corte de varios sustratos “de la muerte” en mamíferos, los cuales incluyen proteínas citoplasmáticas y nucleares, que juegan un papel en la replicación y reparación del DNA, así como en la maduración del RNA y división celular (Tabla 1.1). Esta actividad bioquímica resulta en los cambios morfológicos que son característicos de la apoptosis. Basado en la especificidad del sustrato, las caspasas son agrupadas dentro de tres categorías (Thornberry et al., 1997):

- ◆ Los miembros del grupo I tienen una preferencia por los sustratos que poseen una secuencia de aminoácidos: triptofano-ácido glutámico-histidina-ácido aspártico (caspasa 1, 4 y 5).
- ◆ Miembros del grupo II prefieren la secuencia: ácido aspártico-ácido glutámico-no determinado-ácido aspártico, con un requerimiento absoluto del residuo aspartato (D) en la posición P4 (caspasa 2, 3, 7 y CED-3).

**TABLA 1.1****Nomenclatura de Caspasas**

Nombre	Sinónimos	Tamaño del Pro-dominio
Caspasa 1	ICE	Largo
Caspasa 2	ICH-1, Need-2	Largo
Caspasa 3	Cpp-32, Yama,	Corto
Caspasa 4	TX, ICH-2, ICErel-II	Largo
Caspasa 5	TY, ICErel-III	Largo
Caspasa 6	Mch2	Corto
Caspasa 7	Mch3, ICE-LAP3, CMH-1	Corto
Caspasa 8	FLICE, Mach, MCH5	Largo
Caspasa 9	ICE-LAP6, Mch6	Largo
Caspasa 10	Mch4	Largo
Caspasa 11	MICH-3, mCASP-11	Largo
Caspasa 12	m-ICH-4, mCASP-12	Largo
Caspasa 13	ERICE	Largo
Caspasa 14	MICE	Corto

- ◆ El grupo III reconoce secuencias: ácido glutámico-no determinado-ácido aspártico (caspasa 6, 8 y 9).

Algunos estudios sugieren que las caspasas del grupo I están involucradas principalmente en procesos de inflamación, mientras que las del grupo II y III son importantes para los eventos de señalización y ejecución de apoptosis. Las caspasas han sido clasificadas también como iniciadoras o efectoras, en respuesta a señales pro-apoptóticas.

Las caspasas (río arriba), a diferencia de las caspasas efectoras (río abajo) poseen pre-dominios largos que contienen dominios estructurales (por ejemplo dominios efectores de la muerte, DEM, o dominios reclutadores de caspasas, DRC) los cuales asocian estas enzimas a sus activadores específicos (Lee et al., 1998) (Hofmann et al., 1997). Las caspasas 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y CED-3 en mamíferos poseen pro-dominios DEM o DRC; en contraste, las caspasas 3, 6, 7 y 14 tienen pro-dominios cortos.

Las proteínas de la familia de Bcl-2 parecen controlar el paso de reclusión de la MCP, determinando si las caspasas serán o no activadas. Los miembros anti-apoptóticos de la familia parecen hacer más difícil la activación de las señales apoptóticas de las proteasas efectoras, mientras que los miembros pro-apoptóticos facilitan esta activación.

### **La mitocondria**

Recientemente se ha descubierto que la mitocondria juega un papel esencial durante la fase de ejecución en la mayoría de los modelos de inducción de apoptosis (Kroemer et al., 1995) (Kroemer et al., 1997) (Kroemer et al., 1998) (Penninger and Kroemer, 1998). En estos modelos se pierde la función de barrera de la membrana mitocondrial, llevando

a la disipación del gradiente de protones transmembranal interno ( $\Delta\Psi_m$ ), y/o a liberación de las proteínas intramembranales como el citocromo C, mediante la destrucción mecánica de la membrana externa (Vander Heiden et al., 1997).

Estos cambios mitocondriales marcan el punto clave del proceso apoptótico, dentro del cual pueden ser distinguidas tres fases generales:

- ◆ Una fase *pre-mitocondrial* (fase de inducción) durante la cual, dependiendo de los estímulos inducidos, una gran variedad de señales de transducción o vías de daño celular pueden ser activadas.
- ◆ Una fase *mitocondrial* (fase de decisión o efectora) durante la cual se pierde la integridad de la membrana mitocondrial y se toma la “decisión de morir”.
- ◆ Una fase *post-mitocondrial* (fase de degradación) durante la cual los factores solubles liberados por la mitocondria activan hidrolasas catabólicas responsables de la degradación de proteínas esenciales y DNA nuclear (Tabla 1.2).

### **Proteínas pro-apoptóticas**

La información disponible a la fecha sugiere que los miembros pro-apoptóticos de la familia de Bcl-2 inician la muerte celular formando poros en las membranas externas de la mitocondria, causando liberación del citocromo C en el citoplasma. Una variante de este mecanismo permite que el poro se forme a través de la membrana interna y externa a la vez, lo cual es llamado transición de la permeabilidad mitocondrial (TPM). La mayoría de los miembros de la familia de Bcl-2 poseen dominios que se anclan a la membrana. Estos dominios se encuentran en una región hidrofóbica del extremo carboxilo terminal, lo que permite su localización en la membrana externa de la mitocondria. Los miembros

**TABLA 1.2****Fases del proceso apoptótico**

<i>Fase</i>	<i>Características</i>
<i>Iniciación (principalmente pre-mitochondrial)</i>	<p>Numerosos caminos son activados por la vía de transducción de señales mediada por receptores</p> <p>Varias moléculas efectoras (ROS, NO, caspasas iniciadoras, gangliósido GD3, Bax, Ca<sup>+</sup>,) convergen en la mitocondria</p>
<i>Efectora (mitochondrial)</i>	<p>La función de la membrana mitocondrial es alterada a nivel de membrana interna (disrupción de el <math>\Delta\psi_m</math>) y/o la membrana externa, causando la liberación de proteínas intramembranales en el citoplasma</p> <p>Las consecuencias bioenergéticas de estos cambios (cese de funciones antioxidantes y generación de ATP) y/o la activación de caspasas por proteínas intramembranales, compromete la función de la membrana mitocondrial</p>
<i>Degradación (post-mitochondrial)</i>	<p>Cambios principales en la fisiología celular a todos los niveles:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Membrana plasmática: exposición de residuos de fosfatidilserina, flujo de K<sup>+</sup> hacia el exterior, entrada de iones Ca<sup>+</sup>, incremento en la permeabilidad y finalmente citólisis</li> <li>◆ Potencial redox: sobreproducción de especies de oxígeno reactivas, oxidación de lípidos insaturados</li> <li>◆ Caspasas: activación de la cascada de caspasas y degradación de múltiples proteínas estructurales en el citosol, citoesqueleto y núcleo</li> <li>◆ Proteasas que no son caspasas: activación de calpains y otras proteasas</li> <li>◆ Nucleasas: degradación de cromatina</li> </ul>



de la familia que pierden estos dominios (como Bad y Bid) y que se encuentran en el citoplasma, pueden emigrar hacia la mitocondria gracias a su capacidad para asociarse y formar heterodímeros con otros miembros de la familia de Bcl-2.

Estas asociaciones heterodiméricas y las translocaciones, son reguladas por los fenomenos de fosforilación (por ejemplo la fosforilación inhibe la asociación de Bad con Bcl-X<sub>L</sub> y Bcl-2) (Wang et al., 1999) y proteólisis (la caspasa 8 corta las interacciones entre Bid y Bax en la membrana mitocondrial) (Desagher et al., 1999). Los miembros mejor estudiados de la familia de Bcl-2 son Bax y Bid.

Bax es una proteína localizada en el citoplasma (Hsu et al., 1997), la cual se transloca a la mitocondria después de la exposición a varios estímulos apoptóticos o a estrés (Saikumar et al., 1998) (Hsu et al., 1997). En la membrana externa, Bax asume una conformación activa e interactua con las proteínas de la membrana externa para formar poros, liberándose citocromo C del espacio intermembranal (Saikumar et al., 1998) (Shimizu et al., 1999). Ni la translocación, ni la formación del poro requieren de la actividad de las caspasas (Finucane et al., 1999). Se ha reportado que Bax interactua con los canales aniónicos dependientes de voltaje (CADV, una proteína de la membrana externa, también llamada porina) y forma poros grandes (Shimizu et al., 1999). El mecanismo parece ser más complejo con el descubrimiento de que Bax, en ausencia de otras proteínas, puede desestabilizar las membranas lipídicas e inducir porosidad, aun a concentraciones mínimas (Basanez et al., 1999).

Algunos reportes han postulado que la liberación de citocromo C, y posiblemente de otras proteínas pro-apoptóticas ocurre vía PTM (Bradham et al., 1998) (Marzo et al., 1998) (Pastorino et al., 1998). Los constituyentes del TPM no están definidos por

completo, pero incluyen proteínas de las membranas internas (tales como transportadores de nucleótidos), membranas externas (tales como CADV), y otras como exoquinasas presentes en los sitios de contacto entre las membranas externa e interna (Beutner et al., 1996). Ha sido reportado que Bax coprecipita con la multiproteína del complejo de poro en las células apoptóticas (Marzo et al., 1998), lo cual sugiere que Bax incrementa la permeabilidad mitocondrial al interactuar con las proteínas del TPM. Sin embargo, evidencias recientes sugieren que la interacción de Bax con proteínas del TPM y la formación de megacanales pueden ser eventos tardíos, dado que la apoptosis y la liberación de citocromo C pueden ocurrir aún en ausencia de TPM (Bossy-Wetzel et al., 1998; Eskes et al., 1998).

A diferencia de Bax, Bid requiere el proceso de proteólisis mediante la caspasa 8 para llevar a cabo su función pro-apoptótica. El corte de Bid puede ser un mecanismo diseñado para amplificar eventos de efectores durante la apoptosis mediada por receptores de la muerte (Desagher et al., 1999) (Li et al., 1998) (Luo et al., 1998).

### **Proteínas anti-apoptóticas**

Las proteínas anti-apoptóticas mejor estudiadas de la familia de Bcl-2 son Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub>, los más potentes inhibidores de la muerte celular descubiertos hasta hoy. En el nemátodo *C. elegans*, el homólogo de Bcl-2, CED-9, previene la muerte celular mediante su unión a CED-4, el cual es requerido para la activación de CED-3 (Wu et al., 1997) (Chinnaiyan et al., 1997). Sin embargo, en mamíferos, la actividad de los homólogos de CED-9, Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> es más compleja. Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> pueden unirse a Apaf-1 (un homólogo de CED-4) y prevenir la activación de la caspasa 9 (un homólogo de CED-3)

(Hu et al., 1998) (Pan et al., 1998) (Cosulich et al., 1999). Sin embargo, el modo de acción predominante de Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> parece ser llevado a cabo en la mitocondria. En la mayoría de los casos Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> parecen actuar previniendo la permeabilización mitocondrial y la liberación del citocromo C, la molécula requerida para la activación de la proteína adaptadora Apaf-1 (Yang et al., 1997) (Kluck et al., 1997). Se ha propuesto que la acción mitocondrial de Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> y Bax depende de su habilidad para formar canales iónicos a través de la membrana mitocondrial (Schendel et al., 1998). Sin embargo, en base a los datos conocidos a la fecha acerca de la hipótesis de los canales iónicos, no existe un modelo satisfactorio que pueda tomar en cuenta las acciones opuestas de Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> y Bax (Antonsson et al., 1997) (Schlesinger et al., 1997). Se ha sugerido que Bax y Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> pueden competir por el mismo blanco, en la membrana externa mitocondrial. Este blanco pudiera ser CADV (Shimizu et al., 1999), pero son necesarias más investigaciones para resolver esta incógnita. De particular interés ha sido el demostrar que Bcl-2 tiene importantes efectos estabilizadores en otras membranas celulares, así como también en el retículo endoplásmico y membrana nuclear (Kuo et al., 1998) (Lam et al., 1994) (Marin et al., 1996). Originalmente se postuló que Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> ejercen efectos de protección al formar heterodímeros con proteínas pro-apoptóticas como Bax, inhibiendo las acciones desestabilizadoras de la membrana de estas proteínas (Otter et al., 1998).

### **Mitocondria vs caspasas**

La disrupción de la membrana mitocondrial es suficiente, por sí misma, para causar la muerte celular, ya sea vía apoptosis o necrosis y parece ser que a nivel post-

mitocondrial, la activación de caspasas decide el modo de muerte celular. Después de la pérdida del  $\Delta\psi_m$  y/o la liberación del citocromo C (con interrupción de la transferencia de electrones entre los complejos II y IV de la cadena respiratoria) la mitocondria pierde su función anti-oxidante, produce un anión superóxido y provoca una catástrofe energética, culminando en la muerte celular, independientemente de la activación de caspasas y exonucleasas (De Maria et al., 1997) (Hirsch et al., 1997) (McCarthy et al., 1997) (Xiang et al., 1996).

En algunos modelos de apoptosis mediada por receptores, no ocurre la activación de caspasas y nucleasas, aunque la muerte celular es precedida por una disrupción del  $\Delta\psi_m$  (Lavoie et al., 1998) (Lesage et al., 1997). En terminos generales parece ser que la disrupción del  $\Delta\psi_m$  tiene una mayor influencia en la muerte celular que la activación de caspasas o endonucleasas; como lo indica el hecho que las células con un valor de  $\Delta\psi_m$  alterado son irreversiblemente llevadas a la muerte celular (Brunet et al., 1998) (Hirsch et al., 1997) (Xiang et al., 1996; Zamzami et al., 1995), mientras que la activación de caspasas puede ocurrir sin el fenómeno de muerte celular (Boise and Thompson, 1997) (Miossec et al., 1997).

## **LINFOMA FOLICULAR**

El término linfoma identifica dos grupos distintos de neoplasias: el linfoma de Hodgkin y el linfoma no-Hodgkin (NHL). Durante la última década se ha llevado a cabo un gran progreso en la elucidación de la patogénesis de los NHL como una clona de expansión maligna de células B o T. Las anormalidades citogenéticas más frecuentemente asociadas con estas enfermedades han sido caracterizadas a nivel molecular, conduciendo a la identificación de un gran número de genes que están alterados en los NHL de células B o células T. El papel en la tumorigénesis de la mayoría de estas alteraciones ha sido confirmado por su capacidad para causar tumores en modelos de animales transgénicos. Además, se ha establecido que la mayoría de estas lesiones genéticas están asociadas selectivamente con tipos específicos de NHL, lo cual representa la posibilidad de tener marcadores específicos de importancia para varios subtipos de NHL (Kaplan, 1980). En contraste con el NHL, las principales características de la patogénesis molecular en las enfermedades de Hodgkin, incluyendo la derivación de su linaje y su origen clonal, permanecen oscuras (Hodgkin, 1832).

### **Mecanismos generales de lesiones genéticas**

Análogamente a la mayoría de tipos celulares, la patogénesis de los linfomas representa un proceso de múltiples pasos que involucran la acumulación progresiva y clonal de múltiples lesiones genéticas, afectando protooncogenes y genes supresores de tumores. Sin embargo, algunas características importantes distinguen el mecanismo y el tipo de alteraciones genéticas asociados con el linfoma de aquellas asociadas a tumores

sólidos. Durante la mayoría de las fases de la enfermedad, el genoma de las células del linfoma es relativamente estable y no es afectado por la inestabilidad típica, generada al azar, de muchos tumores sólidos, particularmente de los de origen epitelial. El linfoma también parece carecer de inestabilidad microsatélite, lo cual es el sello de los defectos moleculares observados en algunos síndromes de predisposición a cánceres hereditarios, así como también en la mayoría de los tipos de tumores esporádicos (Nuland, 1981). Inversamente, el genoma de las células del linfoma es caracterizado por pocas anomalías cromosómicas, comúnmente representadas por translocaciones cromosómicas (Bennet, 1985).

A nivel molecular, las lesiones genéticas identificadas en linfomas incluyen oncogenes activados por translocaciones cromosómicas, así como genes supresores de tumores inactivados por deleciones cromosómicas y mutaciones. Además, el genoma de ciertos subtipos de linfoma puede ser alterado por la introducción de genes exógenos por virus oncogénicos.

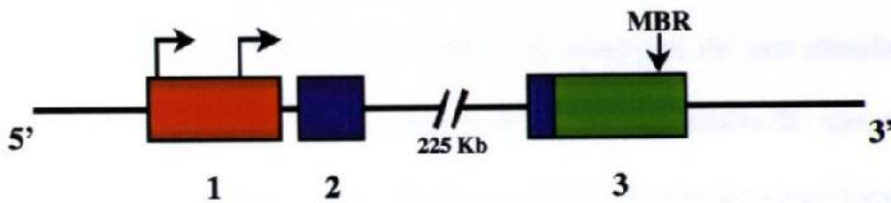
### **Linfoma folicular**

El sello genético de los linfomas foliculares portadores de transformaciones (Lft) está representado por la fractura cromosomal en los cromosomas 18q21 y los re-arreglos de *bcl-2*, lo cual se presenta en el 80-90% de los casos, independientemente del subtipo citológico (Pinkus and Said, 1988) (Poppema, 1980) (Burns et al., 1984) (Poppema et al., 1979) (Poppema et al., 1979). La translocación de t(14;18)(q32;q21) es la más común en enfermedades linfoides humanas (Poppema, 1980) (Burns et al., 1984) (Poppema et al., 1979) (Poppema et al., 1979). Las raras variantes de las translocaciones t(2;18)(p11;q21)

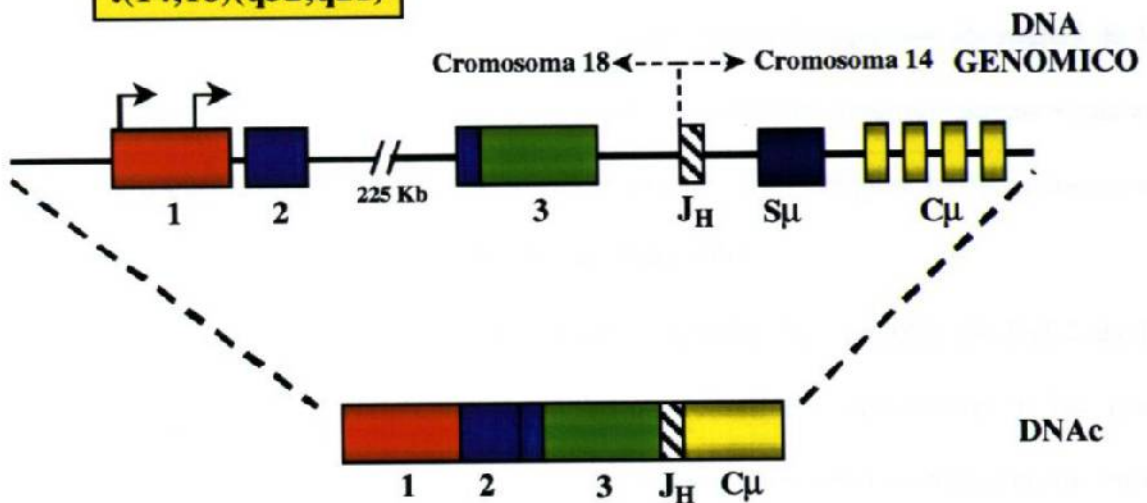
y  $t(18;22)(q21;q21)$  representan equivalentes biológicos. Virtualmente todos los LFt y una fracción de los linfomas de células grandes difusas portan el rompimiento en los cromosomas 18q21 (Pinkus and Said, 1988) (Hansmann et al., 1989). En la  $t(14;18)$ , los re-arreglos implican una unión del gene de *bcl-2* en el extremo 3' de la región no transcrita al segmento J de la IgH (Figura 1.2), resultando en una desregulación en la expresión de *bcl-2* (Burns et al., 1984) (Poppema et al., 1979) (Poppema et al., 1979). La consecuencia de esta translocación es la presencia de niveles constitutivamente altos de la proteína Bcl-2 en las células, resultando de un incremento en la transcripción y, posiblemente, un procesamiento más eficiente del RNA (Hansmann et al., 1990; Osborne and Butler, 1984). Aproximadamente un 70% de los rompimientos del cromosoma 18 se agrupan dentro de la región de mayores rompimientos cromosómicos (Poppema, 1980) (Burns et al., 1984) (Poppema et al., 1979) (Poppema et al., 1979).

El papel preciso de la activación de *bcl-2* en la patogénesis del LFt es complejo. A pesar de que el LFt está compuesto de células B maduras, la translocación parece ocurrir en las etapas tempranas de la oncogenia, en una fase de células pre-B (Falini et al., 1995). La contribución patogénica de las lesiones de Bcl-2 al desarrollo del LFt está documentada por la observación de que el crecimiento del NHL, portador de las translocaciones, es específica y eficientemente inhibido *in vitro* por oligonucleotidos antisentido dirigidos contra el gene de *bcl-2* (Carbone et al., 1995).

### BCL-2 en Línea Germinal



### t(14;18)(q32;q21)



**FIGURA 1.2. Representación esquemática de las translocaciones cromosómicas que involucran al gene de Bcl-2.** A nivel de línea germinal Bcl-2 está compuesto por tres exones , con un intrón grande entre los exones 2 y 3. La región que codifica para el gene *bcl-2* esta indicada por los cuadros oscuros, y los exones que no codifican son indicados con cuadros blancos. Los promotores *bcl-2* en el exon 1 están indicados por flechas. La región principal de rompimiento (MBR) también se indica con una flecha.



## **BCL-2**

El proto-oncogene de *bcl-2* fué originalmente descubierto debido a que está involucrado en la translocación cromosómica t(14;18), comunmente encontrada en los NHL de células B (Tsujiimoto et al., 1985). El resultado de esta translocación es la producción de altos niveles de la proteína Bcl-2 en las células B, que abrigan dicha translocación. Debido a que 85-90% de los casos de LFL poseen la translocación t(14;18) (Pezzella et al., 1990), se ha determinado que esta translocación ocasiona un exceso en la activación del gene *bcl-2* y por lo tanto es responsable de su transformación en una célula neoplásica (Lampert, 1999). Adicionalmente, altos niveles de patrones aberrantes de la proteína Bcl-2 han sido reportados para una amplia variedad de cánceres humanos que no portan las translocaciones u otras alteraciones estructurales del gene *bcl-2*, como es el caso de la leucemia crónica linfocítica (Hanada et al., 1993).

Una de las características únicas de la familia de proteínas de Bcl-2 es la capacidad de heterodimerización entre las proteínas anti-apoptóticas y las pro-apoptóticas, la cual es considerada la base para inhibir la actividad biológica de los otros miembros de esta familia (Oltvai et al., 1993) (Yang et al., 1995). Esta heterodimerización es mediada por la inserción de la región BH3 de una proteína pro-apoptótica dentro de una región hidrofóbica compuesta por los dominios BH1, BH2 y BH3 de una proteína anti-apoptótica (Sattler et al., 1997). Adicionalmente a los dominios BH1 y BH2, el dominio BH4 es requerido para poseer una actividad anti-apoptótica (Huang et al., 1998). En contraste, BH3 es esencial y posee por sí mismo una actividad pro-apoptótica (Chittenden et al., 1995).

## **Localización y posibles funciones**

Se ha reportado que en humanos, ratones, ratas y pollos, Bcl-2 tiene un peso molecular de aproximadamente 25 a 26 kD (Piris et al., 1994). Diversos estudios llevados a cabo, como el fraccionamiento subcelular, inmunofluorescencia confocal y microscopía electrónica han proporcionado evidencias de que Bcl-2 está asociado a la mitocondria, específicamente a la membrana mitocondrial externa, en una posición opuesta a la membrana interna, donde ocurre la mayoría de los pasos de la fosforilación oxidativa (de Jong et al., 1994) (Jacobson et al., 1993). Aparte de la membrana externa de la mitocondria, una gran cantidad de la proteína de Bcl-2 es encontrada en la envoltura nuclear. De manera similar a la situación de la mitocondria, estudios de microscopía electrónica sugieren que la proteína de Bcl-2 no está distribuida en la envoltura nuclear en un patrón uniforme (de Jong et al., 1994) (Krajewski et al., 1993). Bcl-2 se encuentra también en algunas partes del retículo endoplásmico. Aunque el significado funcional de la distribución intracelular inusual de Bcl-2 es poco claro, la posible asociación de Bcl-2 con los complejos mitocondriales y los complejos del poro nuclear es un tópico de particular interés.

## **La familia de Bcl-2**

La MCP está controlada por la interacción de un gran número de genes los cuales pueden promover o bloquear la muerte celular. Muchos de los genes involucrados en las vías que llevan a la muerte celular pueden ser encontrados en organismos como el nemátodo *C. elegans* y la mosca *Drosophila melanogaster* (Hengartner and Horvitz, 1994) (Steller, 1995). En los mamíferos, estos genes reguladores de la apoptosis existen como

una familia de varios genes que se encuentran estrechamente relacionados entre sí, y que codifican para proteínas que tienen fuerte homología en sus secuencias de aminoácidos y en su función. A la fecha, han sido descritos 14 homólogos de Bcl-2 (tanto en mamíferos, como en otras especies), algunos de los cuales, como es el caso de Bcl-2, actúan como proteínas anti-apoptóticas o bloqueadores de la muerte celular, mientras que otros miembros poseen una función opuesta. Las proteínas antiapoptóticas incluyen Bcl-X<sub>L</sub>, MCL-1, A1/BFL-1, Bcl-W, Nr-13 (en aves) y Ced-9 (en nemátodos), entre otras. Entre los más conocidos promotores de la muerte celular, pertenecientes a la familia de Bcl-2, se encuentran Bax, Bcl-X<sub>S</sub>, Bad, Bak, Bik, and Bid (Boise et al., 1993) (Oltvai et al., 1993) (Kozopas et al., 1993) (Lin et al., 1993) (Gibson et al., 1996) (Gillet et al., 1995) (Hengartner and Horvitz, 1994; Yang et al., 1995) (Chittenden et al., 1995) (Kiefer et al., 1995) (Choi et al., 1995) (Farrow et al., 1995) (Boyd et al., 1995) (Wang et al., 1996). Existe un homólogo adicional, Brag-1, el cual fué descubierto debido a su sobreexpresión en gliomas, y otros dos más, descubiertos en *Xenopus*, que aunque sus efectos en la vida y muerte celular no han sido estudiados formalmente, parecen ser también supresores de apoptosis (Das et al., 1996) (Cruz-Reyes and Tata, 1995).

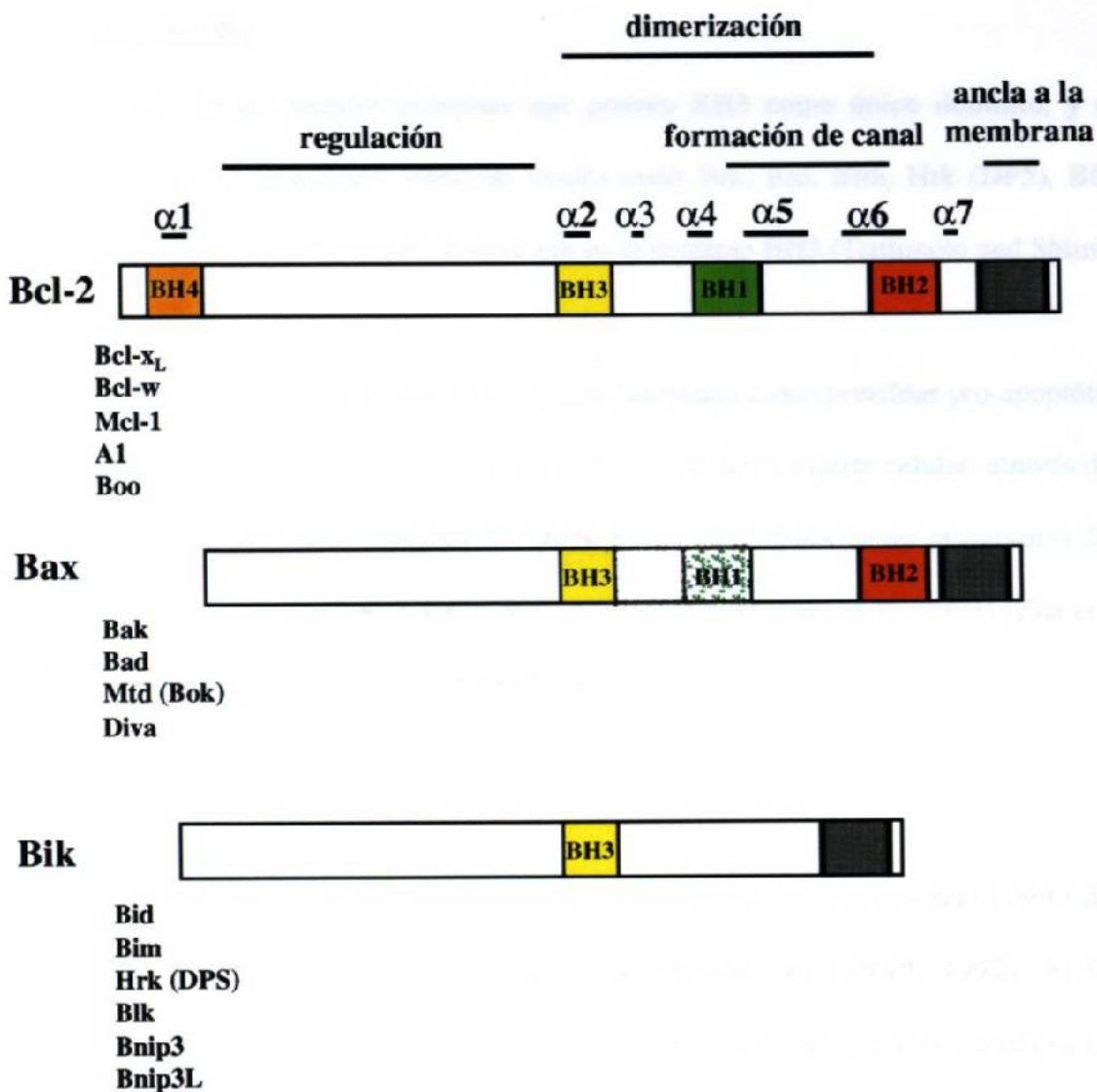
La proporción entre miembros pro-apoptóticos y anti-apoptóticos de la familia de Bcl-2 expresados en una célula individual determina grandemente la facilidad con que la célula activará el programa que la llevará al proceso de apoptosis, cuando esté confrontada a los estímulos apropiados. Estudios en la expresión de varias de estas proteínas sugieren que la mayoría están ampliamente expresadas en tejidos normales, através de todo el cuerpo, pero con patrones específicos del tipo celular, los cuales varían temporalmente durante la diferenciación y activación celular. Así, el repertorio de

proteínas de la familia de Bcl-2 expresado en una célula en particular, en un tiempo dado, es con frecuencia único (Krajewski et al., 1994) (Krajewski et al., 1994) (Krajewski et al., 1995) (Krajewska et al., 1996).

### **Categorías en la Familia de Bcl-2**

Se demostró inicialmente que la proteína de Bcl-2 tenía la capacidad de inhibir la muerte celular inducida por la falta de IL-3 (Tsujimoto et al., 1985) (Vaux et al., 1988), y subsecuentemente mostró inhibir la muerte celular por algunos otros estímulos incluyendo agentes quimioterapéuticos y proteínas de choque térmico (Tsujimoto, 1989). En años recientes ha sido bien establecido que Bcl-2 previene la mayoría de las formas de muerte celular, así como ciertas formas de muerte celular por necrosis. Hasta la fecha se han aislado un gran número de proteínas pertenecientes a esta familia (Adams and Cory, 1998) (Tsujimoto, 1998), las cuales se dividen en tres categorías principales (Figura 1.3):

- ◆ Miembros anti-apoptóticos de esta familia como lo son Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1, A1 (Bfl-1) y Boo, todos los cuales son capaces de ejercer una actividad opuesta a la muerte celular y muestran gran homología entre ellos, particularmente entre cuatro regiones, desde la región homóloga a Bcl-2 (BH1) hasta la BH4, aunque algunos miembros pierden aparentemente el dominio BH4.
- ◆ Miembros pro-apoptóticos como Bax, Bak, Bad, Mtd (Bok), Diva, etc. los cuales muestran una homología en la secuencia de las regiones BH1, BH2 y BH3, pero no



**FIGURA 1.3. Representación esquemática de Bcl-2 y proteínas relacionadas.** Se muestran las secuencias conservadas BH1, BH2, BH3 y BH4.  $\alpha_1$ - $\alpha_7$  indican hélices identificadas en Bcl- $X_L$ . La región entre  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  posee un papel regulatorio en esta proteína.

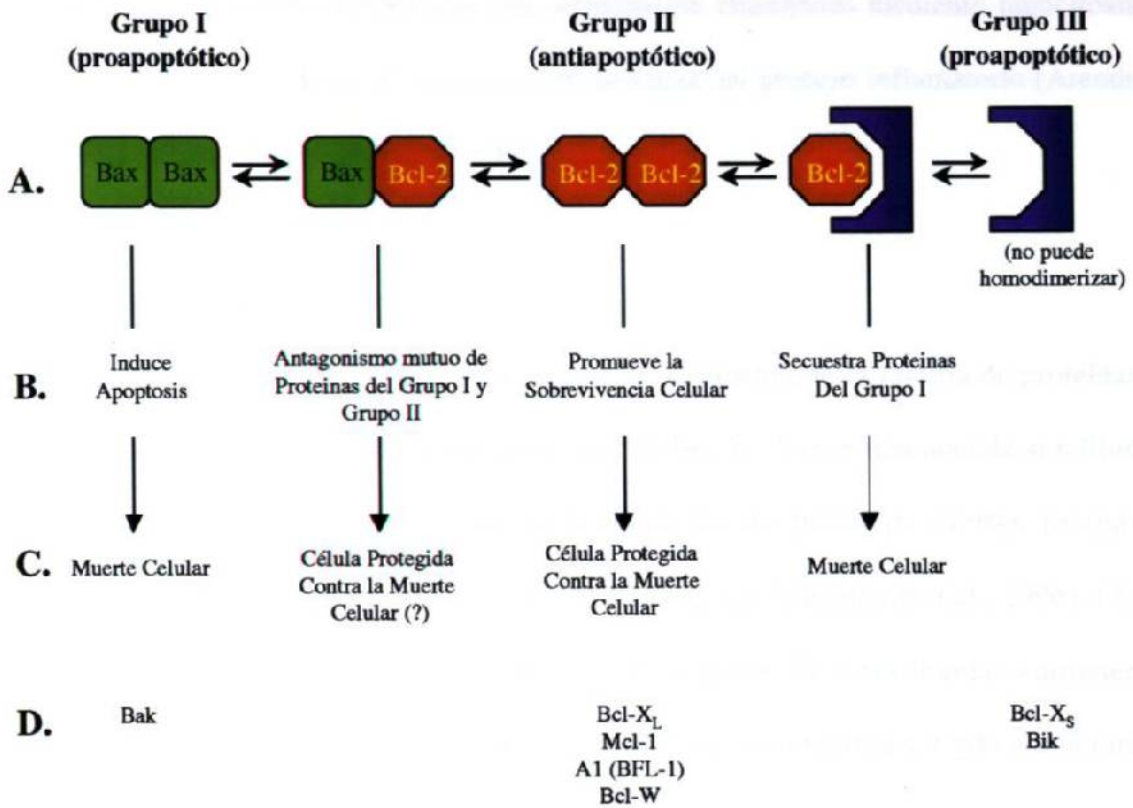
en BH4, aunque se ha reportado cierta homología con BH4 solo en algunos miembros de esta familia.

- ◆ El tercer grupo incluye proteínas que poseen BH3 como único dominio, y con actividad pro-apoptótica, entre las cuales están Bik, Bid, Bim, Hrk (DP5), Blk y Bnip3; todas ellas mostrando homología en el dominio BH3 (Tsujimoto and Shimizu, 2000)

Algunos miembros de este tercer grupo funcionan como proteínas pro-apoptóticas pero parecen estar relacionados indirectamente a la vía de la muerte celular, a través de la inhibición de proteínas apoptóticas del grupo I, las cuales parecen ser promotoras de la muerte celular de manera autónoma (Sato et al., 1994) (Hanada et al., 1993) (Zha et al., 1996) (Jurgensmeier et al., 1997) (Figura 1.4).

### **Regulación de la muerte celular**

La MCP juega un papel indispensable en el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis dentro de todos los organismos multicelulares (Raff, 1992). Análisis genéticos y moleculares desde nemátodos hasta humanos indican que la vía del suicidio celular es altamente conservada entre las especies (Ellis et al., 1991) (Steller, 1995). Aunque la capacidad de llevar a cabo el proceso de apoptosis parece ser inherente a todas las células, la susceptibilidad a la misma varía marcadamente de célula a célula y está influenciada por eventos tanto internos como externos a la autonomía celular. En todos los tejidos en los cuales ocurre la división celular, es necesaria la presencia de un mecanismo que remueva o elimine las células dañadas, ésta necesidad es cubierta *in vivo* por el proceso conocido como MCP (Fesus et al., 1991).



**FIGURA 1.4. Modelo para la homodimerización y heterodimerización de la familia de proteínas de Bcl-2.** Efectos regulatorios en apoptosis: A: dimerización, B: Acción, C: destino de la célula, D: otros miembros de grupo.

Este mecanismo incluye condensación de cromatina y fragmentación nuclear (pinocitosis), encogimiento celular, deformación de la membrana y exocitosis de partículas celulares (cuerpos apoptóticos). A diferencia de las células bajo un proceso de necrosis, la cual involucra lisis celular seguida por una respuesta inflamatoria, las células apoptóticas y los cuerpos apoptóticos son rápidamente eliminados mediante fagocitosis llevada a cabo por las células circundantes, en ausencia del proceso inflamatorio (Arends and Wyllie, 1991) (Wyllie and Kerr, 1980).

### **Formación de canales iónicos**

Una gran parte del entendimiento acerca de la función de la familia de proteínas de Bcl-2 proviene de la estructura tridimensional de Bcl-X<sub>L</sub>. Existe una notable similitud estructural entre Bcl-X<sub>L</sub> y los dominios formadores de poros de ciertas toxinas bacterianas, tales como las toxinas de difteria y las calcinas (Muchmore et al., 1996). Las estructuras de Bcl-X<sub>L</sub> y los dominios formadores de poros de estas toxinas consisten principalmente de  $\alpha$ -hélices conectadas por asas de varias longitudes. Cada estructura contiene un par de hélices hidrofóbicas centrales que son suficientemente largas para penetrar la bicapa lipídica de la membrana y se escudan del medio ambiente acuoso por otras 5 o 7 hélices, las cuales son anfipáticas (un lado hidrofílico y el otro hidrofóbico), y pueden orientar sus superficies hidrofóbicas hacia las hélices centrales, y las superficies hidrofílicas hacia afuera.

Estudios de toxinas bacterianas sugieren que bajo condiciones apropiadas, la inserción eficiente de las hélices hidrofóbicas centrales a través de la bicapa lipídica es un paso en el proceso de la formación del poro (Parker et al., 1992) (Duche et al., 1996)



(Merrill et al., 1990) (Cramer et al., 1992) (Shin et al., 1993). Datos recientes indican que, debido a su similaridad estructural con estas toxinas bacterianas, tanto Bcl-X<sub>L</sub> recombinante así como Bcl-2 y Bax, pueden formar poros en liposomas (Minn et al., 1997) (Schendel et al., 1997). Otros estudios para monitorear la formación de poros demuestran también que Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, y Bax pueden formar canales conductores de iones muy fácilmente (Minn et al., 1997) (Schendel et al., 1997) (Antonsson et al., 1997).

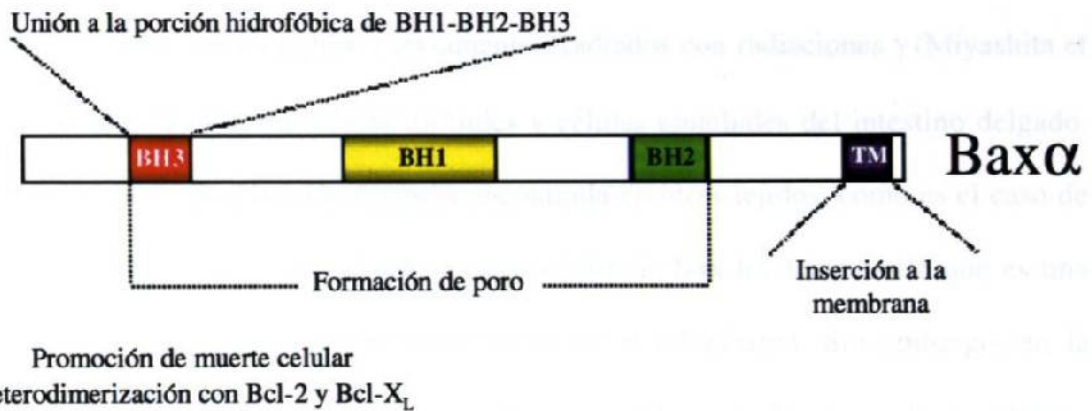
## **BAX**

Bcl-2, por sí misma, funciona como una proteína represora de la apoptosis, mientras que otro miembro de esta familia, Bax, actúa como promotor de la muerte celular. Bax fue originalmente identificada como una proteína que co-immunoprecipitó con Bcl-2 de diferentes líneas celulares (Oltvai et al., 1993). La determinación de la secuencia de aminoácidos de la proteína Bax mostró una alta homología con Bcl-2. La sobreexpresión de Bax en una línea celular dependiente de IL-3 mostró que posee un efecto muy diferente a Bcl-2 en ausencia de IL-3, ya que las células murieron por apoptosis a una velocidad mucho mayor que la normal (Oltvai et al., 1993). Bax fue el primer miembro de la familia de Bcl-2 en ser identificado como un promotor de apoptosis. Además, el mismo trabajo mostró que Bax y Bcl-2 pueden antagonizar mutuamente y estar co-expresadas en las mismas células (Brady and Gil-Gomez, 1998).

### **Estructura**

El gene de *bax* codifica para una proteína de 21kDa, la cual es 96% homóloga entre el ratón y el humano (Oltvai et al., 1993). El gene murino de *bax* consiste de seis exones, los cuales codifican para una proteína de 4.5 Kb. El gene produce también transcritos alternativos, cuya forma predominante codifica para un mRNA de 1.0 Kb, y es designado como *bax*  $\alpha$ . Al igual que Bcl-2 y otros miembros de esta familia, la proteína Bax tiene regiones altamente conservadas, denominadas BH1-BH3 (Figura 1.5), las cuales están involucradas en la heterodimerización entre Bax y los otros miembros de los otros miembros de la familia de Bcl-2, así como con la función pro-apoptótica de la misma (Yin et al., 1994).

Es un antígeno expresado sin aparente especificidad en tejidos, y es regulado *in vivo* por el gene *p53* *in vitro* (Miyashita and Reed, 1995). Similarmente, *in vitro* se han observado interacciones de Bax en algunos tejidos de ratón, los cuales son *p53*-dependientes (Toni). Se ha demostrado que existe una regulación positiva de los



**FIGURA 1.5. Relación entre la estructura y función de la proteína Bax  $\alpha$ .** Las regiones coloreadas indican la posición de las regiones de homología (BH) con Bcl-2 y el dominio hidrofóbico de inserción transmembranal (TM) de la porción carboxilo terminal. Se indican también algunas funciones relacionadas a ciertos dominios BH.

## Síntesis y Localización

Bax es ampliamente expresado sin aparente especificidad en tejidos, y es regulado río arriba por el gene *p53 in vitro* (Miyashita and Reed, 1995). Similarmente, *in vivo* se han detectado niveles disminuídos de Bax en algunos tejidos de ratón, los cuales son *p53-/-* (Miyashita et al., 1994). Se ha demostrado que existe una regulación positiva de los niveles de Bax *in vivo* en tejidos previamente irradiados con radiaciones  $\gamma$  (Miyashita et al., 1994), en particular en células linfoides y células epiteliales del intestino delgado. Esta regulación de Bax ha sido también encontrada en otros tejidos, como es el caso de las neuronas. Un estudio de la localización celular de Bax ha demostrado que es una proteína soluble presente predominantemente en el citoplasma. Sin embargo, en la inducción de apoptosis, Bax cambia de una forma soluble capaz de unirse a la membrana, la cual esta co-localizada en la membrana de la mitocondria (Wolter et al., 1997).

## Función Biológica

Estudios recientes han sugerido que tal como Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub>, Bax tiene la capacidad de formar canales en las membranas biológicas. Bax es una proteína biológicamente activa que cuando es adicionada a una bicapa lipídica planar, forma canales conductores de iones dependientes de voltage y pH (Antonsson et al., 1997), lo cual sugiere un efecto intrínseco formador de poro. Esto puede permitir el flujo pasivo de iones y moléculas pequeñas a través de la membrana intracelular para activar una interrupción del potencial transmembranal y la subsecuente activación de caspasas.

Otro punto interesante es la evidencia genética generada por el entrecruzamiento de ratones *bax -/-* y *bcl-2 -/-*. Una copia simple de *bax* fué capaz de promover la apoptosis

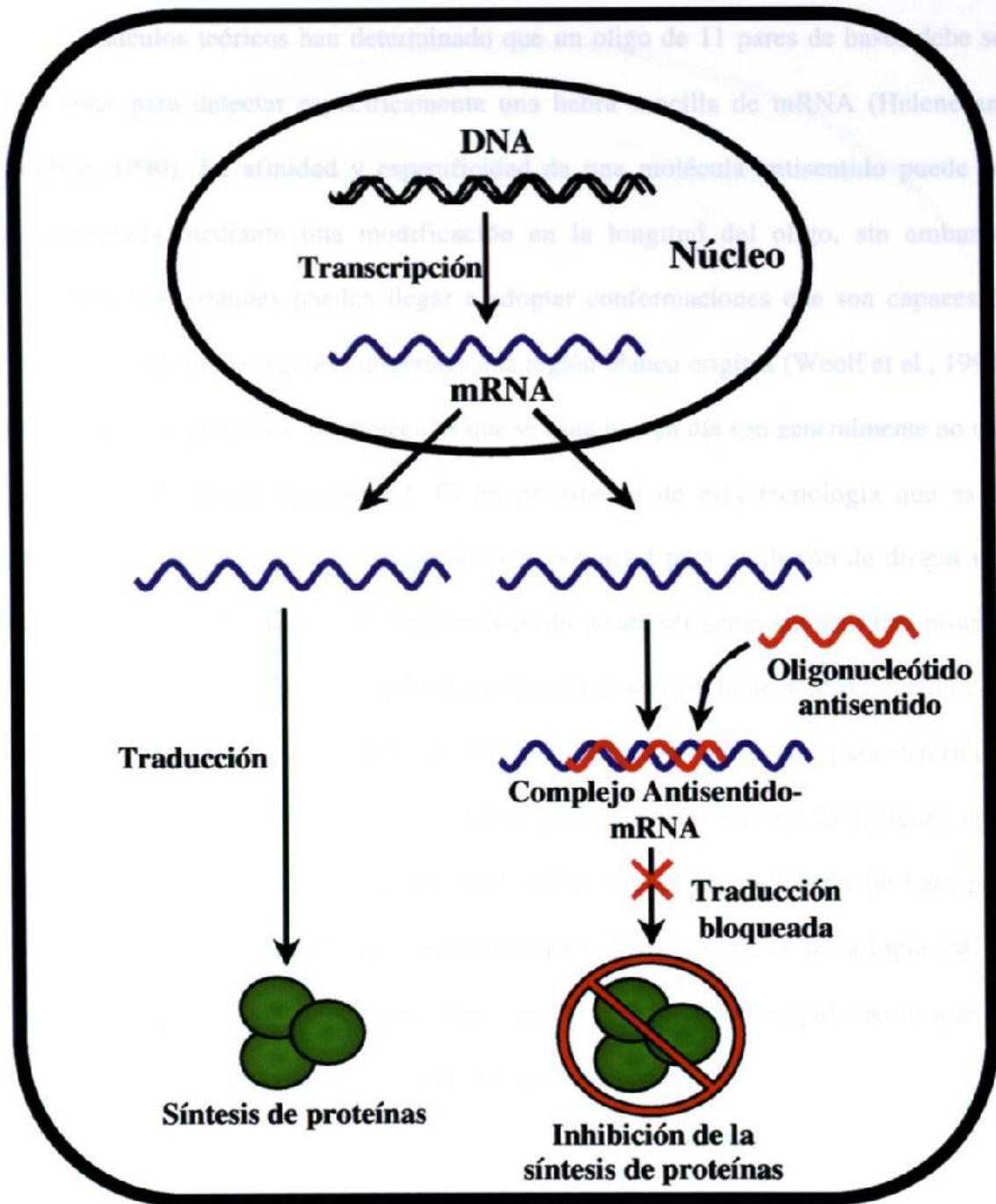
en la ausencia de *bcl-2*, como se ha visto en timocitos *bax +/-* y *bcl-2 -/-*. Así mismo, la sobreexpresión de *bcl-2* continúa reprimiendo apoptosis en la ausencia de *bax*. Por consecuencia, tanto Bax como Bcl-2 pueden funcionar independientemente uno de otro *in vivo* para regular el proceso de apoptosis (Knudson and Korsmeyer, 1997).

## OLIGONUCLEOTIDOS ANTISENTIDO

### Composición

Los oligos antisentido son secuencias cortas de DNA, de una sola hebra, las cuales tienen un gran futuro como drogas terapéuticas debido a su potencial para bloquear la síntesis de proteínas con una gran especificidad (Figura 1.6). Estas moléculas son diseñadas para hibridizar en base al modelo de apareamiento de bases de Watson y Crick. Este apareamiento es específico a una secuencia complementaria localizada en el transcrito del RNAm, teniendo como resultado la interferencia del proceso de traducción mediante diversos mecanismos. El primer uso que se les dió a los oligos antisentido para modificar la expresión de una proteína fué descrito por Zamecnik y Stephenson en 1978 (Zamecnik and Stephenson, 1978), desde entonces, numerosos estudios han sido llevados a cabo usando este mecanismo para alterar la expresión de proteínas, tanto *in vitro* como *in vivo* (Bennett, 1998) (Wagner and Flanagan, 1997) (Kaneda et al., 1997).

Existen tres aspectos importantes en el uso de oligos antisentido como drogas que hacen esta tecnología particularmente promisoría para aplicaciones terapéuticas y como una herramienta para analizar las funciones biológicas de las proteínas. El primero de ellos es la alta afinidad que muestran las moléculas antisentido para la secuencia blanco, resultado de la fuerza de los múltiples enlaces de hidrógeno formados entre los pares de bases complementarios, los cuales favorecen la formación de el complejo DNA-mRNA. El segundo es la selectividad del modelo de Watson y Crick para el apareamiento de bases de estas moléculas antisentido, las cuales poseen un grado de especificidad igual al observado en la mayoría de las drogas convencionales.



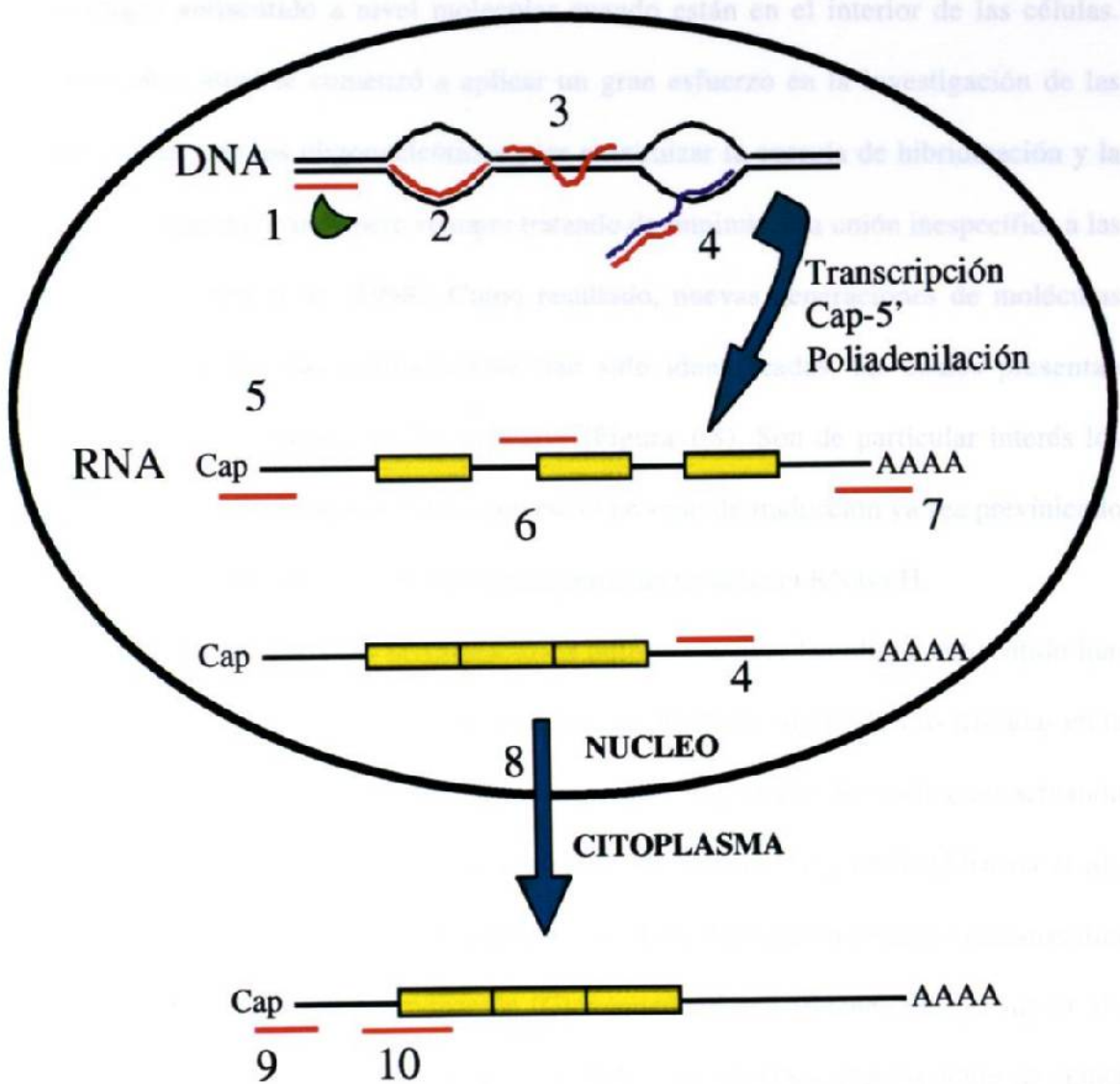
**FIGURA 1.6. Inhibición de proteínas por los oligonucleótidos antisentido.** El primer paso para la expresión de una proteína consiste en la transcripción de la información del DNA al mRNA, para ser posteriormente traducida en el citoplasma, formándose la proteína correspondiente. Los oligonucleótidos antisentido son cadenas sencillas de DNA que tienen la capacidad de unirse al mRNA bloqueando la expresión de dicha proteína.

Cálculos teóricos han determinado que un oligo de 11 pares de bases debe ser suficiente para detectar específicamente una hebra sencilla de mRNA (Helene and Toulme, 1990). La afinidad y especificidad de una molécula antisentido puede ser incrementada mediante una modificación en la longitud del oligo, sin embargo, moléculas más grandes pueden llegar a adoptar conformaciones que son capaces de unirse parcialmente a regiones diferentes a la región blanco original (Woolf et al., 1992). Para evitar este problema, las moléculas que se usan hoy en día son generalmente no más grandes de 25 bases de longitud. El tercer aspecto de esta tecnología que es de considerable interés clínico e industrial, es el potencial para un diseño de drogas más rápido y racional. En teoría, un oligo antisentido puede ser generado para una proteína blanco específica, siempre y cuando sea conocida la secuencia de ácidos nucleicos del gene en cuestión. Esto contrasta con el riguroso proceso necesario para determinar primeramente la función de la molécula y posteriormente definir la relación entre ligando-receptor o enzima-substrato, antes del diseño de las moléculas de bajo peso molecular usadas como drogas convencionales. En general, la tecnología de los antisentidos puede ayudar a desarrollar terapias efectivas más rápidamente que las técnicas tradicionales usadas para las drogas convencionales.

### **Mecanismo de acción**

Existen varios mecanismos mediante los cuales los oligos antisentido pueden interrumpir potencialmente la expresión de genes por medio de la interferencia con el metabolismo del RNA, después de su hibridización con una secuencia específica blanco (Figura 1.7). Sin embargo, poco es conocido acerca del mecanismo preciso de acción de

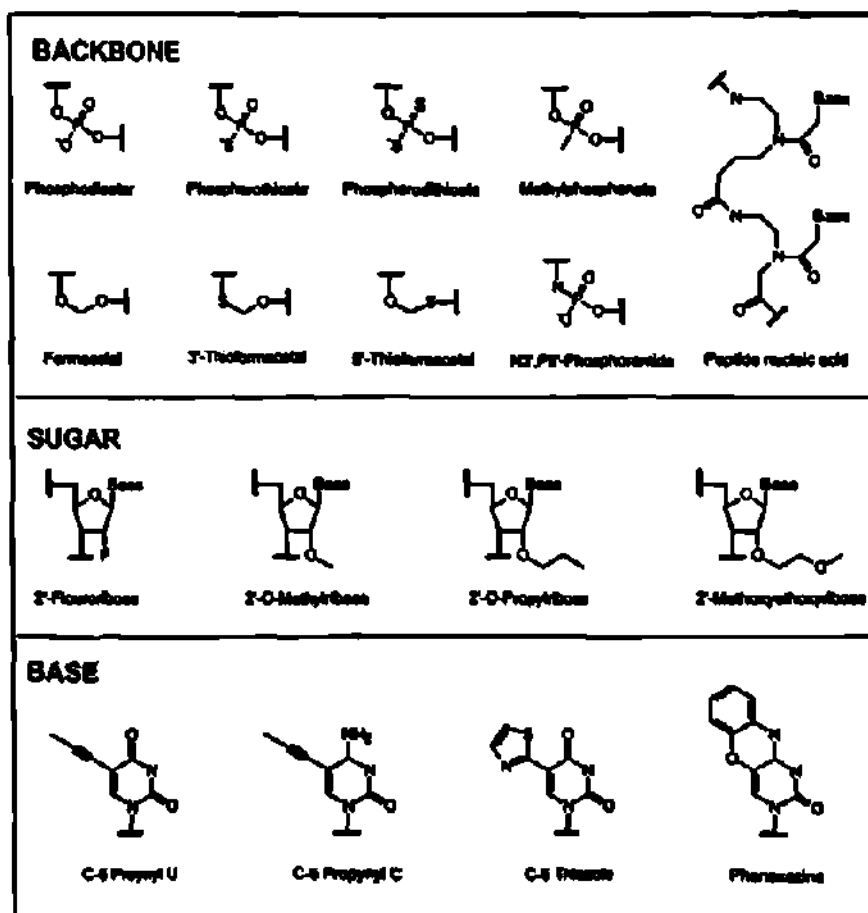
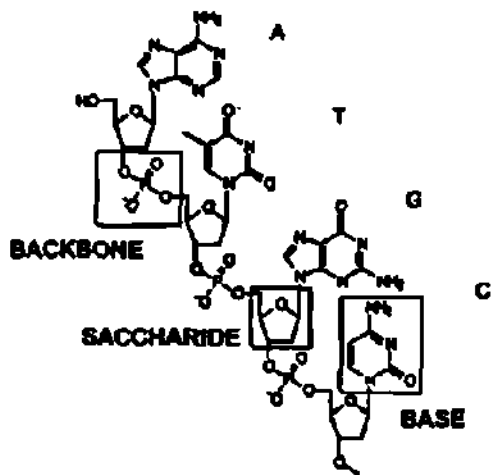




**FIGURA 1.7. Mecanismos potenciales de los oligonucleótidos antisentido.** En una célula existen diversos sitios donde los oligonucleótidos antisentido pueden unirse a las secuencias blanco: (1) compitiendo con los factores de transcripción, (2) uniéndose a una hebra sencilla de DNA, (3) uniéndose a una hebra doble de DNA, (4) actuando como sustrato para la RNasa H, (5) inhibiendo la formación del Cap-5', (6) inhibiendo la maduración del RNA, (7) inhibiendo la poliadenilación del mRNA, (8) inhibiendo el transporte del RNA al citoplasma, (9) inhibiendo el reconocimiento del Cap-5' y (10) rompiendo las interacciones RNA-proteínas.

estos oligos antisentido a nivel molecular cuando están en el interior de las células. Algunos años atrás se comenzó a aplicar un gran esfuerzo en la investigación de las modificaciones de los oligonucleótidos para maximizar la energía de hibridización y la estabilidad a las nucleasas, pero siempre tratando de minimizar la unión inespecífica a las proteínas (Gewirtz et al., 1998). Como resultado, nuevas generaciones de moléculas antisentido modificadas químicamente han sido identificadas, las cuales presentan alteraciones en las bases y en los azúcares (Figura 1.8). Son de particular interés los oligonucleótidos que bloquean estéricamente el proceso de traducción ya sea previniendo las uniones o la translocación del ribosoma, pero que no activan RNasa H.

Adicionalmente a las investigaciones descritas arriba, los oligos antisentido han sido diseñados para interrumpir el metabolismo del RNA en diferentes vías (listadas en la Figura 4). Los oligonucleótidos pueden interrumpir el proceso de traducción actuando como señuelo para los factores de traducción (Morishita et al., 1995) (Sharma et al., 1996) mediante la unión del DNA genómico de doble hebra para formar una estructura triple que puede bloquear la traducción (Giovannangeli and Helene, 1997) (Sun et al., 1996) y por la sustitución de una hebra de DNA en un DNA pre-existente de doble cadena (Bukanov et al., 1998) (Nielsen et al., 1991). Las moléculas antisentido han sido diseñadas para inhibir las modificaciones post-transcripcionales del RNA nuevo cuando se transforma en RNA maduro, así como prevenir poliadenilación o la maduración del pre-RNA<sub>m</sub> (Kulka et al., 1989).



**FIGURA 1.8. Modificaciones químicas de los oligonucleótidos antisentido.** Todas las modificaciones han sido llevadas a cabo sin perder la capacidad de unión a las secuencias de mRNA en base al modelo de apareamiento de Watson y Crick.

## **Barreras para la actividad**

A pesar del potencial de los oligonucleótidos antisentido, la tecnología ha tenido un lento desarrollo como terapia clínica, en comparación con los tratamientos de quimioterapia convencional en modelos animales y humanos. Más aún, las dosis altas requeridas para observar actividad biológica hacen que las drogas antisentido sean relativamente caras, comparadas con otros tratamientos. En esta sección se discute cuales son las principales razones por las cuales la actividad de los antisentidos es limitada (Tabla 1.3) y que formas están siendo aplicadas para resolver estas limitaciones

**TABLA 1.3**

### **Factores para desarrollar oligos antisentido con fines terapéuticos**

1. Degradación por nucleasas
2. Rápida eliminación del plasma
3. Baja captación intracelular
4. Interacciones con proteínas no específicas
5. Toxicidad sistémica
6. Necesidad de administraciones frecuentes

## **Sensibilidad a las nucleasas**

La estructura química de una hebra sencilla de DNA está basada en el esqueleto fosfodiéster que posee. Los oligonucleótidos basados en esta estructura pueden ser sensibles a la actividad exonucleasa en el suero y posiblemente a una actividad endonucleasa dentro de la célula (Eder et al., 1991), convirtiéndose de esta manera en los componentes terapéuticos menos usados, excepto en muy altas dosis, debido a la corta vida media que poseen. Para incrementar la resistencia de los oligos contra la degradación por nucleasas, se han llevado a cabo varias modificaciones a la estructura química de los mismos, dando como resultado diversas clases de oligos, entre los que se encuentran los P-etoxy oligos (Tari et al., 1998), análogos lipofílicos de fosfodiésteres, que han sido sintetizados por adición de un grupo etilo a un átomo de oxígeno de grupo fosfato, el cual está unido a una de las bases del DNA. También se incluyen los metilfosfonatos (Miller et al., 1985), en los cuales el oxígeno es substituido por un grupo metilo; los fosforotiatos (Stein et al., 1989), donde los átomos de sulfuro reemplazan el oxígeno y finalmente ácidos nucleicos peptídicos (Nielsen et al., 1991), donde algunas unidades de N-(2-aminoetil) glicina son substituidas.

Sin embargo, la mayoría de estos compuestos tienen alguna característica no deseada, los metilfosfonatos son relativamente insolubles y por lo tanto no pasan rápidamente al interior celular, mientras que los ácidos nucleicos peptídicos tienen una alta estabilidad termodinámica de hibridación y especificidad a la secuencia blanco de RNA, pero tienen una baja permeabilidad a la membrana (Wittung et al., 1995). Los fosforotiatos, por otro lado, son altamente solubles en agua, y son rápidamente captados por las células, facilitando el rompimiento del complejo oligonucleótido

antisentido/mRNA por medio de la actividad de la RNasa H. Aunque la molécula de sulfuro puede por sí misma causar toxicidad a la célula, se han creado quimeras de fosfodiésteres-fosforotioatos, donde se sustituye el oxígeno terminal de un oligonucleótido con un átomo de azúfre (Ghosh et al., 1991). Estas moléculas retienen la propiedad de resistencia a la degradación por nucleasas, así como un menor incremento en la toxicidad que normalmente es inducido por la presencia de átomos de azúfre, y son resistentes a la actividad de la RNasa H. Los P-etoxy oligos, por su parte, tienen la característica de que pueden permanecer unidos a la molécula blanco con una gran afinidad y ser altamente resistentes a nucleasas (Tari and Lopez-Berestein, 1997). Estas quimeras han sido satisfactoriamente utilizadas en algunos experimentos, tanto *in vitro* como *in vivo* (Cotter et al., 1994) (Pocock et al., 1995).

### **Captación celular**

Los estudios en cultivo de células han demostrado que la captación intracelular de los oligos es un proceso activo dependiente del tipo de célula, tiempo y temperatura, pero también de algunos parámetros relacionados con los antisentidos, como lo son concentración, secuencia, longitud y estructura química (Crooke, 1991) (Crooke et al., 1995).

Los oligonucleótidos son moléculas cargadas negativamente y funcionan como poli-aniones. Esta propiedad resulta en una baja captación y distribución celular, por lo cual se han propuesto una variedad de mecanismos para mejorar la entrada de los mismos a la célula, incluyendo pinocitosis de fase fluida y endocitosis mediada por receptores (Gao et al., 1993) (Beltinger et al., 1995). Una proteína de membrana de 80 kD

encontrada en las células de leucemia HL-60 y en fibroblastos de ratón ha sido identificada como un posible mediador de la captación activa de oligonucleótidos (Loke et al., 1989) (Yakubov et al., 1989). Una vez dentro de la célula, los oligonucleótidos son frecuentemente encontrados dentro de los endosomas o de otras vesículas citoplásmicas (Wagner, 1994) (Farrell et al., 1995), sugiriendo que el transporte a través de las membranas intracelulares hacia los sitios de actividad biológica, como lo son el citoplasma y el núcleo, no es siempre el óptimo. Varios grupos han contemplado el incremento del transporte intracelular de los oligonucleótidos por diversos métodos que incluyen la encapsulación en lípidos catiónicos (Bennett et al., 1992) (Lewis et al., 1996) y uniones covalentes al lípido (Krieg et al., 1993) o a los ligandos de los receptores transmembranales, tales como la transferrina (Citro et al., 1992) y el folato (Wang et al., 1995). Sin embargo, la relativa impermeabilidad de las membranas celulares a los oligonucleótidos es uno de los principales obstáculos para el desarrollo de estas moléculas como agentes terapéuticos.

Nosotros hemos demostrado previamente que los liposomas pueden incrementar la captación intracelular de los P-etoxy oligos y que éstos oligos pueden ser fácilmente incorporados en los liposomas con una eficiencia igual o mayor al 95% (Tormo et al., 1998) (Tari and Lopez-Berestein, 1997) (Tari et al., 1996) (Gutiérrez-Puente et al., 1999).

## LIPOSOMAS

### Estructura

Uno de los factores que tienen mayor influencia en el transporte de antisentidos como agentes terapéuticos es la baja permeabilidad de las membranas celulares a estos compuestos. Debido a que los sitios de actividad de los oligos son principalmente en el citoplasma y/o en el núcleo, la penetración de estos agentes dentro de las células es esencial. Si bien, las secuencias antisentido deben ser internalizadas por las células (Loke et al., 1989) (Jaroszewski and Cohen, 1991), el grado de captación puede no ser el adecuado para mantener la actividad *in vivo*; por lo cual se han diseñado algunos sistemas acarreadores para proteger la estructura de los antisentidos en contra de la degradación por nucleasas y para mejorar el paso a través de la membrana celular.

Los liposomas son un sistema bien estudiado de transporte de drogas y ofrecen características que favorecen su uso en el manejo de agentes antisentido. Los liposomas son vesículas que pueden estar formados de una o más capas de fosfolípidos y fueron descritos por vez primera en el año de 1965 (Bangham et al., 1965), despertando gran interés debido a su potencial como sistemas acarreadores de drogas. En un medio acuoso la mayoría de los fosfolípidos espontáneamente adoptan una configuración de bicapas, formando láminas macromoleculares de membranas concéntricas y organizadas, estructuras cerradas rodeando un centro acuoso interno para formar liposomas. Los solutos contenidos entre estas estructuras son encapsulados, y si el soluto no puede difundirse a través de las membranas liposomales es entonces atrapado. El término liposoma es genérico para una variedad de sistemas diferentes, siendo más utilizado para



describir vesículas multilaminares (MLV), vesículas unilaminares grandes (LUV) y vesículas unilaminares pequeñas (SUV), las cuales serán descritas en detalle más adelante. Las secuencias antisentido pueden ser atrapadas entre las capas hidrofóbicas o ser disueltas en el medio acuoso, para después ser liberadas por un mecanismo de partición, es decir, cuando se rompe la estructura del liposoma. Para usos clínicos, los liposomas son comúnmente compuestos de fosfolípidos neutros y colesterol y tienen en promedio diámetros de 50 a 100 nm.

### **Vesículas multilaminares**

Uno de los métodos más comunes de preparar liposomas es disolver primeramente el lípido en un solvente orgánico, tal como cloroformo, para formar una película de lípidos en un recipiente de vidrio. Posteriormente se evapora el solvente bajo condiciones de vacío o de una corriente de gas inerte. Cuando un exceso de agua es agregado a la película las moléculas de lípidos se hidratan y se organizan en estructuras multilaminares, en las cuales las lamelas son arregladas en orden concéntrico, separadas por angostos espacios acuosos. Las estructuras MLV con diámetros de 1-10  $\mu\text{m}$ , pueden ser separadas de la pared de vidrio fácilmente con agitación suave. La distancia intralamelar es dictada por la carga en la superficie de las membranas adyacentes. La fosfatidilcolina es un lípido neutro, consecuentemente las membranas internas están estrechamente empaquetadas, como puede ser observado por microscopía electrónica de criofactura, donde el sentido del corte atraviesa el plano de las bicapas lipídicas (Figura 1.9).

Una pequeña porción de lípido con carga puede ser incorporado para proporcionar

una repulsión electrostática entre las bicapas, lo cual incrementa el volumen de

resolución (B)

volumen de

ngelación y

acramente las

la fuerza para

liposomas es

estructuras son

chulano and

tracamente por

reducción en

Figura

Figura 1.9

Figura 1.9

Figura 1.9

Figura 1.9

Figura 1.9

Figura 1.9

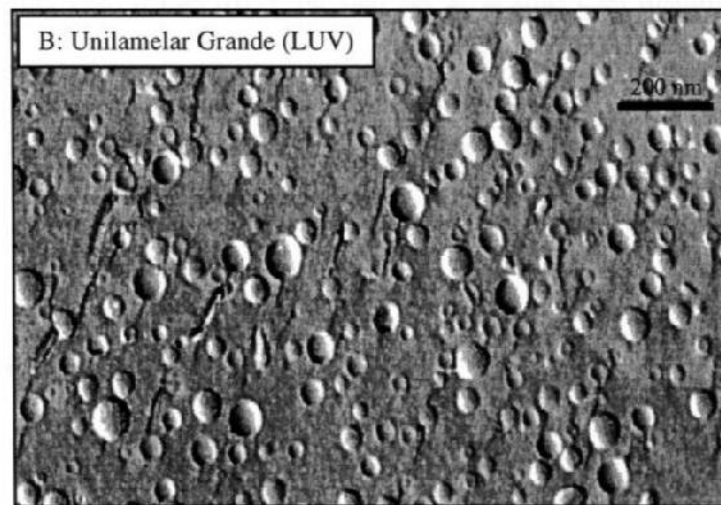
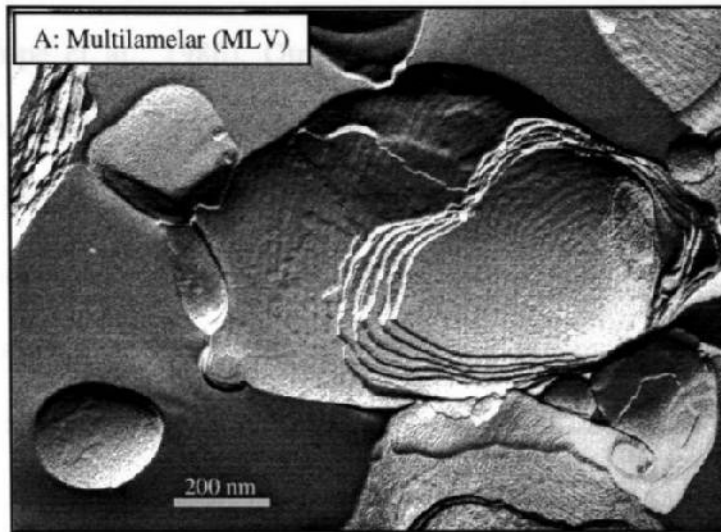
Figura 1.9

Figura 1.9

Figura 1.9

Figura 1.9

Figura 1.9

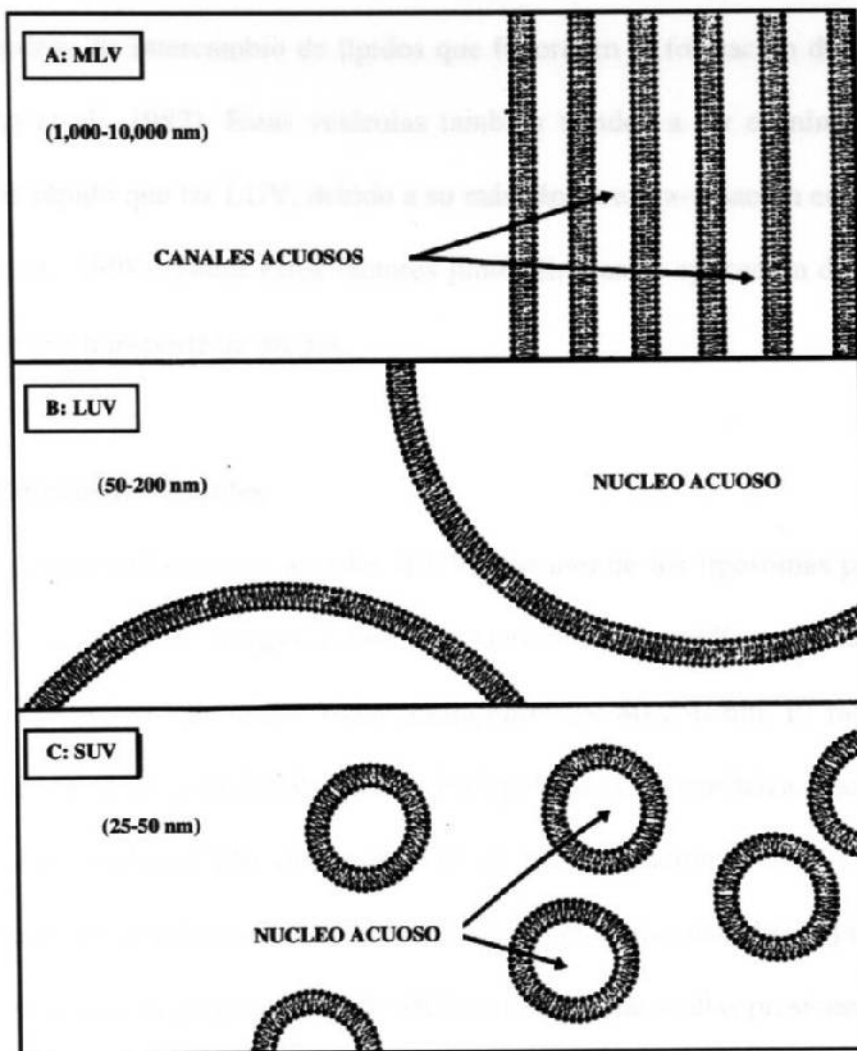


**FIGURA 1.9. Micrografías electrónicas de criofractura de diferentes tipos de vesículas.** Las vesículas multilamelares (A) fueron extruídas a través de dos filtros de policarbonato con tamaño de poro de 100 nm para generar vesículas unilamelares grandes (B).

Una pequeña porción de lípido con carga puede ser incorporado para proporcionar una repulsión electrostática entre las bicapas, lo cual incrementa el volumen de encapsulación (Hope et al., 1986). Otro método para incrementar el volumen de encapsulación de las MLV es someterlas a ciclos repetidos de congelación y descongelación (Mayer et al., 1986). Los cristales de hielo rompen físicamente las lamelas internas, originando que las estructuras vesiculares internas tengan la fuerza para formar las membranas. Como se discute posteriormente, el tamaño de los liposomas es uno de varios factores críticos que determinan la tasa a la cual estas estructuras son eliminadas de la circulación después de su administración intravenosa (i.v.) (Juliano and Stamp, 1975) (Senior, 1987). Las MLV pueden ser atrapadas casi instantáneamente por macrófagos y/o por el sistema microvascular, siendo consecuentemente reducidas en tamaño antes de comenzar a ser utilizadas por el sistema acarreador de drogas (Figura 1.10).

### **Vesículas Unilaminares Pequeñas**

Cuando una suspensión de MLV es sujeta a sonicación de alta energía o a homogenización de alta presión las bicapas se rompen y se cierran nuevamente como vesículas de membrana sencilla (Huang, 1969). Estas son descritas como vesículas unilaminares debido a que sus dimensiones reflejan el radio mínimo de curvatura que puede ser adoptado por una membrana de dos capas; típicamente estas vesículas oscilan entre 25-50 nm de diámetro, dependiendo de la composición del lípido. La Figura 1.10 muestra la curvatura relativa para cada tipo de liposoma en forma esquemática. Debido al radio acuoso de curvatura mostrado por las SUV puede haber dos veces más lípido en la



**FIGURA 1.10. Representación esquemática del tamaño de los liposomas y su lamelaridad.** Representación esquemática de tres tipos de liposomas: (A) una vesícula multilamelar, (B) vesícula unilamelar grande y (C) vesícula unilamelar pequeña.

capa externa comparado con la capa interna. Esta diferencia en la concentración de lípidos hace las vesículas inestables, resultando en una tendencia a experimentar una fusión y un proceso de intercambio de lípidos que favorecen la formación de vesículas grandes (Wong et al., 1982). Estas vesículas también tienden a ser eliminadas de la circulación más rápido que las LUV, debido a su más rápida extra-vasación en el hígado (Rodríguez et al., 1998). Todos estos factores juntos limitan la aplicación de las SUV como un sistema de transporte de drogas.

### **Vesículas Unilamelares Grandes**

Las vesículas unilamelares grandes (LUV) son uno de los liposomas preferidos como sistema acarreador de drogas. Consiste en una bicapa sencilla encerrada en un núcleo acuoso, pero con un diámetro que oscila entre los 80-250 nm. El radio de la curvatura es menos agudo y la distribución de los lípidos es casi simétrica, haciendo las LUV más estables en la circulación después de su administración *in vivo* y teniendo mayor vida media en circulación. Estas vesículas son preparadas usando un proceso de extrusión según el cual las preparaciones de MLV son expuestas a altas presiones a través de filtros de policarbonato con tamaños de poro definidos, de 50-200 nm de diámetro (Hope et al., 1985).

### **Factores claves en el transporte de drogas**

Se ha demostrado que la retención estable de una droga encapsulada, la eliminación de la circulación y el acceso a los tejidos blanco están estrechamente relacionados con el tamaño, lamelaridad y composición de los liposomas (Senior, 1987)

(Jones and Nicholas, 1991) (Scherphof and Morselt, 1984). Pueden llegar a formarse liposomas que oscilan en tamaño entre 25 a 15000 nm, pero en general, los liposomas mayores de 50-100 nm de diámetro son muy grandes para pasar a través de las paredes de los vasos sanguíneos normales. Sin embargo, en áreas donde se presenta nueva formación de vasos capilares, tales como tumores o áreas de inflamación, los liposomas más grandes pueden pasar más fácilmente.

Los liposomas más pequeños con un rango de tamaño de 50-200 nm tienen el potencial de transportar las drogas encapsuladas más selectivamente a los tumores, tomando la ventaja de poder “filtrarse” por los capilares del tumor (Gabizon et al., 1990) (Vaage et al., 1994). Un incremento en la facilidad para localizar tumores usando liposomas pequeños ha sido demostrado para varias drogas citotóxicas en sistemas de modelos animales y ha sido confirmado en estudios llevados a cabo en humanos (Gabizon et al., 1990) (Gabizon and Papahadjopoulos, 1988) (Papahadjopoulos et al., 1991).

La estabilidad de la estructura de los liposomas en el plasma depende del tamaño, lamellaridad, composición de los lípidos y la temperatura prevalente, pero su interacción con las proteínas del plasma, particularmente lipoproteínas de alta densidad, es también de considerable importancia (Senior, 1987) (Allen and Chonn, 1987) (Lasíc et al., 1991) (Scherphof and Morselt, 1984).

Las ventajas y desventajas de cada sistema de transporte se mencionan en la Tabla 1.4. Los liposomas convencionales son sujetos a una rápida captura por las células fagocíticas del sistema retículo endotelial. Es posible reducir la captación de liposomas por las células retículo endotelial saturando temporalmente la captación de los mismos

por el hígado y el bazo, mediante la utilización de partículas liposomales libres de droga (Abra and Hunt, 1981), pero también por otros procedimientos disponibles hoy en día. A finales de los 80's se incluyeron ciertos lípidos dentro de las bicapas para prolongar su tiempo de circulación. Así, los fosfolípidos saturados forman bicapas rígidas en combinación con colesterol y son retenidos por períodos más largos en la circulación comparados a los liposomas compuestos de formas insaturadas del mismo lípido (Senior, 1987).

La habilidad para modificar las características estructurales de los liposomas ha permitido la producción de formas diversas de los mismos, las cuales pueden servir en los diferentes aspectos clínicos. Por ejemplo, la rápida captación de liposomas por el sistema retículo endotelial puede ser explotado para terapia viral y bacteriana (Janknegt et al., 1992) (de Marie, 1996), y puede ser utilizada también en el desarrollo de nuevas vacunas (Gregoriadis, 1990). La formulación de liposomas con un mayor tiempo de circulación y sitios de extravasación preferenciales ha llevado al desarrollo de nuevas y efectivas drogas anti-cáncer (Park et al., 1995) (Vingerhoeds et al., 1994).

**TABLA 1.4**

**Propiedades de diferentes sistemas acarreadores de lípidos para el transporte de oligos antisentido**

<b>Sistema Acarreador</b>	<b>Ventajas Potenciales</b>	<b>Limitaciones</b>
Liposoma Convensional	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Protección a nucleasas</li> <li>◆ Relativa larga vida en circulación</li> <li>◆ Acumulación pasiva en el sitio blanco</li> <li>◆ No toxicidad relativa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Baja eficiencia de encapsulación</li> <li>◆ Bajo transporte intracelular</li> <li>◆ Baja especificidad al blanco</li> </ul>
Liposoma Dirigido al Blanco	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Protección a nucleasas</li> <li>◆ Endocitosis incrementada</li> <li>◆ Especificidad al blanco</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Baja eficiencia de encapsulación</li> <li>◆ Rápida eliminación de plasma</li> <li>◆ Toxicidad a tejidos</li> </ul>
Liposoma Sensible al pH	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Protección a nucleasas</li> <li>◆ Transporte intracelular</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Baja eficiencia de encapsulación</li> <li>◆ Baja especificidad al blanco</li> <li>◆ Rápida eliminación del plasma</li> <li>◆ Toxicidad a tejidos</li> </ul>
Liposomas Fusionados	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Protección a nucleasas</li> <li>◆ Transporte intracelular</li> </ul>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Baja eficiencia de encapsulación</li> <li>2. Rápida eliminación del plasma</li> <li>3. Toxicidad a tejidos</li> </ol>
Complejos Catiónicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Alta eficiencia de encapsulación</li> <li>◆ Eficiencia en el transporte intracelular</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Limitada protección a nucleasas</li> <li>◆ Baja especificidad al blanco</li> <li>◆ Rápida eliminación del plasma</li> <li>◆ Toxicidad a tejidos</li> </ul>



## **OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION**

Los mecanismos moleculares precisos por los cuales Bcl-2 regula la muerte celular estan contenidos en la observación de que Bcl-2 es un miembro de una familia de reguladores apoptóticos, los cuales también incluyen a Bax. Es claro que Bcl-2 existe como parte de un complejo generado a través de su heterodimerización con Bax. La relación de Bcl-2:Bax parece ser determinante en la actividad funcional de Bcl-2, aunque el papel de la activación de Bcl-2 en la patogénesis del LFt es complejo.

La hipótesis central de este trabajo es que la proporción Bcl-2/Bax es crítica para la regulación del crecimiento celular en el LFt. Estudiamos el papel de Bcl-2 en células de LFt con diferente expresión de Bcl-2:Bax para determinar si la ausencia o presencia de Bax es crítica en la inducción de apoptosis en células de LFt. Para demostrar esta hipótesis utilizamos oligonucleótidos antisentido dirigidos a Bcl-2 para explorar el papel de Bcl-2 y Bax respecto al crecimiento celular e inhibición de proteínas.

También estudiamos en modelos murinos la seguridad, farmacocinética y distribución en tejidos de los P-ethoxy oligonucleótidos antisentido dirigidos a Bcl-2. Esta fase preliminar sirve como base farmacológica para estudiar la inhibición de Bcl-2 en animales portadores del LFt. Los resultados obtenidos ayudarán a elucidar el papel potencial de la relación Bcl-2:Bax en LFt.

Los objetivos específicos para este proyecto son los siguientes:

- **Determinar si la inhibición del crecimiento celular de linfoma está relacionada a la proporción de Bcl-2:Bax y a la presencia de Bax.**
- **Determinar la seguridad, farmacocinética y distribución en tejidos de P-etoxy oligos antisentido incorporados en liposomas (L-Bcl-2 As) en ratones.**
- **Determinar en modelos experimentales de LFT si la inhibición de la expresión de Bcl-2 utilizando L-Bcl-2 As conlleva a la supresión del tumor.**
- **Determinar la farmacología celular de secuencias cortas de L-Bcl-2 As.**

## ESTUDIOS PRELIMINARES

Reportes previos han demostrado que la proteína Bcl-2 es determinante para mantener el crecimiento de células de LFt que expresan la translocación t(14;18). Los mecanismos por los cuales la proteína Bcl-2 puede ser regulada río abajo ocasionando la inhibición del crecimiento en células de LFt no ha sido estudiada aún. Para estudiar el papel de la relación de Bcl-2/Bax en la regulación del crecimiento en células del linfoma que expresan o pierden la translocación t(14;18) y para estudiar los mecanismos mediante los cuales la inhibición del crecimiento celular puede ser mediada en los linfomas (Tormo et al., 1998), en nuestro laboratorio, desarrollamos un desoxi-oligonucleótido complementario al marco abierto de lectura del mRNA de Bcl-2. Posteriormente lo incorporamos en liposomas y fué dirigido hacia diferentes líneas celulares: LFt, Linfoma de Burkitt y una línea de leucemia aguda de células T. Una disminución dependiente de la dosis fué observada en los diferentes linfomas incubados con los L-Bcl-2 As. Se observó inhibición del crecimiento en la línea celular de LFt, la cual posee la translocación t(14;18) y sobre-expresa la proteína Bcl-2.

Uno de los mecanismos por los cuales los L-Bcl-2 As pueden inhibir el crecimiento celular en estas líneas celulares de LFt, puede ser la inducción de apoptosis, ya que las células tratadas tuvieron un incremento en el índice apoptótico y mostraron la típica fragmentación del DNA característica de este proceso. En conclusión Tormo et al. demostraron que la proteína Bcl-2 parece ser crítica en la regulación del crecimiento de las células de LFt. La regulación río abajo de Bcl-2 puede permitir una disminución en la proporción de Bcl-2/Bax y dar lugar a un incremento en la inducción de apoptosis en las

células de LFt. Por lo tanto, la regulación negativa de Bcl-2 puede constituir una de las bases importantes para el enfoque molecular en el tratamiento de los LFt.

## **CAPITULO II**

### **SEGURIDAD, FARMACOCINETICA Y DISTRIBUCION EN TEJIDOS DE P-ETOXY OLIGONUCLEOTIDOS ANTISENTIDO INCORPORADOS EN LIPOSOMAS DIRIGIDOS HACIA BCL-2**

## RESUMEN

Los oligos antisentido tienen la capacidad de bloquear selectivamente genes causantes de enfermedades, mediante la inhibición de proteínas asociadas a estas enfermedades. Sin embargo, su efectividad se ve limitada por la baja capacidad de transporte intracelular. Hemos demostrado previamente que los liposomas pueden incrementar la capacidad de captación intracelular de P-ethoxy oligos, análogos hidrofóbicos de fosfodiésteres y encontramos que L-Bcl-2 As pueden selectivamente inhibir la producción de la proteína Bcl-2 por medio de la inducción de la inhibición del crecimiento en líneas celulares del LF.

Para entender el comportamiento *in vivo* de los L-Bcl-2 As, llevamos a cabo una serie de estudios para evaluar la seguridad, farmacocinética y distribución en tejidos de inyecciones i.v. de L-Bcl-2 As en ratones normales. La administración diaria por 5 días consecutivos de 20 mg de L-Bcl-2 As/kg de peso, no mostró efectos adversos en las funciones hepáticas y renales, como tampoco en los parámetros hematológicos. La histopatología tampoco reveló ningún cambio significativo en la morfología de los órganos estudiados. En ratas, el área de distribución de L-Bcl-2 As bajo la curva refleja un modelo de distribución de dos compartimentos, con una eliminación bifásica en el plasma.

La  $T_{1/2\alpha}$  y la  $T_{1/2\beta}$  fueron aproximadamente de 8 minutos y 4.2 horas respectivamente, y el volumen de distribución ( $V_d$ ) fue de 79 ml, indicando una amplia distribución en el cuerpo. Las máximas concentraciones de L-Bcl-2 As fueron encontradas en bazo > hígado > riñones. Estos estudios mostraron que en las dosis

estudiadas no se presentó toxicidad significativa asociada con los L-Bcl-2 As aún seis semanas después de la inoculación del tumor y que los L-Bcl-2 As mostraron estar ampliamente distribuídos en el cuerpo.

## INTRODUCCION

Ha sido demostrado que la apoptosis es regulada por diversas señales, incluyendo el gene *bcl-2*. La proteína Bcl-2 interactúa con otros productos de diferentes genes, tales como Bax, a través de la producción de dímeros, los cuales llevan a la regulación de apoptosis. Los homodímeros de Bcl-2 bloquean apoptosis, mientras que los homodímeros formados por Bax promueven la apoptosis, Bax puede unirse a la proteína de Bcl-2 y neutralizar la capacidad de Bcl-2 para bloquear la muerte celular (Neilan et al., 1993) (Reed, 1995). La proporción de Bcl-2 y Bax es crucial para determinar la susceptibilidad de una célula a la muerte. Basado en su función como regulador de la sobrevivencia celular y en su potencial papel en la resistencia a drogas, el gene *bcl-2* representa un blanco ideal para nuevas estrategias terapéuticas diseñadas para perfeccionar los tratamientos anti-cáncer.

Los oligos antisentido pueden inhibir la expresión de ciertas proteínas asociadas a enfermedades, tales como Bcl-2 (Agrawal, 1996). Cuando los oligos antisentido se unen al mRNA blanco, se forma un complejo DNA-mRNA, el cual tiene la capacidad de inhibir la producción de la proteína correspondiente. Por lo tanto estos oligos antisentido facilitan el estudio del papel de las proteínas individuales en las funciones celulares. Sin embargo, su efectividad como moléculas potenciales ha sido limitada por su baja capacidad de transporte intracelular (Cotter, 1997) (Alama et al., 1997) (Temsamani and Guinot, 1997).

Hemos demostrado previamente que los liposomas (como sistemas acarreadores) pueden incrementar la captación celular de los P-ethoxy oligos, los cuales son análogos



hidrofóbicos de fosfodiésteres, resistentes a la degradación por nucleasas. Los P-ethoxy oligos fueron utilizados debido a que pueden ser fácilmente incorporados en los liposomas con una eficiencia mayor o igual al 95%. Los P-ethoxy oligos antisentido pueden causar una inhibición selectiva en la expresión de proteínas y en el crecimiento celular (Tari et al., 1996) (Tormo et al., 1998). Nosotros hemos demostrado que la proporción de las proteínas Bcl-2/Bax es importante para la regulación de las líneas celulares del LFt (Tormo et al., 1998). La regulación de Bcl-2 utilizando L-Bcl-2 As lleva a una disminución en la proporción de Bcl-2/Bax y un incremento en la inducción de apoptosis en células transformadas de LF. Por lo tanto, la regulación de la proteína Bcl-2 proporciona un buen fundamento para la terapia molecular del LF. Como un prelude a los tratamientos clínicos, es importante entender la farmacocinética, distribución y seguridad o toxicidad de los L-Bcl-2 As cuando es administrado iv en dosis simples y múltiples en animales experimentales (roedores).

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Animales, Lípidos y P-ethoxy Oligos.**

Las ratas Lewis con un peso aproximado de 400 g c/u y los ratones ICR con un peso de 25 a 30 g, fueron obtenidos de la compañía Harlan-Sprague-Dawley (Indianapolis, IN). 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina y P-ethoxy oligos fueron comprados de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) y Oligos Etc. respectivamente. Un oligo específico para el sitio de iniciación de la traducción de el mRNA e Bcl-2 humano, fue utilizado como oligo antisentido: 5'CAGCGTGCGCCATCCTTCCC3'.

### **Marcaje de los Oligos para Bcl-2 con [<sup>32</sup>P].**

Los oligos para Bcl-2 (480µg) fueron marcados durante toda la noche a 37°C con 0.5 mCi de [<sup>32</sup>P]ATP en el extremo 5', utilizando 500 U de la enzima T4 polinucleótido quinasa, obtenida de Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN), en 350 µL de buffer T4 quinasa, similarmente a como fué descrito previamente (Tari and Lopez-Berestein, 1997). Un volumen final del 25% de dimetil sulfóxido (v/v) fué incluido en la mezcla de reacción para permitir que los P-ethoxy oligos permanecieran solubles durante las reacciones de marcaje. Después de que el marcaje de los oligos fué llevado a cabo, los oligos fueron filtrados dos veces, a través de un filtro Microcon-3 (Amicon, Beverly, MA) para separar los oligos marcados de el [<sup>32</sup>P]ATP libre. Típicamente, un 99% de la radioactividad fué asociada con los oligos (Tari and Lopez-Berestein, 1997).

### **Preparación de Liposomas.**

L-Bcl-2 As fueron preparados como se describe previamente (Beham et al., 1997) (Tormo et al., 1998), mezclando 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina con P-ethoxy oligos antisentido para Bcl-2 (20:1, mol/mol) en exceso de tert-butanol. La mezcla fue sometida a agitación en un vortex y posteriormente congelada utilizando un baño de acetona y CO<sub>2</sub> sólido, para ser finalmente liofilizada. La preparación liofilizada fue hidratada con 0.9% de solución salina fisiológica al 0.9%. Nosotros habíamos determinado previamente que la eficiencia de incorporación en los liposomas de los P-ethoxy oligos era de  $\geq 95\%$  (Tari and Lopez-Berestein, 1997).

### **Extracción de los Oligos Marcados con <sup>32</sup>P a Partir de las Muestras de Tejidos y Sangre.**

0.1 ml de sangre completa ó 50-100 mg de muestras de tejido fueron digeridos con 0.5 a 1.0 ml de amina-hidróxido/etanol (1:2, v/v) a 60°C por toda la noche, seguido por una decolorización con 0.5 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% (p/p). Posteriormente se agregaron 15 ml de cocktail de centelleo a cada una de las muestras. La cantidad de <sup>32</sup>P asociado con la muestra fue determinada por un contador de centelleo líquido.

### **Farmacocinética.**

Las ratas Lewis (machos) con un peso aproximado de 400 g fueron anestesiadas con tiopental sódico (35 mg/kg de peso), vía intraperitoneal (i.p.). La arteria femoral derecha y la vena femoral izquierda fueron expuestas quirúrgicamente y posteriormente canalizadas. Las ratas fueron inyectadas i.v. con los L-Bcl-2 As utilizando una dosis de

10 mg de oligos por cada kg de peso. Se tomaron muestras de sangre arterial, aproximadamente de 0.3 ml cada una, a intervalos de 5, 10, 20, 30, 90, 120, 180 y 240 minutos posteriores a la inoculación. Después de cada intervalo de tiempo, el catéter fué lavado con una solución 1:000 de heparina de sodio (v/v) para evitar la coagulación. Una alícuota de la dosis inyectada fué mantenida como muestra control. Las muestras de sangre completa fueron extraídas, procesadas y sometidas a un contador de centelleo líquido para determinar la radioactividad del  $^{32}\text{P}$ . Los parámetros farmacocinéticos fueron determinados por análisis de regresión no lineal (Rstrip; Micro Math, Inc., Salt Lake City, UT). Los resultados corresponden a un modelo de dos compartimentos:

$$C_t = Ae^{-\alpha} + Be^{-\beta}$$

donde  $C_t$  equivale a la concentración en el tiempo  $t$ ,  $A$  y  $B$  son el intercepto del eje  $y$ , son las constantes para la distribución y la eliminación respectivamente y  $t$  es el tiempo.  $t_{1/2\alpha}$  y  $t_{1/2\beta}$  fueron calculadas de  $\ln 2/\alpha$  y  $\ln 2/\beta$ , respectivamente.  $C_0$  fué calculada de la ecuación anterior al tiempo cero; por lo tanto  $C_0$  equivale a  $A + B$ .  $V_d$  fué calculada como la proporción de la dosis inicial para  $C_0$ .

### **Estudios de Seguridad.**

Grupos de 10 ratones cada uno fueron inyectados en la vena de la cola, con una dosis sencilla y otro grupo por 5 días consecutivos con L-Bcl-2 As, con un volúmen de 0.2 ml. Se obtuvieron muestras de sangre 1, 2 y 6 semanas posteriores a la inyección, para analizar los parámetros hematológicos y algunas funciones renales y hepáticas. Los parámetros hematológicos incluyen cuentas de sangre completa y cuentas de plaquetas. Para las funciones hepáticas se analizó la enzima transaminasa glutámico oxalacética de

suero (TGO) y fosfatasa alcalina. Como funciones renales fueron realizados ensayos de creatinina y urea.

### **Distribución en Tejidos.**

Liposomas conteniendo Bcl-2 oligos antisentido marcados con  $^{32}\text{P}$  fueron inyectados i.v. en 15 ratones con un peso aproximado de 30 g cada uno. Los cuales fueron divididos en tres grupos de cinco ratones cada uno y fueron sacrificados a las 4, 24 y 48 horas después de la inoculación. Un grupo de cinco ratones sin ningún tratamiento fue utilizado como control. Los órganos extraídos (corazón, pulmones, riñones, hígado y bazo) fueron disectados, tomándose de 50-100 mg de muestra, 150  $\mu\text{l}$  de sangre y 200  $\mu\text{l}$  de medula ósea de cada uno de los ratones. Todas las muestras fueron pesadas y procesadas, para posteriormente contar la radioactividad asociada a ellas en un contador de centelleo líquido. Los resultados fueron expresados como la media más el valor de la desviación estándar (S.D.) de microgramos de oligos por gramo de tejido.

### **Histopatología.**

Seis semanas después de la última inyección, sea de dosis sencilla o múltiple, todos los ratones fueron sacrificados, siendo colectadas muestras de sangre y tejidos. Corazón, pulmones, bazo, riñones e hígado fueron fijados por inmersión en una solución buffer de formalina al 10%. Los tejidos fueron embebidos en bloques de parafina a partir de los cuales se cortaron secciones de 2 a 4  $\mu\text{m}$ , que fueron teñidos con la técnica de hematoxilina y eosina.

## RESULTADOS

### Estudios de Toxicidad Utilizando una Dosis Simple

Los ratones toleraron la más alta concentración de L-Bcl-2 As (40 mg/kg de peso) que pudo ser administrada en un volumen máximo de 0.2 ml, el cual representa aproximadamente el 10% del volumen intravascular total en un ratón. Ninguna evidencia de toxicidad fué encontrada en los parámetros hematológicos ni en los resultados bioquímicos de las pruebas renales y hepáticas llevadas a cabo 1 (Tabla 2.1), 2 (Tabla 2.2) ó 6 (Tabla 2.3) semanas posteriores a la inyección.

### Estudios de toxicidad Utilizando Dosis Múltiples

La administración consecutiva de L-Bcl-2 As en cinco dosis individuales de 7.5 a 20 mg/kg de peso no resultó en anomalías significativas en los parámetros hematológicos, ni en las funciones hepáticas y renales analizadas 2 (Tabla 2.4), o 6 (Tabla 2.5) semanas posteriores a la inyección.

### Farmacocinética

La eliminación de L-Bcl-2 As del plasma fué cercana a un modelo matemático de dos compartimentos (correlación  $r^2 > 0.98$ ). La fase inicial de distribución ocurrió en los primeros 10 min después de la inyección ( $t_{1/2\alpha} = 8.1 \pm 2.4$  min). La vida media de la fase terminal ( $t_{1/2\beta}$ ) fué de  $235.56 \pm 128.2$  min (Tabla 1.6). El  $V_d$  fué más grande ( $79.74 \pm 18.93$  ml) que el volumen de sangre total en ratas de este tamaño.

## **Distribución en Tejidos**

L-Bcl-2 As fueron encontrados en corazón, riñones, hígado, pulmón y bazo (Tabla 2.7). Sin embargo, a las 4 y 24 h, las más altas concentraciones de L-Bcl-2 As fueron detectadas en hígado y bazo, pero a las 48 h, el pulmón mostro la más alta concentración. 4 h después de la inyección, las concentraciones de L-Bcl-2 As en hígado y bazo alcanzan entre 30-40  $\mu\text{g/g}$  de tejido, mientras que las concentraciones de L-Bcl-2 As en corazón, pulmón y riñones varían de 18-22  $\mu\text{g/g}$  de tejido. En cerebro, el rango fué siempre menor que 4.2  $\mu\text{g/g}$  de tejido. Para las 48 h, las concentraciones de L-Bcl-2 As en hígado y bazo habían disminuido hasta 8-10  $\mu\text{g/g}$  de tejido, comparado con los 5-16  $\mu\text{g/g}$  de tejido en corazón, pulmones y riñones. Una concentración mucho menor de L-Bcl-2 As (0.04-0.15  $\mu\text{g/femur}$ ) pudo ser detectada en la médula ósea, sin embargo, permanece relativamente constante durante las 48 h. En sangre, los niveles fueron menores de 7.2  $\mu\text{g/ml}$  durante todos los tiempos medidos.

**TABLA 2.1**

**Efecto de una dosis simple de L-Bcl-2 As en ratones ICR una semana posterior a la  
inyección <sup>a</sup>**

Parámetros Hematológicos <sup>b</sup>						
Dosis (mg/kg)	Leucocitos (x 10 <sup>3</sup> /μl)	Eritrocitos (x 10 <sup>6</sup> /μl)	Hemoglobina (g/dl)	Hematocrito (%)	Linfocitos (%)	Plaquetas (x 10 <sup>3</sup> /μl)
0	8.0 (1.9)	8.5 (0.5)	15.4 (0.8)	43.6 (1.6)	84.7 (6.2)	1025.0 (189)
10	6.3 (1.9)	8.1 (0.5)	14.4 (0.9)	42.0 (2.2)	82.1 (3.4)	1253.2 (243)
20	7.3 (2.8)	8.1 (0.4)	14.8 (0.6)	41.6 (1.4)	79.8 (7.8)	1382.7 (150)
30	5.6 (1.9)	7.7 (0.5)	14.3 (1.1)	40.5 (2.0)	82.9 (4.8)	970.0 (290)
40	6.4 (2.2)	6.4 (2.2)	15.0 (0.8)	41.9 (1.8)	80.4 (3.9)	1096.3 (207)

Funciones Renales y Hepáticas <sup>b</sup>				
Dosis (mg/kg)	Creatinina (mg/dL)	Urea (mg/dL)	TGO <sup>c</sup> (U/L)	Fosfatasa Alcalina (U/L)
0	0.7 (0.0)	30.0 (2.7)	335.3 (347)	98.7 (40.7)
10	0.6 (0.1)	29.9 (8.2)	184.7 (105)	118.4 (39.9)
20	0.5 (0.7)	27.0 (4.4)	321.3 (251)	128.4 (34.6)
30	0.6 (0.0)	26.0 (2.1)	156.3 (53)	108.7 (30.7)
40	0.5 (0.0)	28.1 (2.6)	223.0 (192)	115.5 (50.9)



<sup>a</sup> Fueron utilizados ratones ICR, 5 machos y 5 hembras.

<sup>b</sup> Todos los parámetros y las funciones fueron expresados como la media de los valores(SD).

<sup>c</sup> TGO, transaminasa glutámica oxalacética.

**TABLA 2.2**

**Efecto de una dosis simple de L-Bcl-2 As en ratones ICR dos semanas posteriores a la inyección <sup>a</sup>**

Parámetros Hematológicos <sup>b</sup>						
Dosis (mg/kg)	Leucocitos (x 10 <sup>3</sup> /μl)	Eritrocitos (x 10 <sup>6</sup> /μl)	Hemoglobina (g/dl)	Hematocrito (%)	Linfocitos (%)	Plaquetas (x 10 <sup>3</sup> /μl)
0	9.5 (3.2)	8.0 (0.2)	14.8 (0.5)	42.7 (1.4)	75.8 (22)	1024.0 (200)
10	6.4 (4.1)	7.9 (0.3)	14.7 (0.8)	42.5 (1.4)	83.2 (8.5)	899.1 (100)
20	7.9 (1.5)	8.0 (0.2)	15.0 (0.3)	43.4 (1.0)	85.3 (2.9)	1087.1 (174)
30	5.9 (1.4)	8.0 (0.4)	14.8 (0.7)	43.0 (1.4)	85.2 (4.8)	954.6 (191)
40	7.0 (2.8)	8.2 (0.4)	15.1 (0.9)	43.0 (2.4)	87.0 (5.4)	980.0 (214)

Funciones Renales y Hepáticas <sup>b</sup>				
Dosis (mg/kg)	Creatinina (mg/dL)	Urea (mg/dL)	TGO (U/L)	Fosfatasa Alcalina (U/L)
0	0.6 (0.0)	33.4 (6.7)	190.7 (70)	86.4 (26.5)
10	0.7 (0.1)	32.1 (2.2)	215.3 (192)	113.7 (15.5)
20	0.6 (0.0)	32.0 (4.1)	254.0 (171)	102.2 (31.7)
30	0.6 (0.0)	29.4 (3.1)	242.1 (193)	89.1 (24.0)
40	0.6 (0.0)	30.6 (2.3)	316.8 (239)	97.5 (34.4)

**<sup>a</sup>** Fueron utilizados ratones ICR, 5 machos y 5 hembras.

**<sup>b</sup>** Todos los parámetros y las funciones fueron expresados como la media de los valores(SD).

**TABLA 2.3**

**Efecto de una dosis simple de L-Bcl-2 As en ratones ICR seis semanas posteriores a la inyección <sup>a</sup>**

<b>Parámetros Hematológicos <sup>b</sup></b>						
Dosis (mg/kg)	Leucocitos (x 10 <sup>3</sup> /μl)	Eritrocitos (x 10 <sup>6</sup> /μl)	Hemoglobina (g/dl)	Hematocrito (%)	Linfocitos (%)	Plaquetas (x 10 <sup>3</sup> /μl)
0	5.5 (1.6)	8.6 (0.5)	14.7 (0.8)	42.2 (1.9)	82.8 (7.1)	1124.5 (277)
10	5.3 (1.7)	8.4 (0.1)	14.5 (0.4)	41.9 (0.9)	81.2 (7.3)	1238.1 (209)
20	6.2 (2.6)	7.8 (1.8)	13.7 (3.3)	38.7 (8.9)	87.4 (6.9)	1061.0 (319)
30	5.3 (2.7)	7.3 (2.7)	12.7 (4.6)	36.5 (13.5)	63.3 (29.5)	1133.2 (410)
40	5.5 (1.1)	8.8 (0.4)	15.3 (0.9)	43.5 (2.5)	79.7 (7.4)	1126.7 (287)

<b>Funciones Renales y Hepáticas <sup>b</sup></b>				
Dosis (mg/kg)	Creatinina (mg/dL)	Urea (mg/dL)	TGO (U/L)	Fosfatasa Alcalina (U/L)
0	0.7 (0.0)	28.3 (5.5)	335.5 (190)	63.3 (21.7)
10	0.6 (0.0)	30.5 (3.0)	145.8 (28)	84.6 (10.6)
20	0.6 (0.0)	32.1 (4.2)	407.0 (268)	62.3 (26.3)
30	0.6 (0.0)	28.0 (3.9)	208.0 (85)	60.0 (16.9)
40	0.6 (0.0)	31.0 (4.4)	160.8 (69)	80.6 (17.6)

**<sup>a</sup> Fueron utilizados ratones ICR, 5 machos y 5 hembras.**

**<sup>b</sup> Todos los parámetros y las funciones fueron expresados como la media de los valores(SD).**

**TABLA 2.4**

**Efecto de dosis múltiple de L-Bcl-2 As en ratones ICR dos semanas posteriores a la inyección <sup>a</sup>**

Parámetros Hematológicos <sup>b</sup>						
Dosis (mg/kg)	Leucocitos (x 10 <sup>3</sup> /μl)	Eritrocitos (x 10 <sup>6</sup> /μl)	Hemoglobina (g/dl)	Hematocrito (%)	Linfocitos (%)	Plaquetas (x 10 <sup>3</sup> /μl)
0	7.5 (2.0)	8.4 (0.4)	14.6 (0.6)	41.7 (1.6)	81.3 (3.7)	1030.8 (286)
7.5	6.4 (1.9)	8.2 (0.4)	14.1 (0.4)	41.6 (3.2)	74.9 (8.5)	1044.7 (212)
15	6.1 (2.0)	8.9 (0.8)	14.7 (0.6)	43.8 (3.1)	71.3 (7.3)	1061.2 (296)
20	7.2 (2.0)	8.7 (0.5)	14.4 (0.5)	42.7 (2.4)	78.8 (8.1)	1020.3 (183)

Funciones Renales y Hepáticas <sup>b</sup>				
Dosis (mg/kg)	Creatinina (mg/dL)	Urea (mg/dL)	TGO (U/L)	Fosfatasa Alcalina (U/L)
0	0.7 (0.0)	27.0 (4.4)	134.3 (64)	69.9 (33.7)
7.5	0.7 (0.1)	28.4 (6.0)	136.8 (68)	67.1 (21.9)
15	0.6 (0.0)	28.4 (5.6)	193.1 (96)	68.4 (32.0)
20	0.6 (0.0)	25.2 (3.7)	131.8 (49)	48.4 (41.3)

<sup>a</sup> Fueron utilizados ratones ICR, 5 machos y 5 hembras.

<sup>b</sup> Todos los parámetros y las funciones fueron expresados como la media de los valores(SD).

**TABLA 2.5**

**Efecto de dosis múltiple de L-Bcl-2 As en ratones ICR seis semanas posteriores a la inyección <sup>a</sup>**

Parámetros Hematológicos <sup>b</sup>						
Dosis (mg/kg)	Leucocitos (x 10 <sup>3</sup> /μl)	Eritrocitos (x 10 <sup>6</sup> /μl)	Hemoglobina (g/dl)	Hematocrito (%)	Linfocitos (%)	Plaquetas (x 10 <sup>3</sup> /μl)
0	6.5 (2.5)	8.5 (0.3)	15.1 (0.6)	43.7 (2.2)	81.2 (4.3)	1154.5 (231)
7.5	6.3 (2.5)	8.5 (0.5)	15.1 (0.3)	42.4 (1.2)	73.2 (6.0)	1153.3 (302)
15	7.3 (2.9)	8.6 (0.5)	15.5 (0.8)	43.3 (2.0)	80.6 (4.2)	1165.3 (240)
20	6.8 (2.5)	8.4 (0.7)	14.7 (1.2)	42.0 (2.8)	82.2 (7.6)	1201.5 (239)

Funciones Renales y Hepáticas <sup>b</sup>				
Dosis (mg/kg)	Creatinina (mg/dL)	Urea (mg/dL)	TGO (U/L)	Fosfatasa Alcalina (U/L)
0	0.7 (0.0)	28.2 (2.8)	252.9 (180)	37.2 (22.1)
7.5	0.6 (0.1)	25.6 (5.5)	188.3 (89)	20.8 (11.8)
15	0.6 (0.1)	28.2 (4.2)	256.4 (161)	37.5 (11.5)
20	0.5 (0.0)	28.3 (5.6)	266.4 (176)	47.1 (16.5)

<sup>a</sup> Fueron utilizados ratones ICR, 5 machos y 5 hembras.

<sup>b</sup> Todos los parámetros y las funciones fueron expresados como la media de los valores(SD).

**TABLA 2.6**

**Farmacocinética de una dosis sencilla de L-Bcl-2 en ratas Lewis**

Rata	$C_{p0}$ <sup>a</sup> (mg/ml)	$V_d$ <sup>b</sup> (ml)	$t_{1/2\alpha}$ (min)	$t_{1/2\beta}$ (min)	$C_{xt}$ <sup>c</sup> (mg/ml x min)	$t_r$ <sup>d</sup> (min)
1	0.05	60.7	5.4	280.0	8.2	390
2	0.05	69.9	7.5	252.0	6.9	347
3	0.04	78.0	11.3	451.4	10.7	623
4	0.04	79.2	8.5	166.4	5.0	227
5	0.03	110.9	-	118.0	5.3	170
Media (SD)	0.04 (0.01)	79.74 (18.93)	8.10 (2.45)	253.56 (128.27)	7.20 (2.3)	351.4 (175.82)

<sup>a</sup>  $C_{p0}$ , concentración máxima al tiempo 0

<sup>b</sup>  $V_d$ , volumen de distribución

<sup>c</sup>  $C_{xt}$ , área bajo la curva de concentración

<sup>d</sup>  $t_r$ , tiempo de residencia



**TABLA 2.7****Distribución en tejidos de L-Bcl-2 As en ratones ICR**

Tiempo h	Organo (media $\mu\text{g}$ of oligos <sup>a</sup> /g of tissues)							
	Sangre <sup>b</sup>	Médula Osea <sup>c</sup>	Cerebro	Corazón	Riñón	Hígado	Pulmón	Bazo
4	7.2 (1.3)	0.4 (0.1)	4.2 (2.8)	18.0 (4.2)	21.6 (4.2)	31.1 (7.1)	21.9 (9.8)	40.6 (23.0)
24	4.2 (0.4)	0.3 (0.1)	2.1 (0.4)	6.7 (1.9)	9.8 (1.3)	14.0 (1.9)	9.7 (1.7)	16.9 (4.1)
48	3.7 (1.7)	0.1 (0.0)	1.7 (0.6)	4.7 (1.7)	7.4 (2.1)	8.0 (2.0)	16.0 (12.3)	9.7 (2.6)

<sup>a</sup> L-Bcl-2 As fueron expresados como la media (SD).

<sup>b</sup> mg de oligos/ml de sangre.

<sup>c</sup> Fué utilizado un solo fémur.

## DISCUSION

Nuestros resultados indican que no existen efectos adversos significativos ni toxicidad asociada con las inyecciones i.v. de los L-Bcl-2 As. Estos liposomas pudieron ser administrados diariamente de forma segura en dosis de hasta 20 mg de oligos por kilogramo de peso corporal por 5 días consecutivos. Esta es la más alta concentración reportada por Tari et al. (Tari et al., 1998), quien bajo las mismas condiciones, probó una concentración de 75 mg de P-ethoxy oligos encapsulados en liposomas/kg de peso corporal. Sin embargo, en los estudios de Tari et al., los P-ethoxy oligos estaban dirigidos hacia el gene *bcr-abl*, el cual está ausente en ratones normales. Por el contrario, en este estudio, nosotros utilizamos L-Bcl-2 As cuyo blanco es el gene *bcl-2*. Este gene es expresado en tejidos de ratones normales. Por lo tanto, los estudios de Tari et al. solamente evaluaron los efectos *in vivo* de los P-ethoxy oligos incorporados en liposomas, mientras que los nuestros fueron diseñados para evaluar los efectos *in vivo* de la inhibición de la proteína de Bcl-2. Nosotros creemos que la toxicidad de un oligo no puede ser generalizada y que es necesario ensayar el perfil de la seguridad potencial de la inhibición de cada gene en particular.

El uso potencial de L-Bcl-2 As como un agente terapéutico es también grandemente afectado por su perfil de seguridad. Estos estudios son de particular valor debido a que el gene *bcl-2* es bien conservado entre las especies de mamíferos (Tsujimoto et al., 1985). Por lo tanto, nosotros decidimos estudiar el perfil de seguridad de L-Bcl-2 As en ratones normales.

La efectividad de los oligos antisentido como agentes terapéuticos es también dependiente de su farmacocinética, distribución en los tejidos, estabilidad y

características de eliminación (Agrawal et al., 1995) (Agrawal et al., 1997). Nosotros encontramos que la farmacocinética y la distribución en tejidos de los L-Bcl-2 As son muy similares a las de otros compuestos liposomales (Zou et al., 1993) (Lopez-Berestein et al., 1994) (Leonetti et al., 1996). La tasa de eliminación del plasma de los L-Bcl-2 As es bifásica; la  $t_{1/2\alpha}$  esta dentro de los 8 min, mientras que la  $t_{1/2\beta}$  esta dentro de las 4.2 h. Estos resultados farmacocinéticos difieren de los reportados por Raynaud et al., cuando administraron i.v. G3139, un oligo fosforotioato antisentido dirigido a Bcl-2, en ratones (Raynaud et al., 1997). Se observó que G3139 despliega una cinética tri-exponencial, con una vida media alfa, beta y gamma de 5 min, 37 min and 11 h, respectivamente. Altas concentraciones de L-Bcl-2 As fueron encontradas en los organos estudiados. Además, L-Bcl-2 As pudo permanecer en bazo, hígado y pulmones por al menos 48 h.

Este patrón de acumulación de L-Bcl-2 difiere de los que han sido reportados para los oligos antisentido sin encapsular, dirigidos a Bcl-2, en los cuales los órganos que han presentado la máxima acumulación de antisentido para Bcl-2 han sido riñones e hígado (DeLong et al., 1997). Esta diferencia en la biodistribución de Bcl-2 puede ser atribuida al uso de lípidos incorporados en un acarreador en vez de los oligos libres. Por ejemplo, cuando lípidos acarreadores (Litzinger et al., 1996) o lipoproteínas (de Smidt et al., 1991) fueron utilizados como vehículos de transporte para oligos antisentido, éstos fueron encontrados principalmente en hígado y bazo, en lugar de riñon, el cual es el principal órgano en el cual se acumulan los oligos libres. La modificación en las uniones de los oligos puede también contribuir a un cambio en la distribución de los tejidos de los mismos. Leonetti et al. encontraron la mayor concentración de liposomas en el hígado en

vez del bazo, cuando utilizaron fosforotioato oligos incorporados en liposomas, dichos oligos contienen una modificación en la unión del grupo fosfato entre los nucleósidos (Leonetti et al., 1996).

Nosotros hemos reportado previamente que los L-Bcl-2 As llevan a una inhibición de la proteína Bcl-2 e inducen supresión del crecimiento en líneas celulares de LF, las cuales son portadoras de la translocación t(14;18). Altas concentraciones de Bcl-2 fueron encontradas en bazo, hígado y en una concentración menor en médula ósea, los cuales son los órganos en donde las masas tumorales del LF son principalmente encontradas. Dado que L-Bcl-2 As no inducen ningún efecto adverso ni toxicidad en los órganos *in vivo*, aún a las seis semanas siguientes a su administración en las dosis probadas, concluimos que L-Bcl-2 As pueden ser usados con seguridad para inhibir el crecimiento del LF. Estos estudios de farmacocinética y distribución de tejidos nos han permitido estimar la frecuencia y la dosis de administración de los L-Bcl-2 *in vivo*. Nosotros estamos actualmente investigando la eficacia de L-Bcl-2 As en modelos experimentales del LF.

## CONCLUSIONES

- ◆ La tasa de aclaramiento en el plasma de los P-etoxy oligonucleótidos es bifásica, con una  $t_{1/2\alpha}$  de 8 minutos y una  $t_{1/2\beta}$  de 4.2 horas.
- ◆ Las más altas concentraciones de P-etoxy oligonucleótidos fueron encontradas en riñon, hígado y bazo.
- ◆ Este tipo de oligonucleótidos incorporados en liposomas puede ser usado para inhibir el crecimiento de células de linfoma y células leucémicas.

## **CAPITULO III**

# **FARMACOLOGIA CELULAR DE P-ETOXY OLIGONUCLEOTIDOS ANTISENTIDO ENCAPSULADOS EN LIPOSOMAS Y DIRIGIDOS A BCL-2**

## RESUMEN

Los P-etoxy oligos son resistentes a las nucleasas, análogos de fosfodiésteres. En este estudio fué utilizado un P-etoxy oligo, de 20 bases de longitud y específico para el sitio de iniciación de la traducción del mRNA humano, para Bcl-2, el cual fué incorporado en liposomas para incrementar su captación intracelular. Este L-Bcl-2 As oligo inhibe selectivamente la expresión de la proteína Bcl-2 e induce la inhibición del crecimiento en las células de LF, portadoras de la translocación t(14;18). Nosotros estudiamos aquí los efectos inhibitorios de secuencias más cortas de oligonucleótidos (7, 9, 11 y 15 bases de longitud) dirigidos hacia el mismo blanco, siendo incorporados todos los oligos en los liposomas de igual manera. A una concentración de 12  $\mu$ M, todos los P-etoxy oligos, aún la secuencia de 7 bases, pudieron inhibir el crecimiento de las células de LFt. También comparamos la secuencia más corta, de 7 bases, con el oligo de 20 bases, encontrando que se obtiene un 20% aproximadamente de viabilidad en las células CJ tratadas con 12  $\mu$ M del oligo de 7 bases y un 30% de viabilidad en las células tratadas con el oligo de 20 bases, ambos después de un período de incubación de 5 días.

Sin embargo, ninguno de los oligos indujo inhibición del crecimiento (90-100% de viabilidad) en la línea celular utilizada como control, que es negativa para la translocación t(14;18). Ambos oligos inhiben la expresión de la proteína Bcl-2 de manera similar: 63% y 70% con la secuencia de 7 bases y la de 20 bases respectivamente. Se encontró también que la máxima captación de estos oligos por las células fué de 200 pmol/l  $\times 10^6$  células, después de 10 horas de incubación; demostrándose también que aproximadamente un 30% de los oligos pueden ser retenidos dentro de la célula en un período de hasta 48 horas. Nuestros resultados indican que ambas secuencias de

antisentido pueden inhibir específicamente la expresión de la proteína Bcl-2 y exhiben un patrón de retención y captación celular muy similar. La actividad inhibitoria fué mantenida con los P-etoxy oligos que poseen un rango de longitud de 7 a 20 bases.



## INTRODUCCION

La familia de proto-oncogenes de Bcl-2 son reguladores críticos de la apoptosis, cuya expresión está frecuentemente alterada en algunos cánceres humanos, incluyendo algunos de los tipos más comunes de leucemia y linfoma. El primer miembro de esta familia de genes en ser identificado fué *bcl-2* debido a que está involucrado en la translocación cromosómica comúnmente encontrada en los NHL de células B. El papel central de la proteína Bcl-2 parece ser la inhibición de apoptosis y se ha determinado que existe una sobre-expresión de la misma como resultado de una translocación cromosómica (Reed, 1997).

Los oligos fosforotioatos presentan una substitución de los átomos de oxígeno, los cuales son reemplazados por átomos de azúfre, siendo ésta una de las modificaciones más frecuentemente hechas a los oligonucleotidos cuando son utilizados como antisentido. Los oligos antisentido trabajan mediante su unión con el mRNA blanco mediante el apareamiento de bases de acuerdo al modelo de Watson y Crick; de esta manera previenen la traducción del mRNA en su proteína correspondiente. Algunos estudios reportados muestran la regulación de la expresión de Bcl-2 usando estos oligos antisentido *in vitro* (Lin et al., 1999) e *in vivo* (Raynaud et al., 1997) (Waters et al., 2000). Nosotros hemos utilizado P-etoxy oligos en lugar de oligos fosforotioatos, debido a que se ha encontrado que estos últimos inducen inhibición no relacionada con la secuencia y en algunos casos toxicidad (Stein and Cheng, 1993). Los P-etoxy oligos poseen un grupo etilo substituyendo al átomo de oxígeno de las uniones fosfato entre los nucleótidos. Virtualmente, todas las modificaciones en la posición del grupo fosfato resultan en la pérdida del reclutamiento de la enzima celular RNAsa H, la cual es

requerida para llevar a cabo la degradación específica de la secuencia de un mRNA blanco (Matteucci, 1997); sin embargo, los P-etoxy oligos pueden permanecer unidos a la molécula blanco con una alta afinidad ( $T_m > 70(C)$ ).

Nosotros hemos demostrado previamente que los liposomas pueden incrementar la captación intracelular de los P-etoxy oligos. Estos oligos son compuestos lipofílicos, resistentes a las nucleasas, y que pueden ser fácilmente incorporados en los liposomas (con  $\geq 95\%$  de eficacia) (Tari and Lopez-Berestein, 1997).

Diferentes longitudes de oligos (13 a 19 bases) han sido usados satisfactoriamente para inhibir las proteínas blanco (Campbell et al., 1990) (Ollikainen et al., 1996) (Zamecnik and Stephenson, 1978). Adicionalmente, secuencias más cortas (15 a 12 bases) de oligos no-modificados, metilfosfonatos, fosforotioatos y  $\alpha$ -oligos han sido también usados para inhibir la expresión de proteínas (Blake et al., 1985) (Cazenave et al., 1987) (Matsukura et al., 1987) (Miller et al., 1985) (Morvan et al., 1987). Sin embargo, el uso de P-etoxy oligos de más corta longitud no ha sido reportado. Este capítulo muestra los resultados obtenidos al estudiar la farmacología celular de diferentes longitudes de P-etoxy oligos, así como la actividad de los mismos cuando están dirigidos hacia células que tienen sobre-expresión de la proteína Bcl-2.

## MATERIALES Y METODOS

Los P-etoxy-oligos, que son análogos no iónicos de fosfodiésteres y resistentes a nucleasas, fueron comprados en la compañía Oligos Etc. (Wilsonville, OR).

### Secuencia de los P-etoxy Oligos.

La longitud de los P-etoxy oligos utilizados fué de un rango de 7 a 20 bases. Los P-etoxy oligos son específicos para el sitio de iniciación de la traducción (codones -2 al +4) del mRNA humano para Bcl-2. De acuerdo a las indicaciones del fabricante, la pureza de los P-etoxy oligos fué estimada en  $\geq 90\%$  utilizando HPLC.

Antisentido	Tamaño	Secuencia
Oligo antisentido	20 mer	CAGCGTGCGCCATCCTTCCC
A	15 mer	TGCGCCATCCTTCCC
B	15 mer	GTGCGCCATCCTTCC
C	11 mer	GCCATCCTTCC
D	11 mer	GCGCCATCCTT
E	9 mer	ATCCTTCCC
F	9 mer	CGCCATCCT
G	7 mer	TCCTTCC
H	7 mer	GCCATCC
Scrambled control	20 mer	TCGCCACTCGATCCTGCCCCG
Scrambled control	7 mer	CTGCCAC

## **Líneas Celulares.**

Fueron utilizadas tres diferentes líneas celulares. Estas líneas fueron K562 (leucemia crónica mieloide) CJ y PT. Estas últimas dos líneas celulares fueron desarrolladas por el Dr Richard J. Ford Jr. La línea celular transformada de LF (CJ) fué aislada de un paciente con LF; estas células portan la translocación cromosómica t(14;18) y sobre-expresan la proteína Bcl-2. Las células PT, las cuales fueron aisladas de un paciente humano, no poseen la translocación t(14;18) y fueron usadas como control negativo.

## **Preparación de Liposomas.**

Los L-Bcl-2 As fueron preparados como fué descrito previamente (Beham et al., 1997) (Tormo et al., 1998) (Gutiérrez-Puente et al., 1999) mezclando los P-etoxy oligos antisentido con 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina en presencia de exceso de tert-butanol. La mezcla fué sometida a agitación en un vortex y congelada en un baño de acetona y CO<sub>2</sub> sólido, para ser liofilizada. La muestra liofilizada fué posteriormente hidratada con solución salina al 0.9%. Nosotros determinamos previamente que la eficacia de la incorporación de los P-etoxy oligos en los liposomas fué de  $\geq 95\%$  (Tari et al., 1998).

## **Efecto de los Oligos en el Crecimiento Celular.**

Las células CJ fueron distribuidas en una placa de 96 pozos (30000 células por pozo) en 0.1 mL de medio de cultivo e incubada con 12  $\mu$ M de L-Bcl-2 As: 7, 9, 11 o 15 bases de longitud y un control de una mezcla de 7 bases de longitud. Después de 5 días de

incubación, el crecimiento celular fue determinado utilizando un ensayo de proliferación celular no radioactivo llamado Celltiter 96<sup>®</sup> Aqueous (Promega Corp., Madison, WI), de acuerdo al protocolo establecido por el fabricante. El crecimiento de las células tratadas fue comparado con el de las células no tratadas bajo las mismas condiciones de cultivo, y fue expresado como el porcentaje de las células tratadas. Cada experimento fue realizado por triplicado y repetido al menos seis veces.

### **Análisis Estadístico.**

Utilizamos la prueba del análisis de varianza (ANOVA) con un valor de  $P$  de 0.01 (Zar, 1999) para determinar si existe alguna diferencia entre la media de los seis tratamientos utilizando los ocho diferentes oligos, de acuerdo con la hipótesis nula  $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$ , etc, donde  $\mu_i$  es la media del tratamiento  $i$ . Si la hipótesis nula es rechazada, entonces se utiliza la comparación múltiple de medias. La prueba de Scheffe fue usada para examinar las diferencias entre todos los posibles pares de medias.

### **Marcaje de los Oligos para Bcl-2 con [<sup>32</sup>P] ATP.**

Los oligos para Bcl-2 (480 $\mu$ g) fueron marcados durante toda la noche a 37°C con 0.5 mCi de [<sup>32</sup>P]ATP en el extremo 5', utilizando 500 U de la enzima T4 polinucleótido quinasa, obtenida de Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN), en 350  $\mu$ L de buffer T4 quinasa, similarmente a como fue descrito previamente (Tari and Lopez-Berestein, 1997). Un volumen final del 25% de dimetil sulfóxido (v/v) fue incluido en la mezcla de reacción para permitir que los P-etoxy oligos permanecieran solubles durante las reacciones de marcaje. Después de que el marcaje de los oligos fue llevado a cabo, los

oligos fueron filtrados dos veces, a través de un filtro Microcon-3 (Amicon, Beverly, MA) para separar los oligos marcados de el [ $^{32}\text{P}$ ]ATP libre. Típicamente, un 99% de la radioactividad es asociada con los oligos (Tari and Lopez-Berestein, 1997).

#### **Captación Celular de los P-etoxy Oligos.**

Las células K562 (250,000 por pozo) fueron distribuidas en una placa de cultivo de 24 pozos conteniendo 0.3 ml de medio/pozo. Dos horas después los P-etoxy oligos marcados con [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]ATP fueron agregados, en concentraciones finales de 2 a 12  $\mu\text{M}$ , tanto para la secuencia de 20 bases como para la de 7 bases (secuencia G). Las células fueron incubadas por los tiempos indicados anteriormente, para ser posteriormente lavadas 3 veces con buffer de fosfatos. La radioactividad fué determinada utilizando un contador beta de centelleo líquido marca Packard (Meriden, CT).

#### **Retención Celular de los L-Bcl-2 As.**

Células K562 cells (250,000 por pozo) fueron distribuidas en una placa de cultivo de 24 pozos conteniendo 0.3 ml de medio/pozo. Dos horas después fueron añadidos 12  $\mu\text{M}$  de oligos marcados con [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]ATP, tanto del oligo de 20 bases como el de 7 bases (secuencia G). Después de 12 horas de incubación las células fueron lavadas tres veces con buffer de fosfatos, antes de ser resuspendidas en medio libre de oligos, por 0 a 48 h. Al final de estos intervalos de tiempo las células fueron lavadas tres veces con una solución de buffer de fosfatos y posteriormente fué determinada su radioactividad.

## **Western Blot para las Proteínas Bcl-2 y Bax.**

Doscientas mil células/pozo fueron distribuidas en una placa de cultivo de 6 pozos, conteniendo 3 ml de medio. Posteriormente fueron incubadas con 8 y 10  $\mu\text{M}$  de L-Bcl-2 As de 20 bases y de 7 bases de longitud (secuencia G) a 37°C. Las células sin tratamiento fueron también mantenidas en medio de cultivo. Las células fueron removidas al tercer día y lisadas en 40  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis (1% Triton, 150 mM NaCl, 25 mM Tris, pH 7.4) manteniéndolas en baño de hielo por 30 min., después se centrifugaron a 12,000g por 10 min; los sobrenadantes fueron recuperados y se determinó el contenido de proteínas totales. Los lisados fueron entonces mezclados con un buffer de muestra conteniendo 1% de SDS y 1%  $\beta$ -mercaptoetanol, y llevados a ebullición por 5 min. Se realizó una electroforesis en geles al 12% de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio, utilizando 10 microgramos de cada uno de los lisados celulares. Posteriormente se electro-transferieron a una membrana de nitrocelulosa y fueron bloqueados con una solución al 5% de leche deshidratada sin grasa. Las membranas fueron incubadas entonces con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-humano para Bcl-2 o con un anticuerpo policlonal de conejo anti-humano para Bax (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA) a 4°C por toda la noche. Después de lavarse e incubarse con el respectivo anticuerpo secundario, ya sea anti-ratón o anti-conejo (Amersham Life Sciences, Cleveland, OH), las membranas fueron reveladas usando un sistema de incremento en la quimioluminiscencia (Amersham). Un análisis densitométrico fue llevado a cabo a partir de esos resultados en los Western Blots, utilizando el sistema AlphaImager™ 2000 (Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA). Después de la visualización de las proteínas Bcl-2 y Bax, la membrana fue nuevamente incubada con el

anticuerpo monoclonal anti-Actina (Sigma, St. Louis, MO) para asegurar que las diferencias observadas en la expresión de las proteínas no eran debidas a una carga desigual de las muestras en los diferentes pozos.



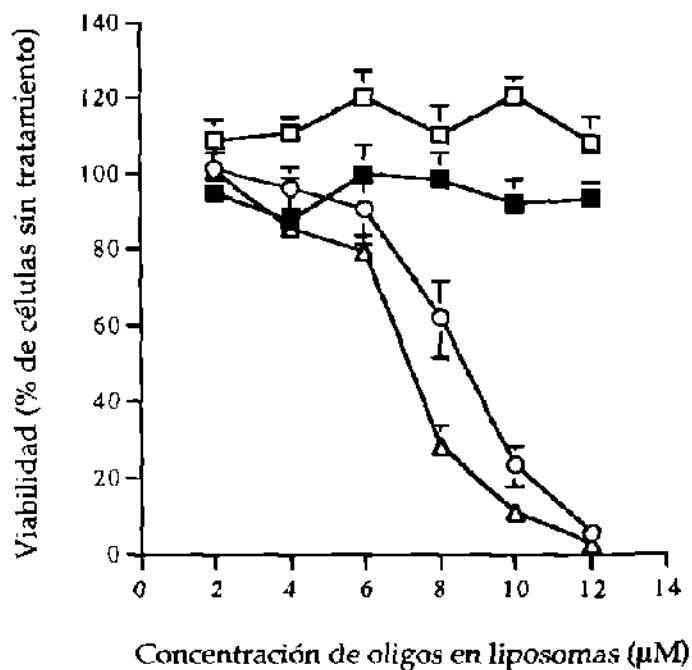
## **RESULTADOS**

### **Efecto de la Longitud de los Oligos en el Crecimiento de una Línea Celular Transformada de LF.**

Cuatro oligos de diferentes longitudes (15, 11, 9 y 7 bases) fueron incorporados en liposomas para observar su efecto en la inhibición del crecimiento en células CJ. Las concentraciones de los L-Bcl-2 As fueron de 2-12  $\mu\text{M}$ . La máxima inhibición fue observada en las células CJ cuando se utilizó una concentración de oligos de 12  $\mu\text{M}$  (Figura 3.1); es base a esto, el resto de las secuencias cortas fueron también adicionadas a las células CJ a una concentración de 12  $\mu\text{M}$  (Tabla 3.1). Con todos los oligos probados se observó inhibición del crecimiento celular.

### **Análisis Estadístico.**

Considerando que los datos tienen una distribución normal fue utilizado el análisis ANOVA para determinar si existen diferencias entre las secuencias utilizadas. Este análisis mostró que existe una diferencia en la media general de los datos ( $F = 7.426$ ,  $P < 0.01$ ). Posteriormente se compararon las varianzas entre los grupos usando la prueba de Levene (dentro del análisis del ANOVA). El resultado obtenido mostró que las varianzas entre los grupos fueron homogéneas ( $L = 0.610$ ,  $P = 0.747$ ) (Tabla 3.2). Posteriormente se confirmó el resultado utilizando la prueba de contrastes múltiples de Scheffe (Zar, 1999) la cual mostró que la homogeneidad observada entre la media de los grupos no estaba relacionada con la longitud del oligo.



**FIGURA 3.1 L-Bcl-2 As inducen inhibición del crecimiento en células CJ.** 30000 células/pozo fueron distribuidas en una placa de 96 pozos, con 0.1 ml de medio y fueron incubadas con 2-12 µM de L-Bcl-2 As, liposomas vacíos o con L-Bcl-2 control por 5 días. La viabilidad de las células fue determinada por un ensayo no radioactivo de proliferación celular, Celltiter 96® Aqueous, como se describe en el texto. ■, oligo control; □, liposomas vacíos; ○, oligo de 20 bases; Δ, oligo de 7 bases.

**TABLA 3.1**

**Efecto de la longitud de los oligos en el crecimiento de una línea celular de LF<sup>a</sup>**

Secuencia	A	B	C	D	E	F	G	H
	Tamaño del Oligo (No. de bases) <sup>a</sup>							
Exp. No.	15		11		9		7	
	% de Viabilidad ( $\pm$ DS) <sup>b</sup>							
1	16 (3)	1 (0)	28 (2)	4 (0)	26 (1)	33 (8)	0 (0)	51 (2)
2	25 (4)	11 (4)	39 (10)	10 (0)	54 (13)	63 (8)	48 (3)	50 (2)
3	54 (5)	41 (4)	43 (11)	35 (6)	23 (8)	38 (4)	53 (13)	69 (13)
4	0 (7)	32 (4)	55 (9)	28 (2)	58 (13)	68 (11)	59 (6)	81 (12)
5	1 (0)	41 (9)	3 (0)	50 (9)	73 (9)	30 (7)	62 (9)	23 (1)
6	2 (0)	1 (0)	0 (0)	2 (0)	3 (0)	4 (0)	18 (1)	46 (3)
7	0 (0)	0 (0)	ND <sup>c</sup>	0 (0)	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Todos los L-Bcl-2 As de diferentes tamaños inhibieron el crecimiento celular de las células CI. 30,000 células CI/pozo fueron incubadas con 12  $\mu$ M de L-Bcl-2 As por 5 días.

<sup>b</sup>El crecimiento celular fue medido utilizando el ensayo no radioactivo de proliferación celular Celltiter 96<sup>®</sup>Aqueous.

<sup>c</sup>No determinado.

**TABLA 3.2****Estadística descriptiva de la viabilidad celular para oligos de diferentes longitudes****12  $\mu$ M de L-Bcl-2 As**

<i>Secuencia</i>	<i>Número de Experimentos</i>	<i>Media de la D. O.*</i>	<i>Desviación Estandar</i>	<i>Mínima D. O.</i>	<i>Máxima D. O.</i>
A	21	0.1316	0.1715	0.0050	0.6040
B	21	0.1840	0.1849	0.0040	0.5280
C	18	0.2928	0.2331	0.0030	0.8140
D	21	0.2296	0.2392	0.0190	0.9100
E	18	0.4696	0.2179	0.2220	0.8430
F	18	0.3879	0.2441	0.0260	0.6860
G	18	0.4338	0.2522	0.0050	0.9320
H	18	0.4967	0.2351	0.2050	0.9510

\*El ANOVA mostró una diferencia significativa entre las medias de los 8 tratamientos (F=7.426,P<0.01)

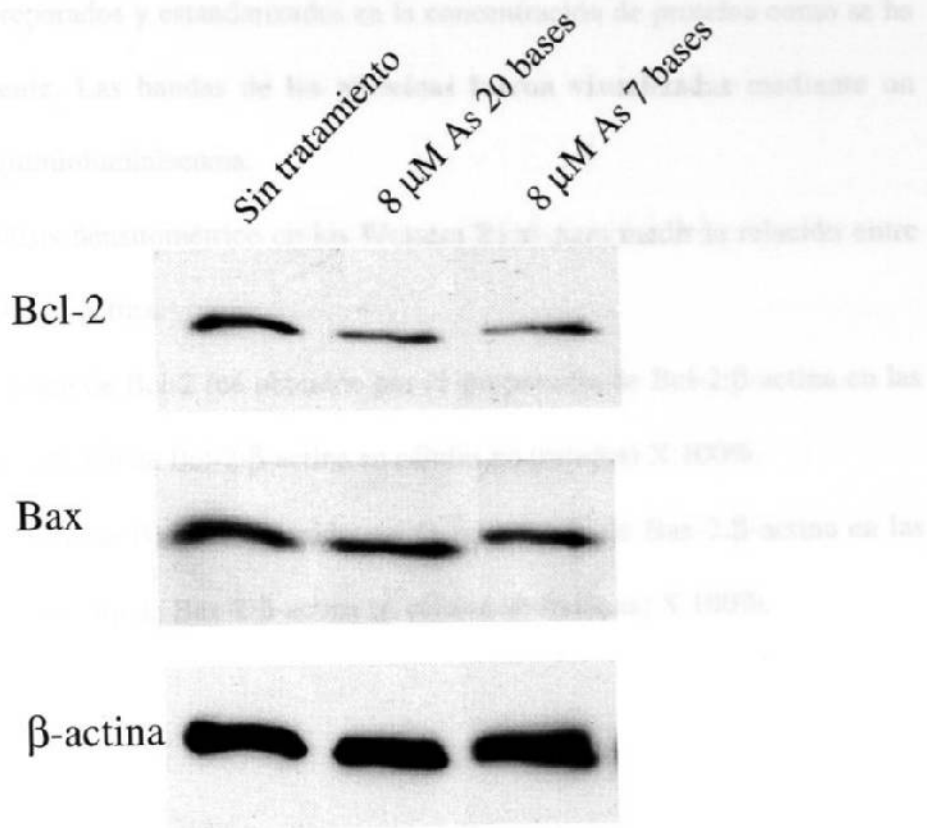
### **Inhibición de la Expresión de la Proteína Bcl-2 Utilizando L-Bcl-2 As.**

El efecto en la expresión de la proteína de Bcl-2 en células *CJ* fué determinado utilizando dos diferentes tamaños de oligos: 20 y 7 bases (secuencia G) mediante la técnica de Western Blot. Cuando las células fueron tratadas con 8  $\mu$ M de L-Bcl-2 As tanto de 20 como 7 bases, disminuyeron los niveles en la expresión de la proteína Bcl-2 (Figura 3.2). Mediante un registro densitométrico se analizó la relación de Bcl-2 con la proteína Actina, observándose una inhibición en los niveles de la proteína Bcl-2 hasta de aproximadamente 60% con los L-Bcl-2 As de 20 bases y 66% con el de 7 bases. Se observó una disminución mayor en la expresión de la proteína Bax cuando se utilizó el oligo de 7 bases, en comparación con el de 20 bases. El análisis densitométrico reveló una disminución en la expresión de Bax en un 13% con el L-Bcl-2 As de 20 bases, y un 33% con el de 7 bases.

### **Captación Celular de L-Bcl-2 As.**

En esta sección estudiamos la captación celular de los *P-etoxy oligos encapsulados* en liposomas, tanto de 20 bases como el de 7 bases (secuencia G). La cinética de estos oligos mostró que la máxima captación celular fué aproximadamente a las 10 h de incubación (los datos no son mostrados aquí). A partir de estos datos decidimos estudiar la captación de oligos a diferentes dosis con un período de incubación de 10 h. Se utilizaron concentraciones de 2 to 12  $\mu$ M de oligos marcados con [<sup>32</sup>P]ATP, observándose un incremento en la radioactividad asociada a las células, en el rango de 2-10  $\mu$ M. (Figura 3.3). La captación celular de los oligos se incrementó proporcionalmente con la cantidad de oligos adicionada, registrándose la máxima captación con una

FIGURA 3.2. Western Blot de las proteínas Bcl-2 y Bax. Las células CT Hs5787 incubadas con los L-Bcl-2 As de 20 y 7 bases de longitud por 3 días. Los lisados celulares fueron preparados y estandarizados en la concentración de proteínas como se ha descrito anteriormente. Las bandas de las proteínas Bcl-2 y Bax se visualizaron mediante un anticuerpo anti-Bcl-2/anti-Bax.



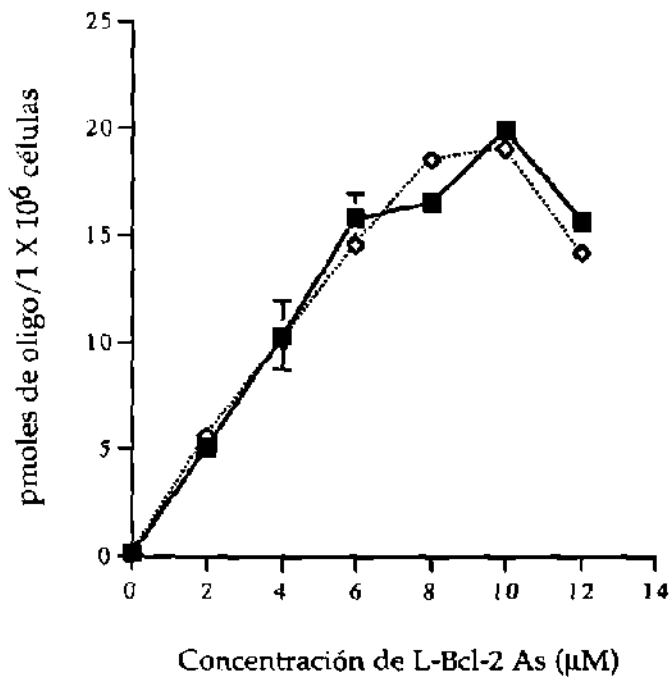
Tratamiento	Ninguno	20 bases	7 bases
Relación de Bcl-2:β-actina <sup>a</sup>	0.4239	0.1716	0.1433
% de inhibición de Bcl-2 <sup>b</sup>	--	60	66
Relación de Bcl-2:β-actina <sup>a</sup>	0.4807	0.4172	0.3212
% de inhibición de Bax <sup>c</sup>	--	13	33

**FIGURA 3.2. Western Blot de las proteínas Bcl-2 y Bax.** Las células CJ fueron incubadas con los L-Bcl-2 As de 20 y 7 bases de longitud por 3 días. Los lisados celulares fueron preparados y estandarizados en la concentración de proteína como se ha descrito previamente. Las bandas de las proteínas fueron visualizadas mediante un incremento en la quimioluminiscencia.

<sup>a</sup>Se realizó un análisis densitométrico en los Western Blots para medir la relación entre Bcl-2/ $\beta$ -actina y Bax/ $\beta$ -actina.

<sup>b</sup>El grado de inhibición de Bcl-2 fue obtenido por  $(1 - \text{proporción de Bcl-2}:\beta\text{-actina en las células tratadas} / \text{proporción de Bcl-2}:\beta\text{-actina en células no tratadas}) \times 100\%$ .

<sup>c</sup>El grado de inhibición de Bax fue obtenido por  $(1 - \text{proporción de Bax-2}:\beta\text{-actina en las células tratadas} / \text{proporción de Bax-2}:\beta\text{-actina en células no tratadas}) \times 100\%$ .



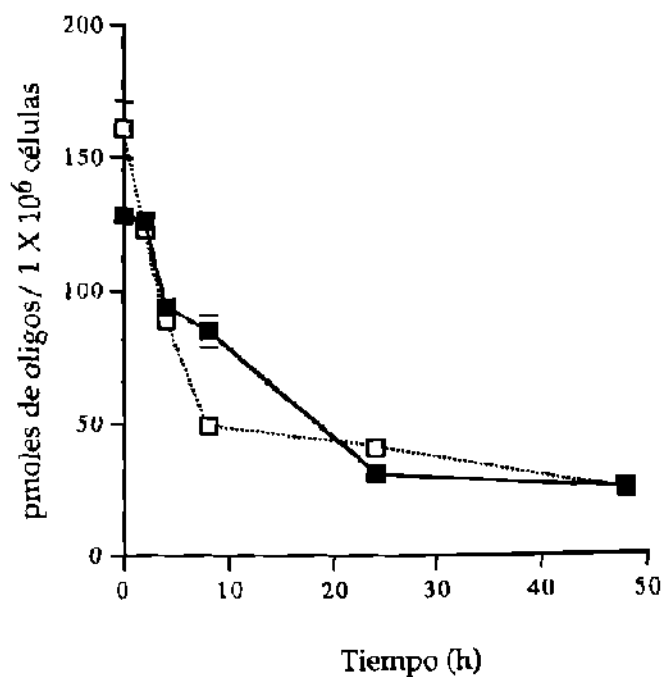
**FIGURA 3.3. Captación de L-Bcl-2 As radioactivos por células K562.** 250,000 células K562/pozo fueron distribuidas en una placa de 24 pozos con 0.3 ml de medio e incubadas con 0-12 µM de L-Bcl-2 As marcados con [<sup>32</sup>P] ATP, por un periodo de 10 h. ■, oligo de 20 bases; □, oligo de 7 bases.



concentración de 10  $\mu\text{M}$ . Aproximadamente 180 a 200 pmol de oligos por cada  $1 \times 10^6$  células fueron captados después de 10 h de incubación.

### **Retención Celular de los L-Bcl-2 As.**

Siguiendo con los análisis de captación de oligos, se estudió la retención intracelular de los L-Bcl-2 As, tanto de 20 como de 7 bases de longitud (Figura 3.4). Se incubaron las células con los oligos marcados con [ $^{32}\text{P}$ ]ATP durante 12 h, se lavaron y posteriormente fueron incubadas por 48 h en medio libre de oligos. Dentro de un período de 8 h de incubación, se encontró que la radioactividad asociada con las células disminuyó en aproximadamente 50% al utilizar el oligo de 7 bases, mientras que para el oligo de 20 bases se requirió un período de aproximadamente 16 h para observar una disminución del 50% en la radioactividad asociada a los oligos. La incubación se prolongó hasta un período de 48 h pero no se observó disminución en los niveles de radioactividad para ninguno de los dos oligos probados.



**FIGURA 3.4. Retención de L-Bcl-2 As por células K562.** Las células K562 fueron incubadas con 12  $\mu$ M de L-Bcl-2 As marcados con [ $^{32}$ P] ATP por 10 h, posteriormente fueron lavadas e incubadas en medio fresco por un período de 0-48 h. ■, oligo de 20 bases; □, oligo de 7 bases.

## DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que los L-Bcl-2 As oligos utilizados aquí, que oscilan entre 7 y 20 bases de longitud pueden inhibir específicamente el crecimiento de células de LF que portan la translocación t(14;18) y sobre-expresan la proteína Bcl-2. Se observó también que no existe diferencia significativa en la captación celular y la retención de los dos oligos analizados, tanto de 20 como de 7 bases de longitud.

Hemos llevado a cabo experimentos *in vitro* en células de LF utilizando cinco diferentes longitudes de P-etoxy oligos: 7, 9, 11, 15 y 20 bases de longitud. Cuando utilizamos una concentración de 12  $\mu$ M de L-Bcl-2 As, en las células CJ observamos una inhibición en el crecimiento con todos los diferentes oligos, incluyendo el de 7 bases de longitud (Tabla 3.1). Fué en base a estos resultados que decidimos comparar la secuencia del oligo más corto, el de 7 bases (secuencia G) con el oligo de mayor longitud (20 bases). Se obtuvo aproximadamente un 90% de inhibición en el crecimiento con 12  $\mu$ M de oligos, tanto de 20 como de 7 bases (Figura 3.1). Sin embargo, ninguno de los dos oligos indujo inhibición del crecimiento (<10%) en la línea celular utilizada como control. Estos resultados sugieren que ambos oligos antisentido son específicos para células que contienen la translocación y un alto nivel de expresión de Bcl-2.

Los análisis estadísticos realizados muestran que las diferencias observadas en la inhibición del crecimiento entre los grupos no estaban relacionadas con la longitud de los oligos. Confirmamos posteriormente que los efectos en la inhibición del crecimiento estaban relacionados con la inhibición de la proteína Bcl-2 (Figura 3.2). El análisis de Western Blot mostró que un 60% de la inhibición en la proteína Bcl-2 fué observado con

el oligo de 20 bases y un 66% con el de 7 bases, lo cual implica que la actividad inhibitoria de Bcl-2 se mantuvo aún con la secuencia más corta de los oligos antisentido. La captación celular de las diferentes concentraciones de oligos han demostrado que para ambas secuencias la máxima captación fué de 80-200 pmol de oligos/1 X 10<sup>6</sup> células, después de 10 h de incubación (Figura 3.3). Estos resultados son similares a los que fueron obtenidos por Tari et al. (Tari et al., 1996), quienes observaron que la captación máxima de oligos fué de 190 pmol de oligos/1 X 10<sup>6</sup> células, utilizando metilfosfonato oligos encapsulados en liposomas, con un período de incubación de 8 h. El patrón de captación de los oligos en este estudio es diferente del que fué reportado previamente por Krieg et al. (Krieg et al., 1991); en el cual encuentran que la captación de los oligos se incremento más de 10 veces en un cultivo de células de bazo de ratón, después de 48 h de incubación. Utilizando un sistema diferente, White et al. encontraron que la máxima captación de oligos en un cultivo de queratinocitos fué a las 24 h (White et al., 1999). Nosotros observamos que la máxima captación para ambas secuencias, tanto la de 7 como la de 20 bases, fué a las 10 h de incubación. Nosotros creemos que las características de captación para ambas secuencias son muy similares debido a que ambas están encapsuladas en el mismo tipo de liposomas; por lo tanto es posible que el liposoma sea el que determine el mecanismo de captación de los oligos. Nuestros resultados también muestran que la retención de los oligos no es dependiente de la longitud de los mismos. Dado que la inhibición de las proteínas es muy similar entre la secuencia de 7 bases y la de 20 bases, ésto nos sugiere que ambos oligos se unen al mRNA con una afinidad similar. En base a la unión al mRNA, cantidades similares de oligos pueden ser mantenidas dentro de las células, permitiendo un retención similar de los diferentes

oligos. En el presente estudio, aún después de un período de incubación de 48 h, el 30% de los oligos tanto de 20 como de 7 bases de longitud fueron retenidos dentro de las células. (Figura 3.4). La siguiente fase de estudio de este trabajo será determinar la actividad antitumoral de estos diferentes L-Bcl-2 As en modelos animales experimentales portadores de tumores causados por LF.

## CONCLUSIONES

- ◆ Nuestros resultados indican que tanto las secuencias de 7 bases como la de 20 bases de longitud pueden inhibir específicamente la expresión de la proteína Bcl-2.
- ◆ Ambas secuencias presentan un patrón farmacológico muy similar.
- ◆ Ninguno de los oligos induce inhibición del crecimiento en una línea celular utilizada como control y que es negativa para la translocación t(14;18).

## **CAPITULO IV**

# **EFFECTO DE P-ETOXY OLIGONUCLEOTIDOS ANTISENTIDO INCORPORADOS EN LIPOSOMAS DIRIGIDOS HACIA BCL-2 EN MODELOS ANIMALES**

## RESUMEN

La translocación t(14;18) se encuentra en la mayoría de de los LF y en algunos linfomas de células B. Esta translocación da como resultado la regulación del gene *bcl-2* y juega un papel muy importante en la oncogénesis. Nosotros hemos demostrado previamente que los liposomas pueden incrementar la captación intracelular de los P-etoxy oligos, los cuales son análogos hidrofóbicos de fosfodiesteres, y que los L-Bcl-2 As pueden inhibir selectivamente la producción de Bcl-2, induciendo inhibición del crecimiento en líneas celulares de LF. Nosotros estudiamos si los L-Bcl-2 As pueden inhibir el crecimiento de LF humano implantado de ratones desnudos y ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID). Una vez establecido el modelo del linfoma, los ratones fueron tratados con los L-Bcl-2 As, así como también con los controles de mezcla de bases (Bcl-2 control), y liposomas vacíos. Los ratones desnudos fueron sacrificados el día 78, encontrándose el desarrollo de tumores en los controles, sin embargo, esto no ocurrió en los ratones tratados con los L-Bcl-2 As. En el modelo de los ratones SCID, a las seis semanas de tratamiento, el peso corporal de los ratones sin tratamiento fué muy similar a los ratones tratados con liposomas vacíos o con L-Bcl-2 control. Estos resultados demuestran el modelo del LF portador de la translocación t(14;18) y la capacidad de modificar el proceso del desarrollo del linfoma con el uso de oligos antisentido dirigidos al gene *bcl-2*. La reducción de los niveles de la proteína Bcl-2 suprime el potencial oncogénico de estas células de linfoma, las cuales juegan un papel esencial en el desarrollo de la enfermedad.



## INTRODUCCION

El LF es una de las patologías más comunes de las células B (Ersboll et al., 1989). Aunque la respuesta a la quimioterapia es buena, las recaídas son inevitables, presentándose una transformación a un tipo histológico más agresivo y una tendencia a la resistencia a drogas (Cullen et al., 1979) (Risdall et al., 1979) (Garvin et al., 1983). La translocación cromosómica t(14;18) es altamente específica para los LF y las yuxtaposiciones del gene *bcl-2* uniéndose a la cadena pesada de la inmunoglobulina (IgH) (Bakhshi et al., 1985) (Weiss et al., 1987). Estos re-areglos resultan en la desregulación y sobreproducción del gene *bcl-2* (Cleary et al., 1986), el cual se sabe bloquea la vía de la apoptosis (Hockenbery et al., 1990). Es bien sabido que la reducción en la expresión del gene *bcl-2* representa un blanco de acción para las estrategias terapéuticas. Hasta la fecha se ha desarrollado una terapia satisfactoria en el tratamiento de LF, siendo necesario el establecimiento de modelos animales para estudiar la historia natural de la enfermedad y para monitorear la terapia de intervención. Para este propósito hemos utilizado un modelo de ratones desnudos y SCID, con la finalidad de establecer un modelo *in vivo* para el LF portador de la translocación t(14;18).

Hemos demostrado previamente que los liposomas pueden incrementar la captación intracelular de los P-etoxy oligos, un análogo hidrofóbico de los fosfodiésteres, y que los L-Bcl-2 As de 20 bases de longitud puede inhibir selectivamente la producción de la proteína Bcl-2, induciendo inhibición del crecimiento en líneas celulares de LF (Tormo et al., 1998) (Fari et al., 1994). Similarmente, una secuencia más corta del antisentido (7

bases de longitud) pudo también inhibir específicamente la expresión de la proteína Bcl-2 y el crecimiento celular del LF (manuscrito en revisión).

Las pruebas *in vitro* de la terapia anti-linfoma ha tenido considerables limitaciones, y ha sido esencial el establecimiento de modelos *in vivo* de la enfermedad para evaluar radicalmente los avances en la terapia, antes de aplicarse a nivel clínico. Los ratones desnudos y, más recientemente los ratones SCID han permitido tener un modelo *in vivo* de un amplio rango de enfermedades hematológicas. Estos modelos fueron seleccionados para establecer un patrón del linfoma de células B debido a que estos ratones pueden portar los trasplantes de leucemias linfocíticas agudas (también de la línea de células B) ya que proporcionan una distribución en los órganos muy similar a las leucemias en humanos (Kamel-Reid et al., 1991) (McCune et al., 1988). En este estudio determinamos si los L-Bcl-2 As pueden inhibir el crecimiento celular de linfomas foliculares humanos transplantados en ratones desnudos y SCID.

## MATERIALES Y METODOS

P-etoxy-oligos, los cuales son análogos no iónicos de fosfodiésteres resistentes a nucleasas, fueron comprados de la compañía Oligos Etc. (Wilsonville, OR).

### Secuencia de los P-etoxy oligos.

Fué utilizado un P-etoxy oligo específico para el sitio de iniciación de la traducción (codones -2 al +4) del mRNA humano para Bcl-2, el cual fué incorporado en liposomas (Tormo et al., 1998) (Gutiérrez-Pucnte et al., 1999). De acuerdo a las indicaciones del fabricante, la pureza de los P-etoxy oligos fué estimada en  $\geq 90\%$  utilizando HPLC.

Antisentido	Tamaño	Secuencia
Bcl-2 Antisentido	20 bases	5'CAGCGTGCGCCATCCTTCCC3'
Control de mezcla de bases	20 bases	5'TCGCCACTCGATCCTGCCCCG3'

### Líneas Celulares

Fué utilizada una línea celular de LF, CJ, la cual porta la translocación t(14;18) y sobre-expresa la proteína Bcl-2. Estas células fueron aisladas de un paciente con LF por el Dr. Richard J. Ford, Jr. (The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Depto. De Patología Molecular).

## **Preparación de Liposomas**

Los L-Bcl-2 As fueron preparados como se describió previamente (Tormo et al., 1998) (Gutiérrez-Puente et al., 1999) mezclando los P-etoxy oligos antisentido con 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina en presencia de tert-butanol. La mezcla fué sometida a agitación en un vortex y congelada en un baño de acetona y CO<sub>2</sub> sólido, para ser liofilizada. La muestra liofilizada fué posteriormente hidratada con solución salina al 0.9%. Nosotros determinamos previamente que la eficacia de la incorporación de los P-etoxy oligos en los liposomas fué de  $\geq 95\%$  ((Tari and Lopez-Berestein, 1997)).

## **Evaluación de los efectos inhibitorios de L-Bcl-2 *in vivo***

### **Modelo 1: Ratones desnudos**

Treinta ratones desnudos (nu/nu) de una edad aproximada de 5-6 semanas, fueron inyectados i.p. con  $3 \times 10^6$  CJ células. Fueron usados tres grupos de 10 ratones cada uno: ratones sin tratamiento (grupo I), ratones tratados con L-Bcl-2 As (grupo II) y ratones tratados con L-Bcl-2 control (L-Bcl-2 control) (grupo III). Una semana después de la implantación del tumor los ratones de los grupos II y III recibieron una dosis i.v. dos veces por semana, de L-Bcl-2 As oligos, o L-Bcl-2 control respectivamente. La dosis de los oligos fué de 15 mg/kg de peso corporal. Los ratones que presentaban un estado moribundo (lo cual se define como un tamaño de tumor que exceda los 1.5 cm<sup>3</sup>). El experimento fué concluído en el día 78, en el cual todos los ratones fueron sacrificados mediante sobredosis de CO<sub>2</sub> gaseoso.

## **Modelo 2: ratones SCID**

Veinticinco ratones SCID, de una edad promedio de 5-6 semanas fueron inyectados i.v. con  $20 \times 10^6$  células CJ cada uno. La dosis de oligo utilizada fué de 10 o 20 mg de oligo/kg de peso corporal. Cinco grupos de 5 ratones cada uno fueron clasificados como sigue: ratones sin tratamiento (Grupo I), tratados con liposomas vacíos a una dosis de 20 mg (Grupo II), con L-Bcl-2 As 10 mg (Grupo III), con L-Bcl-2 As 20 mg (Grupo IV) y ratones tratados con L-Bcl-2 control 20 mg (Grupo V). Una semana posterior a la implantación del tumor, los ratones fueron inyectados dos veces por semana con el tratamiento respectivo. El experimento fué concluído durante la sexta semana cuando todos los ratones fueron sacrificados mediante la inhalación de  $\text{CO}_2$ .

## **Histopatología.**

Corazón, pulmones, bazo, riñones, intestinos, hígado y médula osea fueron fijados por inmersión en una solución buffer de formalina al 10%. Los tejidos fueron embebidos en bloques de parafina a partir de los cuales se cortaron secciones de 2 a 4  $\mu\text{m}$ , los cuales fueron teñidos con la técnica de hematoxilina y eosina.

## **RESULTADOS**

### **Modelo 1: Ratones desnudos**

#### **Sobrevivencia:**

En el día 78, 6 ratones de los grupos I y III presentaban un estado moribundo por lo cual fueron sacrificados, a diferencia de los ratones del grupo II en el que solo 3 ratones estaban afectados.

#### **Histopatología:**

Las observaciones patológicas más comunes fueron hiperplasia linfoide y/o linfoma. La segunda característica patológica más común fué la invasión de tumor en el bazo y ocasionalmente algunos ratones desarrollaron también tumores en riñones, páncreas, pulmón, peritoneo y médula ósea.

**TABLA 4.1.****Efectos histopatológicos de los oligos en ratones desnudos**

Observaciones	Ratones sin tratamiento <sup>a</sup>	L-Bcl-2 As <sup>b</sup>	L-Bcl-2 control <sup>c</sup>
Ratones que presentan lesiones, hiperplasia y/o tumor en los órganos examinados	9/10	6/9	7/8
Ratones que no presentan lesiones aparentes y/o tumor en los órganos examinados	1/10	3/9	1/8
Ratones que presentan tumor en el bazo	7/10	2/9	7/8
Ratones que no presentan tumor aparente en el bazo	3/10	7/9	1/8

<sup>a</sup> Número total de ratones (tejidos) analizados=10

<sup>b</sup> Número total de ratones (tejidos) analizados =9

<sup>c</sup> Número total de ratones (tejidos) analizados =8

## **Modelo 2: ratones SCID**

### **Sobrevivencia:**

Los ratones fueron sacrificados después de recibir 12 inyecciones del tratamiento correspondiente. Los ratones fueron sacrificados debido a que el grupo sin tratamiento (grupo I) y los tratados con liposomas vacíos (grupo II), así como los del grupo tratado con L-Bcl-2 control (grupo V) presentaban un estado moribundo, con pérdida dramática de peso (Tabla 4.2) y pérdida de la coordinación motora, así como incapacidad para comer o beber. Sin embargo, los ratones tratados con 10 mg de L-Bc-2 As (grupo III) y los tratados con 20 mg de L-Bcl-2 As (Grupo IV) mostraron un incremento en el peso corporal (Figura 4.1) y presentan una condición general saludable.



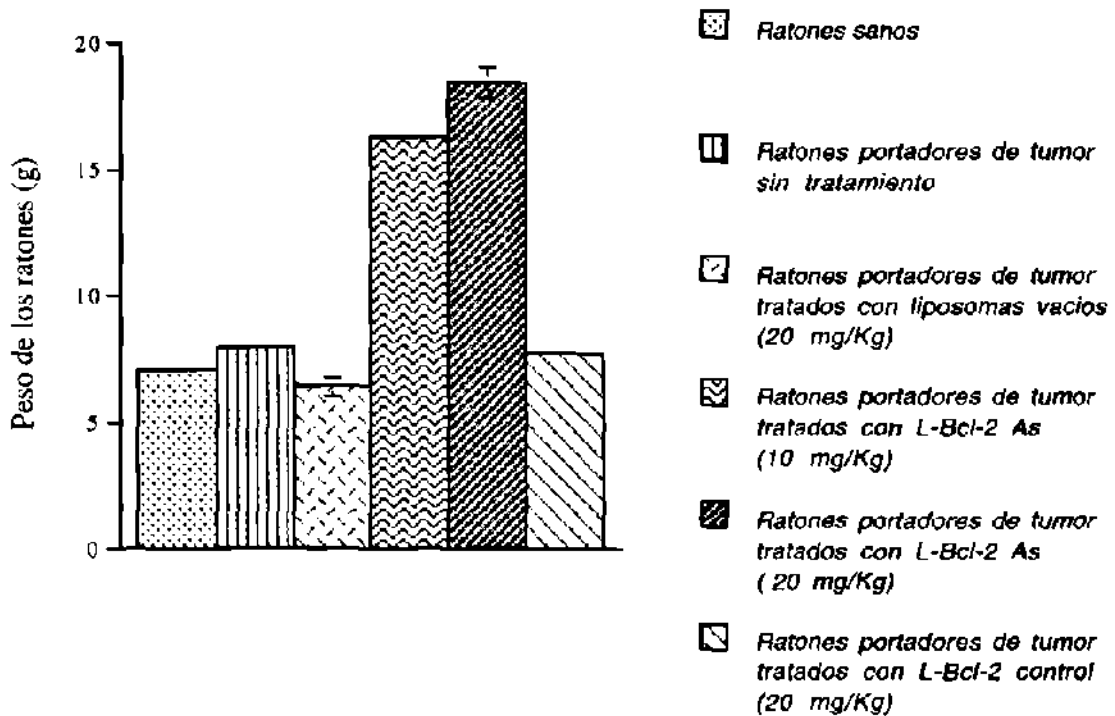
**TABLA 4.2**

**Efecto de la administración de oligos en el peso de ratones SCID a las seis semanas de tratamiento<sup>a</sup>**

Ratón	Peso del ratón (g)					
	Peso inicial	Sin tratamiento	Liposomas vacíos (20 mg)	L-Bcl-2 As (10 mg)	L-Bcl-2 As (20 mg)	L-Bcl-2 control (20 mg)
1	6.5	7.8	6	15.4	17.5	7.5
2	6.9	8.2	5.9	16.3	18.6	7.8
3	7.2	7.5	6.5	16.1	19.1	7.6
4	7.1	7.9	6.4	15.8	17.9	7.7
5	7.0	8	6.8	17.0	18.7	7.9
Media <sup>b</sup>	6.9 (0.27)	7.8 (0.26)	6.3 (0.37)	16.1 (0.6)	18.3 (0.6)	7.7 (0.16)

<sup>a</sup>La prueba de t ( $P < 0.01$ ) mostró diferencias significativas entre los grupos tratados con L-Bcl-2 As y los grupos sin tratamiento, tratados con liposomas vacíos o los tratados con L-Bcl-2 control.

<sup>b</sup>Todos los valores fueron expresados como la media (SD).



**FIGURA 4.1. Efecto de la administración i.v. de L-Bcl-2 As, L-Bcl-2 control y liposomas vacíos en ratones SCID.**

## DISCUSION

Hemos demostrado previamente que los L-Bcl-2 As pueden regular la expresión de la proteína Bcl-2 en cultivo de tejidos (Tormo et al., 1998) (Gutiérrez-Puente et al., 1999). En este capítulo reportamos la eficacia de estas mismas moléculas antisentido encapsuladas en liposomas *in vivo*, utilizando modelos animales de ratones desnudos y SCID. Reportes previos de trabajos llevados a cabo por Cotter et al. y por de Kroon et al. han demostrado capacidad para establecer un modelo de ratones SCID utilizando un linfoma de células portadoras de la translocación t(14;18) (Cotter et al., 1994) (de Kroon et al., 1994) y la eficacia de los antisentidos dirigidos hacia el oncogene *bcl-2 in vivo* (Pocock et al., 1995).

En nuestro modelo de ratones desnudos, la regulación río abajo de la proteína Bcl-2 L-Bcl-2 As mostró casi una completa abolición del crecimiento del linfoma en bazo (Tabla 4.1), con 7/9 ratones que aparentemente no presentaron tumor en el bazo, comparados con los ratones sin tratamiento (3/10) y los ratones tratados con L-Bcl-2 control (1/8). Esto se correlaciona con nuestros resultados previos de la distribución en tejidos utilizando L-Bcl-2 As (Gutiérrez-Puente et al., 1999), donde las concentraciones más altas de L-Bcl-2 As fueron encontradas en bazo, hígado y en una menor cantidad en médula ósea, órganos que son los principales portadores de tumores en el LF.

Nosotros queremos comparar este modelo de ratones con el modelo SCID, utilizando la misma línea celular para examinar los efectos de los L-Bcl-2 As contra el crecimiento

de tumores *in vivo* utilizando el peso corporal como parámetro a medir (Figura 4.1). Después de seis semanas del comienzo del tratamiento, el peso corporal de los ratones sin tratamiento fué muy similar al del grupo tratado con liposomas vacíos o a los del grupo tratado con L-Bcl-2 control (Tabla 4.2). Sin embargo, los ratones tratados con dos diferentes dosis de L-Bcl-2 As mostraron un incremento en el peso corporal de hasta casi tres veces más. Nuestra explicación para estos hallazgos es que la regulación negativa de la expresión de Bcl-2 en una célula que es altamente dependiente de la expresión de la proteína Bcl-2 para su sobrevivencia, lleva a la misma a la muerte mediante el proceso de apoptosis. Esta hipótesis esta basada en nuestros resultados previos en los cuales L-Bcl-2 As disminuyó la expresión de Bcl-2 en un fenómeno dependiente de la dosis, y causó también inhibición del crecimiento en la línea celular CJ (Tormo et al., 1998). Además, mostramos que uno de los mecanismos por los cuales L-Bcl-2 As induce inhibición del crecimiento en estas células de LFl es mediante inducción apoptótica, dado que las células tratadas tuvieron un incremento en el índice apoptótico y en la fragmentación del DNA (Tormo et al., 1998). Por lo tanto, mediante la regulación negativa de la expresión de Bcl-2, la célula puede no ser capaz de recobrase y por consiguiente morir, previniendo de esta forma la formación de tumores.

Nuestros resultados son similares a los encontrados por Cotter et al. (Cotter et al., 1996). Ellos implantaron en ratones SCID células DoHH-2, las cuales fueron obtenidas de un paciente con linfoma de células B portadoras de la translocación t(14;18) y mostraron una eliminación casi completa del linfoma, en un 83% de los ratones tratados con el antisentido para Bcl-2 G3139. Sin embargo, ellos necesitaron

pre-tratar las células del LF con oligos antisentido para Bcl-2 antes de inocularlas en los ratones SCID. En nuestro caso, nuestros resultados sugieren una aplicación alternativa para el tratamiento de linfomas que pudiera ser usada *in vivo* para regular río abajo la expresión de Bcl-2. Tratamientos futuros basados en los blancos moleculares de las células del linfoma y determinando la eficacia de los tratamientos en modelos animales nos dará, al menos, un conocimiento empírico del tratamiento de los linfomas en general. En conclusión, en este estudio hemos alterado la biología de las células transformadas del linfoma, utilizando oligos antisentido para Bcl-2, lo cual demostró que alterar la expresión de Bcl-2 ofrece un posible blanco en el tratamiento terapéutico de los LF.

## **CONCLUSIONES**

- ◆ Los oligos antisentido dirigidos hacia Bcl-2 mostraron actividad antitumoral en los modelos de LF utilizando ratones desnudos y ratones SCID.
- ◆ Alterar la expresión de Bcl-2 es una alternativa en el tratamiento terapéutico de los LF

## REFERENCIAS

Abra, R. M., and Hunt, C. A. (1981). Liposome disposition *in vivo*. III. Dose and vesicle-size effects. *Biochimica et Biophysica Acta* 666, 493-503.

Adams, J. M., and Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-6.

Agrawal, S. (1996). Antisense oligonucleotides: towards clinical trials. *Trends in Biotechnology* 14, 376-87.

Agrawal, S., Zhang, X., Lu, Z., Zhao, H., Tamburin, J., Yan, J., Cai, H., Diasio, R., Habus, I., and Z, J. (1995). Absorption, tissue distribution and *in vivo* stability in rats of a hybrid antisense oligonucleotide following oral administration. *Biochemical Pharmacology* 50, 571-6.

Agrawal, S., Zhao, Q., Jiang, Z., Oliver, C., Giles, H., and Heath, J. (1997). Toxicologic effects of an oligodeoxynucleotide phosphorothioate and its analogs following intravenous administration in rats. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* 7, 575-84.

Alama, A., Barbieri, F., Cagnoli, M., and Schettini, G. (1997). Antisense oligonucleotides as therapeutic agents. *Pharmacological Research* 36, 171-8.

Allen, T. M., and Chonn, A. (1987). Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS Letters* 223, 42-6.

Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature [letter]. *Cell* 87, 171.

Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermod, J. J., Mazzei, G., Maundrell, K., Gambale, F., Sadoul, R., and Martinou, J. C. (1997). Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 277, 370-2.

Antonsson, B., Conti, F., and Ciavatte, A. (1997). Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 277, 370-372.

Arends, M. J., and Wyllie, A. H. (1991). Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *International Review of Experimental Pathology* 32, 223-54.

Bakhshi, A., Jensen, J. P., Goldman, P., Wright, J. J., McBride, O. W., Epstein, A. L., and Korsmeyer, S. J. (1985). Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 41, 899-906.

Bangham, A. D., Standish, M. M., and Watkins, J. C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology* 13, 238-52.

Basanez, G., Nechushtan, A., Drozhinin, O., Chanturiya, A., Choe, E., Tutt, S., Wood, K. A., Hsu, Y., Zimmerberg, J., and Youle, R. J. (1999). Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 5492-7.

Beham, A., Marin, M., Fernandez, A., Hermann, J., Brisbay, S., Tari, A., Lopez-Berestein, G., Lozano, G., Sarkiss, M., and McDonnell, T. (1997). Bcl-2 inhibits p53 nuclear import following DNA damage. *Oncogene* 15, 2767-2772.

Beltinger, C., Saragovi, H. U., Smith, R. M., LeSauteur, L., Shah, N., DeDionisio, L., Christensen, L., Raible, A., Jarett, L., and Gewirtz, A. M. (1995). Binding, uptake, and



intracellular trafficking of phosphorothioate-modified oligodeoxynucleotides. *Journal of Clinical Investigation* 95, 1814-23.

Bennet, J. (1845). Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took place from suppuration of the blood. *Edinb Med Surg J* 64, 413-418.

Bennett, C. (1998). Antisense oligonucleotides: is the glass half full or half empty? *Biochem. Pharmacol.* 55, 9-19.

Bennett, C. F., Chiang, M. Y., Chan, H., Shoemaker, J. E., and Mirabelli, C. K. (1992). Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Molecular Pharmacology* 41, 1023-33.

Beutner, G., Ruck, A., Riede, B., Welte, W., and Brdiczka, D. (1996). Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore. *FEBS Letters* 396, 189-95.

Blake, K. R., Murakami, A., and Miller, P. S. (1985). Inhibition of rabbit globin mRNA translation by sequence-specific oligodeoxyribonucleotides. *Biochemistry* 24, 6132-8.

Boise, L., Gonzalez-Garcia, M., and Postema, C. (1993). *bcl-x*, a *bcl-2* related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74, 597-608.

Boise, L. H., and Thompson, C. B. (1997). *Bcl-x(L)* can inhibit apoptosis in cells that have undergone Fas-induced protease activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 3759-64.

Bossy-Wetzel, E., Newmeyer, D. D., and Green, D. R. (1998). Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO Journal* 17, 37-49.

Boyd, J., Gallo, G., and Elangovan, B. (1995). Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene 11*, 1921-1928.

Bradham, C. A., Qian, T., Streetz, K., Trautwein, C., Brenner, D. A., and Lemasters, J. J. (1998). The mitochondrial permeability transition is required for tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis and cytochrome c release. *Molecular & Cellular Biology 18*, 6353-64.

Brady, H. J., and Gil-Gomez, G. (1998). Bax. The pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bax. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology 30*, 647-50.

Brunet, C. L., Gunby, R. H., Benson, R. S., Hickman, J. A., Watson, A. J., and Brady, G. (1998). Commitment to cell death measured by loss of clonogenicity is separable from the appearance of apoptotic markers. *Cell Death & Differentiation 5*, 107-15.

Bukanov, N., Demidov, V., Nielsen, P., and Frank-Kamenetskii, M. (1998). PD-Loop: a complex of duplex DNA with an oligonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95*, 5516-5520.

Burns, B. F., Colby, T. V., and Dorfman, R. F. (1984). Differential diagnostic features of nodular L & H Hodgkin's disease, including progressive transformation of germinal centers. *American Journal of Surgical Pathology 8*, 253-61.

Campbell, J. M., Bacon, T. A., and Wickstrom, E. (1990). Oligodeoxynucleoside phosphorothioate stability in subcellular extracts, culture media, sera and cerebrospinal fluid. *Journal of Biochemical & Biophysical Methods 20*, 259-67.

Carbone, A., Gloghini, A., Gattei, V., Aldinucci, D., Degan, M., De Paoli, P., Zagonel, V., and Pinto, A. (1995). Expression of functional CD40 antigen on Reed-Sternberg cells and Hodgkin's disease cell lines. *Blood 85*, 780-9.

Cazenave, C., Loreau, N., Thuong, N. T., Toulme, J. J., and Helene, C. (1987). Enzymatic amplification of translation inhibition of rabbit beta-globin mRNA mediated by anti-messenger oligodeoxynucleotides covalently linked to intercalating agents. *Nucleic Acids Research* 15, 4717-36.

Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Lane, B. R., and Dixit, V. M. (1997). Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death [see comments]. *Science* 275, 1122-6.

Chittenden, T., Flemington, C., Houghton, A. B., Ebb, R. G., Gallo, G. J., Elangovan, B., Chinnadurai, G., and Lutz, R. J. (1995). A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO Journal* 14, 5589-96.

Chittenden, T., Harrington, E., and O'Connor, R. (1995). Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374, 733-736.

Choi, S., Park, I., Yun, J., Sung, Y., Hong, S., and Shin, H. (1995). A novel bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow. *Oncogene* 11, 1693-1698.

Citro, G., Perrotti, D., Cucco, C., D'Agnano, I., Sacchi, A., Zupi, G., and Calabretta, B. (1992). Inhibition of leukemia cell proliferation by receptor-mediated uptake of c-myc antisense oligodeoxynucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 7031-5.

Cleary, M. L., Smith, S. D., and Sklar, J. (1986). Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* 47, 19-28.

Cory, S. (1995). Regulation of lymphocyte survival by the Bcl-2 gene family. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 513-43.

Cosulich, S. C., Savory, P. J., and Clarke, P. R. (1999). Bcl-2 regulates amplification of caspase activation by cytochrome c. *Current Biology* 9, 147-50.

Cotter, F. (1997). Antisense therapy for lymphomas. *Hematological Oncology* 15, 3-11.

Cotter, F. E., Corbo, M., and Raynaud, F. (1996). Bcl-2 antisense therapy in lymphoma: *in vitro* and *in vivo* mechanisms, efficacy, pharmacokinetics and toxicity studies. *Annals of Oncology* 7, 32.

Cotter, F. E., Johnson, P., Hall, P., Pocock, C., al Mahdi, N., Cowell, J. K., and Morgan, G. (1994). Antisense oligonucleotides suppress B-cell lymphoma growth in a SCID-hu mouse model. *Oncogene* 9, 3049-55.

Cramer, W. A., Zhang, Y. L., Schendel, S., Merrill, A. R., Song, H. Y., Stauffacher, C. V., and Cohen, F. S. (1992). Dynamic properties of the colicin E1 ion channel. *FEMS Microbiology Immunology* 5, 71-81.

Crooke, R., Graham, M., Cooke, M., and Crooke, S. (1995). *In vitro* pharmacokinetics of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *J Pharmacol Exp Ther* 275, 462-473.

Crooke, R. M. (1991). *In vitro* toxicology and pharmacokinetics of antisense oligonucleotides. *Anti-Cancer Drug Design* 6, 609-46.

Cruz-Reyes, J., and Tata, J. (1995). Cloning, characterization and expression of two *Xenopus* bcl-2-like cell-survival genes. *Gene* 158, 171-179.

Cullen, M. H., Lister, T. A., Brearley, R. I., Shand, W. S., and Stansfeld, A. G. (1979). Histological transformation of non-Hodgkin's lymphoma: a prospective study. *Cancer* 44, 645-51.

Das, R., Reddy, E., Chatterjee, D., and Andrews, D. (1996). Identification of a novel Bcl-2 related gene, BRAG-1 in human glioma. *Oncogene* 12, 947-951.

de Jong, D., Prins, F., and Mason, D. (1994). Subcellular localization of the Bcl-2 protein in malignant and normal lymphoid cells. *Cancer Res* 54, 256-260.

de Kroon, J. F., Kluin, P. M., Kluin-Nelemans, H. C., Willemze, R., and Falkenburg, J. H. (1994). Homing and antigenic characterization of a human non-Hodgkin's lymphoma B cell line in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Leukemia* 8, 1385-91.

De Maria, R., Lenti, L., Malisan, F., d'Agostino, F., Tomassini, B., Zeuner, A., Rippo, M. R., and Testi, R. (1997). Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-induced apoptosis [published erratum appears in *Science* 1998 Apr 17;280(5362):363]. *Science* 277, 1652-5.

de Marie, S. (1996). Liposomal and lipid-based formulations of amphotericin B. *Leukemia* 10 Suppl 2, s93-6.

de Smidt, P., Doan, T., de Falco, S., and van Berkel, T. (1991). Association of antisense oligonucleotides with lipoproteins prolongs the plasma half-life and modifies the tissue distribution. *Nucleic Acid Research* 19, 4695-4700.

DeLong, R., Nolting, A., Fisher, M., Chen, Q., Wickstrom, E., Kligshiteyn, M., Demirdji, S., Caruthers, M., and Juliano, R. (1997). Comparative pharmacokinetics, tissue distribution, and tumor accumulation of phosphorothioate, phosphorodithioate, and methylphosphonate oligonucleotides in nude mice. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7, 71-77.

Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B., and Martinou, J. C. (1999). Bid-induced conformational

change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *Journal of Cell Biology* 144, 891-901.

Duche, D., Izard, J., and Gonzalez-Manas, J. (1996). Membrane topology of the colicin A pore-forming domain analyzed by disulfide bond engineering. *J Biol Chem* 271, 15401-15406.

Eder, P. S., DeVine, R. J., Dagle, J. M., and Walder, J. A. (1991). Substrate specificity and kinetics of degradation of antisense oligonucleotides by a 3' exonuclease in plasma. *Antisense Research & Development* 1, 141-51.

Ellis, H. M., and Horvitz, H. R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44, 817-29.

Ellis, R. E., Yuan, J. Y., and Horvitz, H. R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annual Review of Cell Biology* 7, 663-98.

Ersboll, J., Schultz, H. B., Pedersen-Bjergaard, J., and Nissen, N. I. (1989). Follicular low-grade non-Hodgkin's lymphoma: long-term outcome with or without tumor progression. *European Journal of Haematology* 42, 155-63.

Eskes, R., Antonsson, B., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Richter, C., Sadoul, R., Mazzei, G., Nichols, A., and Martinou, J. C. (1998). Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg<sup>2+</sup> ions. *Journal of Cell Biology* 143, 217-24.

Falini, B., Venturi, S., Martelli, M., Santucci, A., Pileri, S., Pescarmona, E., Giovannini, M., Mazza, P., Martelli, M. F., and Pasqualucci, L. (1995). Mediastinal large B-cell lymphoma: clinical and immunohistological findings in 18 patients treated with different third-generation regimens. *British Journal of Haematology* 89, 780-9.

Farrell, C. L., Bready, J. V., Kaufman, S. A., Qian, Y. X., and Burgess, T. L. (1995). The uptake and distribution of phosphorothioate oligonucleotides into vascular smooth muscle cells *in vitro* and in rabbit arteries. *Antisense Research & Development* 5, 175-83.

Farrow, S., White, J., and Martinou, I. (1995). Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* 374, 731-733.

Ferlini, C., De Angelis, C., Biselli, R., Distefano, M., Scambia, G., and Fattorossi, A. (1999). Sequence of metabolic changes during X-ray-induced apoptosis. *Experimental Cell Research* 247, 160-7.

Ferry, J. A., Zukerberg, L. R., and Harris, N. L. (1992). Florid progressive transformation of germinal centers. A syndrome affecting young men, without early progression to nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease. *American Journal of Surgical Pathology* 16, 252-8.

Fesus, L., Davies, P., and Piacentini, M. (1991). Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death. *European Journal of Cell Biology* 56, 170-177.

Finucane, D. M., Bossy-Wetzel, E., Waterhouse, N. J., Cotter, T. G., and Green, D. R. (1999). Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *Journal of Biological Chemistry* 274, 2225-33.

Gabizon, A., and Papahadjopoulos, D. (1988). Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 6949-53.

Gabizon, A., Price, D. C., Huberty, J., Bresalier, R. S., and Papahadjopoulos, D. (1990). Effect of liposome composition and other factors on the targeting of liposomes to experimental tumors: biodistribution and imaging studies. *Cancer Research* 50, 6371-8.

Gao, W. Y., Storm, C., Egan, W., and Cheng, Y. C. (1993). Cellular pharmacology of phosphorothioate homooligodeoxynucleotides in human cells. *Molecular Pharmacology* 43, 45-50.

Garvin, A. J., Simon, R. M., Osborne, C. K., Merrill, J., Young, R. C., and Berard, C. W. (1983). An autopsy study of histologic progression in non-Hodgkin's lymphomas. 192 cases from the National Cancer Institute. *Cancer* 52, 393-8.

Gewirtz, A., Sokol, D., and Ratajczak, M. (1998). Nucleic acid therapeutics: state of the art and future prospects. *Blood* 92, 712-736.

Ghosh, M., Ghosh, K., and Cohen, J. S. (1991). Oligodeoxynucleotide analogs as informational drugs to regulate translation. *Nucleic Acids Symposium Series*, 139-42.

Gibson, L., Holmgren, S., Huang, D., Bernard, O., Copeland, N., and Jenkins, N. (1996). *Bcl-w*, a novel member of the *bcl-2* family, promotes cell survival. *Oncogene* 13, 665-75.

Gillet, G., Guerin, M., Trembleau, A., and Brun, G. (1995). A *bcl-2* related gene is activated in avian cells transformed by the Rous sarcoma virus. *EMBO J* 14, 1372-1381.

Giovannangeli, C., and Helene, C. (1997). Progress in developments of triplex-based strategies. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7, 413-421.

Gregoriadis, G. (1990). Immunological adjuvants: a role for liposomes. *Immunology Today* 11, 89-97.

Gutiérrez-Puente, Y., Tari, A., Stephens, C., Rosenblum, M., Tamez-Guerra, R., and Lopez-Berestein, G. (1999). Safety, pharmacokinetics, and tissue distribution of liposomal P-ethoxy oligonucleotides targeted to *Bcl-2*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 291, 865-869.



Hanada, M., Delia, D., Aiello, A., Stadtmauer, E., and Reed, J. (1993). *bcl-2* Gene hypomethylation and high level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 82, 1820-1828.

Hansmann, M. L., Fellbaum, C., Hui, P. K., and Moubayed, P. (1990). Progressive transformation of germinal centers with and without association to Hodgkin's disease. *American Journal of Clinical Pathology* 93, 219-26.

Hansmann, M. L., Stein, H., Fellbaum, C., Hui, P. K., Parwaresch, M. R., and Lennert, K. (1989). Nodular paragranuloma can transform into high-grade malignant lymphoma of B type. *Human Pathology* 20, 1169-75.

Helenc, C., and Toulme, J. (1990). Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigene nucleic acids. *Biochem. Biophys. Acta* 1049, 99-125.

Hengartn, M., and Horvitz, H. (1994). Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev* 4, 581-586.

Hengartner, M. O., and Horvitz, H. R. (1994). *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 76, 665-76.

Hirsch, T., Marchetti, P., Susin, S. A., Dallaporta, B., Zamzami, N., Marzo, I., Geuskens, M., and Kroemer, G. (1997). The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* 15, 1573-81.

Hockenbery, D., Nuñez, G., Milliman, C., Schreiber, D., and Korsmeyer, S. (1990). *Bcl-2* is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348, 334-336.

Hodking, T. (1832). On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Med Chir Trans* 17, 68-70.

Hofmann, K., Bucher, P., and Tschopp, J. (1997). The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends in Biochemical Sciences* 22, 155-6.

Hope, M., Bally, M., Mayer, L., Janoff, A., and Cullis, P. (1986). Generation of multilamellar vesicles. *Chem. Phys. Lipids* 40, 89-107.

Hope, M., Bally, M., Webb, G., and Cullis, P. (1985). Production of large unilamellar by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta.* 812, 55-65.

Hsu, Y. T., Wolter, K. G., and Youle, R. J. (1997). Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 3668-72.

Hu, Y., Benedict, M. A., Wu, D., Inohara, N., and Nunez, G. (1998). Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 4386-91.

Huang, C. (1969). Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry* 8, 344-52.

Huang, D. C., Adams, J. M., and Cory, S. (1998). The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. *EMBO Journal* 17, 1029-39.

Jacobson, J., Burne, J., and King, M. (1993). Apoptosis and Bcl-2 protein in cells without mitochondrial DNA. *Nature* 361, 365-368.

Janknegt, R., de Marie, S., Bakker-Woudenberg, I. A., and Crommelin, D. J. (1992). Liposomal and lipid formulations of amphotericin B. Clinical pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics* 23, 279-91.

Jaroszewski, J., and Cohen, J. (1991). Cellular uptake of antisense oligonucleotides. *Adv Drug Delivery Rev* 6, 235-240.

Jones, M. N., and Nicholas, A. R. (1991). The effect of blood serum on the size and stability of phospholipid liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1065, 145-52.

Juliano, R. L., and Stamp, D. (1975). The effect of particle size and charge on the clearance rates of liposomes and liposome encapsulated drugs. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 63, 651-8.

Jurgensmeier, J. M., Krajewski, S., Armstrong, R. C., Wilson, G. M., Oltersdorf, T., Fritz, L. C., Reed, J. C., and Otilie, S. (1997). Bax- and Bak-induced cell death in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular Biology of the Cell* 8, 325-39.

Kamel-Reid, S., Letarte, M., Doedens, M., Greaves, A., Murdoch, B., Grunberger, T., Lapidot, T., Thorner, P., Freedman, M. H., and Phillips, R. A. (1991). Bone marrow from children in relapse with pre-B acute lymphoblastic leukemia proliferates and disseminates rapidly in scid mice. *Blood* 78, 2973-81.

Kaneda, Y., Morishita, R., and Dzau, V. (1997). Prevention of restenosis by gene therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 811, 299-308.

Kaplan, H. (1980). *Hodking's disease*, ed 2 Edition (Cambridge: Harvard University Press).

Kiefer, M., Brauer, M., and Powers, V. (1995). Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374, 736-739.

Kluck, R. M., Bossy-Wetzell, E., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis [see comments]. *Science* 275, 1132-6.

Knudson, C., and Korsmeyer, S. (1997). Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death. *Nature Genetics* 16, 358-363.

Kozopas, K., Yang, T., Buchan, H., Zhou, P., and Craig, R. (1993). MCL1, a gene expressed in programmed cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci* 90, 3516-3520.

Krajewska, M., Krajewski, S., Epstein, J. I., Shabaik, A., Sauvageot, J., Song, K., Kitada, S., and Reed, J. C. (1996). Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers. *American Journal of Pathology* 148, 1567-76.

Krajewski, S., Bodrug, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Gascoyne, R., Berean, K., and Reed, J. C. (1995). Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. Differential regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death *in vivo*. *American Journal of Pathology* 146, 1309-19.

Krajewski, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Miyashita, T., Wang, H. G., and Reed, J. C. (1994). Immunohistochemical determination of *in vivo* distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *American Journal of Pathology* 145, 1323-36.

Krajewski, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Wang, H. G., Irie, S., Fong, L., and Reed, J. C. (1994). Immunohistochemical analysis of *in vivo* patterns of Bcl-X expression. *Cancer Research* 54, 5501-7.

Krajewski, S., Tanaka, S., and Takayama, S. (1993). Investigations of the subcellular distribution of the Bcl-2 oncoprotein : Residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 53, 4701-4714.

Krieg, A., Gmelig-Meyling, F., Gourley, M., Kisch, W., Chrisey, L., and Steinberg, A. (1991). Uptake of oligodeoxyribonucleotides by lymphoid cells is heterogeneous and inducible. *Antisense Research and Development* 1, 161-171.

Krieg, A. M., Tonkinson, J., Matson, S., Zhao, Q., Saxon, M., Zhang, L. M., Bhanja, U., Yakubov, L., and Stein, C. A. (1993). Modification of antisense phosphodiester oligodeoxynucleotides by a 5' cholesteryl moiety increases cellular association and improves efficacy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 1048-52.

Kroemer, G., Dallaporta, B., and Resche-Rigon, M. (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annual Review of Physiology* 60, 619-42.

Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssiere, J. L., and Mignotte, B. (1995). The biochemistry of programmed cell death. *FASEB Journal* 9, 1277-87.

Kroemer, G., Zamzami, N., and Susin, S. A. (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology Today* 18, 44-51.

Kulka, M., Snith, C., Aurelian, L., Fischelevich, R., Meade, K., Miller, P., and Ts'o, P. (1989). Site specificity of the inhibitory effects of oligo(nucleoside methylphosphonate)s complementary to the acceptor splice junction of herpes simplex virus type 1 immediate early mRNA 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 6868-6872.

Kuo, T. H., Kim, H. R., Zhu, L., Yu, Y., Lin, H. M., and Tsang, W. (1998). Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump by Bcl-2. *Oncogene* 17, 1903-10.

Lam, M., Dubyak, G., Chen, L., Nunez, G., Miesfeld, R. L., and Distelhorst, C. W. (1994). Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca<sup>2+</sup> fluxes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 6569-73.

Lampert, I. A. (1999). The synthesis of Bcl-2 and other proteins in the neoplastic follicles of follicular lymphoma. *Molecular Pathology* 52, 29-31.

Lasic, D. D., Martin, F. J., Gabizon, A., Huang, S. K., and Papahadjopoulos, D. (1991). Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times. *Biochimica et Biophysica Acta* 1070, 187-92.

Lavoie, J. N., Nguyen, M., Marcellus, R. C., Branton, P. E., and Shore, G. C. (1998). E4orf4, a novel adenovirus death factor that induces p53-independent apoptosis by a pathway that is not inhibited by zVAD-fmk. *Journal of Cell Biology* 140, 637-45.

Lee, Y., Renaud, R. A., Friedrich, T. C., and Gorski, J. (1998). Estrogen causes cell death of estrogen receptor stably transfected cells via apoptosis. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 67, 327-32.

Leonetti, C., D'Agano, I., Lozupone, F., Valentini, A., Geiser, T., Zon, G., B, Citro, G., and Zupi, G. (1996). Antitumor effect of c-myc antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides on human melanoma cells *in vitro* and in mice. *Journal of the National Cancer Institute* 88, 419-29.

Lesage, S., Steff, A. M., Philippoussis, F., Page, M., Trop, S., Mateo, V., and Hugo, P. (1997). CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> thymocytes are preferentially induced to die following CD45 cross-linking, through a novel apoptotic pathway. *Journal of Immunology* 159, 4762-71.

Lewis, J. G., Lin, K. Y., Kothavale, A., Flanagan, W. M., Matteucci, M. D., DePrince, R. B., Mook, R. A., Jr., Hendren, R. W., and Wagner, R. W. (1996). A serum-resistant

cytofectin for cellular delivery of antisense oligodeoxynucleotides and plasmid DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 3176-81.

Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501.

Lin, E., Orlofsky, A., Berger, M., and Prystowsky, M. (1993). Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. *J Immunol* **151**, 1979-1988.

Litzinger, D., Brown, J., Wala, I., Kaufman, S., Van, G., Farrell, C., and Collins, D. (1996). Fate of cationic liposomes and their complex with oligonucleotide *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1281**, 139-149.

Loke, S. L., Stein, C. A., Zhang, X. H., Mori, K., Nakanishi, M., Subasinghe, C., Cohen, J. S., and Neckers, L. M. (1989). Characterization of oligonucleotide transport into living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 3474-8.

Lopez-Berestein, G., Rosemblum, M., Sadeghi, T., and Mehta, K. (1994). Pharmacokinetics, tissue distribution, and toxicology of tretinoin incorporated in liposomes. *J. Liposomes Res.* **4**, 689-700.

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**, 481-90.

Marin, M. C., Fernandez, A., Bick, R. J., Brisbay, S., Buja, L. M., Snuggs, M., McConkey, D. J., von Eschenbach, A. C., Keating, M. J., and McDonnell, T. J. (1996).

Apoptosis suppression by *bcl-2* is correlated with the regulation of nuclear and cytosolic  $Ca^{2+}$ . *Oncogene* 12, 2259-66.

Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J. M., Susin, S. A., Vieira, H. L., Prevost, M. C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J. C., and Kroemer, G. (1998). Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 281, 2027-31.

Matsukura, M., Shinozuka, K., Zon, G., Mitsuya, H., Reitz, M., Cohen, J. S., and Broder, S. (1987). Phosphorothioate analogs of oligodeoxynucleotides: inhibitors of replication and cytopathic effects of human immunodeficiency virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 7706-10.

Mayer, L. D., Hope, M. J., and Cullis, P. R. (1986). Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochimica et Biophysica Acta* 858, 161-8.

McCarthy, N. J., Whyte, M. K., Gilbert, C. S., and Evan, G. I. (1997). Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the *Bcl-2* homologue Bak. *Journal of Cell Biology* 136, 215-27.

McCune, J. M., Namikawa, R., Kaneshima, H., Shultz, L. D., Lieberman, M., and Weissman, I. L. (1988). The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* 241, 1632-9.

Merrill, A., Cohen, F., and Cramer, W. (1990). On the nature of the structural change of the colicin E1 channel peptide necessary for its translocation-competent state. *Biochemistry* 29, 5829-5836.

Miller, P., Agris, C., Aurelian, A., Blake, K., Murakami, M., Reddy, P., Spitz, S., and Ts'o, P. (1985). Control of ribonucleic acid function by oligonucleoside methylphosphonates. *Biochimie* 67, 769-776.



Minn, A. J., Velez, P., Schendel, S. L., Liang, H., Muchmore, S. W., Fesik, S. W., Fill, M., and Thompson, C. B. (1997). Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 385, 353-7.

Miossec, C., Dutilleul, V., Fassy, F., and Diu-Hercend, A. (1997). Evidence for CPP32 activation in the absence of apoptosis during T lymphocyte stimulation. *Journal of Biological Chemistry* 272, 13459-62.

Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartwig, E. A., and Yuan, J. (1993). Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* 75, 653-60.

Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., Hoffman, B., and Reed, J. C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of *bcl-2* and *bax* gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene* 9, 1799-805.

Miyashita, T., and Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human *bax* gene. *Cell* 80, 293-9.

Morishita, R., Gibbons, G., Horiuchi, M., Ellison, K., Nakama, M., Zhang, L., Kaneda, Y., Ogiwara, T., and Dzaou, V. (1995). A gene therapy using a transcription factor decoy of the E2F binding site inhibits smooth muscle proliferation *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 5855-5859.

Morvan, F., Rayner, B., Imbach, J. L., Chang, D. K., and Lown, J. W. (1987). alpha-DNA-III. Characterization by high field 1H-NMR, anti-parallel self-recognition and conformation of the unnatural hexadeoxyribonucleotides alpha-[d(CpApTpGpCpG)] and alpha-[d(CpGpCpApTpG)]. Alpha-oligodeoxynucleotides as potential cellular probes for gene control. *Nucleic Acids Research* 15, 4241-55.

Muchmore, S., Sattler, M., and Liang, H. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, and inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381, 335-341.

Neilan, J., Luz, Z., Alfonso, C., Kutish, G., Sussman, M., and Rock, D. (1993). An African swine fever virus with similarity to the protooncogene Bcl-2 and the Epstein-Barr virus gene BHRF1. *Journal of Virology* 67, 4391-4394.

Nicholson, D. W., and Thornberry, N. A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends in Biochemical Sciences* 22, 299-306.

Nielsen, P. E., Egholm, M., Berg, R. H., and Buchardt, O. (1991). Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 254, 1497-500.

Nuland, S. B. (1981). The lymphatic contiguity of Hodgkin's disease: a historical study. *Bulletin of the New York Academy of Medicine* 57, 776-86.

Ollikainen, H., Lappalainen, K., Jaaskelainen, I., Syrjaneu, S., and Pulkki, K. (1996). Liposomal targetin of Bcl-2 antisense oligonucleotides with enhanced stability into human myeloma cell lines. *Leukemia and Lymphoma* 24, 165-174.

Oltvai, Z., Millman, C., and Korsmeyer, S. (1993). Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-619.

Osborne, B. M., and Butler, J. J. (1984). Clinical implications of progressive transformation of germinal centers. *American Journal of Surgical Pathology* 8, 725-33.

Otter, I., Conus, S., Ravn, U., Rager, M., Olivier, R., Monney, L., Fabbro, D., and Borner, C. (1998). The binding properties and biological activities of Bcl-2 and Bax in cells exposed to apoptotic stimuli. *Journal of Biological Chemistry* 273, 6110-20.

Pan, G., O'Rourke, K., and Dixit, V. M. (1998). Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *Journal of Biological Chemistry* 273, 5841-5.

Papahadjopoulos, D., Allen, T. M., Gabizon, A., Mayhew, E., Matthay, K., Huang, S. K., Lee, K. D., Woodle, M. C., Lasic, D. D., and Redemann, C. (1991). Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 11460-4.

Papassotiropoulos, A., Ludwig, M., Naib-Majani, W., and Rao, G. S. (1996). Induction of apoptosis and secondary necrosis in rat dorsal root ganglion cell cultures by oxidized low density lipoprotein. *Neuroscience Letters* 209, 33-6.

Park, J. W., Hong, K., Carter, P., Asgari, H., Guo, L. Y., Keller, G. A., Wirth, C., Shalaby, R., Kotts, C., and Wood, W. I. (1995). Development of anti-p185HER2 immunoliposomes for cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 1327-31.

Parker, M. W., Postma, J. P., Pattus, F., Tucker, A. D., and Tsernoglou, D. (1992). Refined structure of the pore-forming domain of colicin A at 2.4 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 224, 639-57.

Pastorino, J. G., Chen, S. T., Tafani, M., Snyder, J. W., and Farber, J. L. (1998). The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *Journal of Biological Chemistry* 273, 7770-5.

Penninger, J. M., and Kroemer, G. (1998). Molecular and cellular mechanisms of T lymphocyte apoptosis. *Advances in Immunology* 68, 51-144.

Pezzella, F., Gatter, K. C., Mason, D. Y., Bastard, C., Duval, C., Krajewski, A., Turner, G. E., Ross, F. M., Clark, H., and Jones, D. B. (1990). Bcl-2 protein expression in

follicular lymphomas in absence of 14;18 translocation [letter] [see comments]. *Lancet* 336, 1510-1.

Pinkus, G. S., and Said, J. W. (1988). Hodgkin's disease, lymphocyte predominance type, nodular--further evidence for a B cell derivation. L & H variants of Reed-Sternberg cells express L26, a pan B cell marker. *American Journal of Pathology* 133, 211-7.

Piris, M., Pezella, F., and Martinez-Montero, J. (1994). p53 and Bcl-2 expression in high-grade B-cell lymphomas: correlation with survival time. *Br J Cancer* 69, 337-341.

Pocock, C. F., Malone, M., Booth, M., Evans, M., Morgan, G., Greil, J., and Cotter, F. E. (1995). BCL-2 expression by leukaemic blasts in a SCID mouse model of biphenotypic leukaemia associated with the t(4;11)(q21;q23) translocation. *British Journal of Haematology* 90, 855-67.

Poppema, S. (1980). The diversity of the immunohistological staining pattern of Sternberg-Reed cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 28, 788-91.

Poppema, S., Kaiserling, E., and Lennert, K. (1979). Hodgkin's disease with lymphocytic predominance, nodular type (nodular paragranuloma) and progressively transformed germinal centres--a cytohistological study. *Histopathology* 3, 295-308.

Poppema, S., Kaiserling, E., and Lennert, K. (1979). Nodular paragranuloma and progressively transformed germinal centers. Ultrastructural and immunohistologic findings. *Virchows Archiv. B, Cell Pathology Including Molecular Pathology* 31, 211-25.

Priault, M., Chaudhuri, B., Clow, A., Camougrand, N., and Manon, S. (1999). Investigation of bax-induced release of cytochrome c from yeast mitochondria permeability of mitochondrial membranes, role of VDAC and ATP requirement. *European Journal of Biochemistry* 260, 684-91.

Raff, M. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356, 397-400.

Raynaud, F., Orr, R., Goddard, P., Lacey, H., Lancashire, H., Judson, I., Beck, T., Bryan, B., and Cotter, F. (1997). Pharmacokinetics of G3139, a phosphorothioate oligodeoxynucleotide antisense to Bcl-2, after intravenous administration or continuous subcutaneous infusion to mice. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 281, 420-7.

Reed, J. (1995). Bcl-2: prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance. *Hematology Oncology Clinics of North America* 9, 451-473.

Reed, J. C. (1998). Dysregulation of apoptosis in non-Hodgkin's Lymphomas: toward a molecular understanding of Bcl-2. *Advances in Leukemia and Lymphoma* 7, 1-15.

Risdall, R., Hoppe, R. T., and Warnke, R. (1979). Non-Hodgkin's lymphoma: a study of the evolution of the disease based upon 92 autopsied cases. *Cancer* 44, 529-42.

Rodrigueza, W. V., Klimuk, S. K., Pritchard, P. H., and Hope, M. J. (1998). Cholesterol mobilization and regression of atheroma in cholesterol-fed rabbits induced by large unilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta* 1368, 306-20.

Rotonda, J., Nicholson, D. W., Fazil, K. M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Ruel, R., Vaillancourt, J. P., Thornberry, N. A., and Becker, J. W. (1996). The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nature Structural Biology* 3, 619-25.

Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J. M., and Venkatachalam, M. A. (1999). Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *American Journal of Medicine* 107, 489-506.

Saikumar, P., Dong, Z., Weinberg, J. M., and Venkatachalam, M. A. (1998). Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury. *Oncogene* 17, 3341-9.

Sato, T., Hanada, M., Bodrug, S., Irie, S., Iwama, N., Boise, L. H., Thompson, C. B., Golemis, E., Fong, L., and Wang, H. G. (1994). Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Feb 28;92(5):2016]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 9238-42.

Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Eberstadt, M., Yoon, H. S., Shuker, S. B., Chang, B. S., Minn, A. J., Thompson, C. B., and Fesik, S. W. (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 275, 983-6.

Schendel, S. L., Montal, M., and Reed, J. C. (1998). Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death & Differentiation* 5, 372-80.

Schendel, S. L., Xie, Z., Montal, M. O., Matsuyama, S., Montal, M., and Reed, J. C. (1997). Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 5113-8.

Scherphof, G., and Morselt, H. (1984). On the size-dependent disintegration of small unilamellar phosphatidylcholine vesicles in rat plasma. Evidence of complete loss of vesicle structure. *Biochemical Journal* 221, 423-9.

Schlesinger, P. H., Gross, A., Yin, X. M., Yamamoto, K., Saito, M., Waksman, G., and Korsmeyer, S. J. (1997). Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 11357-62.

Senior, J. H. (1987). Fate and behavior of liposomes *in vivo*: a review of controlling factors. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 3, 123-93.

Sharma, H., Perez, J., Higgins-Sochaski, K., Hsiao, R., and Narayanan, R. (1996). Transcription factor decoy approach to decipher the role of NF-kappa B in oncogenesis. *Anticancer Res.* 16, 61-69.

Shimizu, S., Narita, M., and Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC [see comments]. *Nature* 399, 483-7.

Shin, Y. K., Levinthal, C., Levinthal, F., and Hubbell, W. L. (1993). Colicin E1 binding to membranes: time-resolved studies of spin-labeled mutants. *Science* 259, 960-3.

Stein, C. A., Matsukura, M., Subasinghe, C., Broder, S., and Cohen, J. S. (1989). Phosphorothioate oligodeoxynucleotides are potent sequence nonspecific inhibitors of *de novo* infection by HIV. *AIDS Research & Human Retroviruses* 5, 639-46.

Steller, H. (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267, 1445-9.

Sun, J., Garestier, T., and Helene, C. (1996). Oligonucleotide directed triple helix formation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 327-333.

Tari, A., Andreeff, M., Kleine, H., and Lopez-Berestein, G. (1996). Cellular uptake and localization of liposomal-methylphosphonate oligodeoxynucleotides. *J Mol Med* 74, 623-628.

Tari, A., and Lopez-Berestein, G. (1997). Oligonucleotide Therapy for Hematological Malignancies. *Journal of Liposomal Research* 7, 19-30.

Tari, A., Neamati, N., Andreeff, M., and Lopez-Berestein, G. (1996). Liposomal delivery of P-ethoxy antisense oligodeoxynucleotides in chronic myelogenous leukemia. In "Targeting of Drugs: Strategies for oligonucleotide and gene delivery in therapy", G. a. McCormack, ed. (N.Y.: Plenum Press), pp. 163-168.

Tari, A., Stephens, C., Rosenblum, M., and Lopez-Berestein, G. (1998). Pharmacokinetics, tissue distribution and safety of P-ethoxy oligonucleotides incorporated in liposomes. *J. of Liposome Research* 8, 251-264.

Tari, A., Tucker, S., Deisseroth, A., and Lopez-Berestein, G. (1994). Liposomal delivery of methylphosphonate oligodeoxynucleotides in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 84, 601-607.

Temsamani, J., and Guinot, P. (1997). Antisense oligonucleotides: a new therapeutic approach. *Biotechnology & Applied Biochemistry* 26, 65-71.

Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-62.

Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Miller, D. K., Molíneaux, S. M., Weidner, J. R., and Aunins, J. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356, 768-74.

Thornberry, N. A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-6.

Thornberry, N. A., Rano, T. A., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V. M., Nordstrom, P. A., Roy, S., Vaillancourt, J. P., Chapman, K. T., and Nicholson, D. W. (1997). A combinatorial approach defines specificities of



members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 272, 17907-11.

Tormo, M., Tari, A. M., McDonnell, T. J., Cabanillas, F., Garcia-Conde, J., and Lopez-Berestein, G. (1998). Apoptotic induction in transformed follicular lymphoma cells by Bcl-2 downregulation. *Leukemia & Lymphoma* 30, 367-79.

Tsujimoto, Y. (1998). Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes to Cells* 3, 697-707.

Tsujimoto, Y. (1989). Stress-resistance conferred by high level of bcl-2 alpha protein in human B lymphoblastoid cell. *Oncogene* 4, 1331-6.

Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, C. M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 1440-3.

Tsujimoto, Y., Gorham, J., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, J. (1985). The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joininig. *Science* 229, 1390-1393.

Tsujimoto, Y., and Shimizu, S. (2000). Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Letters* 466, 6-10.

Vaage, J., Barbera-Guillem, E., Abra, R., Huang, A., and Working, P. (1994). Tissue distribution and therapeutic effect of intravenous free or encapsulated liposomal doxorubicin on human prostate carcinoma xenografts. *Cancer* 73, 1478-84.

Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Williamson, E. K., Schumacker, P. T., and Thompson, C. B. (1997). Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria [see comments]. *Cell* 91, 627-37.

Vaux, D. L., Cory, S., and Adams, J. M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440-2.

Vingerhoeds, M. H., Storm, G., and Crommelin, D. J. (1994). Immunoliposomes *in vivo*. *Immunomethods* 4, 259-72.

Wagner, R., and Flanagan, W. (1997). Antisense technology and prospects for therapy of viral infections and cancer. *Mol. Med. Today* 3, 31-38.

Wagner, R. W. (1994). Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Nature* 372, 333-5.

Walker, N. P., Talanian, R. V., Brady, K. D., Dang, L. C., Bump, N. J., Ferez, C. R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M. C., and Hammill, L. D. (1994). Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)<sub>2</sub> homodimer. *Cell* 78, 343-52.

Wang, H. G., Pathan, N., Ethell, I. M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T. F., and Reed, J. C. (1999). Ca<sup>2+</sup>-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284, 339-43.

Wang, K., Yin, X., Chao, D., Milliman, C., and Korsmeyer, S. (1996). BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev* 10, 2859-2869.

Wang, S., Lee, R. J., Cauchon, G., Gorenstein, D. G., and Low, P. S. (1995). Delivery of antisense oligodeoxyribonucleotides against the human epidermal growth factor receptor into cultured KB cells with liposomes conjugated to folate via polyethylene glycol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 3318-22.

Weiss, L. M., Warnke, R. A., Sklar, J., and Cleary, M. L. (1987). Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *New England Journal of Medicine* 317, 1185-9.

White, P., Fogarty, R., McKean, S., Venables, D., Werther, G., and Wraight, C. (1999). Oligonucleotide uptake in cultured keratinocytes: Influence of confluence, cationic liposomes, and keratinocyte cell type. *The Journal of Investigative Dermatology (J Invest Dermatol)* 112, 699-705.

Wilson, K. P., Black, J. A., Thomson, J. A., Kim, E. E., Griffith, J. P., Navia, M. A., Murcko, M. A., Chambers, S. P., Aldape, R. A., and Raybuck, S. A. (1994). Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme [see comments]. *Nature* 370, 270-5.

Wittung, P., Kajanus, J., Edwards, K., Nielsen, P., Norden, B., and Malmstrom, B. G. (1995). Phospholipid membrane permeability of peptide nucleic acid [corrected and republished in *FEBS Lett* 1995 Nov 20;375(3):27-9]. *FEBS Letters* 365, 27-9.

Wolter, K. G., Hsu, Y. T., Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X. G., and Youle, R. J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *Journal of Cell Biology* 139, 1281-92.

Wong, M., Anthony, F. H., Tillack, T. W., and Thompson, T. E. (1982). Fusion of dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles at 4 degrees C. *Biochemistry* 21, 4126-32.

Woolf, T., Melton, D., and Jennings, C. (1992). Specificity of antisense oligonucleotides *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 7305-7309.

Wu, D., Wallen, H. D., Inohara, N., and Nunez, G. (1997). Interaction and regulation of the *Caenorhabditis elegans* death protease CED-3 by CED-4 and CED-9. *Journal of Biological Chemistry* 272, 21449-54.

Wyllie, A., and Kerr, A. (1980). Currie:Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306.

Wyllie, A. H. (1997). Apoptosis: an overview. *British Medical Bulletin* 53, 451-65.

Xiang, J., Chao, D. T., and Korsmeyer, S. J. (1996). BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 14559-63.

Yakubov, L. A., Deeva, E. A., Zarytova, V. F., Ivanova, E. M., Ryte, A. S., Yurchenko, L. V., and Vlassov, V. V. (1989). Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 6454-8.

Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80, 285-91.

Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P., and Wang, X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked [see comments]. *Science* 275, 1129-32.

Yin, X. M., Oltvai, Z. N., and Korsmeyer, S. J. (1994). BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax [see comments]. *Nature* 369, 321-3.

Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., and Horvitz, H. R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75, 641-52.

Zamecnik, P. C., and Stephenson, M. L. (1978). Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75, 280-4.

Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssiere, J. L., Petit, P. X., and Kroemer, G. (1995). Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death *in vivo*. *Journal of Experimental Medicine* 181, 1661-72.

Zar, J. H. (1999). *Biostatistical Analysis*, Fourth Edition (New Jersey: Prentice Hall).

Zha, H., Fisk, H. A., Yaffe, M. P., Mahajan, N., Herman, B., and Reed, J. C. (1996). Structure-function comparisons of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Molecular & Cellular Biology* 16, 6494-508.

Zou, Y., Preibe, W., Ling, Y., and Perez-Soler, R. (1993). Organ distribution and tumor uptake of annamycin, a new anthracycline derivative with high affinity for lipid membranes, entrapped in multilamellar vesicles. *Cancer Chemo. Pharmacol.* 32, 190-196.



