

TRABAJOS ORIGINALES

APOPTOSIS INDUCIDA POR EL TNF- α EN CÉLULAS CRÓNICAMENTE INFECTADAS CON EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA FELINA

Eduardo Mortola M. (Dr. Vet.* y Yasuyuki Momoi (D.V.M.)

TNF- α INDUCED APOPTOSIS IN CELLS CHRONICALLY INFECTED WITH FELINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS

The mechanism by which Feline Immunodeficiency Virus (FIV) infection kills the cells is called apoptosis. In this experiment, we induced apoptosis with tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and assayed the glutathione (GSH) level, in a feline fibroblastic cell line (CRFK), chronically infected with FIV. Uninfected CRFK cells remained unchanged, while the infected cells showed morphological changes characteristic of apoptosis and a marked decrease in GSH values. DNA electrophoretic assay showed the fragmentation of nucleosomal DNA in the infected cells, indicating the cytotoxic effect of TNF- α . In this study, TNF- α was also found to markedly decrease the FIV replication, as shown by the reverse transcriptase (RT) assay. This paper intends to present new information useful for both understanding the pathogenesis of FIV infection and for developing future cures for this disease.

Palabras claves: Inmunodeficiencia felina, TNF- α apoptosis.

Key words: TNF- α , feline immunodeficiency virus apoptosis.

INTRODUCCIÓN

El virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) fue aislado por primera vez en 1986, por Pedersen y col. (1987) y Yamamoto y col. (1987). De aquí en más, este virus ha sido sometido a intensas investigaciones, no sólo por ser el agente causal de un síndrome de inmunodeficiencia en gatos, sino por tener muchas propiedades físicas y biológicas similares con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). FIV ha sido clasificado dentro de la familia Retroviridae y en la subfamilia Lentivirus. (Pedersen y col., 1987; Yamamoto y col., 1988; Olmstedt y col., 1989; Talbott y col., 1989; Steinmann y col., 1990; Egberink, 1991). Este virus causa en los gatos serias alteraciones en la inmunidad celular, tal como un deterioro en la producción primaria de linfocitos T CD4+ y reducción en la respuesta proliferativa secundaria T; estos trastornos se manifiestan rápidamente luego de la infección y antes de que los animales enfermos presenten una marcada T-linfopenia, caracterizada por una inversión de la relación CD4+/CD8, con descenso en el

número de linfocitos T CD4+, y en algunos casos incremento en el número de CD8+ (English y col., 1993).

La infección con FIV causa en la célula un daño particular llamado "apoptosis" o muerte celular programada, que difiere morfológica y bioquímicamente de necrosis (Bishop y col., 1993). Apoptosis también aparece como un mecanismo celular fisiológico suicida, que preserva la homeostasis (Gougeon y col., 1993), y que ocurre como parte del desarrollo de ciertos procesos inmunorreguladores, incluyendo la supresión clonal de timocitos autorreactivos en el desarrollo del timo (Blackman y col., 1990; Egberink y col., 1992). La apoptosis requiere de activación celular, síntesis proteica y la acción de una endonucleasa endógena específica, dependiente del calcio, la cual causa en la célula una serie de cambios morfológicos que ocurren en tres etapas. En la primera, hay una condensación de la cromatina, desintegración del nucleolo y ruptura de las cadenas de DNA en pequeños fragmentos. Reducción del volumen total de la célula, incremento de la densidad celular y compactación de los organoides citoplásmicos, pero la mitocondria permanece morfológicamente normal. En la segunda fase, hay una desintegración del núcleo y citoplasma en pequeños cuerpos apoptóticos, asociado con una rápida alteración de la membrana plasmá-

*Jefe de Trabajos Prácticos - Cátedra de Inmunología Veterinaria - Facultad de CS. Veterinarias UNLP - Argentina. Estudiante del Curso de PhD - Faculty of Agriculture, The University of Tokyo - Japan.

tica. En la tercera fase, aparece una súbita degeneración de lo que resta del núcleo y estructuras del citoplasma (Walker y col., 1988; Wyllie, 1988).

El factor de necrosis tumoral α (TNF- α), parece jugar un importante rol en la infección por HIV. Los niveles de TNF- α en suero aumentan en enfermos por HIV (Lahdevirta y col., 1988), y los monocitos de estos pacientes secretan espontáneamente más TNF- α que los de individuos sanos (Lau y col., 1989). Se ha demostrado en HIV que el TNF- α activa la replicación de virus latentes en células crónicamente infectadas, produciendo un efecto citotóxico directo (Matsuyama y col., 1989; Fong y col., 1990; Poli y col., 1990); sin embargo, este mecanismo de acción no está todavía claramente dilucidado.

Uno de los aspectos patológicos de FIV, no directamente relacionados con la infección viral, sino con efectos secundarios generados por la respuesta del huésped, es la inflamación crónica de la célula y el estrés oxidativo que acompañan a la infección, donde el TNF- α tiene un rol relevante (Roederer y col., 1992 y 1993). Ese estrés, contribuye eventualmente a la pérdida de linfocitos T CD 4+.

Entre los más importantes sistemas de defensa que posee la célula contra la oxidación está el glutathione (GSH), un tripéptido formado por ácido glutámico, cisteína y glicina, que actúa removiendo los radicales oxígeno libres formados a consecuencia de la infección (De-Vries y col., 1993).

En el presente trabajo, nosotros investigamos en una línea celular de fibroblastos felinos (CRFK) crónicamente infectada con FIV, la inducción de apoptosis por el TNF- α y las variaciones en el nivel de GSH intracelular. Los resultados aquí expuestos pueden brindar una información útil para la comprensión de la patología en la infección por FIV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Células y cultivos celulares: se utilizó una línea celular de fibroblastos felinos (CRFK) (Crandell y col., 1973) como control no infectado y células CRFK crónicamente infectadas con la cepa Petaluma de FIV (CRFK/FIV), que fueron provistas por el Dr. T. Ishida (Nippon Veterinary and Animal Science University). Las células, en una concentración aproximada de 5×10^5 /ml, se cultivaron en RPMI 1640 enriquecido con 10% de suero fetal bovino a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂.

Citoquinas: el recombinante humano de TNF- α fue obtenido del Suntory Institute for Biochemical Research (Osaka, Japan); su pureza, analizada por SDS-PAGE, fue del 98,6% y su actividad específica, confirmada usando células L929, fue de 2,8 x 10⁶ U/mg.

Protocolo experimental: células CRFK Y CRFK/FIV fueron cultivadas por 15 h para su adhesión al frasco; luego el medio de cultivo fue removido totalmente y reemplazado por medio de cultivo fresco conteniendo TNF- α en concentraciones de 0,50, 100 y 200 U/ml e incubadas durante 72 h. Muestras de células fueron cosechadas diariamente a fin de: a) determinar la viabilidad, b) analizar la morfología, c) medir el nivel de GSH y d) extraer el DNA. Así mismo, se recolectó sobrenadante de los cultivos para determinar la actividad de la enzima transcriptasa reversa (RT).

Viabilidad y morfología celular: la viabilidad fue determinada por la prueba de exclusión del azul de trypan; para lo cual, una muestra de células fue diluida 1:2 con una solución al 0,3% de azul de trypan en PBS. El número de células vivas (capaces de rechazar el colorante) y muertas (capaces de incorporar el azul de trypan) fue contado por hemocitometría.

La morfología celular fue analizada por microscopía óptica, para lo cual las células fueron teñidas con una solución de Giemsa.

Análisis de la enzima viral transcriptasa reversa (RT): las muestras de los sobrenadantes de los cultivos fueron sometidas a centrifugación a 8.000 g por 10 min para eliminar los desechos celulares y luego a ultracentrifugación a 100.000 g por 10 min para concentrar las partículas virales. Posteriormente, la enzima RT fue analizada por un test de ELISA (Kit de ensayo no radiactivo - Boehringer Mannheim).

Determinación de glutathione (GSH): las células fueron lavadas dos veces con PBS y centrifugadas. El pellet resultante fue resuspendido en ácido tricloroacético al 5% y el nivel de GSH medido por el método desarrollado por Tietze (Tietze, 1969), el cual retiene concentraciones de GSH por debajo de 100 ng/ml.

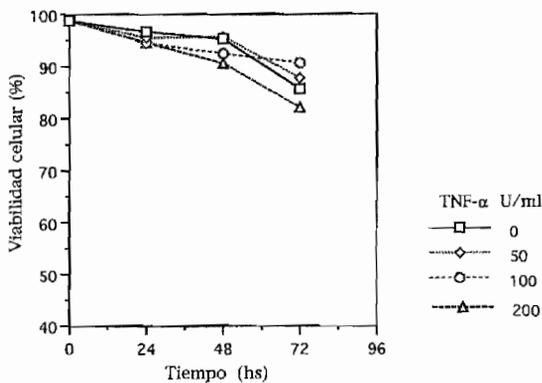
Análisis de la fragmentación del DNA: aproximadamente 5×10^6 células fueron recolectadas por un suave raspado de los frascos y sin descartar el sobrenadante, centrifugadas a 3000 rpm, lavadas 2 veces con PBS y el pellets resultante resuspendido en un buffer de lisis (5 mM de Tris-HCl pH 7,4; 0,5% de SDS; 2mM de EDTA; 0,5 mg de proteinasa K y 50 μ g de RNasa) e incubado durante 3 h a 50 °C. El DNA fue extraído con fenol y cloroformo, precipitado con etanol, centrifugado a 10.000 rpm y resuspendido en TE buffer (10 mM Tris-HCL, pH 8; 1 mM EDTA, pH 8). Para la electroforesis, el DNA fue mezclado con una solución de azul de bromophenol en glicerol, y separado en un gel de agarosa al 2,5% a 50 V por 8 h.

Análisis estadístico: la interpretación estadística de los resultados fue realizada por el test de t.

RESULTADOS

Viabilidad celular: La viabilidad de las células CRFK no sufrió diferencias significativas a lo largo de la experiencia (Figura 1); en contraposición, como se muestra en la Figura 2, las células CRFK/FIV bajo el efecto del TNF- α , presentaron una marcada pérdida de viabilidad a las 24 h, acrecentándose a las 48 h y llegando a las 72 h de incubación con un porcentaje de muerte celular del 56,5% y 68,3% para concentraciones de TNF- α de 100 y 200 U/ml, respectivamente.

Figura 1. Efecto del TNF- α sobre la viabilidad de las células CRFK

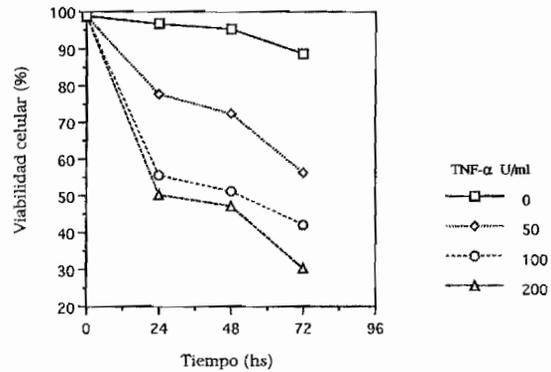


Morfología celular: a la vista del microscopio óptico, las células CRFK/FIV bajo la influencia del TNF- α , presentaron una reducción de tamaño y pérdida de adhesión a la superficie del frasco de cultivo. En los preparados teñidos con Giemsa (Foto 1) se pudo observar los cambios morfológicos propios de la apoptosis como condensación de la cromatina nuclear, vacuolización citoplasmática y formación de vesículas en el citoplasma conteniendo condensaciones de cromatina. Algunas de estas células presentaron tumefacción, propia de una necrosis secundaria.

Actividad de la enzima RT: la Figura 3 muestra la replicación viral medida a través de la actividad de la enzima RT, en las células CRFK/FIV bajo el efecto del TNF- α . Los valores correspondientes a la enzima RT experimentaron un marcado descenso, entre 40,3 y 69,2%, dependiendo de la dosis de TNF- α empleada.

Nivel de GSH intracelular: en las células CRFK crónicamente infectadas con FIV el nivel basal de GSH disminuyó en 40,9% con respecto al control no infectado. La presencia del TNF- α en los cultivos provocó un descenso aún más marcado de los niveles de GSH (57,5; 63,6 y 71,2% para concentraciones de

Figura 2. Efecto del TNF- α sobre la viabilidad de las células CRFK/FIV



TNF- α de 50, 100 y 200 U/ml, respectivamente) (Figura 4).

Fragmentación del DNA: la electroforesis en gel de agarosa del DNA de las células infectadas luego del cultivo por 24 h en presencia del TNF- α , reveló la fragmentación del DNA en bandas de 180 a 200 bp que ocurre en el proceso de apoptosis, mientras que en los controles sin la influencia del TNF- α , no se observó ninguna alteración (Foto 2).

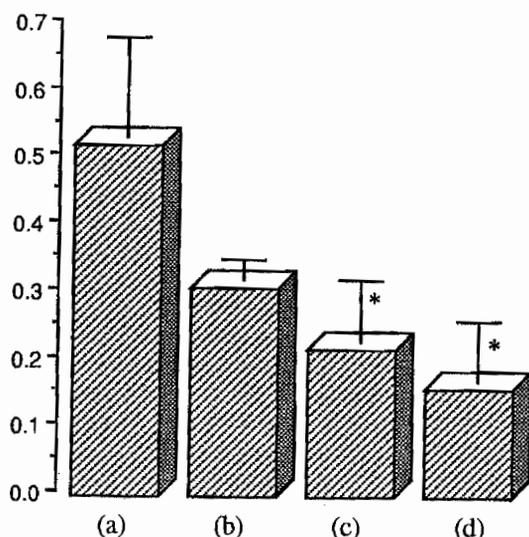
DISCUSIÓN

Como en la infección por HIV, la infección por FIV está asociada a una disminución progresiva en el número de linfocitos T CD4+, y la apoptosis es un



Foto 1. Tinción con Giemsa de Células CRFK/FIV bajo el efecto del TNF- α , que muestra los cambios morfológicos típicos de la apoptosis.

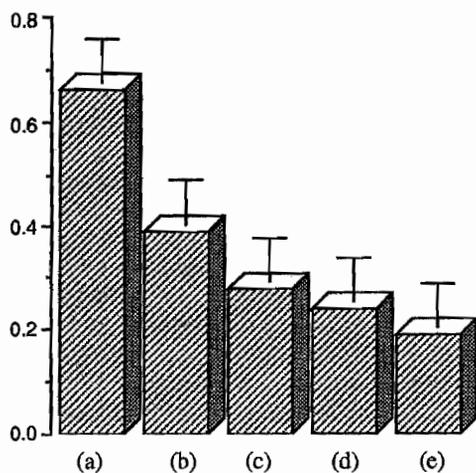
Figura 3. Actividad de la enzima *Reversa Transcriptasa*



a) CRFK/FIV; b) CRFK/FIV/TNF50; c) CRFK/FIV/TNF100; d) CRFK/FIV/TNF200
Diferencias significativas: * $P < 0,05$ [comparado con el control infectado sin la influencia del TNF- α (a)]

posible mecanismo responsable de esta depleción en la inmunodeficiencia del gato. Si bien, las células T CD4+ felinas son altamente susceptibles a la infección por FIV, el virus infecta también linfocitos CD8+ y CD4-, como también linfocitos B, macrófagos, astrocitos, células de la corteza renal, etc. (Brown y col., 1991; Yamamoto y col., 1988). Así, a diferencia de HIV el receptor celular para la glicoproteína gp 120 de FIV no es necesariamente la molécula CD4+; receptores no CD4 han sido recientemente identificados, los cuales estarían relacionados con una proteína de superficie de 24 kilodaltons (Hosie y col., 1993).

Figura 4. Nivel de (GSH) intracelular



a) CRFK; b) CRFK/FIV; c) CRFK/FIV/TNF50; d) CRFK/FIV/TNF100; e) CRFK/FIV/TNF200

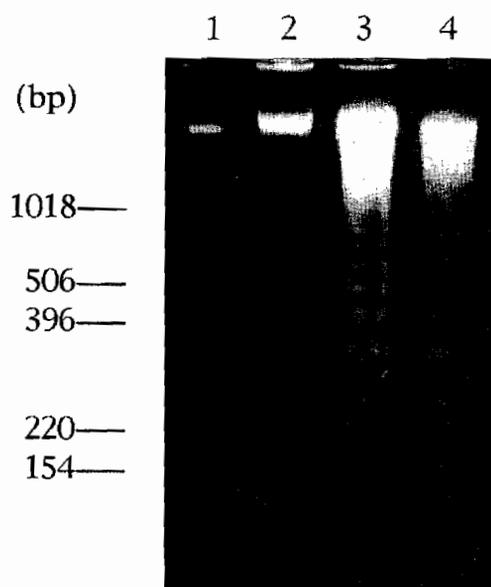


Foto 2. Análisis del DNA en gel de agarosa de células CRFK (línea 1); CRFK/FIV (línea 2); CRFK/FIV en presencia del TNF- α en concentraciones de 100 y 200 U/ml (líneas 3 y 4, respectivamente).

La apoptosis es un mecanismo de daño y muerte celular donde la activación de una enzima endonucleasa endógena en las células apoptóticas produce la ruptura del DNA en múltiples fragmentos de aproximadamente 200 bp (Wyllie y col., 1980; Wyllie y col., 1984; Duke y col., 1983), mientras la célula continúa viviendo (Shi y col., 1990). En el presente estudio, a juzgar por el test de exclusión del azul de trypan, hemos hallado que la fragmentación del DNA en las células CRFK infectadas con FIV ocurrió antes de la muerte celular y sus cambios morfológicos corresponden a los predeterminados para la apoptosis.

Bishop y col. encontraron que los PBMC (monocitos de sangre periférica) de gatos infectados con FIV, reducen notablemente la viabilidad *in vitro*, desarrollan apoptosis y mueren espontáneamente sin ningún estímulo externo, tal como ocurre en individuos infectados por HIV. En nuestros estudios, por tratarse las células CRFK de una línea celular establecida y adaptada a sobrevivir infectada con la cepa Petaluma de FIV, necesita del estímulo de una citocina como el TNF- α para desarrollar apoptosis y su consecuente muerte celular.

Una marcada diferencia entre el nivel de GSH de las células sanas e infectadas con FIV bajo la influen-

cia del TNF- α , nos sugiere que la actividad del virus venció la protección intracelular ejercida por el GSH para remover los radicales oxígeno libres formados dentro de la célula, con una alteración en su sistema de regulación que contribuye a su disfunción y eventual apoptosis.

El bajo nivel de GSH que presentan las células infectadas potencia la sensibilidad al TNF- α , el cual tiene un efecto estimulador directo sobre la actividad viral, incrementando la susceptibilidad a la oxidación (Kalebic y col., 1991).

El TNF- α no produjo ningún efecto sobre las células CRFK, pero sí llegó a vencer la protección ejercida por el GSH, desarrollando apoptosis en aquellas infectadas crónicamente con FIV cuando se empleó en concentraciones de 100 y 200 U/ml; consecuencia análoga al tratamiento con TNF- α en células crónicamente infectadas con HIV, en donde además favoreció la replicación viral (Matsuyama y col., 1989). En nuestro trabajo, si bien hubo una reactivación viral y un marcado efecto citotóxico luego de la incorporación del TNF- α , el nivel medio de la enzima RT en los sobrenadantes de los cultivos presentó un significativo descenso (con respecto a los controles infectados sin la influencia del TNF- α), que se asocia a una ausencia de replicación viral, debido a que las células mueren rápidamente por apoptosis.

El mecanismo que emplea el TNF- α para llevar a la célula a la apoptosis no ha sido totalmente dilucidado, pero recientes hallazgos (Evan y col., 1992; Hockenberry y col., 1990; Yonish-Rouach y col., 1991), indican que varios genes celulares como son bcl-2, p53, y c-myc están asociados con la apoptosis, y la sensibilidad del TNF- α a las células CRFK/FIV está asociada con modulaciones de estos genes debidas a la infección por el virus. Tampoco está totalmente aclarado cómo el TNF- α destruye selectivamente por apoptosis a las células infectadas sin afectar a las no infectadas; pero en trabajos experimentales realizados (Ohno, 1993) se ha hallado que células CRFK no infectadas se tornan sensibles al TNF- α cuando se las somete al tratamiento con ciertos antibióticos, lo que nos sugiere la existencia de un receptor para el TNF- α tanto en células CRFK infectadas como no infectadas. Además, dobles cadenas de RNA aumentan la sensibilidad de las células al TNF- α provocándoles su muerte (Gromkowski y col., 1990). Por lo que podríamos especular que el RNA del virus podría estar asociado con la sensibilidad al TNF- α de las células CRFK infectadas.

Recientemente se ha reportado que el nivel de TNF- α en el suero de pacientes con SIDA es significativamente más alto que en personas sanas (Lahdevirta y col., 1988). Así mismo, cuando los linfocitos de sangre periférica de pacientes con SIDA son cultivados *in vitro*, producen niveles más altos de TNF- α

que los de personas sanas (Ratner y col., 1987). También, el TNF- α puede ser producido por macrófagos bajo diferentes estímulos, incluyendo la infección viral (Beutler y col., 1987). Así, en portadores de HIV, cuando son infectados por algún virus o inmunológicamente estimulados, podrían producir TNF- α , éste atacaría las células T infectadas con HIV eliminándolas, lo que agravaría la depleción de linfocitos T y por lo tanto la inmunodeficiencia (Matsuyama y col., 1989). En esta experiencia, la inducción de apoptosis por TNF- α en células CRFK crónicamente infectadas, nos sugiere que en gatos con FIV, esta citokina inducida por la misma infección podría matar por apoptosis a los linfocitos T infectados, incrementando la inmunodeficiencia del paciente.

El presente trabajo tiende a desarrollar áreas para el estudio de los mecanismos por los cuales el FIV induce apoptosis, y su rol en la progresión de la inmunodeficiencia, lo que podría ser de gran ayuda para comprender la patogénesis, no sólo de la infección por FIV, sino también de la infección por HIV del humano, así como para el potencial desarrollo de vacunas contra estos agentes.

RESUMEN

El mecanismo por el cual el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) causa la muerte celular es denominado apoptosis. En este trabajo nosotros inducimos apoptosis con el uso del tumor necrosis factor alfa (TNF- α) y analizamos el nivel de glutathione (GSH) en una línea celular de fibroblastos felinos (CRFK) crónicamente infectada con FIV. Las células no infectadas permanecieron sin sufrir variación, mientras que las infectadas mostraron un marcado descenso en el nivel de GSH y cambios morfológicos típicos de la apoptosis. El análisis por electroforesis del DNA mostró fragmentación del mismo en pequeñas porciones, indicando el efecto citotóxico del TNF- α en células portadoras del virus. Éste también provocó, a juzgar por la medición de la enzima transcriptasa reversa (RT), un descenso marcado en la replicación viral. Este trabajo tiende no sólo a clarificar la patogénesis, de la infección por FIV, sino también a brindar información para futuras terapias contra esta enfermedad.

REFERENCIAS

- BEUTLER, B. y CERAMI, A., 1987. Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *N. Engl. J. Med.* 316: 379-385.
- BISHOP, S.A., GRUFFYDD-JONES, T.J., HARBOUR, D.A. y STOKES, C.R., 1993. Programmed cell death (apoptosis) as a mechanism of cell death in peripheral blood mononuclear cells from cats infected with feline immunodeficiency virus (FIV). *Clin. Exp. Immunol.* 93: 65-71.
- BLACKMAN, M., KAPPLER, J. y MARRACK, P., 1990. The role of the TCR in positive and negative selection of developing T-cells. *Sci.* 24: 1335-1341.

- BROWN, W.C., BISSEY, L. y LOGAN, K.S., 1991. Feline immunodeficiency virus infects both CD4 and CD8 T lymphocytes. *J. Virol.* 65: 3359-3364.
- CRANDELL, R.A., FABRICANT, C.G. y NELSON-REES, W.A., 1973. Development, characterization, and viral susceptibility of a feline (*Felis catus*) renal cell line (CRFK). *In vitro* 9: 176-185.
- DE-VRIES, N. y DE-FLORA, S., 1993. N-acetyl-L-cysteine. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 17F: 270-277.
- DUKE, R.C., CERVENEK, R. y COHEN, J.J., 1983. Endogenous endonuclease induced DNA fragmentation: an early event in cell-mediated cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 6361-6365.
- EGBERINK, H., 1991. Feline immunodeficiency virus infection an animal model for AIDS. PhD Thesis, University of Utrecht.
- EGBERINK, H. y HORZINEK, M.C., 1992. Animal immunodeficiency viruses. *Vet. Microbiology* 33: 311-331.
- ENGLISH, R.V., JOHNSON, C.M., GEBHARD, D.H. y TOMPKINS, M.B., 1993. In vivo lymphocyte tropism of feline immunodeficiency virus. *J. Virol.* 67(9): 5175-5186.
- EVAN G.L., WYLLIE, A.H., GILBERT, C.S., LITTLEWOOD, T.D., LAND, H., BROOKS, M., WALTERS, C.M., PENN, L.Z. y HANCOCK, D.C., 1992. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein cell. 69: 119-128.
- FONG, Y. y LOWRY, S.F., 1990. Tumor necrosis factor in the pathophysiology of infection and sepsis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 55: 157-170.
- GOUGEON, M.L. y MONTAGNIER, L., 1993. Apoptosis in AIDS. *Sci.* 260: 1269-1270.
- GROMKOWSKI, S.H., MAMA, K., YAGI, J., SEN, R. y RATH, H., 1990. Double-stranded RNA and bacterial lipopolysaccharide enhance sensitivity to TNF- α mediated cell death. *Int. Immunol.* 2: 903-908.
- HOCKENBERY, D., NUNEZ, G., MILLIMAN, C., SCHREIBER, R.D. y KORSMEYER, S.J., 1990. Bcl-2 in inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature (London)* 348: 334-336.
- HOSIE, M.F., WILLET, B.J., DUNSFORD, T.H., JARRET, O. y NEIL, J.C., 1993. A monoclonal antibody which blocks infection with feline immunodeficiency virus identifies a possible non-CD4 receptor. *J. Virol.* 67: 1667-1671.
- KALEBIC, T., KINTER, A., POLI, G., ANDERSON, M.E., MEISTER, A. y FAUCI, A.S., 1991. Suppression of human immunodeficiency virus expression in chronically infected monocytic cells by glutathione, glutathione ester and N-acetylcysteine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 989-90.
- LAHDEVIRTA, J., MAURY, C.P.J., TEPPA, A.M. y REPO, H., 1988. Elevated levels of circulating cachectin/tumor necrosis factor in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Med.* 85: 289-291.
- LAU, A.S. y LIVESEY, J.F., 1989. Endotoxin induction of tumor necrosis factor in enhanced by acid-labile interferon - α in acquired immunodeficiency syndrome. *J. Clin. Invest.* 84: 738-743.
- LAURENT-CRAWFORD, A.G., KRUST, B., MULLER, S., RIVIERE, Y., REY-GUILLE, M.A., BECHET, J.M., MONTAGNIER, L. y HOVANESSIAN, A.G., 1991. The cytopathic effect of HIV is associated with apoptosis. *Virology* 185: 829-839.
- MATSUYAMA, T., HAMAMOTO, T., SOMA, G., MIZUNO, D., YAMAMOTO, N. y KOBAYASHI, N., 1989. Cytocidal effect of tumor necrosis factor on cells chronically infected with human immunodeficiency virus (HIV): Enhancement of HIV replication. *J. Virol* 63(6): 2504-2509.
- OHNO, K., 1993. Studies on pathogenesis in feline immunodeficiency virus infection. Tesis. Tokyo. Department of Veterinary Internal Medicine. Faculty of Agriculture. The University of Tokyo. Japan.
- OLMSTED, R.A., BARNES, A.K., YAMAMOTO, J.K., HIRSCH, V.M., PURCELL, R.H. y JOHNSON, P.R., 1989. Molecular cloning of feline immunodeficiency virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86: 2448-2452.
- PEDERSON, N.C., 1987. Feline leukemia virus. In: M.J. Appel (Editor), *Virus Infections of Carnivores*. Amsterdam, Elsevier. pp. 299-335.
- POLI, G., JINTER, A., JUSTEMENT, J.S., KEHRL, J.H., BRESSLER, P., STANLEY, S. y FAUCI, A.S., 1990. Tumor necrosis factor functions in an autocrine manner in the induction of human immunodeficiency virus expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 782-735.
- RATNER, L., POLMAR, S.H., PAUL, N. y RUDDLE, N., 1987. Cytotoxic factors secreted by cells infected by human immunodeficiency virus type I. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 3: 147-155.
- ROEDERER, M., ELA, S.W., FRANK, J.T., STAAL, F.J., HERZENBERG, L. y HERZENBERG, L., 1992. N-acetylcysteine: A New Approach to Anti-HIV Therapy. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 8(2): 209-217.
- ROEDERER, M., STAAL, F.J., ELA, S.W., HERZENBERG, L. y HERZENBERG, L., 1993 N-acetylcysteine: Potential for AIDS therapy. *Pharmacology* 46: 121-129.
- SHI, Y., SZALAY, M.G., PASKAR, L., BOYER, M., SINGH, B. y GREEN, D.R., 1990. Activation-induced cell death in T cell hybridoma is due to apoptosis: morphologic aspects on DNA fragmentation. *J. Immunol.* 144: 3326-3333.
- STEINMAN, R., DOMBROWSKI, J. y O'CONNOR, T., 1990. Biochemical and immunological characterization of the major structural proteins of feline immunodeficiency virus. *J. Virol.* 71: 701-716.
- TERAI, C., KORNBLUTH, R.S., PAUZA, C.D., RICHMAN, D. y CARSON, D.A., 1991. Apoptosis as a mechanism of cell death in cultured T lymphoblasts acutely infected with HIV-1. *J. Clin. Invest.* 87: 1710-1715.
- TIETZE, F., 1969. Enzymic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione. *Anal Biochem* 27: 502-522.
- WALKER, N.I., HARMON, B.V., GOBE, G.C. y KERR, J.F. 1988. Patterns of cell death. *Meth. Achiev. Exp. Pathol.* 13: 18-25.
- WYLLIE, A.H., KERR, J.F. y CURRIE, A.R., 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytology* 68: 251-306.
- WYLLIE, A.H., 1988. Apoptosis. *ISI Atlas Science: Immunology* 1: 192-196.
- WYLLIE, A.H., MORRIS, R.G., SMITH, A.L. y DUNLOP, D., 1984. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.* 142: 67-77.
- YAMAMOTO, J.K., HO, E.W., THEILEN, G.H. y PEDERSON, N.C., 1987. Isolation of a feline T-lymphotropic lentivirus resembling human immunodeficiency virus (HIV). *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 28: 454-468.
- YAMAMOTO, J.K., SPARGER E., HO, E.W., ANDERSEN, P.A., O'CONNOR, T.P., MANDELL, C.P., LOWENSTINE, L., MUNN, R. y PEDERSEN, N.C., 1988. Pathogenesis studies of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in cats. *Am. J. Vet. Res.* 49: 1246-1258.
- YONISH-ROUACH, E., RESNITZKY, D., LOTEN, J., SACHS, L., KIMICHI, A., y OREN, M., 1991. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukemic cells that inhibited by interleukin-6. *Nature (London)* 352: 345-349.

Recibido el 12 de septiembre de 1996
Aceptado el 30 de mayo de 1997