UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR A

Ca^{2+}-ATPasa y muerte celular inducida por Ca^{2+} en células cardíacas H9c2

por

Antonio Manuel Lax Pérez

Memoria presentada para optar al
Grado de Doctor en Bioquímica

Murcia, a 27 de febrero de 2009

Facultad de Veterinaria
UNIVERSIDAD DE MURCIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A

D. Cecilio J. Vidal Moreno, Catedrático de Universidad del Área de Ciencias Experimentales y Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A de la Universidad de Murcia,

I N F O R M A:

Que la Tesis Doctoral titulada ***Ca^{2+}-ATPasa y muerte celular inducida por Ca^{2+} en células cardíacas H9c2***, ha sido realizada por **D. Antonio Manuel Lax Pérez** bajo la inmediata dirección y supervisión de **D. Francisco Fernández Belda** y **D. Fernando Soler Pardo** y que el Departamento ha dado su conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

Murcia, a 27 de febrero de dos mil nueve

Fdo.: **Dr. D. Cecilio Vidal Moreno**
Director de Departamento

Facultad de Veterinaria
UNIVERSIDAD DE MURCIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A

D. Francisco Fernández Belda, Catedrático de Universidad y **D. Fernando Soler Pardo**, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A,

A U T O R I Z A N:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada ***Ca^{2+}-ATPasa y muerte celular inducida por Ca^{2+} en células cardíacas H9c2***, realizada por **D. Antonio Manuel Lax Pérez** bajo nuestra dirección y supervisión, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A, y que presenta para la obtención del Grado de Doctor en Bioquímica por la Universidad de Murcia.

Murcia, a 27 de febrero de dos mil nueve

Dr. D. Francisco Fernández Belda
Catedrático

Dr. D. Fernando Soler Pardo
Profesor Titular

A mi esposa,

Mª del Carmen Asensio López

A mis dos hijas,

Alba y Nerea

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que a lo largo de poco más de cuatro años han participado de alguna manera en la elaboración de esta Tesis Doctoral y de las que no puedo olvidarme.

En primer lugar el agradecimiento incondicional a mis padres Manuel y Ana por el apoyo que siempre me han dado. En especial a mi padre que ha contribuído de forma decisiva a mi formación no solo en conocimientos sino también como persona. A él quiero expresarle mi agradecimiento más profundo y decirle que me siento muy orgulloso de ser su hijo.

De igual forma quisiera resaltar la comprensión, paciencia, apoyo y el continuo cariño de mi mujer Mª del Carmen que me ha servido de guía en los momentos más oscuros de este largo camino. Gracias por haber apoyado este gran proyecto.

A todos mis profesores de la Licenciatura de Bioquímica y en especial a los Dres. D. Francisco Fernández Belda y D. Fernando Soler Pardo, que han sido los directores de esta Tesis, por haberme dado la oportunidad de integrarme en su grupo de investigación. Gracias de todo corazón por vuestra constancia, interés y rigor en el trabajo diario. Su labor de dirección, dedicación y buen criterio les convierte en protagonistas fundamentales de esta Tesis Doctoral.

A los Dres. D. Joaquín García-Estañ y Dña. Noemí Marín del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina que haber puesto a mi disposición el espectrofluorímetro de doble longitud de onda y por la inestimable ayuda que siempre me prestaron. No puedo sino agradecerles muy sinceramente el haberme permitido realizar en su laboratorio una parte importante del trabajo experimental.

De los primeros años como alumno interno agradezco los consejos de Isabel Fortea que estaba entonces como yo ahora. También a mis compañeros de laboratorio Sonia Sánchez, María del Carmen Asensio y Ramón Coca con los que compartí buenos momentos.

A todos los componentes del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A y en especial a Fernando Gandía, Julio Morote, Luis Muñoz, Alejandro Torrecillas, Rubén López y Consuelo Marín.

También deseo expresar mi agradecimiento a Toñi Bernabeu, José Muñoz, Juana García y Salvadora Martínez del Servicio de Cultivos Celulares por la colaboración, paciencia y apoyo que siempre me han brindado. Tampoco me olvido de Maruja García del Servicio de Microscopía y de Maria Teresa Castells y Antonio Espinosa del Servicio de Análisis de Imágenes por el tiempo que dedicaron a resolver todas mis consultas.

Al MEC por haberme dado la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral como becario de investigación.

Y finalmente a la memoria de mis dos abuelos Pepe y Antonio por los momentos que hoy son solo recuerdos.

Muchísimas gracias a todos !!!!!

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia a través del proyecto BMC2002-02474, ayuda BES-2003-1168.

Los Capítulos 3, 4, 5, 6 y 7 de esta memoria han dado lugar a las siguientes publicaciones:

Lax, A., Soler, F. y Fernández-Belda, F. *Functional approach to the catalytic site of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase: binding and hydrolysis of ATP in the absence of Ca^{2+}.*
J. Bioenerg. Biomembr. 36 (2004), 265-273.

Lax, A., Soler, F. y Fernández-Belda, F. *Intracellular Ca^{2+} pools and fluxes in cardiac muscle-derived H9c2 cells.*
J. Bioenerg. Biomembr. 37 (2005), 249-259.

Lax, A., Soler, F. y Fernández-Belda, F. *Cytoplasmic Ca^{2+} signals and cellular death by apoptosis in myocardiac H9c2 cells.*
Biochim. Biophys. Acta. 1763 (2006), 937-947.

Soler, F., Lax, A. y Fernández-Belda, F. *Cellular death linked to irreversible stress in the sarcoplasmic reticulum: the effect of inhibiting Ca^{2+}-ATPase or protein glycosylation in the myocardiac cell model H9c2.*
Arch. Biochem. Biophys. 466 (2007), 194-202.

Lax, A., Soler, F. y Fernández-Belda, F. *Mitochondrial damage as death inducer in heart-derived H9c2 cells: More than one way for an early demise.*
En fase de publicación.

El experimentador que no sabe lo que está buscando no comprenderá lo que encuentra

Claude Bernard (1813-1878) Fisiólogo francés

ABREVIATURAS MENOS FRECUENTES

Å	Angstrom
AA	Acrilamida
AM	Acetoximetilo
AMP-PNP	Adenosina 5'-(β,γ-imido) trifosfato
AN	Apertura numérica
AO	Naranja de acridina
Bax	Proteína X asociada a Bcl-2
BHQ	2,5-Di(t-butil)hidroquinona
BSA	Albúmina de suero bovino
BisAA	Bisacrilamida
Casp	Caspasa
CCCP	Carbonil-cianida-m-clorofenilhidrazona
cit c	Citocromo c
COX IV	Subunidad IV de citocromo c oxidasa
CsA	Ciclosporina A
dATP	2'-Desoxi-adenosín 5'-trifosfato
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
ECM	Medio extracelular
E_2	Conformación de SERCA sin Ca^{2+} unido
E_1Ca	Conformación de SERCA con Ca^{2+} unido
E_2P	Conformación de SERCA fosforilada sin Ca^{2+} unido
EGTA	Ácido etilenglicol bis (β-aminoetiléter)-N,N,N´,N´, tetraacético
E_1PCa_2	Conformación de SERCA fosforilada con Ca^{2+} unido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
E_2TG	Conformación de SERCA sin Ca^{2+} en presencia de tapsigargina
F	Fluorescencia
Hepes	Acido (N-[2-Hidroxietil]piperazina-N´-[2-etano-sulfónico]
IO	Ionomicina
IP_3	Inositol 1, 4, 5-trisfosfato
JC-1	Yoduro de 5,5´,6,6´tetracloro 1,1´,3,3´ tetraetilbenzimidazol carbocianina

kpb	Kilopares de bases
MEM	Membrana externa mitocondrial
Me_2SO	Dimetilsulfóxido
MIM	Membrana interna mitocondrial
Mops	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
MTT	Bromuro de 3-(4-5-dimetiltiazol-2-yl)-2-5-difeniltetrazolio
mV	Milivoltios
PARP	Polimerasa de Poli(ADP-ribosa)
PBS	Tampón fosfato salino
PBST	Tampón fosfato salino con Tween 20
pCa	Logaritmo negativo de la concentración de Ca^{2+} (M)
PI	Yoduro de propidio
P_i	Fosfato inorgánico
PMCA	Ca^{2+}-ATPasa de membrana plasmática
pNPP	p-Nitrofenilfosfato
Procasp	Procaspasa
PSA	Persulfato amónico
PTP	Poro de permeabilidad transitoria
p/v	Relación peso/volumen
kDa	Kilodaltons
RE	Retículo endoplásmico
rpm	Revoluciones por minuto
RS	Retículo sarcoplásmico
RSE	Retículo sarco-endoplásmico
SDS	Dodecil sulfato sódico
SERCA	Ca^{2+}-ATPasa de retículo sarco-endoplásmico
ST	Estaurosporina
TEMED	N, N, N', N' -Tetrametiletilendiamina
TG	Tapsigargina
TM	Tunicamicina
TMRM	Ester metílico de tetrametilrodamina

Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TX-100	Tritón X-100
UI	Unidad internacional (μmoles/min)
v/v	Relación volumen/volumen
VP	Vasopresina [Arg8]
x g	Aceleración de la gravedad
z-IETD-fmk	N-benziloxicarbonil-Ile-Glu(OCH_3)-Thr-Asp(OCH_3)-fluorometilcetona
z-LEHD-fmk	N-benziloxicarbonil-Leu-Glu(OCH_3)-His-Asp(OCH_3)-fluorometilcetona
z-VAD-fmk	N-benziloxicarbonil-Val-Ala-Asp(OCH_3)-fluorometilcetona
$\Delta\Psi_m$	Potencial de la membrana interna mitocondrial
∅	Diámetro

1

Introducción y objetivos

3 INTRODUCCIÓN
3 Regulación del Ca^{2+}
5 RSE y Ca^{2+}
5 SERCA
8 Muerte celular
9 Apoptosis
9 Morfología de la apoptosis
10 Caspasas
14 Ruta intrínseca de la apoptosis
16 Proteínas reguladoras: Familia Bcl-2
18 Proteínas inhibidoras de la apoptosis
18 Estrés en el RSE y apoptosis
21 RSE y apoptosis inducida por Ca^{2+}
22 Mitocondria y apoptosis
24 Mecanismos de permeabilización mitocondrial
28 OBJETIVOS

2

Protocolos, técnicas y materiales

35 MANIPULACIÓN DE CÉLULAS EN CULTIVO
36 Trabajo en cabina de flujo laminar
36 Descongelación y cultivo de H9c2
38 Subcultivo de células
39 Recuento y estimación de viabilidad celular
42 Siembra de células
42 Congelación de células
44 Descomplementación del suero
44 Detección de micoplasmas

46 FLUORIMETRÍA A DOBLE LONGITUD DE ONDA
48 Características del fluorocromo Fura-2
49 Carga de células con Fura-2
51 Medida de Ca^{2+} citosólico usando Fura-2
53 Calibración de las medidas de fluorescencia
54 Cálculo de K_d para Ca^{2+}-Fura-2
55 Cuantificación del Ca^{2+} citosólico
56 Valoración del Fura-2 compartimentalizado
58 MICROSCOPÍA DE EPIFLUORESCENCIA
60 Características del fluorocromo AO
61 Detección morfológica de apoptosis
62 Fijación y tinción del material genético
62 Análisis de la muestra y datos técnicos
63 CITOMETRÍA DE FLUJO
65 Características del fluorocromo JC-1
66 Carga de células con JC-1
67 Estimación del $\Delta\Psi_m$ usando JC-1
70 MICROSCOPÍA CONFOCAL DE BARRIDO
74 Localización de Bax activo por inmunofluorescencia
75 Carga de células con MitoTracker Red®
75 Fijación y permeabilización de células
76 Intensificación de señal e incubación con anticuerpos
76 Observación en microscopio confocal
77 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS
77 Aislamiento de proteínas totales
79 Aislamiento de proteínas citosólicas
80 Cuantificación de proteínas
82 ELECTROTRANSFERENCIA
82 Electroforesis en geles de poliacrilamida
85 Electrotransferencia de proteínas
87 Inmunodetección
88 Sensibilización de la membrana
89 Incubación con anticuerpos específicos
90 Revelado de la membrana
91 Stripping de la membrana

92 DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR
94 MATERIAL FUNGIBLE
95 MATERIAL BIOLÓGICO
95 PRODUCTOS QUÍMICOS
99 MEDIOS TAMPONADOS Y DISOLUCIONES GENERALES
99 Tampón fosfato salino
99 Tampón fosfato salino con Tween-20
99 Medio de Hank
100 ECM con Ca^{2+}
100 ECM con EGTA
101 MEDIOS DE CULTIVO
101 DMEM con glucosa baja
102 Medio de cultivo completo
103 ESTRUCTURAS QUÍMICAS

3

Ca^{2+}-ATPasa en ausencia de Ca^{2+}

109 RESUMEN
109 INTRODUCCIÓN
111 MATERIALES Y MÉTODOS
111 Materiales
111 Concentración de Ca^{2+} libre
112 Preparación de muestras
112 Hidrólisis de ATP en ausencia de Ca^{2+} y K^{+}
113 Hidrólisis de ATP en presencia de Ca^{2+} y K^{+}
113 Unión de ATP en ausencia de Ca^{2+}
114 Presentación de datos
114 Modelos moleculares
114 RESULTADOS
121 DISCUSIÓN

4 Depósitos intracelulares y flujos de Ca^{2+} en células H9c2

131 RESUMEN
131 INTRODUCCIÓN
132 MATERIALES Y MÉTODOS
132 Materiales
133 Reactivos y medios
133 Cultivo de células H9c2
133 Preparación de dihidroRhod-2/AM
134 Carga de indicadores fluorescentes
135 Imágenes confocales
135 Fluorescencia de muestras en suspensión
136 Concentración de Ca^{2+} libre
136 Presentación de datos
137 RESULTADOS
146 DISCUSIÓN

5 Señales de Ca^{2+} citosólico y muerte celular por apoptosis en células H9c2

153 RESUMEN
153 INTRODUCCIÓN
155 MATERIALES Y MÉTODOS
155 Materiales y reactivos
156 Manipulación de células en cultivo
156 Imágenes confocales
157 Medidas de fluorescencia con indicadores de Ca^{2+}
158 Medidas de fluorescencia con TMRM

158 Viabilidad celular
159 Microscopía de epifluorescencia
159 Citometría de flujo con PI
160 Inmunodetección de PARP
161 Presentación de datos
161 RESULTADOS
173 DISCUSIÓN

6

Estrés en el retículo sarcoplásmico y muerte celular

179 RESUMEN
179 INTRODUCCIÓN
181 MATERIALES Y MÉTODOS
181 Materiales
181 Reactivos y medios
182 Anticuerpos
183 Cultivo de células H9c2
183 Viabilidad celular
183 Carga de células con JC-1 y citometría de flujo
184 Localización de Bax activo por inmunofluorescencia
185 Muestras para la extracción y detección de proteínas
185 Extractos celulares
185 Cuantificación de proteínas
186 Separación y detección de proteínas
186 Presentación de datos
187 RESULTADOS
198 DISCUSIÓN

7

Daño mitocondrial y muerte celular

205 RESUMEN
205 INTRODUCCIÓN
207 MATERIALES Y MÉTODOS
207 Materiales
207 Reactivos y medios
208 Cultivo de células H9c2
208 Viabilidad celular
209 Apariencia morfológica
209 Tinción de cromatina
209 Medidas del $\Delta\Psi_m$
210 Preparación de extractos celulares
211 Cuantificación de proteínas
211 Separación y detección de proteínas
211 Presentación de datos
212 RESULTADOS
222 DISCUSIÓN

8

Resumen y conclusiones

227 RESUMEN Y CONCLUSIONES

9

Bibliografía

233 BIBLIOGRAFÍA

1

Introducción y objetivos....

Yellow Fall Trees. David Lorenz Winston

INTRODUCCIÓN

Regulación del Ca^{2+}

El ión Ca^{2+} controla numerosos procesos intracelulares relacionados con la contracción muscular, desarrollo y maduración neuronal, expresión génica, liberación de neurotransmisores, secreción, muerte celular y otros (Clapham, 1995; Ginty, 1997; Berridge, 1998; Spitzer y Ribera, 1998). La coordinación de estas funciones requiere señales de Ca^{2+} que son distintas en el espacio y en el tiempo y que están reguladas de forma muy precisa (Berridge y otros, 2003). La concentración basal de Ca^{2+} libre en el citosol es de ~100 nM mientras que en el medio extracelular es ~2 mM y en depósitos intracelulares es ~400 nM. Los elevados gradientes de concentración permiten que aumentos transitorios de Ca^{2+} citosólico puedan actuar como señales intracelulares.

La concentración de Ca^{2+} en el citosol es en cada momento un balance entre flujos de entrada que tienden a elevarla y flujos de salida que tienden a disminuirla. La entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular se produce a favor de gradiente y está mediada por canales específicos situados en la membrana plasmática. La salida de Ca^{2+} desde el citosol hasta el medio extracelular se produce en contra del gradiente de concentración y está controlada por la proteína PMCA cuya actuación requiere hidrólisis de ATP. Otro mecanismo de salida implica al intercambiador Na^{+}/Ca^{2+} que es especialmente activo en células excitables como neuronas y músculo cardiaco. Este intercambiador acopla la salida de Ca^{2+} desde el citosol con la entrada de Na^{+} a favor de gradiente desde el medio extracelular (Fig. 1.1).

La principal fuente de Ca^{2+} intracelular es el RS —en células excitables— o el RE —en células no excitables. La descarga de Ca^{2+} desde el RS se produce a través del receptor de rianodina —con localización preferente en células excitables— mientras que la salida desde el RE se produce a través del receptor de IP_3 —con localización preferentemente en células no excitables. Estos receptores son en realidad canales intracelulares de Ca^{2+} que muestran similitud en su estructura primaria (Furuichi y otros, 1989), ultraestructura y electrofisiología. El proceso opuesto lo realiza SERCA que bombea Ca^{2+} desde el citosol al interior del RS/RE (Fig. 1.1).

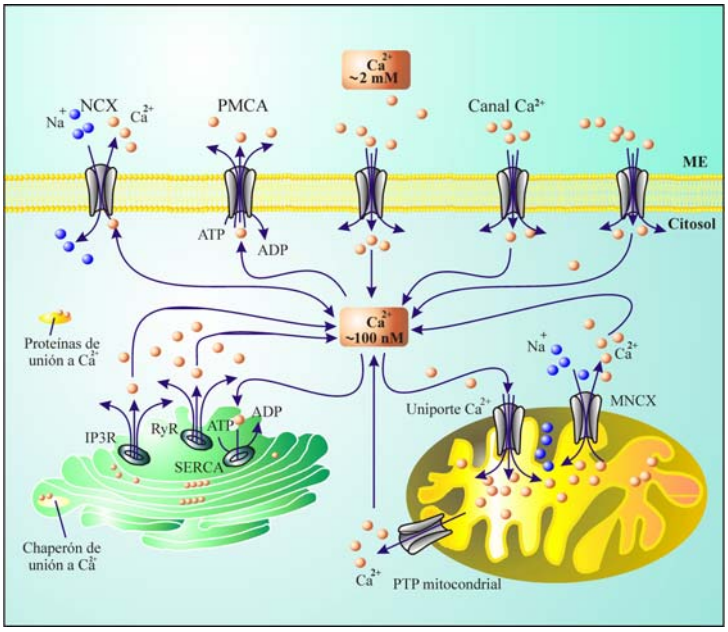


Figura 1.1.- Sistemas que controlan el Ca^{2+} citosólico. Los aumentos del Ca^{2+} citosólico se producen por entrada de Ca^{2+} desde el medio externo (ME) a través de canales específicos de la membrana plasmática o por salida de Ca^{2+} almacenado en el RS/RE a través de los receptores de rianodina (RyR) y de IP_3 (IP_3R). El intercambiador Na^+/Ca^{2+} mitocondrial (MNCX) y el PTP también provocan aumentos del Ca^{2+} citosólico. Los descensos de la concentración del Ca^{2+} citosólico se producen por intervención de las bombas PMCA y SERCA, el intercambiador Na^+/Ca^{2+} de la membrana plasmática (NCX) y el uniporte de Ca^{2+} de la mitocondria.

La mitocondria también interviene en la homeostasis de Ca^{2+} (Duchen, 2000). La salida de Ca^{2+} mitocondrial al citosol se produce a través de dos transportadores: el intercambiador Na^+/Ca^{2+} y el PTP, éste último relacionado con el proceso de apoptosis. El intercambiador Na^+/Ca^{2+} de membrana plasmática es electrogénico mientras que el intercambiador Na^+/Ca^{2+} mitocondrial es electroneutro. El paso de Ca^{2+} citosólico a la mitocondria está favorecido por el $\Delta\Psi_m$ que es de unos -180 mV. El transportador uniporte de Ca^{2+} es un canal selectivo que se abre cuando la concentración de Ca^{2+} en el citosol se eleva al nivel μM y es inhibible por rojo rutenio y sus derivados (Matlib y otros, 1998). Este transportador posee baja afinidad por Ca^{2+} pero alta capacidad de transporte. Hay descrita una vía rápida de captación de Ca^{2+} en mitocondrias de hígado de rata conocida como RaM (*rapid mode of uptake*) que se considera un mecanismo adicional a la entrada de Ca^{2+} por el transportador uniporte (Sparagna y otros, 1995). Aparato de Golgi y núcleo también tienen depósitos de Ca^{2+} aunque su función y transportadores no se conocen con suficiente detalle.

RSE y Ca^{2+}

El RE es una extensa red de membranas que forman túbulos y sacos y que está presente en todas las células eucarióticas. Se extiende por todo el citosol y tiene zonas contiguas con el núcleo. El RE está implicado en procesos de biosíntesis, plegamiento, ensamblaje y modificación de numerosas proteínas tanto solubles como de membrana. Aproximadamente un tercio de las proteínas sintetizadas se translocan al interior del RE donde adquieren el plegamiento adecuado antes de alcanzar su localización definitiva (Kaufman, 1999). Otra importante función es la de servir como depósito intracelular de Ca^{2+} para lo cual dispone de proteínas transportadoras y proteínas con capacidad para retener Ca^{2+}.

Las células musculares disponen de un RE especialmente desarrollado que se denomina RS. Su estructura en células de músculo esquelético está formada por regiones tubulares —que se orientan paralelamente a las miofibrillas— y que se conocen como túbulos longitudinales. Las preparaciones enriquecidas en túbulos longitudinales son adecuadas para estudios funcionales de SERCA porque es la proteína mayoritaria en este tipo de membrana. Las cisternas terminales aparecen como zonas ensanchadas de los túbulos longitudinales que se localizan en regiones más próximas a los túbulos transversos. Es la región que contiene los receptores de IP_3 y de rianodina. El Ca^{2+} que se almacena en el lumen del RSE está unido a proteínas que tienen alta capacidad pero baja afinidad para unir Ca^{2+} y que se localizan en las cisternas terminales. La más importante es calsecuestrina aunque hay otras como calreticulina (Leberer y otros, 1990) y los chaperones Grp78 y Grp94 que participan en el plegamiento de las proteínas (Schröder y Kaufman, 2005).

SERCA

Esta proteína está formada por una única cadena polipeptídica anclada en la membrana de forma asimétrica. El número de aminoácidos depende de la isoforma pero en todos los casos es próximo a 1.000. La masa molecular es de ~110 kDa. Pertenece a la familia de las ATPasas de tipo P porque forma un intermedio fosforilado durante su ciclo de reacción (Pedersen y Carafoli, 1987). Acopla el transporte de iones Ca^{2+} con la hidrólisis de ATP y muestra actividad ATPasa dependiente de Mg^{2+} que se activa por Ca^{2+} (Inesi, 1985).

La primera estructura tridimensional a nivel atómico se obtuvo de SERCA 1a que es la isoforma que se encuentra en músculo esquelético adulto (Toyoshima y otros, 2000) y corresponde a la estructura con Ca^{2+} unido (Fig. 1.2). La región

transmembranal de la proteína está formada por diez hélices α que tienen distinta longitud y grado de inclinación. Contiene los sitios de unión de Ca^{2+}. La región que sobresale por la cara citosólica está formada por tres dominios claramente separados que se designan como: A (dominio de activación), P (dominio de fosforilación) y N (dominio del nucleótido). El dominio P contiene el sitio de fosforilación donde se encuentra Asp351 que forma el intermedio de reacción acil-fosfato.

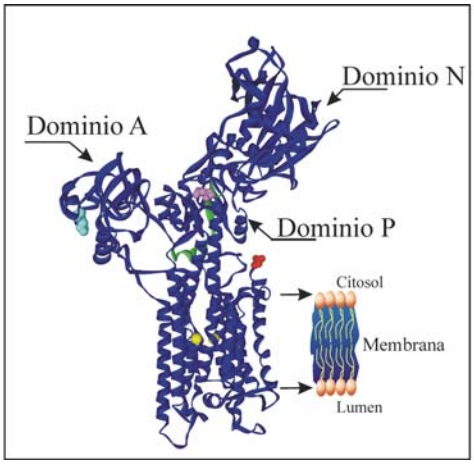


Figura 1.2.- Estructura 3D de SERCA con Ca^{2+} unido. Los iones Ca^{2+} (*amarillo*) se unen a la región de las hélices transmembranales. Asp351 (*rosa*) —que se fosforila durante el ciclo de reacción— está en el dominio P. También se muestra el segmento proteico que lo contiene (*verde*). La unión de ATP se produce en el dominio N. La integridad del dominio A es necesaria para que el acoplamiento entre transporte de Ca^{2+} e hidrólisis de ATP. Los extremos NH_2 (*azul*) y COOH (*rojo*) aparecen marcados.

Las dos conformaciones principales de esta proteína son: E_1Ca_2 y E_2. Al comparar las estructuras cristalinas de SERCA en presencia y ausencia de Ca^{2+} se observa que son muy diferentes. E_1Ca_2 muestra los dominios citosólicos A, P y N muy separados (Toyoshima y otros, 2000) mientras que E_2 se caracteriza por tener agrupados estos dominios (Toyoshima y Nomura, 2002). La idea de conformaciones estables que transmiten las estructuras cristalinas no se corresponde con la realidad. Datos de simulación indican que la unión de Ca^{2+} a la proteína es fluctuante debido a los continuos ataques de moléculas de H_2O que provoca la energía térmica (Sugita y otros, 2005). Estudios recientes indican que SERCA puede mostrar el patrón típico de digestión de la conformación E_1 incluso en ausencia de Ca^{2+} si se encuentra a pH alcalino y en presencia de Mg^{2+} (Inesi y otros, 2008). Estos datos sugieren que la transición conformacional entre E_2 y E_1 se produce de forma espontánea cuando la

proteína está en el entorno lipídico de la membrana aunque la unión de Ca^{2+} es necesaria para formar la especie catalíticamente activa E_1Ca_2.

La estructura tridimensional de la proteína es claramente dependiente de los ligandos asociados. Esto ha permitido identificar hasta nueve estructuras diferentes que se corresponden con distintos estados conformacionales de la proteína implicados en el ciclo de reacción (Toyoshima, 2008).

El proceso catalítico y de transporte se puede esquematizar con un ciclo mínimo de reacciones parciales que dan lugar a que se transporten 2 Ca^{2+} por cada ATP que se hidroliza (Fig. 1.3).

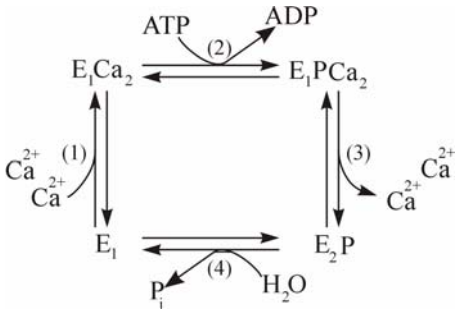


Figura 1.3.- Ciclo de reacción de SERCA. Las etapas básicas son: (1) unión de $2Ca^{2+}$ a la proteína por su cara citosólica; (2) fosforilación por ATP para dar EP con Ca^{2+} unido; (3) cambio conformacional del EP que permite la disociación de los $2Ca^{2+}$ dentro del RS y acumulación de EP sin Ca^{2+} unido; (4) hidrólisis del EP sin Ca^{2+} unido para liberar P_i y recuperar la forma E_1 de la enzima.

La proteína SERCA también está implicada en la producción de calor por parte del músculo. Se estima que el 25-45 % del calor producido por el músculo sóleo de ratón en reposo se debe a recirculación de Ca^{2+} entre RS y sarcoplasma (Chinet y otros, 1992). El calor que produce el músculo puede llegar al 70 % del total en crías de pato aclimatadas al frío que carecen de tejido adiposo marrón. La adaptación al frío conlleva un aumento del 30-50 % del contenido en proteína SERCA y en receptor de rianodina (Dumonteil y otros, 1993). También es llamativo el caso de peces como el marlín y el pez espada que evitan los descensos de temperatura en el cerebro a través de los músculos oculares transformados en tejido calentador (Block y otros, 1994). Las células del tejido calentador tienen un RS muy desarrollado y mitocondrias y apenas disponen de filamentos contráctiles.

Estudios calorimétricos indican que la cantidad de calor que libera la hidrólisis de ATP durante el transporte de Ca^{2+} catalizado por SERCA no es constante. Varía de 7 a 32 kcal/mol dependiendo de la ausencia o presencia de un gradiente de Ca^{2+}. Los valores altos de calor se obtienen cuando hay formado un gradiente de Ca^{2+} y se debe a

desacoplamiento del ciclo de reacción que permite hidrólisis de ATP pero no transporte neto de Ca^{2+} (de Meis, 2001).

La constante aparente para la unión de Ca^{2+} a SERCA es ~1 μM mientras que la concentración de Ca^{2+} libre en el citosol es 100 nM. Esto significa que SERCA apenas une Ca^{2+} cuando la célula muscular está en reposo pero sí dispone de ATP. Cuando vesículas aisladas de RS se incuban en presencia de Mg^{2+} y ausencia de Ca^{2+} se observa hidrólisis de ATP a baja velocidad. Esta actividad independiente de Ca^{2+} que fue inicialmente discutida si era debida o no SERCA supone una alteración del ciclo de reacción antes descrito.

Muerte celular

La muerte celular se puede producir a través de procesos regulados o de procesos no regulados. Apoptosis es el ejemplo típico de muerte celular regulada pero no es el único. Autofagia es otro mecanismo que sirve de adaptación al estrés evitando la muerte por apoptosis (Maiuri y otros, 2007). El conocimiento actual indica que distintos procesos de muerte celular regulada pueden solaparse o producirse en lugar de apoptosis (Degterev y Yuan, 2008). En el caso de procesos no regulados estaría la necrosis que se produce por un daño lo suficientemente importante que impide la supervivencia de la célula. Algunos autores consideran que necrosis no es un mecanismo de muerte celular sino el conjunto de cambios degradativos que se observan como consecuencia de la muerte celular (Majno y Joris, 1995). Para describir el proceso sugieren el término oncosis en lugar de necrosis puesto que se produce hinchamiento celular y ruptura de la membrana plasmática.

Hay datos que ponen de manifiesto que apoptosis y necrosis (oncosis) no son tan distintas como se creía. Hay descritos procesos de muerte celular que comparten características de apoptosis y necrosis en distinto grado (Leist y Jäättelä, 2001). Se apunta incluso que necrosis (oncosis) podría considerarse una forma regulada de muerte celular ya que está asociada a una serie de procesos que se producen de forma secuencial (Golstein y Kroemer, 2007). En cualquier caso, el solapamiento de mecanismos parece ser regla general y no excepción. Es razonable pensar que un proceso tan importante como es la muerte celular no dependa de un único mecanismo y que existan mecanismos alternativos que puedan sustituir o reforzar a alguno de ellos.

Apoptosis

El concepto de apoptosis se introdujo para describir un mecanismo de muerte celular con características morfológicas determinadas (Kerr y otros, 1972). El termino apoptosis se utiliza con frecuencia como sinónimo de muerte celular programada (*programmed cell death*), entendiendo que la célula tiene capacidad para poner en marcha un programa "suicida" en respuesta a determinados estímulos. Esta definición tiene un marcado carácter funcional e implica que la muerte se produce por activación regulada de un programa preexistente codificado en el genoma.

Apoptosis es un mecanismo fisiológico de muerte celular que está asociado a embriogénesis, eliminación de tejidos dañados o infectados, recambio de células en organismos o actuaciones del sistema inmune. La alteración de la actividad apoptótica de la célula da lugar a estados patológicos. Así por ejemplo, una apoptosis muy activa se relaciona con enfermedades cardiodegenerativas y neurodegenerativas o también con daños isquémicos donde se produce pérdida de masa celular. Por el contrario, una disminución del proceso apoptótico da lugar a patologías como: cáncer, infecciones víricas y enfermedades autoinmunes.

Morfología de la apoptosis

Las células que sufren apoptosis muestran una secuencia típica de cambios morfológicos y bioquímicos. El proceso comienza con condensación del citosol y reducción del volumen celular debido a pérdida de H_2O y electrolitos. Es frecuente encontrar alteraciones en la estructura de la membrana plasmática con expresión o desaparición de receptores, variación en la composición de lípidos de la bicapa lipídica —desplazamiento de fosfatidilserina desde la cara interna a la externa mediante un mecanismo enzimático dependiente de ATP. También es característica la formación de protuberancias o *blebbing* en la membrana plasmática como consecuencia de una despolimerización de los filamentos de actina que forman el citoesqueleto. En lo que respecta al núcleo se produce condensación progresiva de la cromatina y agregación en la periferia nuclear (Kerr y otros, 1995) de manera que el núcleo varía su aspecto morfológico (Fig. 1.4). Durante este proceso se activan endonucleasas dependientes de Mg^{2+} y reguladas por Ca^{2+}. Estas endonucleasas, en colaboración con determinadas proteasas, rompen el DNA en fragmentos de ~700 kpb que progresivamente dan lugar a fragmentos más pequeños de ~300 kpb. En algunos sistemas celulares, el DNA se degrada hasta fragmentos más pequeños de 180-200 pares de bases o múltiplos que corresponden a unidades de nucleosomas o múltiplos de esa estructura. Esta peculiar

forma de fragmentación producen las conocidas “escaleras de DNA” que se visualizan al aplicar métodos electroforéticos en geles de agarosa y constituyen uno de los marcadores más conocidos del proceso apoptótico (Vaux y otros, 1994).

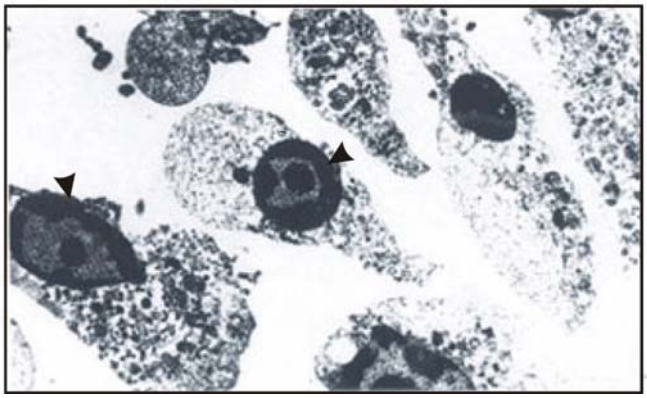


Figura 1.4.- Células epiteliales humanas en apoptosis. La micrografía electrónica muestra condensación y agregación de cromatina en la periferia del núcleo (*puntas de flecha*) y granulación del citoplasma.

La membrana plasmática engloba después fragmentos nucleares con elementos deteriorados del citosol y orgánulos intactos como mitocondrias para formar los cuerpos apoptóticos. Estos cuerpos expresan marcadores de superficie que permiten ser reconocidos y fagocitados. El resultado final es la desaparición de la célula de forma silenciosa, es decir, sin que se libere su contenido al espacio extracelular y por tanto sin afectar a células vecinas y sin desencadenar procesos inflamatorios.

Un rasgo característico de la apoptosis es la participación activa de la célula ya que ésta pone en marcha una serie de mecanismos que culminan con su propia desintegración física. El concepto de muerte activa está apoyado por la existencia de moléculas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas que controlan el proceso.

Caspasas

Las caspasas son una familia de proteasas —cisteinil-aspartato proteasas— que juegan un papel fundamental en la muerte celular por apoptosis (Thornberry y Lazebnik, 1998). Se caracterizan por tener una Cys en el centro activo que forma parte de una secuencia conservada de cinco aminoácidos. En mamíferos hay identificadas catorce caspasas diferentes de las que once se encuentran en humanos: casp 1-10 y casp 14.

Las caspasas se suelen encontrar como precursores de baja o nula actividad que se denominan procaspasas. Las procaspasas tienen una masa de 30-55 kDa y están formadas por tres dominios: dominio del extremo terminal NH_2 —también llamado prodominio—, dominio de la subunidad grande p20 —que contiene el centro activo— y dominio del extremo terminal COOH que corresponde a la subunidad pequeña p10. Los dominios de las subunidades p20 y p10 están separados en algunos casos por una secuencia corta.

El análisis filogenético indica la existencia de dos grandes subfamilias. Las caspasas inflamatorias, que están implicadas en la maduración de citoquinas pro-inflamatorias, son: casp 1, 4, 5, 11, 12, 13 y 14 y las caspasas apoptóticas, que están implicadas en procesos de muerte celular, son: casp 2, 3, 6, 7, 8, 9 y 10. Estas últimas se dividen en dos grupos (Fig. 1.5) dependiendo de la estructura y función del prodominio (Lincz, 1998). Se distingue entre caspasas iniciadoras que son: casp 2, 8, 9 y 10 y caspasas ejecutoras que son: casp 3, 6 y 7.

Las caspasas iniciadoras se caracterizan por tener una región terminal NH_2 grande con uno o varios módulos de interacción proteína-proteína que permite el reconocimiento y asociación con proteínas reguladoras (Fig. 1.5). Es el caso del dominio de reclutamiento y activación de caspasas CARD que está en casp 2 y 9 o del dominio efector de muerte DED que se encuentra en casp 8 y 10. La secuencia de aminoácidos de estos dos dominios es distinta pero muestran un plegamiento tridimensional similar que consiste en seis hélices α antiparalelas (Hofmann, 1999). El mismo plegamiento se encuentra en el dominio de muerte DD que es un tercer dominio de interacción presente en proteínas implicadas en el inicio de la apoptosis. Las caspasas ejecutoras carecen de prodominio o es muy pequeño (Fig. 1.5), son activadas por una caspasa iniciadora o por otra caspasa ejecutora según los casos y son responsables de muchos de los cambios morfológicos que caracterizan la apoptosis.

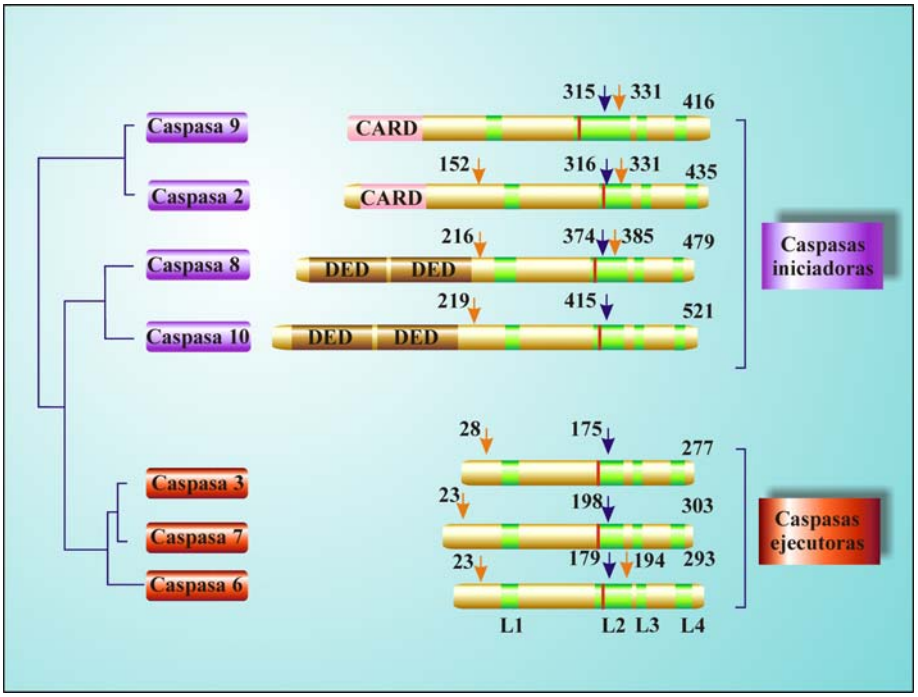


Figura 1.5.- Caspasas apoptóticas en mamíferos. Las caspasas iniciadoras disponen de módulos CARD o DED en el extremo terminal NH_2 para asociarse a otras proteínas mientras que las caspasas ejecutoras carecen de prodominio funcional. El primer corte entre subunidad grande y subunidad pequeña se indica con una flecha (*azul*). Otros cortes se indican con flechas (*naranja*). Los lazos del centro activo (L1-L4) están marcados como regiones en verde mientras que la Cys funcional que está en L2 se indica con una línea roja.

La activación de caspasas requiere el reconocimiento de una secuencia de cuatro aminoácidos —P_4-P_3-P_2-P_1— en la proteína sustrato y el corte por el enlace P_1-X en el que P_1 suele ser Asp. La secuencia del tetrapéptido de reconocimiento es distinta para las diferentes caspasas. La reacción hidrolítica requiere también que la molécula de sustrato tenga una determinada estructura terciaria. Esto evita que una determinada caspasa pueda hidrolizar cualquier proteína que tenga la secuencia de reconocimiento. La selectividad de la reacción impide una degradación aleatoria de proteínas durante la apoptosis. Estudios *in vitro* también indican que si están presentes a una concentración suficiente o se prolonga el tiempo de exposición la mayoría de caspasas pueden hidrolizar a la mayoría de sustratos. Esto sugiere que la hidrólisis selectiva de determinados sustratos por determinadas caspasas al comienzo de la apoptosis podría simplemente reflejar la proximidad de una caspasa activa a un determinado sustrato en un determinado momento (Degterev y Yuan, 2008).

El proceso de activación es dependiente del tipo de caspasa. La activación de caspasas iniciadoras requiere la intervención de un complejo multiproteico (Fig. 1.6).

En el caso de casp 2 que se activa en respuesta a un daño en el DNA nuclear interviene el complejo PIDDosoma (Tinel y Tschopp, 2004). La activación de casp 8, y probablemente la de casp 10, requiere el complejo señalizador inductor de muerte DISC (Krammer, 2000) mientras que en la activación de casp 9 interviene el apoptosoma (Jiang y Wang, 2004). En todos los casos se produce autoactivación de la caspasa como consecuencia de una oligomerización inducida por la presencia del complejo proteico. Los modelos de proximidad inducida, dimerización inducida por proximidad o conformación inducida se utilizan para explicar resultados experimentales aunque el mecanismo molecular preciso es todavía objeto de discusión (Bao y Shi, 2007).

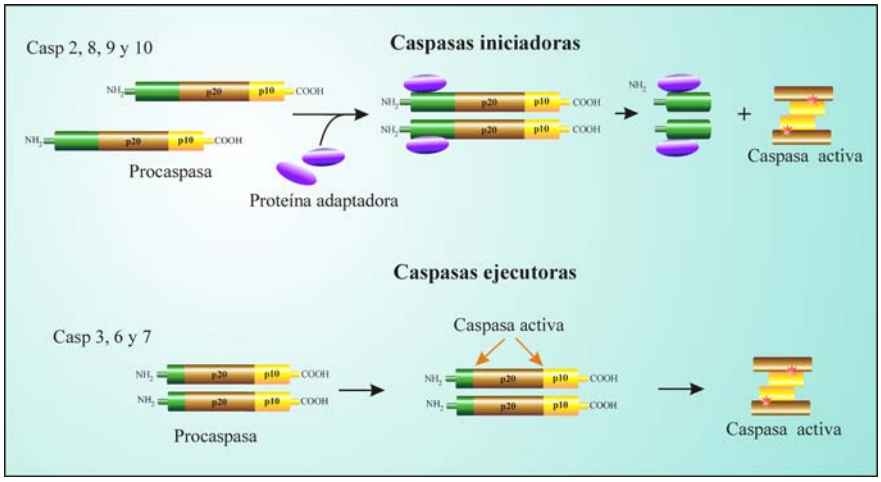


Figura 1.6.- Esquemas de activación de caspasas. Las procaspasas tienen: prodominio (*verde*), dominio de la subunidad grande (*marrón*) y dominio de la subunidad pequeña (*amarillo*). Las procaspasas iniciadoras son monómeros y la interacción de su prodominio con el correspondiente complejo señalizador produce oligomerización y activación de la molécula. Las procaspasas ejecutoras son homodímeros y son activadas por moléculas de caspasas activas. Una caspasa activa está formada por cuatro subunidades $[p20/p10]_2$. Las subunidades pequeñas quedan adyacentes y rodeadas por las subunidades grandes. Cada molécula de caspasa tiene dos centros activos (*asterisco rojo*) que funcionan de forma independiente.

El conocimiento del mecanismo de activación de caspasas ejecutoras procede de datos estructurales obtenidos por difracción de rayos X y estudios bioquímicos de casp 7. La molécula de procasp 7 tiene estructura de homodímero. Los lazos L1, L3 y L4 de un monómero forman parte de su centro activo mientras que el lazo L2 queda fuera del centro activo. Esta estructura corresponde a la molécula inactiva. La disposición espacial de los lazos L1-L4 está controlada por el lazo L2' que pertenece al otro monómero de la molécula. La ruptura intramolecular entre p20 y p10 en el segundo monómero libera el lazo L2' lo que provoca la reorientación de los lazos L1-L4 en el

primer monómero y permite que la Cys catalítica de L2 adopte la posición adecuada para la catálisis (Shiozaki y Shi, 2004). En cuanto a la localización de las caspasas, suele ser citosólica aunque también se han encontrado en mitocondria, RSE y núcleo.

Ruta intrínseca de la apoptosis

Esta vía se activa a través de una serie de estímulos que producen estrés celular y que proceden del interior de la célula. Este es el caso de determinadas drogas, radiaciones electromagnéticas, agentes oxidantes y elevaciones prolongadas del Ca^{2+} libre citosólico. Hay estímulos que actúan directamente sobre la mitocondria mientras que otros lo hacen indirectamente a través de moléculas mediadoras como Bax. En todos los casos, la permeabilización de la MEM provoca la salida al citosol de un grupo de proteínas pro-apoptóticas mitocondriales como: cit c, AIF (A*poptosis Inducing Factor*), Smac (S*econd Mitochondria-derived Activator of Caspases*)/Diablo (*Direct IAP-binding protein with low pI*), Omi/HtrA2 y endonucleasa G (Fig. 1.7).

Cit c es una proteína que interviene como transportador de electrones en la mitocondria pero que al liberarse al citosol participa en la activación de casp 9. La liberación de cit c —que está presente en el espacio intermembranal de la mitocondria— es el paso limitante en la formación del apoptosoma. El cit c liberado se une en el citosol a siete moléculas de Apaf-1 (*apoptosis protease activating factor-1*) que tienen un dominio CARD oculto. La unión de cit c provoca la exposición del dominio CARD de Apaf-1 lo que permite la unión a procasp 9 en presencia de dATP. De esta forma se produce la oligomerización del complejo proteico que se denomina apoptosoma (Fig. 1.7). El reclutamiento de varias moléculas de procasp 9 conduce a su activación por proteolisis autocatalítica al aumentar la concentración local en el apoptosoma. La relación entre las moléculas de procasp 9 y Apaf-1 es de 1:1 (Zou y otros, 1999) pero se desconoce la relación entre Apaf-1 y cit c.

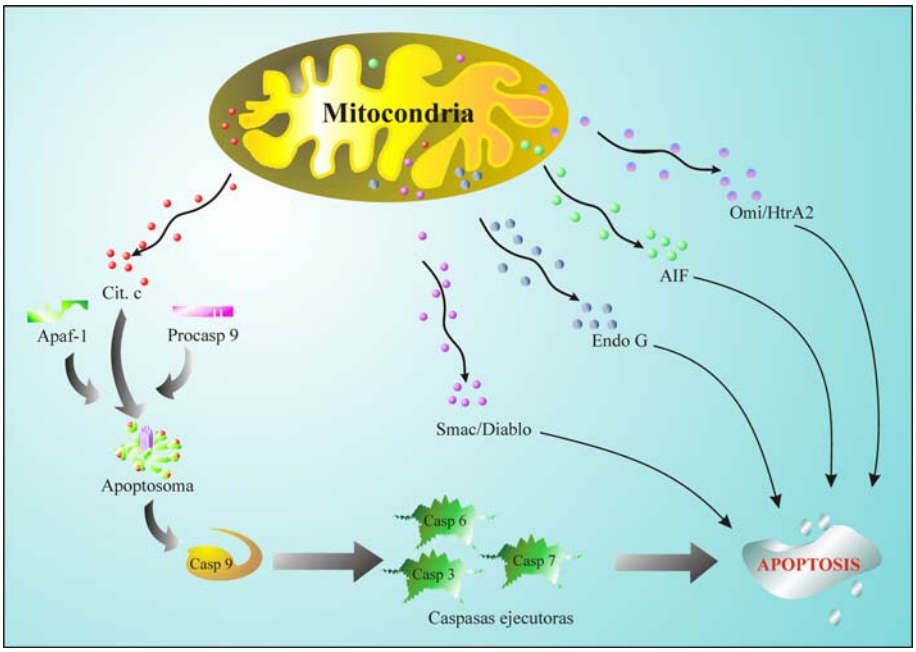


Figura 1.7.-Ruta intrínseca de la apoptosis. La ruta se activa cuando aumenta la permeabilidad de la MEM y se produce liberación de proteínas pro-apoptóticas. El cit c liberado de la mitocondria junto con Apaf-1, ATP o dATP y procasp 9 forman el apoptosoma que permite el autoprocesamiento de procasp 9. Se forma casp 9 que a su vez produce activación de las caspasas ejecutoras 3, 6 y 7. Las proteínas: Smac/Diablo, Endonucleasa G, AIF y Omi/HtrA2 también se liberan de la mitocondria e intervienen en la ejecución apoptótica.

Casp 9 activa desencadena la activación de las caspasas ejecutoras 3, 6 y 7. La activación secuencial de una caspasa por otra crea una cascada expansiva de actividad proteolítica que conlleva digestión de proteínas estructurales del citosol (Thornberry y Lazebnik, 1998), fragmentación y degradación del DNA nuclear (Boatright y Salvesen, 2003) y fagocitosis de cuerpos apoptóticos.

Casp 3 se puede activar por las caspasas iniciadoras 8 y 9 (Zhivotovsky, 2003) a través de la proteolisis interna en un Asp que separa las subunidades p20 y p10. Las caspasas ejecutoras también pueden sufrir autoactivación así casp 3 es capaz de cortar y activar a procasp 3.

Casp 8 —que es la caspasa iniciadora en la ruta extrínseca de apoptosis— puede activar la ruta intrínseca al actuar sobre la proteína Bid que es un miembro de la familia de proteínas Bcl-2. La forma truncada de Bid o t-Bid induce permeabilización de la MEM y provoca liberación de cit c (Danial y Korsmeyer, 2004). La participación de la mitocondria y la formación del apoptosoma sirven para potenciar la ruta extrínseca cuando la activación de casp 8 es insuficiente para activar las caspasas ejecutoras.

PARP es una proteína nuclear que se activa cuando se produce ruptura en una cadena de DNA y cataliza la síntesis de poliADP-ribosa utilizando NAD^+ como sustrato. El polímero se transfiere a proteínas relacionadas con la cromatina como histona H1, histona H2B, lámina B, etc., a proteínas implicadas en la estructura del DNA como topoisomerasas I y II o incluso a la propia PARP lo que provoca su inactivación (d'Amours y otros, 1999). Casp 3 hidroliza la molécula de PARP (~116 kDa) en dos fragmentos de 85 y 25 kDa, lo que resulta en la pérdida de su función. PARP fue la primera proteína identificada como sustrato de las caspasas. Por tanto, las caspasas también inactivan a la enzima PARP (Kaufmann y otros, 1993).

Proteínas reguladoras: Familia Bcl-2

La familia Bcl-2 es un grupo de proteínas que en mamíferos cuenta en la actualidad con al menos quince miembros. El nombre se debe a Bcl-2 que fue el primer miembro de la familia que se caracterizó. Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*) es una proteína implicada en la aparición del linfoma 2 de células B.

La proteínas de esta familia poseen de una a cuatro copias de un motivo conservado denominado dominio de homología con Bcl-2 o BH que se numeran de BH1 a BH4 (Fig. 1.8) (Adams y Cory, 2001). Desde el punto de vista funcional se distingue entre miembros pro-apoptóticos y anti-apoptóticos. El dominio BH4 está relacionado con la función anti-apoptótica (Reed, 1997). Sin embargo, el dominio BH3 se encuentra en todos los miembros pro-apoptóticos y parece tener una implicación directa en la inducción de la apoptosis (Bree y otros, 2002; Burlacu, 2003). La mayoría de miembros dispone de una cola hidrofóbica en el extremo terminal COOH que permite su inserción en la MEM u otras membranas celulares (Oltvai y otros, 1993).

Si atendemos al aspecto estructural las proteínas de esta familia se clasifican en tres subfamilias. Los miembros del grupo I como Bcl-2 y Bcl-x_L se caracterizan por tener los cuatro dominios BH —BH1-BH4— y mostrar actividad anti-apoptótica. Los miembros del grupo II tienen estructura similar a los del grupo I pero carecen del dominio BH4 y presentan actividad pro-apoptótica. Las proteínas Bax y Bak son los ejemplos mejor caracterizados. Los miembros del grupo III se caracterizan por tener un único dominio BH —el dominio BH3— y pueden o no tener región transmembranal. Todos tienen actividad pro-apoptótica y los miembros mas conocidos son: Bid, Bad, Bim, Bik, Noxa y Puma.

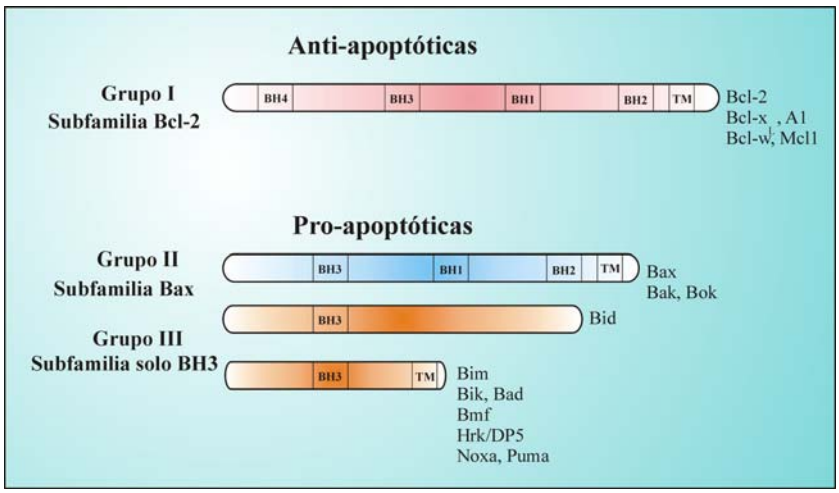


Figura 1.8.- Esquema de proteínas de la familia Bcl-2. Los dominios de homología con Bcl-2 (*BH*) y el dominio transmembranal (*TM*) aparecen indicados. Las proteínas del grupo I tienen los dominios BH1-BH4 y son anti-apoptóticas. Las proteínas del grupo II tienen los dominios BH1-BH3 mientras que los del grupo III solo tienen dominio BH3. Las proteínas de los grupos II y III son pro-apoptóticas.

La distribución subcelular de las proteínas de esta familia es heterogénea. Los miembros anti-apoptóticos son proteínas integrales de membrana. Bcl-2 y Bcl-x_L se localizan en la cara citosólica de membranas de diferentes compartimentos intracelulares —mitocondria, RSE y núcleo— (Burlacu, 2003) y en condiciones normales actúan inhibiendo a los miembros pro-apoptóticos a través de heterodimerización con éstos (Merry y Korsmeyer, 1997). Los miembros con función pro-apoptótica como Bax se localizan en el citosol pero sufren un cambio conformacional y se translocan a la MEM cuando se activa el programa de muerte celular por apoptosis (Donehower, 2002; Burlacu, 2003). El cambio conformacional conlleva la exposición de sus extremos terminales NH_2 y COOH. En la MEM se integran formando oligómeros o multímeros (Hsu y otros, 1997; Gross y otros, 1998). Bak sin embargo se localiza en la MEM (Griffiths y otros, 1999) aunque cambia de conformación y forma grandes agregados durante la apoptosis (Wei y otros, 2001).

La función principal de los miembros de la familia Bcl-2 es regular la liberación de factores pro-apoptóticos desde el compartimento intermembranal de la mitocondria hasta el citosol. Bcl-2 controla la permeabilidad de la MEM evitando la apertura de canales implicados en la salida al citosol de distintos componentes con actividad pro-apoptótica (Antonsson y Martinou, 2000). Bcl-2 se expresa ampliamente durante el desarrollo embrionario y se ha visto que favorece la supervivencia de las células frente a determinados estímulos pro-apoptóticos como la exposición a luz ultravioleta,

radiaciones γ, estrés térmico, ausencia de los factores de crecimiento TGFα y TGFβ, citoquinas, infecciones víricas o agentes que provocan la formación de radicales libres (Reed, 1994).

La participación de las proteínas Bax y Bak es requisito indispensable para la activación de la ruta intrínseca de apoptosis ya que regulan la liberación de cit c y otros factores pro-apoptóticos mitocondriales (Wei y otros, 2001). Se ha visto que las proteínas pro-apoptóticas que solo tienen dominio BH3 son incapaces de activar la apoptosis en ausencia de Bax o Bak (Zong y otros, 2001).

Proteínas inhibidoras de la apoptosis

Muchas estrategias empleadas para inhibir la apoptosis están sacadas de la maquinaria que utilizan los virus para mantener activa una infección.

Las proteínas inhibidoras de la apoptosis o IAPs constituyen una familia de proteínas que fueron inicialmente descubiertas en baculovirus por su capacidad para inhibir la muerte celular en respuesta a una infección vírica.

Las proteínas inhibidoras que se han caracterizado en células de mamífero bloquean tanto a caspasas iniciadoras como a caspasas ejecutoras y ejercen un papel regulador de la apoptosis. En la actualidad constituyen una familia de cinco miembros: cIAP1, cIAP2, XIAP, IAP neuronal y survivina que muestran un alto grado de conservación durante la evolución. cIAP1 y cIAP2 inhiben la activación de las caspasas ejecutoras 3 y 7 (Deveraux y otros, 1998) y también son capaces de inhibir la activación de casp 9 inducida por cit c. De esta forma mantienen a las procaspasas en estado latente y protegen a la célula de eventuales degradaciones inespecíficas (Tamm y otros, 1998). Estas proteínas inhibidoras juegan un algunos casos un papel clave en la resistencia a terapias contra el cáncer (Bandala y otros, 2001).

La actividad de estas proteínas inhibidoras está a su vez regulada por otras proteínas. Así por ejemplo, Smac/Diablo es un inhibidor de las IAPs de mamíferos (Chai y otros, 2000). Smac/Diablo reside en la mitocondria al igual que cit c por lo que su liberación al citosol tiene efecto pro-apoptótico indirecto al neutraliza la actividad anti-apoptótica de las proteínas IAPs.

Estrés en el RSE y apoptosis

El RE es extremadamente sensible a alteraciones en el medio intracelular y muy especialmente a niveles de glucosa, ATP, oxígeno, pH, Ca^{2+} y estado redox. Estas alteraciones provocan acumulación y agregación de proteínas desplegadas y mal

plegadas en su interior. El RE —y de igual forma el RS— es capaz de detectar esas alteraciones que colectivamente se conocen como “estrés en el RE” y dispone de mecanismos para corregir esas alteraciones. La respuesta permite ajustar la capacidad funcional del RE/RS. En un primer momento se inhibe la síntesis de proteínas para evitar la acumulación de proteínas desplegadas y mal plegadas en el RE/RS. Después se induce transcripción de genes de chaperones que intervienen en el plegamiento de proteínas y se activa la vía de degradación de proteínas asociada al RE/RS. Este mecanismo elimina las proteínas defectuosas en un proceso que implica devolución al citosol, ubiquitinación y degradación en el proteosoma (Travers y otros, 2000).

La “respuesta a proteínas desplegadas” es el mecanismo más importante en células de mamífero que consiste en una reprogramación génica para restablecer la homeostasis. Consiste en tres rutas de señalización cada una de las cuales se inicia en una proteína de la membrana del RE que actúa como detector de estrés (Fig. 1.9). Se trata de las proteínas ATF6 (Haze y otros, 1999), PERK (Harding y otros, 1999) e IRE1 (Mori y otros, 1993). Las proteínas se mantienen inactivas cuando su extremo terminal NH_2 se encuentra unido a Grp78 en el interior del RE. Ante una señal de estrés, Grp78 se separa de las proteínas transmembranales lo que produce activación y puesta en marcha de la respuesta (Rao y Bredesen, 2004; Schröder y Kaufman, 2005). La forma activa de ATF6 es ATF6 p50 que se desplaza al núcleo para inducir la expresión de: Grp78, Grp94, calreticulina y de los factores de transcripción: CHOP y XBP-1. Por otra parte, la oligomerización de PERK en la membrana provoca autofosforilación y activación. PERK activo es una quinasa que fosforila al factor eIF2α inhibiendo la síntesis de proteínas que se acumulan en el RSE. Sin embargo, eIF2α fosforilado no bloquea la síntesis del factor de transcripción ATF4 que se traslada al núcleo e induce la expresión de genes involucrados en la respuesta al estrés. La activación de IRE1 permite que actúe como endonucleasa sobre el mRNA de XBP-1 para que se forme sXBP-1 que a su vez induce la expresión de genes implicados en la fase de adaptación. IRE1 activo también interacciona con TRAF2 que recluta y activa a la quinasa ASK1 y pone en marcha las rutas de las quinasas JNK y p38 MAPK. Cuando el daño en el RSE es muy intenso o prolongado, los mecanismos anteriores son insuficientes para recuperar la homeostasis en cuyo caso se desencadena la respuesta apoptótica (Ferri y Kroemer, 2001). La célula opta por el suicidio como mal menor para preservar la integridad del órgano o tejido.

El estrés en el RSE está relacionado con varios estados patológicos incluyendo diabetes, enfermedades neurodegenerativas y cardíacas (Oyadomari y Mori, 2004).

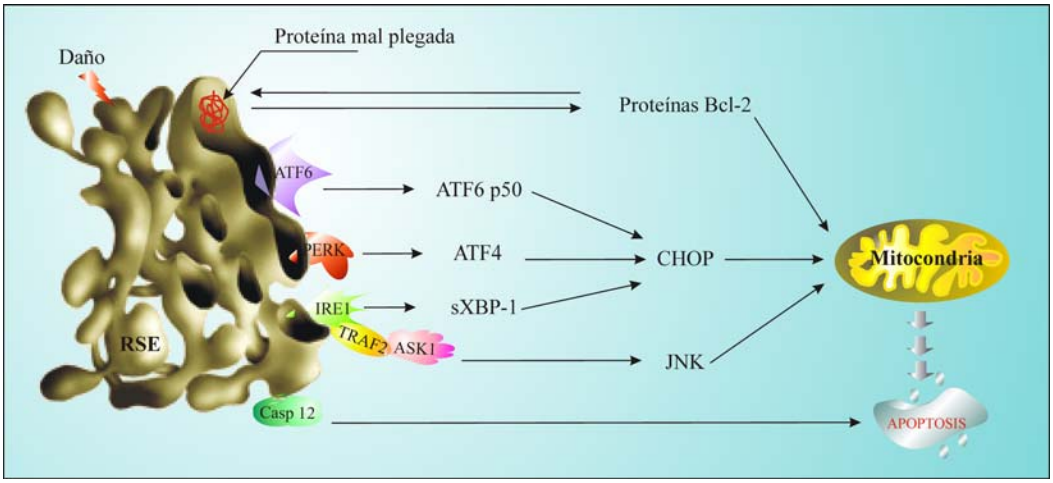


Figura 1.9.- Rutas de estrés y apoptosis relacionadas con el RSE. La acumulación de proteínas desplegadas o mal plegadas en el RSE activa la respuesta. ATF6, PERK e IRE1 son proteínas detectoras del daño que permanecen inactivas cuando están unidas a Grp78. La liberación de ATF6 permite su translocación al Golgi donde se procesa. La forma activa ATF6 p50 se desplaza al núcleo para inducir la expresión de CHOP y otras proteínas. PERK activo fosforila a eIF2α inhibiendo la síntesis de proteínas y su acumulación en el RSE. No bloquea la síntesis de ATF4 que se traslada al núcleo e induce la expresión de genes involucrados en restauración de la homeostasis. IRE1 activo procesa al mRNA de XBP-1 para formar sXBP-1 que a su vez induce la expresión de genes implicados en la fase de adaptación. IRE1 activo también interacciona con TRAF2 que recluta y activa a ASK1 y pone en marcha rutas de las quinasas de estrés y la activación de casp 12.

Las señales anti-apoptóticas que inducen PERK, ATF6 e IRE1 se convierten en pro-apoptóticas cuando la alteración en el RSE desborda la capacidad de recuperación. En este proceso están implicados varios intermediarios como: JNK, CHOP, GADD34 y proteínas de la familia Bcl-2.

La activación transcripcional de CHOP (Fig. 1.9) induce la activación de determinados genes como: GADD34, ERO1α y TRB3 y reprime la expresión de otros como Bcl-2. El nivel de expresión de GADD34 guarda relación con la extensión de la apoptosis inducida por determinados agentes aunque se desconoce su mecanismo de acción. Se ha sugerido que la supervivencia de la célula sometida a niveles bajos de estrés está relacionada con la inestabilidad intrínseca de algunos mediadores como CHOP y GADD34. Según este modelo, el efecto pro-apoptótico sería patente cuando el nivel de estas proteínas excede un determinado umbral que estaría asociado a situaciones de estrés intenso y prolongado en el RE (Rutkowski y otros, 2006).

Por otra parte, JNK que se activa a través de la ruta de IRE1 (Urano y otros, 2000) fosforila y activa a la proteína pro-apoptótica Bim (Lei y Davis, 2003) e inhibe a las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-x_L (Yamamoto y otros, 1999). La proteína

TRAF2 de esa misma ruta también interacciona con procasp 12 (Fig. 1.9) y la sensibiliza para ser activada (Nakagawa y otros, 2000). La activación de casp 12 en roedores (Nakagawa y otros, 2000) —o su equivalente en humanos casp 4— es característica de daño en el RE y la participación de otras caspasas como 3, 6, 7, 8 y 9 es conocida aunque los efectos funcionales de casp 12 y su relación con las otras caspasas no se ha establecido de forma definitiva. De hecho, el papel de casp 12 es objeto de debate porque la ausencia de casp 12 por manipulación genética no evita la muerte celular (Di Sano y otros, 2006). Por el momento se desconoce el mecanismo completo de la respuesta al daño en el RE, cómo se integran las señales anti-apoptóticas y pro-apoptóticas que determinan el destino de la célula y si las respuestas en cardiomiocitos son iguales a las que se producen en otros tipos de células (Lin y otros, 2007).

RSE y apoptosis inducida por Ca^{2+}

Estímulos que alteran al nivel de Ca^{2+} en el RSE, entre los que se incluyen: condiciones de hipoxia, elevación del nivel de IP_3, agentes oxidantes e inhibidores de SERCA, inducen muerte por apoptosis. Los efectos asociados a una alteración del Ca^{2+} son: apertura del PTP mitocondrial provocado por la entrada masiva de Ca^{2+} a la mitocondria (Bernardi y otros, 1999), activación local de calpaínas (Chan y Mattson, 1999) que activan a Bax y Bid y a varias caspasas e inhiben a Bcl-2 y Bcl-x_L, exposición de fosfatidilserina por la cara externa de la membrana plasmática que sirve de señal de reconocimiento para la fagocitosis, transferencia de cardiolipina desde la MIM a la MEM que es la señal utilizada por Bax y Bid para su inserción en la membrana mitocondrial (Lutter y otros, 2000), activación de calcineurina por Ca^{2+}/calmodulina que desfosforila a Bad y permitir su dimerización con Bcl-x_L (Wang y otros, 1999) y desfosforila a factores de transcripción de la familia NFAT lo que permite su entrada al núcleo para activar la expresión de determinados genes (Youn y otros, 1999), activación de isoformas de óxido nítrico sintasa dependiente de Ca^{2+} que aumentan el estrés oxidativo (Orrenius y otros, 2003), activación de la proteína de fisión mitocondrial Dlp-1 y alteraciones en la proteína de unión a Ca^{2+} TCTP (fortilina) que regula a las proteínas Bcl-2/Bax y Mcl-1 (Liu y otros, 2005).

Las proteínas de la familia Bcl-2 también regulan el Ca^{2+} acumulado en el RSE (Schendel y otros, 1998). Diferentes observaciones sugieren que pueden facilitar los flujos de Ca^{2+} desde el RSE al citosol mediante la formación de canales iónicos (Schendel y otros, 1998). Estas proteínas también afectan a la actividad de canales

intracelulares de Ca^{2+} del RSE. Se ha comprobado que Bcl-2 regula la actividad del receptor de IP_3 (Oakes y otros, 2005) y que la reducción de la expresión de ciertas isoformas de este receptor disminuye la sensibilidad a muerte celular por apoptosis (Khan y otros, 1996).

Estudios realizados en fibroblastos modificados genéticamente que carecen de las proteínas Bax y Bak muestran una disminución del Ca^{2+} almacenado en el RSE y en consecuencia una disminución de la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria (Scorrano y otros, 2003). Esto pone de manifiesto que las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak controlan la acumulación de Ca^{2+} en el RSE y promueven translocación de Ca^{2+} desde el RSE hasta la mitocondria y liberación de cit c (Nutt y otros, 2002). La proteína anti-apoptótica BI-1 (*Bax inhibitor-1*) también regula la homeostasis del Ca^{2+} en el RSE de forma semejante a Bcl-2 y Bcl-x_L. La sobreexpresión de la proteína BI-1 reduce la liberación de Ca^{2+} del RSE, mientras que el silenciamiento del gen de BI-1 aumenta la sensibilidad a muerte celular inducida por agentes como TG, TM y brefeldina A que causan estrés en el RSE (Chae y otros, 2004). La conexión entre muerte celular y regulación de Ca^{2+} en el RSE también se pone de manifiesto con la proteína Bap31. La forma truncada de esta proteína induce la liberación de Ca^{2+} del RSE que actúa como señal pro-apoptótica en la mitocondria (Breckenridge y otros, 2003).

Mitocondria y apoptosis

Las mitocondrias no solo se encargan de sintetizar la mayor parte del ATP en células eucarióticas sino que también tienen un papel central en muchos otros procesos intracelulares. Es el lugar donde se produce la síntesis y degradación de metabolitos esenciales así como de especies reactivas de oxígeno que son subproductos de la respiración. Intervienen en la regulación del Ca^{2+} citosólico ya que son capaces de almacenar Ca^{2+} cuando sale del RSE y liberarlo después. En los últimos diez años se ha conocido otra función muy importante como es la capacidad para detectar daños intracelulares y generar señales de muerte que conducen a la desintegración celular (Ferri y Kroemer, 2001).

Aunque las mitocondrias se representan como estructuras independientes en realidad constituyen una extensa red tubular interconectada y muy dinámica que sufre continuamente procesos de fusión y fisión (Chan, 2006). Las mitofusinas Mfn1 y Mfn2 que son GTPasas intervienen en la fusión de la MEM mientras que OPA1 es necesaria para la fusión de la MIM. También se sabe que la fisión mitocondrial se produce cuando Dlp-1 que es una GTPasa interacciona con hFis1 que es una proteína de la

MEM. La fusión y fisión mitocondrial es fundamental para mantener la morfología adecuada de las mitocondrias y alteraciones en la extensión de estos procesos están asociadas a determinadas situaciones. Así por ejemplo, las mitocondrias cambian de estructura tubular a estructura fragmentada cuando las células entran en apoptosis lo que parece requisito necesario para la liberación de cit c. De hecho, la liberación de cit c se asocia a un aumento de la fisión mitocondrial (Karbowski y Youle, 2003). Por otra parte, la sobreexpresión de hFis1 produce fragmentación mitocondrial, salida de cit c y apoptosis. Estos y otros resultados indican que la maquinaria de fusión/fisión mitocondrial interacciona directa o indirectamente con componentes de la respuesta apoptótica (Breckenridge y otros, 2003).

Las mitocondrias no se distribuyen al azar sino que se localizan adyacentes a la red del RSE lo que garantiza el adecuado suministro de ATP y permite que ambos orgánulos intervengan en la regulación de las señales de Ca^{2+} citosólico. Esto hace que alteraciones en la salida de Ca^{2+} del RSE afecten a la función mitocondrial y puedan dar lugar a un aumento de la fisión y al proceso de apoptosis. Se discute si la salida de cit c durante la apoptosis es consecuencia de los procesos de fisión que producen permeabilización incontrolada de las membranas mitocondriales o si la fisión es parte del mecanismo de salida de cit c.

La relación entre RSE, Ca^{2+} y mitocondria también se demuestra al comprobar que una sobreexpresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 disminuye el nivel de Ca^{2+} dentro del RSE y se produce una menor entrada de Ca^{2+} a la mitocondria al activar el receptor de IP_3 (Pinton y otros, 2000). Esta situación atenúa el proceso de apoptosis. La falta de proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak que también disminuyen el Ca^{2+} en el RSE producen el mismo efecto (Scorrano y otros, 2003). El Ca^{2+} del RSE también está relacionado con la fisión mitocondrial porque la expresión de Bap31 truncada, que es una proteína del RSE que se une a Bcl-2 y Bcl-x_L, induce translocación de Dlp-1 que da lugar a fragmentación mitocondrial y salida de cit c (Breckenridge y otros, 2003). Por tanto, la coordinación funcional entre RSE y mitocondria además de regular señales de Ca^{2+} en el citosol tiene capacidad para regular la morfología mitocondrial. Alteraciones en el Ca^{2+} del RSE pueden provocar sobrecarga de Ca^{2+} en la mitocondria y desencadenar apoptosis.

Mecanismos de permeabilización mitocondrial

La mitocondria como orgánulo esencial de la actividad celular está dotada de mecanismos que le permiten detectar alteraciones y participar en la propia ejecución de la célula (Ferri y Kroemer, 2001).

La permeabilidad de las membranas mitocondriales constituye un elemento clave a través del cual se controla la activación de determinados procesos que conducen de forma irreversible a la muerte celular. De hecho, la permeabilización de la MEM se considera un punto sin retorno en la apoptosis y responsable de la activación de caspasas implicadas en la ruta intrínseca. La permeabilización de la MEM no siempre está relacionada con una disipación del $\Delta\Psi_m$.

La permeabilización de la MEM da lugar a tres mecanismos generales relacionados con la muerte celular: liberación de proteínas activadoras de caspasas, liberación de moléculas involucradas en muerte celular independiente de caspasas y pérdida de funciones mitocondriales esenciales para la supervivencia de la célula (Green y Kroemer, 2004).

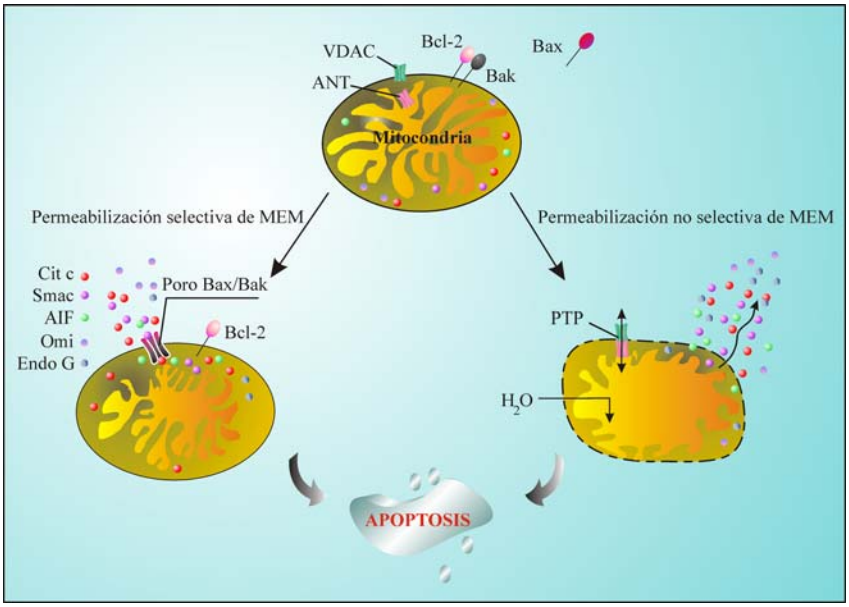


Figura 1.10.- Permeabilización mitocondrial. La permeabilización selectiva de la MEM se produce cuando el estímulo apoptótico activa a proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2. La activación de Bax y Bak a través de proteínas "solo BH3" provoca su inserción y oligomerización en la MEM creando poros. La permeabilización no selectiva de MEM se produce cuando el estímulo apoptótico provoca la asociación del canal aniónico dependiente de voltaje (*VDAC*) y la translocasa de nucleótidos de adenina (*ANT*) para formar el PTP abierto. La caída del $\Delta\Psi_m$ y la entrada masiva de H_2O provocan hinchamiento de la matriz mitocondrial y ruptura de la MEM. En ambos casos se produce liberación de proteínas pro-apoptóticas.

Las hipótesis sobre señales que inician el proceso de permeabilización de la MEM son variadas aunque los mecanismos implicados pueden concretarse en dos. Unos involucran solo a la MEM mientras que otros incluyen la participación de las dos membranas mitocondriales.

El primer mecanismo consiste en una permeabilización selectiva de la MEM que no implica alteración de la MIM ni despolarización mitocondrial (Gross y otros, 1999; Loeffler y Kroemer, 2000). Esta respuesta está mediada por proteínas de la familia Bcl-2 que actúan directamente sobre la MEM creando poros capaces de liberar proteínas pro-apoptóticas que se encuentran en el espacio intermembranal (Fig. 1.10).

Como ya se ha descrito, la familia Bcl-2 está formada por proteínas con actividad pro-apoptótica y anti-apoptótica que promueven o bloquean la permeabilización de la MEM, respectivamente. La proporción relativa de proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas parece ser importante para determinar el destino final de una célula expuesta a un estímulo pro-apoptótico. La relación Bax/Bcl-2 suele tomarse como indicativo de la sensibilidad celular a la apoptosis (Javelaud y Besancon, 2002).

Las proteínas Bcl-2 se encuentran en diversas localizaciones subcelulares. Algunos miembros pro-apoptóticos como Bax se encuentran en el citosol cuando están en estado inactivo pero se translocan a la MEM ante una señal apoptótica. El mecanismo de acción de Bax parece relacionado con su capacidad para formar canales en membranas lipídicas debido a que su estructura presenta similitud con los dominios formadores de poros de algunas toxinas como la toxina diftérica y las colicinas. Bax puede encontrarse en forma monomérica u oligomérica siendo esta última la única capaz de formar canales en membranas lipídicas y de inducir liberación de cit c (Antonsson y otros, 2001).

Bid, al igual que Bax, presenta localización citosólica. Su activación requiere hidrólisis selectiva catalizada por casp 8 o granzima B (Heibein y otros, 2000) y posterior N-miristoilación para migrar a la mitocondria donde induce permeabilización de la MEM y liberación de cit c.

El mecanismo de acción de las proteínas anti-apoptóticas de la familia parece ser la interacción con proteínas pro-apoptóticas como Bax y Bak impidiendo que se formen las estructuras que dan lugar a la creación de canales.

Las proteínas “solo BH3” —que constituyen el tercer tipo de proteínas de la familia Bcl-2— son pro-apoptóticas y regulan a los miembros de las otras dos subfamilias. Hay proteínas “solo BH3” como Puma, Noxa y Bad que se unen e inhiben a las proteínas anti-apoptóticas y de forma indirecta permiten la activación de las

proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak (Kuwana y otros, 2002; Chen y otros, 2005). Otras proteínas "solo BH3" como Bid y Bim tienen capacidad para unirse y activar directamente a Bax y Bak (Green y Chipuk, 2008).

El bloqueo de la permeabilización de la MEM muestra un efecto citoprotector mayor que el conseguido con la inhibición de caspasas cuando la célula se somete a un daño en la mitocondria (Green y Kroemer, 2004). Esto indica que la permeabilización de la MEM se produce en una etapa anterior a la activación de las caspasas.

El segundo mecanismo se basa en la formación de un poro en la membrana mitocondrial conocido como PTP mitocondrial que permite el paso de H_2O y solutos pequeños (Fig. 1.10). Su apertura permite la transición desde un estado de baja permeabilidad a un estado de conductancia elevada e inespecífica. La apertura del PTP mitocondrial provoca un descenso rápido del $\Delta\Psi_m$ con la consiguiente bajada de los niveles de ATP. La entrada masiva de H_2O que provoca la despolarización produce hinchamiento de la mitocondria, ruptura de la MEM y liberación de moléculas del espacio intermembranal al citosol (Kroemer y Reed, 2000). Las moléculas que se liberan al citosol activan diferentes rutas de ejecución apoptótica.

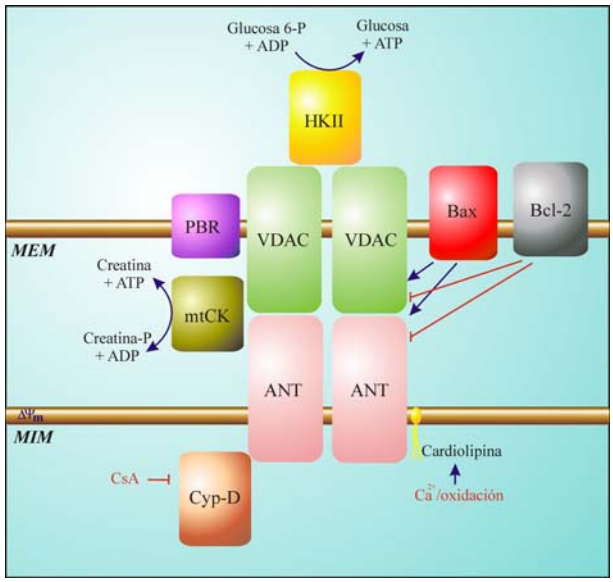


Figura 1.11.- Esquema de la estructura del PTP mitocondrial. El núcleo del poro está formado por la translocasa de nucleótidos de adenina (*ANT*) de la MIM y el canal aniónico dependiente de voltaje o porina (*VDAC*) de la MEM. Otras proteínas del poro son: hexoquinasa II (*HKII*) citosólica, receptor de benzodiazepinas (*PBR*) de la MEM, creatina quinasa (*mtCK*) del espacio intermembranal y ciclofilina D (*Cyp-D*) de la matriz mitocondrial. Bax facilita la apertura del poro y Bcl-2 inhibe la apertura del poro.

El PTP mitocondrial es un complejo multiproteico que establece puntos de contacto entre MEM y MIM. El núcleo del poro está formado por la translocasa de nucleótidos de adenina de la MIM y el canal aniónico dependiente de voltaje o porina de la MEM (Crompton y otros, 2002). Otras proteínas que forman parte del complejo son: hexoquinasa II citosólica, receptor de benzodiazepinas de la MEM, creatina quinasa del espacio intermembranal y ciclofilina D de la matriz mitocondrial (Zamzami y Kroemer, 2004). La Figura 1.11, muestra un esquema de la composición proteica del PTP mitocondrial.

Este modelo de PTP mitocondrial es todavía objeto de debate. De hecho, hay descrito un PTP activo en mitocondrias de ratón genéticamente modificado que carece de translocasa de nucleótidos de adenina lo que indicaría que no es un componente esencial (Kokoszka y otros, 2004). Se sabe que los componentes del PTP mitocondrial están separados cuando no hay activación (Crompton y otros, 2002) y es la llegada de un estímulo apoptótico a la mitocondria lo que desencadena el ensamblaje de los componentes. Esto da lugar a la formación de un poro de 1’0 a 1’3 nm de radio que permite el paso no selectivo de moléculas de tamaño inferior a 1’5 kDa.

Los factores que regulan la formación y apertura del PTP mitocondrial son muy variados. Destacan el Ca^{2+}, las especies reactivas de oxígeno y determinadas proteínas de la familia Bcl-2. Cuando el Ca^{2+} citosólico permanece elevado de forma prolongada —como ocurre en una situación de isquemia— se produce una sobrecarga del Ca^{2+} mitocondrial debido a que el sistema uniporte de entrada que tiene baja afinidad permanece activo mientras que los sistemas de salida que son de alta afinidad se saturan. En esta situación, la mitocondria no es capaz de mantener elevado el Ca^{2+} mitocondrial de forma indefinida. El mecanismo de liberación de Ca^{2+} mitocondrial implica la formación del PTP. El aumento de conductancia es irreversible y se produce como consecuencia de la saturación de los sitios de unión de Ca^{2+} del PTP mitocondrial (Ichas y Mazat, 1998). La transición entre los estados abierto y cerrado del PTP está regulada por factores como el $\Delta\Psi_m$, los nucleótidos de adenina y cationes divalentes.

Las especies reactivas de oxígeno también son capaces de inducir la apertura del PTP (Atlante y otros, 2000) efecto que se puede prevenir con la presencia de agentes antioxidantes como vitamina E o glutatión.

Algunos miembros de la familia Bcl-2 están relacionados con la regulación del PTP mitocondrial. Así, la proteína Bcl-2 produce estabilización de la MEM, aumento de la capacidad de carga de Ca^{2+} en la mitocondria (Murphy y otros, 2001) y mantenimiento del $\Delta\Psi_m$ (Zhu y otros, 1999). En cambio, Bax y Bak pueden

interaccionar con proteínas del PTP mitocondrial e inducir su apertura (Marzo y otros, 1998). Se ha visto que Bax puede asociarse con el canal aniónico dependiente de voltaje de la MEM y provocar salida de cit c desde el espacio intermembranal (Shimizu y otros, 2000). Por su parte, hexoquinasa II interfiere con la capacidad de Bax para unirse a la mitocondria y promover la liberación de cit c, posiblemente compitiendo con Bax para unirse al canal aniónico dependiente de voltaje (Pastorino y otros, 2002). Además, Bax y Bcl-2 interaccionan con la translocasa de nucleótidos de adenina regulando su actividad (Marzo y otros, 1998). No se ha demostrado que el Ca^{2+} tenga capacidad para inducir oligomerización de proteínas Bcl-2 y su translocación a la mitocondria durante la apoptosis salvo en el caso de la activación de Bad por calcineurina.

Las proteínas involucradas en los procesos de fusión y fisión mitocondrial durante la apoptosis también parecen estar implicadas en la permeabilización de la MEM (Newmeyer y Ferguson-Miller, 2003).

La apertura del PTP mitocondrial puede ser inducida o inhibida por diversos fármacos. Entre ellos destaca CsA, un fármaco inmunosupresor que inhibe específicamente y a baja concentración la apertura del PTP mitocondrial a través de su interacción con ciclofilina D (Crompton y otros, 1988).

A pesar de existir dos mecanismos de permeabilización de la MEM claramente distintos, la posible cooperación entre ellos y la importancia relativa de cada uno en diferentes tipos celulares sometidos a distintos estímulos no se ha establecido. A pesar de ello y con independencia del estímulo inicial ambas rutas conducen a la liberación de proteínas pro-apoptóticas del espacio intermembranal que desencadenan la ejecución del proceso de apoptosis.

OBJETIVOS

Los objetivos generales planteados en el plan de trabajo de esta Tesis Doctoral son estudiar el fenómeno de desacoplamiento energético ocasionado durante la actuación de SERCA en determinadas condiciones experimentales y la caracterización de procesos relacionados con alteraciones del Ca^{2+} intracelular que están implicados en la activación de muerte celular por apoptosis.

Desacoplamiento energético de SERCA

El trabajo consiste en caracterizar el mecanismo de acción de SERCA cuando hidroliza ATP en ausencia de Ca^{2+}. Esta situación se produce siempre que la célula

muscular se encuentra en estado de reposo o bien cuando está impedida la unión de Ca^{2+} a la proteína como ocurre en presencia de determinados inhibidores. Desde el punto de vista mecanístico se define como un estado de desacoplamiento energético puesto que hay hidrólisis de ATP pero no hay transporte de Ca^{2+}.

Este estudio se ha realizado usando una preparación microsomal procedente de músculo blanco de contracción rápida que abunda en las patas traseras de conejo. La preparación se obtiene por centrifugación diferencial tras disgregación mecánica del músculo. Contiene de forma mayoritaria membrana de RS y un bajo contenido en mitocondrias.

Los objetivos concretos que se plantean son los siguientes:

Caracterización funcional de la actividad ATPasa en ausencia de Ca^{2+}

- Efecto de la concentración de Mg^{2+} o de ATP libre sobre la actividad ATPasa.
- Efecto de la concentración de vanadato o de AMP-PNP sobre la actividad ATPasa.
- Efecto de la concentración de vanadato o de AMP-PNP sobre la velocidad de hidrólisis de pNPP.
- Efecto de la concentración de Mg^{2+} o de vanadato sobre la afinidad de unión de ATP a la proteína.

La hidrólisis de ATP se determina midiendo la cantidad de Pi liberado a distintos tiempos de reacción. La hidrólisis de pNPP se determina valorando el p-nitrofenol que se acumula. La unión de ATP se mide mediante técnica radiactiva y filtración de las muestras.

Estudio estructural de la conformación E_2 de SERCA

- Localización de aminoácidos en la región citosólica de la proteína.
- Determinación de distancias interatómicas entre Asp351 y aminoácidos del dominio N.
- Interacción de ATP con el dominio N de la proteína y su relación con el centro de fosforilación.

La información estructural se obtiene a partir del modelo molecular de la conformación E_2 de SERCA que está disponible en el *Protein Data Bank*.

Alteraciones del Ca^{2+} intracelular y apoptosis

El segundo objetivo general es la caracterización de procesos que provocan una elevación prolongada del Ca^{2+} citosólico. Esta situación es una señal de estrés que desencadena la muerte celular por apoptosis.

En este trabajo se ha utilizado una línea celular de mioblastos (H9c2) procedente de tejido embrionario de corazón de rata. El modelo de células aisladas tiene la ventaja de eliminar la influencia de efectos externos tales como las respuestas hormonal e inflamatoria. Es un modelo apropiado para estudiar los objetivos concretos que aquí se plantean.

Caracterización de flujos y depósitos de Ca^{2+} en células H9c2

- Visualización de Ca^{2+} citosólico, Ca^{2+} mitocondrial y $\Delta\Psi_m$ mediante microscopía confocal.
- Señales citosólicas de Ca^{2+} inducidas por VP, TG o BHQ.
- Efecto de CCCP sobre la señal citosólica de Ca^{2+} y el $\Delta\Psi_m$.
- Respuesta de depósitos intracelulares de Ca^{2+} y del $\Delta\Psi_m$ a agentes que movilizan Ca^{2+}.
- Respuesta del Ca^{2+} mitocondrial a agentes que movilizan Ca^{2+}.

Las medidas se realizan con ayuda de indicadores fluorescentes como Fluo-3 y Fura-2 para estudiar Ca^{2+} citosólico, Rhod-2 para estudiar Ca^{2+} mitocondrial y TMRM para valorar $\Delta\Psi_m$.

Relación entre señales citosólicas de Ca^{2+} generadas por TG y muerte celular por apoptosis

- Señales citosólicas de Ca^{2+} inducidas por TG 10 μM: efecto de la composición del medio extracelular.
- Respuesta de depósitos intracelulares de Ca^{2+} a agentes que movilizan Ca^{2+}: efecto de la composición del medio extracelular.

- Efecto de TG 10 μM sobre Ca^{2+} mitocondrial y $\Delta\Psi_m$.
- Efecto de TG sobre viabilidad celular, condensación y fragmentación de material genético y pérdida de contenido en DNA.
- Efecto de TG sobre fragmentación de PARP.

La señal citosólica de Ca^{2+} se estudia con los indicadores Fluo-4 y Fura-2. La viabilidad celular se analiza midiendo la capacidad reductora de las mitocondrias. El proceso de apoptosis valorando condensación y fragmentación de cromatina mediante microscopía de fluorescencia y pérdida de material genético por citometría de flujo. La ejecución del programa apoptótico se estudia midiendo la ruptura específica de PARP que cataliza casp 3.

Estudio del estrés irreversible del RSE como inductor de muerte apoptótica

- Efecto de inductores de estrés en el RSE sobre viabilidad celular.
- Efecto de inductores de estrés en el RSE sobre liberación de cit c al citosol y $\Delta\Psi_m$.
- Efecto de inductores de estrés en el RSE sobre activación y translocación de Bax.
- Efecto de inductores de estrés en el RSE sobre activación de caspasas y dependencia de agentes moduladores.

La situación de estrés en el RSE se induce exponiendo células a TG 3 μM—que inhibe a SERCA— o a TM —que inhibe la glicosilación de proteínas. La viabilidad celular se estudia valorando la actividad reductasa mitocondrial. El $\Delta\Psi_m$ se determina con indicador fluorescente y técnica de citometría de flujo. Los parámetros de apoptosis: cit c en citosol, activación de caspasas y traslocación de Bax a la mitocondria se analizan por técnica inmunológica tras separación y electrotransferencia de proteínas. La activación de Bax se estudia con anticuerpo específico para la forma activa y microscopía confocal de fluorescencia.

Estudio del daño mitocondrial como inductor de muerte por apoptosis

- Efecto de inductores de daño mitocondrial sobre viabilidad celular.
- Efecto de inductores de daño mitocondrial sobre liberación de cit c al citosol y $\Delta\Psi_m$.

- Efecto de inductores de daño mitocondrial sobre translocación de Bax a la mitocondria.
- Efecto de inductores de daño mitocondrial sobre activación de caspasas y dependencia de agentes moduladores.
- Efecto de inductores de daño mitocondrial sobre morfología celular y apariencia del material genético.

El daño mitocondrial se induce exponiendo células a ST o a una concentración elevada de TG como 10 μM. La viabilidad celular se estudia mediante el ensayo con MTT. La valoración del $\Delta\Psi_m$ se realiza con indicador fluorescente y citometría de flujo. La liberación de cit c, activación de caspasas y translocación de Bax a la mitocondria se estudia mediante inmunodetección después de someter las proteínas a separación electroforética y electrotransferencia. La morfología celular se analiza por microscopía de contraste de fases y la apariencia del material genético por microscopía confocal de barrido.

2

Protocolos, técnicas y materiales....

Solitude. David Lorenz Winston

MANIPULACIÓN DE CÉLULAS EN CULTIVO

El crecimiento *in vitro* de células eucarióticas es relativamente lento mientras que el de bacterias, hongos y levaduras es mucho más rápido. Por tanto, uno de los problemas más graves cuando se trabaja con cultivos celulares es el de la contaminación por microorganismos. Este tipo de contaminación puede provocar la muerte del cultivo en poco tiempo. Por ello es recomendable hacer un seguimiento al microscopio de las características del cultivo para detectar posibles contaminaciones o cambios espontáneos en el fenotipo. La fuente de contaminación más frecuente es el aire. El éxito del cultivo se basa fundamentalmente en mantener condiciones de asepsia rigurosa utilizando material esterilizado y trabajando en ambiente estéril.

El material fungible esterilizado se guarda en recipientes bien cerrados que se almacenan en la sala de cultivos y que solo se abren y cierran dentro de la cabina de flujo laminar.

El material de vidrio se esteriliza en un autoclave modelo AE-75 DRY (*Raypa*) a 121 ºC durante 20 min. Al final del proceso se programa una fase de secado de 30 min. El resto de material fungible, incluyendo las cajas que contienen las puntas de pipeta, se esteriliza en las mismas condiciones pero sin secado.

Las disoluciones que carecen de componentes termosensibles se esterilizan en el autoclave —121 ºC durante 20 min — sin ciclo de secado. Los medios con componentes termosensibles se esterilizan con unidades de filtración estériles Millex® GV (*Millipore*).

Las células se mantienen a 37 ºC en fase de crecimiento exponencial utilizando un incubador de CO_2 modelo Hera cell (*Heraeus*). El contenido en CO_2 se ajusta al 5 % y la humedad relativa que proporciona el baño de agua es ≥ 95 %.

Todas las manipulaciones de congelación, descongelación, cambio de medios, subcultivos, etc. se realizan en una cabina de flujo laminar vertical modelo AV 100 (*Telstar*) con caudal de filtración de 1.000 m^3 de aire esterilizado/h.

La separación/recuperación de células descrita en los distintos protocolos se realiza con un rotor 8179 y centrífuga refrigerada modelo Labofuge 400R (*Heraeus*).

La observación rutinaria de los cultivos se hace con un microscopio invertido modelo DM IL (*Leica Microsystems*). La incorporación de una cámara digital DC300F (*Leica*) y su conexión a un ordenador permite observar las imágenes en un monitor.

La cabina de flujo laminar, el incubador de CO_2 y la sala de cultivos se someten a una limpieza periódica cada siete días.

Trabajo en cabina de flujo laminar

Procedimiento

1. Poner en funcionamiento la cabina y limpiar la superficie de trabajo con etanol al 70 %.
2. Poner el material y equipo necesario dentro de la cabina. No obstaculizar los flujos de aire.
3. Encender la lámpara de luz UV y dejar actuar durante al menos 15 min antes de empezar a trabajar.
4. Ponerse guantes desechables de látex, pulverizarse con etanol al 70 % y dejar secar al aire durante 30 s antes de empezar a trabajar. No contaminar los guantes tocando alguna superficie fuera de la cabina. Si así fuera, repetir el paso 4.
5. Al terminar, desinfectar de nuevo la superficie de trabajo con etanol al 70 %.

Descongelación y cultivo de H9c2

H9c2 es una línea celular procedente de ventrículo cardíaco de embrión de rata que fue establecida por Kimes y Brandt (1976). Estas células —mioblastos— tienen apariencia fusiforme y longitud próxima a 100 μm cuando crecen en monocapa (Fig. 2.1, paneles A, B y C) pero tienden a fusionarse para formar células multinucleadas muy largas —miotubos— que se apilan y dan estructuras tridimensionales (Fig. 2.1, paneles D, E y F).

La confluencia del cultivo provoca la formación de miotubos, proceso que se ve favorecido al bajar la concentración de suero del 10 al 1 %. La fusión de mioblastos se evita impidiendo que la confluencia del cultivo supere el 70-80 %. El tiempo de duplicación de las células en nuestras condiciones de cultivo es de unas 24 h por tanto un subcultivo por semana es suficiente para mantener la población de mioblastos.

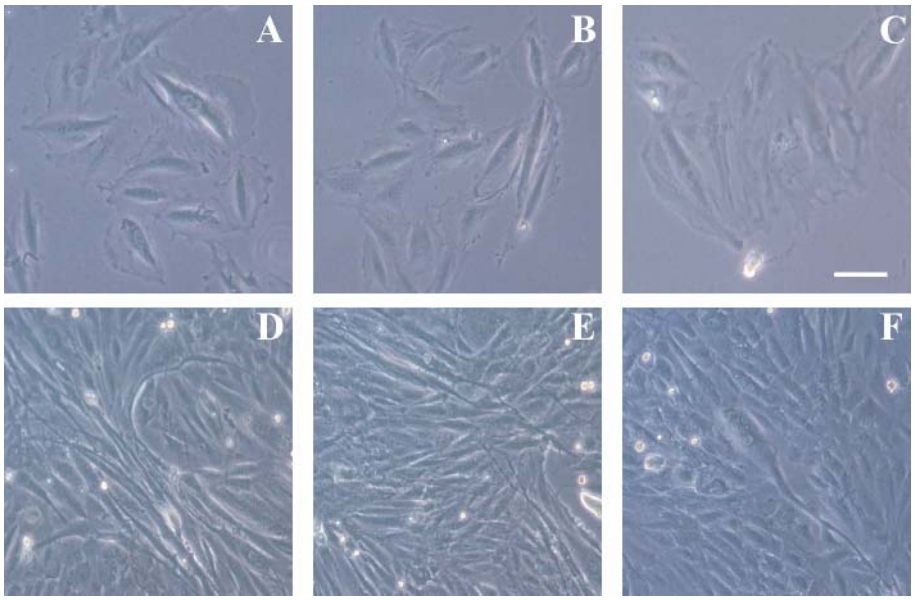


Figura 2.1. Cultivo de H9c2 observado mediante contraste de fases. Los mioblastos muestran una estructura fusiforme típica cuando crecen en monocapa. Las imágenes en A, B y C corresponden a un cultivo de tres días. Cuando el cultivo se prolonga más de una semana y el porcentaje de confluencia se acerca al 100 % se produce la fusión de los mioblastos dando lugar a células multinucleadas, largas y ramificadas llamadas miotubos (D, E y F). Las imágenes están tomadas con un objetivo 10×. (Datos propios). El tamaño de la barra en el panel C es 50 μm.

Equipamiento necesario

- Baño de agua a 37 ºC
- Bomba de vacío
- Cabina de flujo laminar
- Incubador de CO_2
- Micropipeta de 1 ml

Material estéril

- Caja con puntas de pipeta
- Frasco de cultivo de 75 cm^2
- Pipetas de vidrio de 10 ml y pipetas Pasteur de vidrio

Muestra y medios

- Criotubo con células H9c2
- Medio de cultivo completo (véase pág. 102)

Procedimiento

1. Sacar el criotubo del depósito de nitrógeno líquido y sumergirlo inmediatamente en el baño de agua. Mantener el criotubo en el baño agitándolo suavemente hasta que se descongele. Llevarlo a la cabina de flujo laminar.

2. Mover el contenido del criotubo con una pipeta Pasteur y pasarlo a un frasco de cultivo de 75 cm^2. Añadir 20 ml de medio de cultivo completo.
3. Poner el frasco de cultivo en el incubador de CO_2 y dejarlo hasta el día siguiente para que las células se adhieran al frasco.
4. Retirar el medio de cultivo con las células muertas y restos celulares y añadir 10 ml de medio de cultivo nuevo.
5. Retornar y mantener el cultivo en el incubador de CO_2. Las células se subcultivan diluyendo 1:6 ó se utilizan para realizar experimentos cuando la confluencia es del 70-80 %.

Subcultivo de células

El protocolo se realiza cuando el cultivo alcanza el 70-80 % de confluencia. El número máximo de pases es de 8 ó 9 para evitar que las células sufran alteraciones fenotípicas no deseadas.

Equipamiento necesario

- Baño de agua a 37 ^oC
- Bomba de vacío
- Cabina de flujo laminar
- Centrífuga refrigerada
- Cronómetro/avisador
- Incubador de CO_2
- Micropipetas de 0'1-1 ml
- Microscopio invertido

Material estéril

- Caja con puntas de pipeta
- Frascos de 175 cm^2 o placas de cultivo
- Pipetas de vidrio (5 y 10 ml) y pipetas Pasteur de vidrio
- Tubos de 50 ml con fondo cónico y sin faldón

Muestra y medios

- Cultivo de células en monocapa
- Medio de cultivo completo
- PBS a 37 ºC
- Tripsina al 0'25 % (p/v)

Procedimiento

1. Retirar el medio de cultivo y lavar dos veces con PBS (0'2 ml/cm^2). Eliminar muy bien el medio de cultivo porque restos de suero inhiben la tripsinización posterior.
2. Precalentar la disolución de tripsina en el baño de agua y añadirla en una proporción de 0'1 ml/cm^2. Comprobar que la monocapa de células queda completamente cubierta. Incubar durante 5 min a 37 ºC.
3. Golpear ligeramente el frasco de cultivo con la palma de la mano para despegar las células adheridas. Comprobarlo con el microscopio invertido.
4. Recoger la suspensión de células y pasarla a un tubo estéril de 50 ml que se mantiene frío en un baño de hielo.
5. Añadir medio de cultivo al frasco donde se ha realizado la tripsinización en una proporción de 0'1-0'2 ml/cm^2. Aspirar el medio de cultivo con una pipeta Pasteur y proyectarlo sobre la capa de células que permanezcan adheridas, para favorecer su separación del frasco.
6. Pasar este medio al tubo de 50 ml con el resto de las células.
7. Centrifugar a 480 ×g (1.600 rpm) durante 10 min a 4 ºC en la centrífuga refrigerada.
8. Desechar el sobrenadante. Resuspender el sedimento de células en medio de cultivo usando una pipeta Pasteur. Contar las células y estimar su viabilidad mediante el método del Azul Tripán.
9. Diluir la suspensión de células en los frascos de cultivo hasta la concentración apropiada y retornar los frascos al incubador de CO_2.

Recuento y estimación de viabilidad celular

El recuento celular se lleva a cabo por el método del Azul Tripán utilizando una cámara de Neubauer. Azul Tripán es un colorante que se utiliza habitualmente en microscopía para distinguir células vivas de células muertas. Posee grupos sulfónicos que le dan carácter ácido y solubilidad en agua (véase pág. 103). El colorante no atraviesa la membrana de células intactas y por tanto solo tiñe células muertas o dañadas. Es un potencial agente cancerígeno.

La cámara de Neubauer es una placa gruesa de vidrio óptico especial con base rectangular del tamaño de un porta-objetos. La parte central lleva labradas cuatro ranuras paralelas a los lados cortos de la placa que dan lugar a tres mesetas (Fig.

2.2). La meseta central es más baja que las dos laterales y la distancia desde la superficie de la meseta central hasta la cara inferior del cubre-objetos es de 0’1 mm.

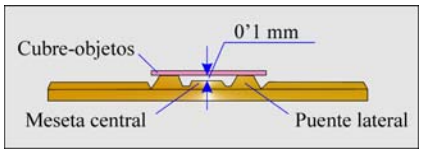


Figura 2.2. Cámara de Neubauer vista de perfil. Las cuatro ranuras de la parte central delimitan tres mesetas. La meseta central es más baja que las mesetas laterales. La distancia desde la superficie de la meseta central hasta el cubre-objetos es de 0’1 mm.

La meseta central de la cámara tiene grabadas dos redes de contaje (Fig. 2.3). Cada red está formada por nueve cuadros de 1 × 1 mm. Los cuadros de las esquinas —1, 2, 3 y 4— están a su vez formados por una cuadrícula de 0’25 × 0’25 mm. Como la superficie de un cuadro es 1 mm^2 y la distancia desde la superficie de la meseta central al cubre-objetos es 0’1 mm, el volumen de muestra será de 0’1 mm^3 lo que equivale a 0’1 μl.

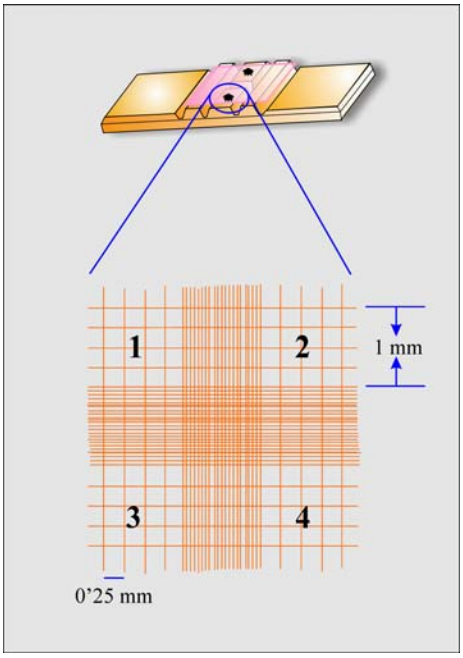


Figura 2.3. Cámara de Neubauer. Vista en perspectiva (*arriba*) y detalle ampliado de una de las redes de contaje (*abajo*). Las cuatro regiones para el contaje están marcadas como 1, 2, 3 y 4.

Equipamiento necesario

- Hemocitómetro (cámara de Neubauer)
- Micropipeta de 0'1 ml
- Microscopio invertido
- Tubo Eppendorf

Muestra y medios

- Azul Tripán al 0'4 % (v/v)
- Etanol al 70% (v/v)
- Suspensión de células en un volumen conocido

Procedimiento

1. Limpiar la cámara de Neubauer con etanol al 70 %.
2. Colocar el cubre-objetos sobre la cámara humedeciendo los bordes del cubre.
3. Poner 50 µl de la disolución de Azul Tripán en un tubo Eppendorf.
4. Agitar bien la suspensión de células y añadir 50 µl al tubo Eppendorf que contiene la disolución de Azul Tripán. Agitar la mezcla con una micropipeta sin hacer burbujas.
5. Tomar 80 µl de la suspensión de células y poner la punta de la pipeta en el borde del cubre-objetos dejando que la disolución entre en la cámara por capilaridad. No debe pasar a las ranuras laterales. Repetir la operación —lavando y secando la cámara previamente— si se forman burbujas.
6. Colocar la cámara de Neubauer en la platina del microscopio y enfocar con el objetivo 10×. Se observarán células birrefringentes que corresponden a células vivas (viables) y células teñidas de azul que corresponden a células muertas (no viables).
7. Contar células viables en cada uno de los cuadros marcados como 1, 2, 3 y 4. Obtener la media aritmética de los cuatro campos. Hacer lo mismo con las células no viables.
8. Calcular la concentración de células viables y no viables y el porcentaje de células viables teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

   A = valor medio del número de células viables

   B = valor medio del número de células no viables

   C = factor de dilución

   D = factor de conversión para expresar la concentración en células/ml. En nuestro caso 10^4 porque el volumen de muestra que se valora en cada campo es de 0'1mm^3.

De esta forma podemos calcular:

- Concentración de células viables (células/ml) = A × C × D
- Concentración de células no viables (células/ml) = B × C × D
- Número total de células viables = concentración de células viables × volumen inicial de células
- Número total de células = número de células viables + número de células muertas

Siembra de células

Una vez realizado el contaje y calculada la viabilidad de las células en suspensión se hace la siembra a una densidad de ~2×10^3 células viables/cm^2. Por tanto:

~15×10^3 células/pocillo + 0'5 ml de medio de cultivo en placas de 24 pocillos.

~2×10^4 células + 2 ml de medio de cultivo en placas de 35 mm de ∅.

~$1'5 \times 10^5$ células + 10 ml de medio de cultivo en frascos de 75 cm^2.

~$3'5 \times 10^5$ células + 15 ml de medio de cultivo en placas de 150 mm de ∅.

~$3'5 \times 10^5$ células + 20 ml de medio de cultivo en frascos de 175 cm^2.

Las placas sembradas se mueven suavemente para repartir las células por toda la superficie. Las placas se introducen después en el incubador de CO_2 donde se mantienen durante 2-5 días antes de empezar los experimentos. Todos los experimentos se realizan cuando el cultivo está al 70-80 % de confluencia.

Congelación de células

Comprobar previamente la ausencia de micoplasmas en el cultivo. Las células congeladas se mantienen siempre en nitrógeno líquido.

Equipamiento necesario

- Baño de agua a 37 °C
- Bomba de vacío
- Cabina de flujo laminar
- Cámara de Neubauer
- Centrífuga refrigerada
- Cronómetro/avisador
- Depósito de nitrógeno líquido

- Micropipetas de 0'1-1 ml
- Microscopio invertido
- Recipiente de poliestireno con alcohol isopropílico

Material estéril

- Caja con puntas de pipeta
- Criotubos de 2 ml
- Pipetas de vidrio (5 y 10 ml) y pipetas Pasteur de vidrio
- Tubos de 50 ml con fondo cónico y sin faldón

Muestra y medios

- Cultivo en monocapa de H9c2
- Medio de cultivo completo
- Me_2SO
- PBS a 37 ºC
- Suero fetal bovino
- Tripsina al 0'25 % (p/v)

Procedimiento

Una vez comprobado que el cultivo mantiene las características iniciales y no está contaminado se procede a la congelación.

1. Seguir el procedimiento para el subcultivo de células descrito antes hasta el punto 7. Después, desechar el sobrenadante y resuspender directamente el sedimento en suero fetal bovino, ajustando la concentración de células a 1-2 × 10^6 células/ml. Asegurarse de que la viabilidad celular es superior al 85 %.
2. Introducir el tubo con las células en un recipiente con hielo.
3. Añadir muy lentamente Me_2SO a la suspensión de células hasta alcanzar una concentración final del 10 % (v/v).
4. Llenar los criotubos con la suspensión de células e identificar los mismos con el nombre de la línea celular, número de pase, fecha de congelación, concentración de células y viabilidad.
5. Colocar los criotubos en un recipiente de poliestireno con alcohol isopropílico y pasar el recipiente a un ultracongelador de –80 ºC. Al día siguiente, trasladar el recipiente al depósito de nitrógeno líquido.

Descomplementación del suero

Equipamiento necesario

- Baño de agua a 56 ºC
- Cabina de flujo laminar
- Congelador de –20 ºC
- Cronómetro/avisador
- Incubador de CO_2

Material estéril

- Pipetas de vidrio de 25 ml
- Tubos de 50 ml con fondo cónico y faldón

Medios

- Suero fetal bovino

Procedimiento

1. Descongelar el suero fetal bovino almacenado a –20 ºC hasta que quede a 25 ºC.
2. Incubarlo durante 30 min a 56 ºC en el baño de agua. Mezclar bien el contenido de la botella agitándola enérgicamente cada 5 min.
3. Distribuir el suero en alícuotas utilizando tubos estériles de 50 ml y almacenarlos a –20 ºC hasta el momento de usar.

Detección de micoplasmas

Los micoplasmas son células procarióticas pequeñas —0’3 a 0’5 µm de ∅— que pueden crecer en los medios de cultivo. La contaminación suele proceder del suero o de la tripsina utilizada. Dado que la contaminación por micoplasmas no es tan evidente como la contaminación por otros microorganismos es importante realizar controles periódicos. Un aviso de posible contaminación es la aparición de gránulos oscuros en el citosol.

La técnica utilizada para su detección es la tinción de DNA con el colorante Hoestch 33258. Este colorante tiene máximos de excitación y emisión a 360 y 470 nm respectivamente. Para la observación de la muestra se utiliza un microscopio de epifluorescencia modelo DMRB (*Leica*) con cámara digital SPOT RT y programa informático SPOT RT versión 3.3 (*Diagnostic Instruments*). Los cultivos libres de micoplasmas sólo presentan fluorescencia en el núcleo de las células mientras que los cultivos contaminados también presentan fluorescencia extranuclear.

Equipamiento necesario

- Cabina de flujo laminar
- Cronómetro/avisador
- Micropipetas de 0'1-1 ml
- Microscopio de epifluorescencia

Material estéril

- Caja con puntas de pipeta
- Cubre-objetos para pocillos de 13 mm de ∅
- Placas de cultivo de 24 pocillos

Muestra y medios

- Cultivo en monocapa de células H9c2. Las células deben haber completado al menos dos subcultivos en ausencia de antibióticos y estar semiconfluentes en el momento de realizar la tinción.
- Medio de Hank (véase pág. 99)
- Hoechst 33258 a 0'5 µg/ml. Diluir diez veces en medio de Hank. No utilizar la disolución de Hoechst 0'05 µg/ml después de 24 h.
- Fijador de Carnoy: metanol absoluto/ácido acético glacial (3:1). Prepararlo el día de su utilización.

Procedimiento

1. Colocar un cubre-objetos dentro de cada pocillo de la placa de cultivo. La densidad celular se ajusta para que las células tengan el citoplasma extendido. Sembrar ~15×10^3 células/pocillo antes de introducir la placa en el incubador de CO_2 donde se mantiene de 4 a 5 días.
2. Retirar el exceso de medio de cultivo con una pipeta Pasteur, pero sin dejar las células totalmente secas. Dejar suficiente medio para que las células queden cubiertas.
3. Fijar las células durante 5 min añadiendo 0'5 ml de fijador de Carnoy.
4. Retirar el fijador con una pipeta Pasteur.
5. Añadir de nuevo otros 0'5 ml de fijador de Carnoy y dejar actuar otros 10 min.
6. Retirar el fijador y dejar secar al aire durante 15 min.
7. Añadir 0'5 ml de Hoestch 33258 a 0'05 µg/ml e incubar en la oscuridad a 25 ºC durante 10 min.
8. Retirar el colorante y lavar tres veces con agua Milli-Q. Proteger de la luz y dejar secar al aire el agua sobrante.

9. Tomar una gota de medio de montaje y ponerla sobre la cara superior de un porta-objetos. Poner el cubre-objetos sobre el porta con la capa de células hacia abajo. Proteger de la luz y guardar a 4 ºC hasta el momento de observar la preparación.

FLUORIMETRÍA A DOBLE LONGITUD DE ONDA

La fluorescencia es una propiedad física de ciertas moléculas que son capaces de emitir luz de una determinada longitud de onda mientras se excitan con una radiación de longitud de onda menor. La aplicación de la técnica de fluorescencia utilizando doble longitud de onda para la excitación o para la emisión tiene la ventaja de que disminuye el ruido de la señal y aumenta la sensibilidad de las medidas. También elimina la influencia del equipo de medida: intensidad de excitación, anchura de rendijas, eficacia de detección, etc. Resulta especialmente útil para eliminar artefactos en medidas de fluorescencia intracelular. Corrige efectos relacionados con el nivel de carga del indicador, salida pasiva del indicador después de la carga, fotoblanqueado, concentración de células en la medida, etc.

La Fig. 2.4 muestra el esquema de un espectrofluorímetro de doble longitud de onda de excitación.

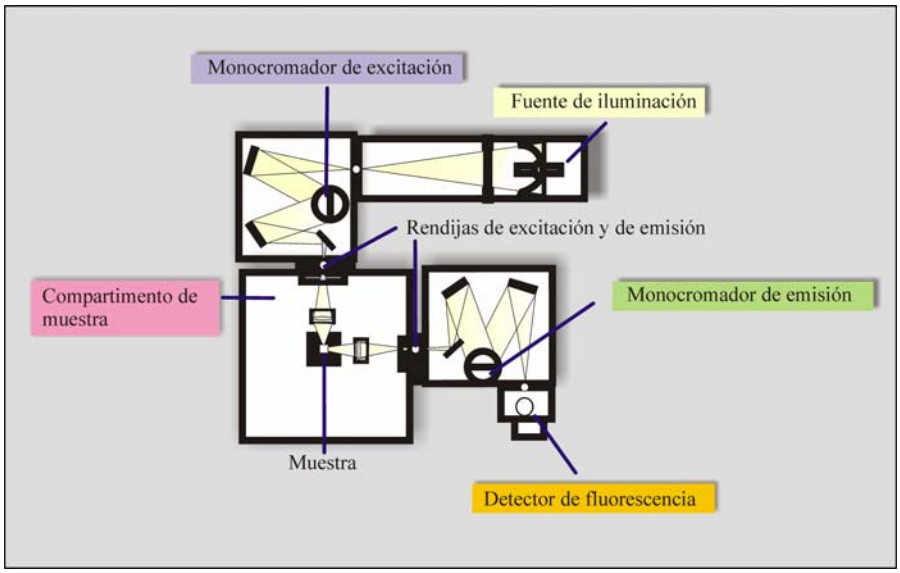


Figura 2.4. Espectrofluorímetro de doble longitud de onda. La trayectoria de la luz se muestra en color amarillo. Ver texto para la descripción de los componentes.

Fuente de iluminación

La fuente luminosa es un arco de xenon de 150 vatios que proporciona una alta intensidad de iluminación. La luz atraviesa los distintos elementos del equipo mediante un sistema de espejos y lentes. Detrás de la lámpara hay una pantalla reflectora que potencia la iluminación. La intensidad de la fluorescencia es proporcional a la intensidad de la luz incidente.

Monocromador de excitación

La luz de la fuente llega al monocromador de excitación donde se selecciona una determinada longitud de onda. El equipo permite seleccionar dos longitudes de onda distintas y cambiar de forma alternativa de una longitud de onda a otra a intervalos de 1 s. Una rendija selecciona el ancho de banda de la radiación que sale del monocromador.

Compartimento de muestra

Las dos luces monocromáticas de excitación llegan a la muestra a través de una lente convergente que se encarga de concentrar la luz en un punto de la cubeta. El compartimento donde se sitúa la cubeta dispone de un agitador magnético para evitar que las células sedimenten durante la medida. También tiene un sistema de termostatización conectado a un baño de agua para mantener un control preciso de la temperatura.

Monocromador de emisión

Este monocromador selecciona la longitud de onda de la luz emitida por la muestra que llega al detector. Una rendija selecciona el ancho de banda de la luz emitida.

Detector de fluorescencia

El detector recibe los fotones de la luz emitida y los convierte en electrones al tiempo que amplifica la señal. El detector más utilizado es del tipo tubo fotomultiplicador que convierte los fotones incidentes en electrones por efecto fotoeléctrico. La amplificación puede regularse variando el voltaje aplicado al tubo fotomultiplicador. La corriente resultante es directamente proporcional a la fluorescencia de la muestra.

Características del fluorocromo Fura-2

Fura-2 es un indicador fluorescente de carácter ácido (véase pág. 104), desarrollado por Tsien y otros (1985) y que es ampliamente utilizado en estudios cuantitativos de Ca^{2+} citosólico.

El espectro de excitación de Fura-2 tiene un máximo a 363 nm que se desplaza hasta ~335 nm al aumentar la concentración de Ca^{2+} (Fig. 2.5). Dicho de otro modo, la presencia de Ca^{2+} produce un desplazamiento a la izquierda del espectro de excitación de Fura-2 pero no altera la intensidad de la fluorescencia. Esto significa que el cociente de la fluorescencia medida a dos longitudes de onda de excitación diferentes es independiente de los valores absolutos de la fluorescencia. Por tanto, distintas medidas realizadas de esta forma —en el denominado modo *ratio*— pueden ser comparadas entre sí aunque la intensidad de fluorescencia de las muestras no sea la misma. Esto no es válido para indicadores como Fluo-3 que responden a la presencia de Ca^{2+} modificando la intensidad de la fluorescencia. En este caso, el cociente de la fluorescencia sí depende de los valores absolutos de la intensidad.

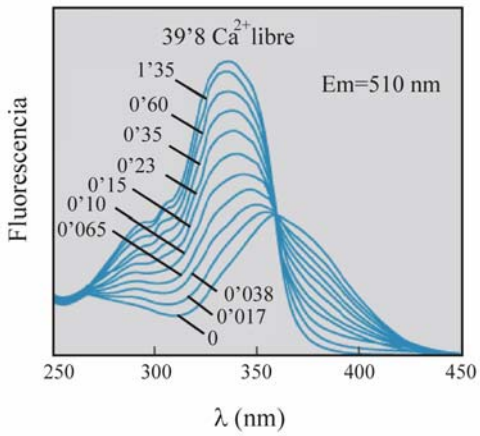


Figura 2.5. Espectro de excitación de Fura-2 en presencia y ausencia de Ca^{2+}. La presencia de Ca^{2+} desplaza el máximo del indicador a longitudes de onda más cortas. Este indicador es adecuado para realizar medidas cuantitativas de Ca^{2+}. (Tomado de *The Handbook, a guide to fluorescent probes and labeling technologies*. Molecular Probes™).

Las condiciones óptimas para medir la respuesta del indicador Fura-2 al Ca^{2+} se consiguen seleccionando una longitud de onda de excitación en la que se produce el mayor aumento de la señal (340 nm) y otra longitud de onda en la que se produce

un descenso de la señal (380 nm). La emisión de la fluorescencia se fija en el máximo (510 nm).

Carga de células con Fura-2

La membrana plasmática es impermeable a Fura-2. Sin embargo, la esterificación de los grupos carboxilato del indicador para formar el derivado AM (véase pág. 104) aumenta la permeabilidad de la molécula aunque le hace perder la capacidad para unir Ca^{2+}.

El compuesto Fura-2/AM atraviesa pasivamente la membrana plasmática y una vez dentro de la célula se hidroliza por esterasas intracelulares para generar la forma ácida del indicador que es sensible al Ca^{2+}. La inclusión de ácido plurónico —un detergente no iónico— en el medio de carga facilita la disolución del derivado éster del indicador en el medio de carga.

El uso del derivado permeable evita la utilización de técnicas de carga invasivas tales como la microinyección pero puede dar lugar a algunos problemas. Por ejemplo: hidrólisis incompleta del derivado AM debido a una baja actividad de las esterasas, compartimentalización durante la carga que hace que el indicador se acumule en los orgánulos intracelulares —proceso que se activa al aumentar la temperatura y/o el tiempo de carga— así como salida pasiva de la forma ácida del indicador. Este último efecto se puede minimizar añadiendo al medio un inhibidor del transporte de aniones como es sulfinpirazona.

Equipamiento necesario

- Agitador vórtex
- Baño de agua a 37 ^{o}C
- Bomba de vacío
- Cabina de flujo laminar
- Centrífuga refrigerada
- Cronómetro/avisador
- Incubador de CO_2
- Micropipetas de 0’1-1 ml

Material estéril

- Caja con puntas de pipeta
- Filtros Millex® GV
- Pipetas de vidrio de 5 y 10 ml

- Tubos de 15 ml con fondo cónico y sin faldón

Muestra y medios

- Me_2SO anhidro
- Ácido plurónico® F-127 al 20 % (p/v). Disolver 1 g de ácido plurónico en 5 ml de Me_2SO anhidro. Calentar a 40 ºC durante 20 min para facilitar la disolución.
- Cultivo en monocapa de H9c2
- ECM con Ca^{2+} (véase pág. 100)
- Fura-2/AM 2 mM. Tomar 50 µg del indicador y disolver en 25 µl de Me_2SO anhidro. Preparar en el momento de usar. Mantenerlo a temperatura ambiente y en la oscuridad.
- PBS a 37 ºC
- Tripsina al 0'25 % (p/v)

Procedimiento

Para cada experimento se siembra una placa de 150 mm de ∅ con $3'5 \times 10^5$ células y 15 ml de medio de cultivo completo. El cultivo se mantiene en el incubador de CO_2 hasta alcanzar una confluencia del 70-80 %.

1. Preparar el medio de carga mezclando 10 µl de ácido plurónico al 20 % (p/v) y 10 µl de Fura-2/AM 2 mM y añadir 10 ml de ECM con Ca^{2+}. Mezclar bien con ayuda de un vórtex. La composición final del medio de carga es: Fura-2/AM 2 µM en ECM con Ca^{2+} conteniendo ácido plurónico 0'02 % (p/v). Mantener a 37 ºC en baño de agua y protegido de la luz hasta el momento de usar.
2. Aspirar el medio de cultivo de la placa y lavar las células dos veces con PBS.
3. Añadir 10 ml de ECM con Ca^{2+} a la placa y dejar durante 30 min a 37 ºC para estabilizar y equilibrar los gradientes iónicos.
4. Aspirar el ECM con Ca^{2+} de la placa y añadir 10 ml de medio de carga. Incubar durante 30 min a 37 ºC en ausencia de luz.
5. Aspirar el medio de carga y lavar dos veces con ECM con Ca^{2+}. Despegar las células por tripsinización (véase pág. 38) y resuspenderlas a una concentración de $2\text{-}4 \times 10^6$ células/ml en ECM con Ca^{2+}.
6. Mantener las células en suspensión durante 30 min a 25 ºC para permitir la desesterificación del indicador. Utilizar las células durante un espacio de tiempo no superior a 3 h.

Medida de Ca^{2+} citosólico usando Fura-2

El experimento consiste en diluir diez veces la suspensión de células cargadas con Fura-2 en la cubeta de medida utilizando ECM con Ca^{2+} o ECM con EGTA como medio de dilución. Estos medios —al igual que el medio de carga del indicador— llevan siempre sulfinpirazona 0'2 mM. Cuando se utiliza ECM con EGTA como medio de dilución las células quedan sin Ca^{2+} libre tras la dilución. Por tanto, una posible salida pasiva del indicador al medio externo no dará señal extracelular de fluorescencia.

Cuando el medio de dilución es ECM con Ca^{2+} se utilizan dos estrategias para eliminar la fluorescencia debida a la salida de Fura-2:

- Centrifugar las células cargadas con el indicador a 480 ×g durante 10 min a 4 ºC y resuspenderlas en ECM con Ca^{2+} inmediatamente antes de empezar las medidas.
- Incluir $NiCl_2$ 10 mM en el medio de dilución ECM con Ca^{2+}. La elevada concentración de Ni^{2+} apaga la fluorescencia del Fura-2 extracelular en presencia de Ca^{2+}.

Las muestras se excitan a 340 y 380 nm y la longitud de onda de la emisión es 510 nm. El ancho de banda de las rendijas es de 4 nm y la sensibilidad de la detección es del 60 %. El compartimento de la muestra está situado sobre un agitador magnético y los reactivos se añaden a la cubeta con micropipetas a través de un orificio practicado en la tapa del compartimento de la muestra. El fluorímetro toma valores alternativos de F_{340} y F_{380} cada segundo y calcula de forma automática el cociente F_{340} /F_{380}.

Las medidas se realizan a 25 ºC en un espectrofluorímetro de doble longitud de onda Aminco-Bowman serie 2 usando la versión 5.00 del programa informático *AB2 Luminiscence Spectrometer*.

La Fig. 2.6 muestra señales de fluorescencia obtenidas en un espectrofluorímetro de doble longitud de onda.

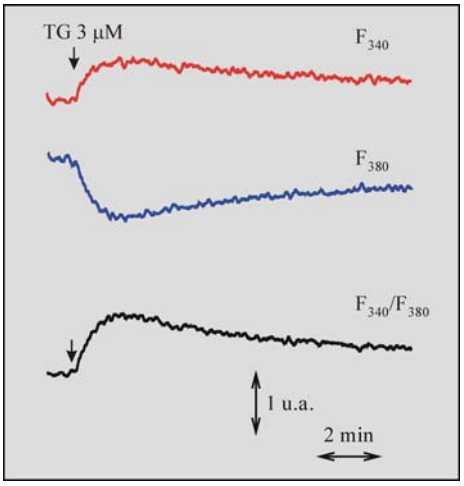


Figura 2.6. Señales de fluorescencia antes y después de añadir TG. Una alícuota de células H9c2 conteniendo Fura-2 2 μM se diluyó diez veces en ECM con Ca^{2+} para dar ~2-4 × 10^5 células/ml. La adición posterior de TG 3 μM se indica con una flecha. El registro superior (*trazo rojo*) corresponde a la señal de fluorescencia cuando la muestra se excita a 340 nm. El registro central (*trazo azul*) corresponde a la fluorescencia emitida cuando se excita a 380 nm. El registro inferior (*trazo negro*) corresponde al cociente de las dos señales anteriores. (Datos propios).

Equipamiento necesario

- Agitador vórtex
- Baño de agua a 37 °C
- Bomba de vacío
- Cabina de flujo laminar
- Centrífuga refrigerada
- Cubetas de cuarzo 10 × 10 mm para fluorímetro
- Espectrofluorímetro Aminco-Bowman
- Incubador de CO_2
- Micropipetas de 0'1-1 ml

Material estéril

- Caja con puntas de pipeta
- Filtros Millex® GV
- Pipetas de vidrio de 5 y 10 ml
- Tubos de 15 ml con fondo cónico y sin faldón

Muestra y medios

- Suspensión de 2-4 × 10^6 células/ml cargadas con Fura-2
- ECM con Ca^{2+} (véase pág 100)
- ECM con EGTA (véase pág. 100)

- EGTA 0'5 M
- $NiCl_2$ 2 M
- PBS a 37 ^oC
- Tripsina al 0'25 % (p/v)
- TX-100 al 20 % (v/v)

Procedimiento

1. Poner 1'8 ml de ECM con Ca^{2+} en la cubeta de medida y situarla dentro del fluorímetro. Incorporar una barra magnética para agitar muy lentamente el contenido de la cubeta.
2. Añadir 0'2 ml de la suspensión celular cargada con Fura-2 (~2-4 × 10^6 células/ml). La concentración de células tras la mezcla será de ~2-4 × 10^5 células/ml. Registrar la señal de fluorescencia.
3. Añadir el agente que quiera estudiarse en el menor volumen posible.
4. Realizar la calibración de la señal como se indica en el apartado siguiente.

Calibración de las medidas de fluorescencia

La calibración de la señal fluorescente se realiza al final de cada experimento estableciendo condiciones de Ca^{2+} saturante y ausencia de Ca^{2+} libre para determinar los valores de $R_{máx}$, $R_{mín}$ y Q (Fig. 2.7).

Procedimiento

1. Añadir 20 µl de TX-100 al 20 % (v/v) a la cubeta de medida que contiene 2 ml de la suspensión celular en ECM con Ca^{2+} para lisar las células. La concentración de TX-100 tras la adición es de 0'2 % (v/v).
2. Medir el cociente de fluorescencia F_{340} /F_{380} en estas condiciones saturantes de Ca^{2+} (R_{max}).
3. Añadir EGTA 40 mM a la misma cubeta. Medir ahora el cociente F_{340} /F_{380} en estas condiciones de ausencia de Ca^{2+} libre (R_{min}).
4. Calcular Q = F_{380} con Ca^{2+} saturante /F_{380} en ausencia de Ca^{2+} libre.
5. Determinar la autofluorescencia en un experimento independiente midiendo F_{340} y F_{380} en células sin Fura-2. Restar esta fluorescencia a todas las medidas y a los valores de calibración antes de calcular los cocientes para cada longitud de onda.

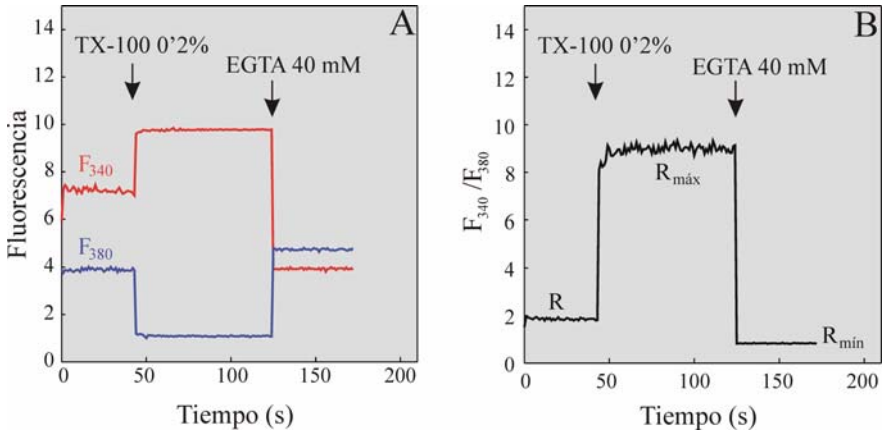


Figura 2.7. Calibración del indicador Fura-2. Una vez realizadas las medidas pertinentes en medio ECM con Ca^{2+} se añade TX-100 al 0'2 % (v/v) para establecer condiciones saturantes de Ca^{2+}. El cociente F_{340} /F_{380} corresponde al valor R_{max}. Después se añade EGTA 40 mM para establecer condiciones de ausencia de Ca^{2+} libre. El cociente F_{340} /F_{380} determina el valor de R_{min}. (A) Registros obtenidos al excitar las muestras a 340 nm (*trazo rojo*) ó 380 nm (*trazo azul*). (B) Registro de la señal F_{340}/F_{380} (*trazo negro*). (Datos propios).

Cálculo de K_d para Ca^{2+}-Fura-2

El valor de K_d determina el intervalo de la concentración de ligando en el que el indicador da una respuesta válida. Ese intervalo corresponde a concentraciones de ligando que se encuentren entre 0'1 y 10 veces el valor de K_d.

Los valores de K_d que proporciona la bibliografía suelen estar calculados en medios acuosos sin células, sin embargo, los valores de K_d son dependientes de distintos factores como: temperatura, pH, viscosidad del medio, fuerza iónica, concentración de proteínas y concentración de otros cationes divalentes. Como los valores de K_d calculados *in vitro* son menores que los calculados *in situ* se suele utilizar datos tabulados para corregirlos. Este procedimiento es solo aproximado por lo que es recomendable hacer la determinación de K_d en las condiciones concretas en las que se van a realizar los experimentos.

La determinación de K_d requiere hacer medidas de Ca^{2+} citosólico modificando el protocolo descrito anteriormente. En este caso, la alícuota de células cargadas con Fura-2 se diluye diez veces en ECM con EGTA para establecer condiciones de ausencia de Ca^{2+} libre. Después se lisan las células para provocar la liberación completa del indicador y a continuación se añaden sucesivas alícuotas de Ca^{2+} para medir los correspondientes aumentos de fluorescencia.

Procedimiento

1. Poner 1'8 ml de ECM con EGTA en la cubeta de medida y situarla en el fluorímetro. Incorporar una barra magnética para poder agitar muy lentamente el contenido evitando que sedimenten las células.
2. Añadir 0'2 ml de la suspensión celular cargada con Fura-2 (~2-4 × 10^6 células/ml). Registrar la señal de fluorescencia.
3. Incorporar 20 µl de TX-100 al 20 % (v/v) y mezclar bien agitando para dar una concentración final de 0'2 % (v/v).
4. Añadir sucesivos volúmenes de $CaCl_2$ para conseguir los siguientes valores de pCa: 8'3, 7'3, 6'7, 6'5, 6'2, 6'0, 5'5, 5'0 y 4'0.
5. Representar los valores de F_{340} /F_{380} en función del pCa. Determinar el valor de K_d en la gráfica (Fig. 2.8).

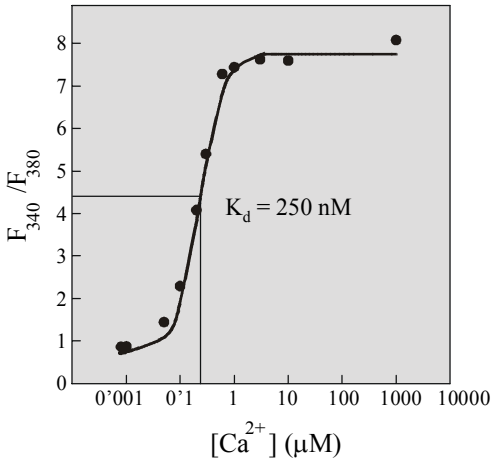


Figura 2.8. Determinación de K_d para el complejo Ca^{2+}-Fura-2. Las células H9c2 cargadas con Fura-2 y suspendidas en ECM con EGTA se lisaron con TX-100 al 0'2 % (v/v) antes de añadir sucesivos volúmenes de Ca^{2+}. El valor calculado de K_d es 250 nM.

Cuantificación del Ca^{2+} citosólico

La concentración de Ca^{2+} libre en el citosol se puede determinar aplicando la ecuación descrita por Grynkiewicz y otros (1985):

$$\left[Ca^{2+}\right]=K_d \times Q \times \frac{(R-R_{mín})}{(R_{máx}-R)}$$

donde R es el cociente F_{340} /F_{380}. $R_{máx}$ y $R_{mín}$ son los valores F_{340}/F_{380} medidos en condiciones de Ca^{2+} saturante y en ausencia de Ca^{2+} libre, respectivamente y Q es una constante que se obtiene del cociente F_{380} en condiciones saturantes de Ca^{2+} /F_{380} en ausencia de Ca^{2+} libre. El valor de K_d para el complejo Ca^{2+}-Fura-2 es el calculado, 250 nM.

Valoración del Fura-2 compartimentalizado

La compartimentalización del indicador se estudió después de cargar las células a 37 ^{o}C con Fura-2 empleando dos tiempos de carga diferentes. El procedimiento requiere determinar la concentración de Ca^{2+} en la fracción soluble y en la fracción de membranas.

Equipamiento necesario

- Agitador vórtex
- Baño de agua a 37 ºC
- Bomba de vacío
- Cabina de flujo laminar
- Centrífuga refrigerada
- Cronómetro/avisador
- Cubetas de cuarzo para fluorescencia
- Espectrofluorímetro Aminco-Bowman
- Incubador de CO_2
- Micropipetas de 0'1-1 ml

Material estéril

- Caja con puntas de pipeta
- Filtros Millex® GV
- Pipetas de vidrio de 5 y 10 ml
- Tubos Eppendorf
- Tubos de 15 ml con fondo cónico y sin faldón

Muestra y medios

- Ácido plurónico
- Cultivo en monocapa de H9c2
- ECM con Ca^{2+} (véase pág. 100)
- Fura-2/AM
- Me_2SO anhidro
- PBS a 37 ^{o}C
- Tripsina al 0'25 % (p/v)
- TX-100 al 20 % (v/v)

Procedimiento

1. Cargar las células a 37 ºC con el indicador Fura-2 durante 10 ó 30 min tal como se ha descrito antes.

2. Poner ~5 × 10^5 células en un tubo Eppendorf y completar el volumen a 1 ml con ECM con Ca^{2+}.
3. Añadir digitonina 50 µg/ml a la suspensión e incubar 5 min a 37 ºC en un baño de agua. La concentración de digitonina es suficiente para que más del 95 % de las células se tiñan al añadir Azul Tripán al 0'4 %.
4. Centrifugar las células a 480 ×g durante 10 min a 4 ºC.
5. Recoger el sobrenadante (1 ml) y pasarlo a una cubeta de fluorescencia. Completar el volumen a 2 ml añadiendo ECM con Ca^{2+}.
6. Añadir 20 µl de TX-100 al 20 % (v/v) para dar una concentración final de 0'2 % (v/v) y registrar la fluorescencia a 340 nm para determinar el Fura-2 que hay en el citosol. Hacerlo para los dos tiempos de carga.
7. Resuspender el sedimento de células en 2 ml de ECM con Ca^{2+}. Añadir 20 µl de TX-100 al 20 % (v/v) y registrar la señal de fluorescencia a 340 nm para determinar el Fura-2 que se ha compartimentalizado. Hacerlo para los dos tiempos de carga.
8. Representar los resultados en forma de porcentaje siendo el 100 % la suma de la fluorescencia de sobrenadante y sedimento. Los resultados muestran alta acumulación de Fura-2 en el citosol y baja compartimentalización a los 10 min. La prolongación del tiempo de carga a 30 min aumenta ligeramente la incorporación de la sonda fluorescente pero no varía su distribución (Fig.2.9).

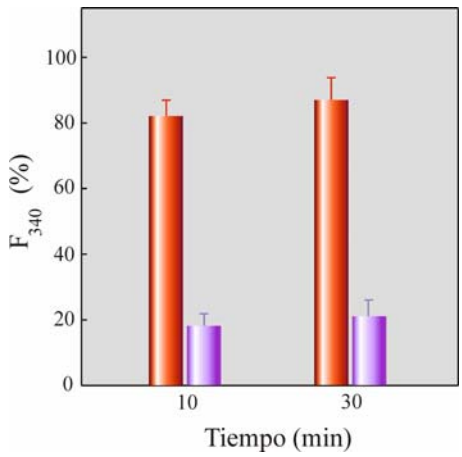


Figura 2.9. Efecto del tiempo sobre la compartimentalización de Fura-2. Las células se cargaron a 37 ºC con Fura-2 durante 10 ó 30 min. El Fura-2 en el citosol se representa con barras rojas. El Fura-2 que se ha compartimentalizado se representa con barras moradas. Los resultados se expresan en porcentaje siendo el 100 % la suma de la fluorescencia a 340 nm que se mide en el sobrenadante más la del sedimento.

Esta técnica fluorimétrica también se utiliza para medidas de Ca^{2+} mitocondrial usando el indicador Rhod-2 (véase pág. 105/134), y de Ψ_m usando TMRM (véase pág. 106/134).

MICROSCOPÍA DE EPIFLUORESCENCIA

Se trata de una modificación de la microscopía convencional donde la luz incidente que ilumina y la luz emitida por la muestra —fluorescencia— viajan a través del objetivo. Por tanto es esencial que los elementos ópticos del microscopio separen muy bien ambos componentes. Esto permite que la señal de fondo al medir la fluorescencia sea baja.

Resulta ventajoso para el estudio de células que se encuentran adheridas a placas de cultivo o porta-objetos porque la luz incidente no tiene que atravesar la muestra y el soporte sólido sino que llega a las células por la misma cara por donde se recoge la fluorescencia.

La Fig. 2.10 muestra el esquema de un microscopio de epifluorescencia.

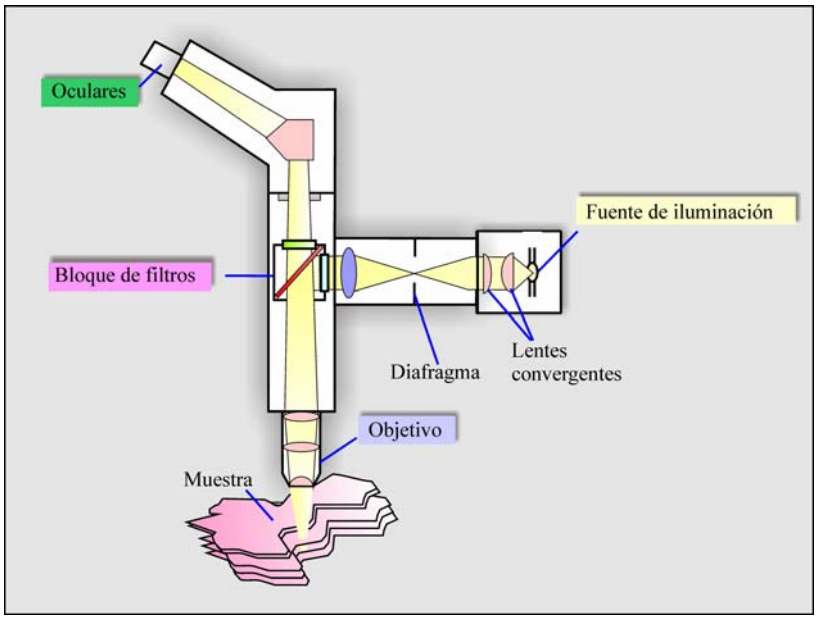


Figura 2.10. Microscopio de epifluorescencia. Diagrama esquemático donde se muestra la trayectoria de la luz en color amarillo. Los elementos más característicos del microscopio se describen en el texto.

Fuente de iluminación

La fuente de iluminación es habitualmente una lámpara de arco de mercurio de 150 vatios.

Bloque de filtros

Este elemento esencial del microscopio está formado por: filtro de excitación, espejo dicroico y filtro de emisión (Fig. 2.11).

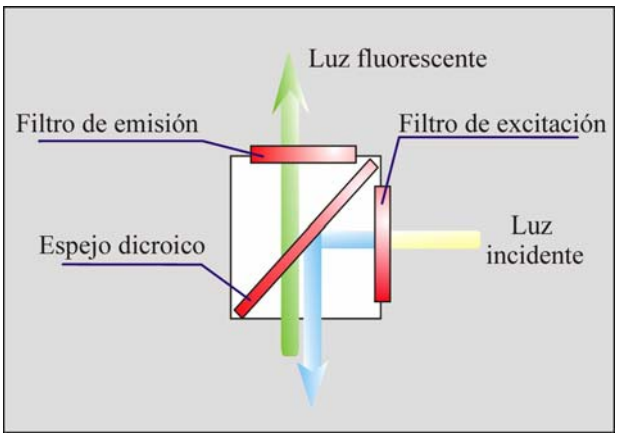


Figura 2.11. Esquema de un bloque de filtros. La luz incidente (*amarillo*) entra en el bloque a través de un filtro que selecciona la longitud de onda de excitación (*azul*). La luz monocromática se refleja en el espejo dicroico antes de llegar a la muestra. La luz emitida —que es de mayor longitud de onda que la de excitación— no se refleja sino que atraviesa el espejo dicroico y llega a un segundo filtro donde se selecciona la longitud de onda de emisión (*verde*) antes de llegar al sistema de detección.

El filtro de excitación es del tipo paso de banda (*band pass*). Permite el paso de una estrecha banda del espectro y bloquea con gran eficacia el paso de luz de longitudes de onda mayores o menores.

El espejo dicroico está situado entre el filtro de excitación y el filtro de emisión y se caracteriza por tener una determinada longitud de onda de transición. Lo habitual es que refleje un 90 % de la luz con longitud de onda menor que la de transición y transmita un 90 % de la luz con longitud de onda mayor que la de transición. Sirve por tanto para separar la luz de excitación de la luz de emisión. Se sitúa formando un ángulo de 45º respecto al rayo de luz incidente.

El filtro de emisión es un filtro de corte o barrera (*cut off* o *long pass*) que sirve para seleccionar la longitud de onda de la luz que emite la muestra.

La elección del bloque de filtros depende del fluorocromo que se desee detectar.

Objetivo

El objetivo es un pequeño cilindro que contiene lentes convergentes. La lente inferior es plano-convexa y tiene una distancia focal muy corta. Las otras lentes que se acoplan encima tienen como misión corregir aberraciones. El objetivo en un microscopio de epifluorescencia actúa primero como un condensador —iluminando la muestra— pero también capta la luz fluorescente dirigiéndola hacia los oculares o al sistema de detección. Por tanto, la luz de excitación y la de emisión comparten trayectoria óptica dentro del objetivo.

Los objetivos secos se utilizan para estudiar superficies de muestras. Los objetivos de inmersión son adecuados para captar imágenes de estructuras formadas por capas que tengan distintos coeficientes de difracción. La mejor resolución se consigue cuando el coeficiente de refracción de la muestra y el del medio de inmersión del objetivo son muy similares.

Los objetivos más adecuados son los que combinan una alta AN, una alta eficacia de transferencia óptica y carecen de aberraciones cromáticas.

Oculares

Los oculares son sistemas ópticos formados por dos lentes convergentes. La superior llamada *ocular* y la inferior llamada *de campo* están separadas por un diafragma. Son los sistemas de lentes más cercanos al ojo del observador. Están situados en la parte superior del microscopio dentro de un tubo hueco. El número de aumentos que es normalmente 10× se indica en la parte superior del mismo.

Características del fluorocromo AO

El fluorocromo AO es un colorante catiónico (véase pág. 105) con capacidad para unirse a ácidos nucleicos —tanto si tienen estructura nativa como desnaturalizada.

AO atraviesa pasivamente las membranas de las células y por tanto no permite distinguir células vivas de células muertas. Interacciona de forma específica con el DNA —intercalándose con la doble cadena— dando lugar a fluorescencia verde. Los espectros de excitación y emisión de AO unido a DNA con máximos a 492 y 525 nm respectivamente son similares a los de fluoresceína. AO también interacciona con el RNA a través de interacciones electrostáticas emitiendo fluorescencia roja. Cuando AO se une a RNA aparecen máximos de excitación y

emisión a 460 y 650 nm respectivamente. Esta diferencia espectral permite distinguir entre DNA y RNA mediante la fluorescencia de AO.

Detección morfológica de apoptosis

Las células se cultivan sobre cubre-objetos en placa de 24 pocillos. Se siembran ~18 × 10^3 células/pocillo en 0'5 ml de medio de cultivo completo y se dejan crecer en el incubador de CO_2 durante 4-5 días. La apariencia del material genético se estudia utilizando la tinción con AO en células previamente fijadas.

Equipamiento necesario

- Cronómetro/avisador
- Micropipeta de 1 ml
- Microscopio óptico mod. DMRB (*Leica*)
- Pinzas
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Porta-objetos de 76 × 26 mm (*Menzel-Glaser*)

Material estéril

- Caja con puntas de pipeta
- Cubre-objetos de 13 mm de ∅
- Placa de 24 pocillos (2 cm^2/pocillo)

Muestra y medios

- AO 100 μg/ml en PBS
- Cultivo de H9c2 en placa de 24 pocillos
- DMEM a 37 ºC
- Fijador de Carnoy: metanol absoluto/ ácido acético glacial (3:1). Preparar el día de su utilización.
- Formaldehído al 40 % (v/v) en agua Milli-Q
- Medio de montaje
- PBS a 37 ^oC

Procedimiento

1. Aspirar el medio de cultivo de los pocillos y lavar las células dos veces con 0'5 ml de PBS cada vez.
2. Añadir 0'5 ml de DMEM a cada pocillo. Adicionar después el agente inductor de apoptosis que corresponda y mantener el cultivo en el incubador de CO_2 el tiempo requerido por el experimento.

3. Retirar el medio de cultivo con el agente inductor de apoptosis y lavar dos veces las células con PBS.
4. El ensayo control se realiza de la misma forma pero en ausencia del agente inductor de apoptosis.

Fijación y tinción del material genético

1. Retirar el exceso de PBS sin dejar las células completamente secas. Añadir 0'25 ml de fijador de Carnoy. Incubar las células durante 5 min a temperatura ambiente.
2. Eliminar la disolución y añadir 0'5 ml de disolución de Carnoy nueva. Dejar actuar 10 min a temperatura ambiente.
3. Retirar el fijador y dejar secar al aire.
4. Diluir veinte veces AO 100 μg/ml en PBS y mezclar con formaldehído al 40 % (v/v) para que quede diluído diez veces. La composición del medio de tinción es: AO 5 μg/ml y formaldehído al 4 % (v/v) en PBS.
5. Añadir 0'5 ml de medio de tinción e incubar 10 min a temperatura ambiente y protegido de la luz.
6. Retirar la disolución del colorante y lavar tres veces con PBS. Dejar secar al aire.
7. Tomar una gota de medio de montaje y colocarla sobre el porta-objetos. Colocar el cubre-objetos —con la capa de células hacia abajo— sobre el porta. Proteger de la luz y guardar a 4 ºC hasta el momento de la observación.

Análisis de la muestra y datos técnicos

El DNA de las muestras se observa en un microscopio de epifluorescencia modelo DMRB (*Leica*). Para visualizar muestras que contengan AO se utiliza el bloque de filtros I3 formado por filtro de excitación 450-490 nm, espejo dicroico de 510 nm y filtro de emisión de 515 nm. Las imágenes se digitalizan con ayuda de una cámara digital SPOT RT (*Diagnostic Instruments, Inc.*) y después se analizan con la versión 3.3 del programa informático SPOT RT.

CITOMETRÍA DE FLUJO

Es una técnica que permite examinar propiedades ópticas de células individuales que forman parte de una población. La propiedad esencial de la citometría de flujo es que las células están en suspensión y fluyen de una en una en el momento de la medida. La detección de propiedades ópticas exige la utilización de una fuente de luz laser y el marcaje previo de las células con el/los fluorocromos de interés. Las señales analógicas de los detectores se convierten en digitales y se almacenan para su análisis posterior. Los resultados se muestran en forma de histograma cuando se estudia un solo parámetro y como representación de puntos (*dot plot*) cuando se analizan dos parámetros simultáneos. La separación física de subpoblaciones se puede conseguir aplicando carga eléctrica en el momento de la detección.

La configuración óptica de un citómetro de flujo puede variar pero la base de su funcionamiento es la misma. La Fig. 2.12 muestra el esquema de uno de estos aparatos.

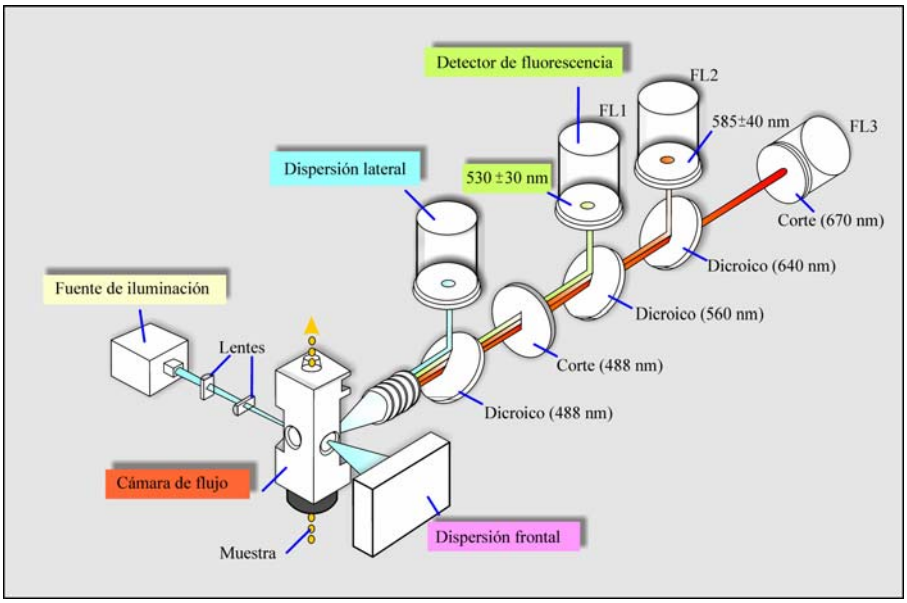


Figura 2.12. Esquema de un citómetro de flujo. Las células en suspensión (*muestra*) se convierten en un flujo unicelular antes de atravesar la ruta óptica del rayo laser. La presencia de varios detectores permite valorar dispersión frontal, dispersión lateral así como fluorescencia verde, naranja y roja.

Fuente de iluminación

La fuente de iluminación suele ser uno o varios rayos laser monocromáticos. El más utilizado es el de argon de baja intensidad (488 nm y 15 milivatios) refrigerado por aire. Los citómetros que utilizan rayo laser tienen configuración ortogonal, es decir, que los ejes de iluminación, detección y paso de muestra son perpendiculares.

El laser atraviesa dos sistemas de lentes antes de incidir sobre la muestra. Esto permite concentrar el rayo en el espacio que atraviesa el flujo unicelular de muestra dentro de la cámara de flujo.

Cámara de flujo

La cámara de flujo es el componente encargado de convertir la suspensión de células en un flujo unicelular (Fig. 2.13). Se abastece de dos fluídos, uno que contiene la muestra en suspensión y otro —que suele ser PBS— es el fluído envolvente que sirve para estabilizar al primero. Ambos fluídos se inyectan desde sus respectivos depósitos y a diferente presión en el interior de la cámara.

El fluído con la muestra se inyecta por la parte inferior y entra en contacto con el fluído envolvente —que también entra por la parte inferior— antes de llegar a la zona central del canal donde incide el rayo laser. El fluído con la muestra entra en el seno del fluído envolvente pero no se mezclan porque ambos fluyen con una presión diferente.

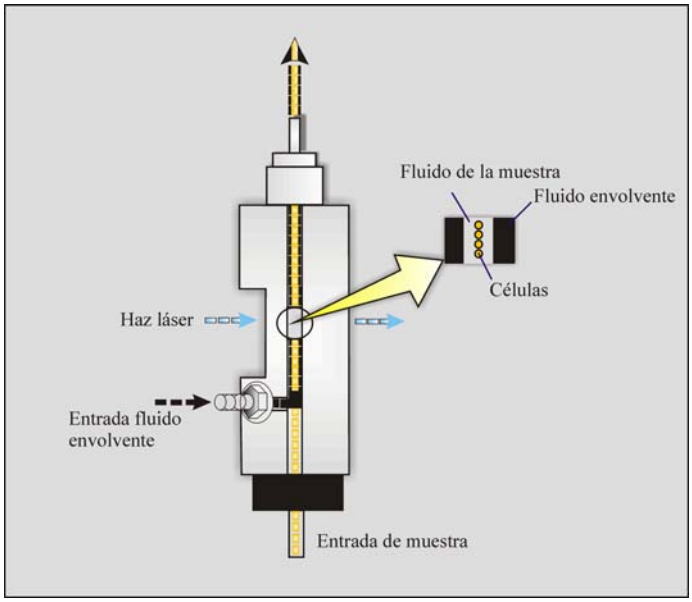


Figura2.13. Esquema de una cámara de flujo. Las células entran por la parte inferior de la cámara y entran en contacto con el fluído envolvente antes de llegar a la zona que ilumina el rayo laser. Las células fluyen de una en una mientras que los fluídos no se mezclan.

Dispersión frontal

El fluído con la muestra pasa entre el haz de luz y un fotodetector —situado en línea con el haz de luz— que sirve para medir la dispersión frontal. La intensidad de la dispersión frontal tiene relación con el tamaño de las células. La muerte celular por necrosis produce aumento y posterior descenso rápido de la dispersión frontal como consecuencia del hinchamiento y posterior ruptura de la membrana plasmática. La muerte por apoptosis produce un descenso de la dispersión frontal como consecuencia de la reducción del volumen celular.

Dispersión lateral

La presencia de un grupo óptico a 90º respecto a la trayectoria de la luz incidente permite detectar dispersión lateral y fluorescencia. La luz dispersada a 90º ó la emitida por un fluorocromo llega a un primer espejo dicroico que refleja la luz con una longitud de onda inferior a 488 nm y llega al fotodetector que mide dispersión lateral. Un aumento de la dispersión lateral se produce cuando aumenta la rugosidad de la superficie celular y/o se produce condensación de material y estructuras intracelulares como ocurre en el proceso de apoptosis.

Detector de fluorescencia

La luz que sale a 90º con longitud de onda superior a 488 nm atraviesa un filtro de corte (*long pass*) a 488 nm y llega a un segundo espejo dicroico que selecciona la luz fluorescente verde que se mide en el canal FL-1. Otros dos espejos separan luz fluorescente naranja y roja que se miden en los canales FL-2 y FL-3, respectivamente.

Cuando la luz incide sobre los fotodetectores (FL-1, FL-2 ó FL-3) se produce una respuesta de los mismos en forma de señal eléctrica. Los pulsos detectados por los fotodetectores pasan a un amplificador y posteriormente son convertidos de señal analógica a digital.

Características del fluorocromo JC-1

JC-1 —un derivado de la benzimidazolcarbocianina (véase pág. 104)— es un catión lipofílico que se acumula en el interior de las mitocondrias de células vivas debido al exceso de carga negativa en la matriz mitocondrial ($\Delta\Psi_m \sim -180$ mV). Cuando la MIM está polarizada se produce la entrada de JC-1 a la mitocondria y su agregación parcial que da lugar a fluorescencia roja. La despolarización de esta

membrana favorece la salida del indicador de la mitocondria y su paso al estado monomérico que tiene fluorescencia verde. Por tanto, el cambio de las propiedades fluorescentes de JC-1 sirve para evaluar el $\Delta\Psi_m$.

Carga de células con JC-1

El experimento comienza sembrando una placa de 150 mm de ∅ con $3'5 \times 10^5$ células en presencia de 15 ml de medio de cultivo completo. Las células se mantienen en las condiciones de cultivo habituales hasta alcanzar un 70-80 % de confluencia.

Equipamiento necesario

- Agitador vórtex
- Baño de agua a 37 ^oC
- Bomba de vacío
- Cabina de flujo laminar
- Centrífuga refrigerada
- Cronómetro/avisador
- Incubador de CO_2
- Micropipetas de 0'1-1 ml

Material estéril

- Caja con puntas de pipeta
- Tubos de fondo cónico de 15 y 50 ml
- Tubos Eppendorf

Muestra y medios

- Cultivo en monocapa de H9c2
- DMEM a 37 ºC
- ECM con Ca^{2+}
- JC-1 5 mg/ml en Me_2SO anhidro
- PBS a 37 ^oC
- Tripsina al 0'25 % (v/v)

Procedimiento

1. Retirar el medio de cultivo y lavar la placa dos veces con 10 ml de PBS cada vez.
2. Añadir 15 ml de DMEM e incorporar el agente inductor de apoptosis. Mantener el cultivo en el incubador de CO_2 el tiempo requerido por el experimento.

3. Preparar el medio de carga —JC-1 5 μg/ml en DMEM sin rojo fenol— en el momento de usar. Agitar bien con ayuda de un vortex y calentar a 37 ºC en el baño de agua.
4. Retirar el medio DMEM con el agente inductor de apoptosis y lavar dos veces la placa con 10 ml de PBS.
5. Añadir el medio de carga e incubar agitando durante 10 min a 37 ºC.
6. Retirar el medio de carga y lavar dos veces la placa con PBS.
7. Seguir el procedimiento de subcultivo hasta el punto 7.
8. Eliminar el sobrenadante y ajustar la concentración de células a 2×10^6 células/ml usando ECM con Ca^{2+}.
9. Diluir a 3×10^5 células/ml en medio ECM con Ca^{2+} para hacer las medidas.
10. Analizar las muestras inmediatamente después de cargar con JC-1. La presencia de JC-1 en estado monomérico (fluorescencia verde) se detecta en el canal FL-1 mientras que los agregados (fluorescencia roja) se evalúan en el canal FL-2.

Estimación del $\Delta\Psi_m$ usando JC-1

Los citómetros de flujo tienen preestablecidos los canales de medida —longitud de onda y ancho de banda— por lo que es importante asegurarse previamente que podemos detectar una determinada señal fluorescente. El espectro de emisión del indicador JC-1 incorporado en células H9c2 muestra máximos a 532 y 596 nm que correponden a la presencia de formas monoméricas y agregadas, respectivamente (Fig. 2.14). Esos máximos pueden ser detectados con el citómetro de flujo modelo FACSort de Becton Dickinson que utiliza laser de argon a 488 nm para la excitación. Los canales de medida FL-1 y FL-2 corresponden a 530±30 nm y 585±42 nm, respectivamente. El programa informático CellQuest™ de BD se utilizó para la adquisición y análisis de datos.

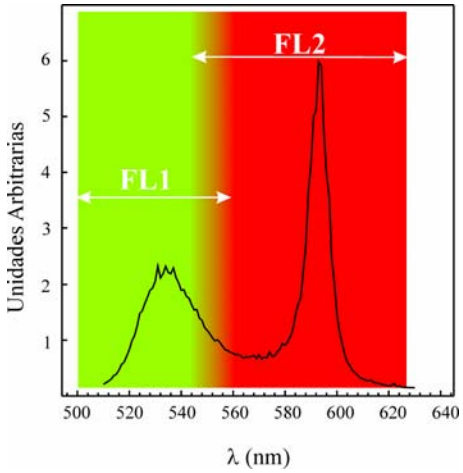


Figura 2.14. Espectro de emisión de JC-1 en células H9c2. El espectro de emisión se obtuvo fijando la excitación a 488 nm. La concentración de células cargadas con JC-1 fue 1'0 × 10^3 células/ml en ECM con Ca^{2+}. El máximo a 532 nm (*fluorescencia verde*) corresponde a la presencia de monómeros mientras que el máximo a 596 nm (*fluorescencia roja*) corresponde a la presencia de agregados. FL-1 y FL-2 indican las ventanas del espectro que seleccionan los canales 1 y 2 del citómetro FACSort de BD.

Procedimiento

1. Crear una plantilla consistente en dos gráficas de puntos para la adquisición y análisis de datos. La dispersión de luz se analiza representando —en escalas lineales— dispersión frontal en eje *x* frente a dispersión lateral en eje *y*. La fluorescencia de la sonda se analiza representando log FL-1 en eje *x* frente a log FL-2 en eje *y*.
2. Poner 0'5 ml de suspensión celular sin tratar en el colector de muestras —compartimento presurizado conectado a la cámara de flujo— y comenzar la adquisición de datos de dispersión y fluorescencia para ajustar las condiciones de medida tal como se describe en los apartados 3-5.
3. Ajustar voltaje y ganancia de los fotomultiplicadores para medir las dispersiones de luz hasta que la población de células quede entre los canales 300 y 400 (Fig. 2.15).

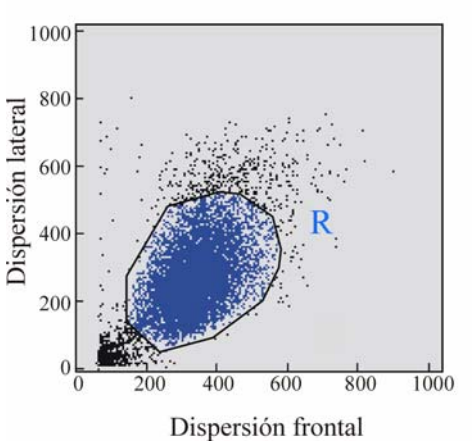


Figura 2.15. Selección de la población de células de interés. Las células cargadas con JC-1 5 µg/ml durante 10 min a 37 ºC, fueron tripsinizadas y resuspendidas en ECM con Ca^{2+} a una concentración de 3 × 10^5 células/ml. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo modelo FACSort de Becton Dickinson. Los voltajes de los fotomultiplicadores para la dispersión lateral y frontal se ajustaron a 273 voltios y a E1, respectivamente. La ganancia fue 1'00 para la dispersión lateral y 5'1 para la dispersión frontal. La gráfica representa dispersión frontal en eje *x* frente a dispersión lateral en eje *y*. La región R corresponde a la población de células seleccionadas.

4. Seleccionar la población de células de interes (R), en base a los parámetros de dispersión frontal y lateral de la luz (Fig. 2.15). Este proceso se conoce como *gating*. Los puntos que quedan fuera de la región R pero por encima son agregados celulares en una elevada proporción mientras que los que quedan por debajo corresponden a fragmentos celulares.
5. En la gráfica log FL-1 frente a log FL-2 se mide la fluorescencia de las células dentro de la región R. Fijar las condiciones de análisis para centrar la población entre 10^2 (FL-1) y 10^3 (FL-2). Para ello, ajustar los voltajes de los detectores FL-1 y FL-2 a 419 y 381 voltios y compensar las señales de fluorescencia —restar un 10 % de FL-2 a FL-1 y un 20 % de FL-1 a FL-2.
6. Adquirir y almacenar los valores de dispersión de luz y fluorescencia de 20.000 células a una velocidad de ~200 células/s.
7. Crear las regiones R1 y R2 como se indica en la Fig. 2.16, panel A. La región R1 contiene células con mitocondrias polarizadas —$\Delta\Psi_m$ alto— mientras que R2 tiene células con $\Delta\Psi_m$ bajo.
8. Repetir el paso 6 usando células tratadas con el agente inductor de apoptosis. La disminución de la fluorescencia roja y el aumento de la fluorescencia verde —que corresponde a la despolarización de las mitocondrias— hace que la

población de células que estaba inicialmente en la región R1 pase a la región R2 (Fig. 2.16, panel B).

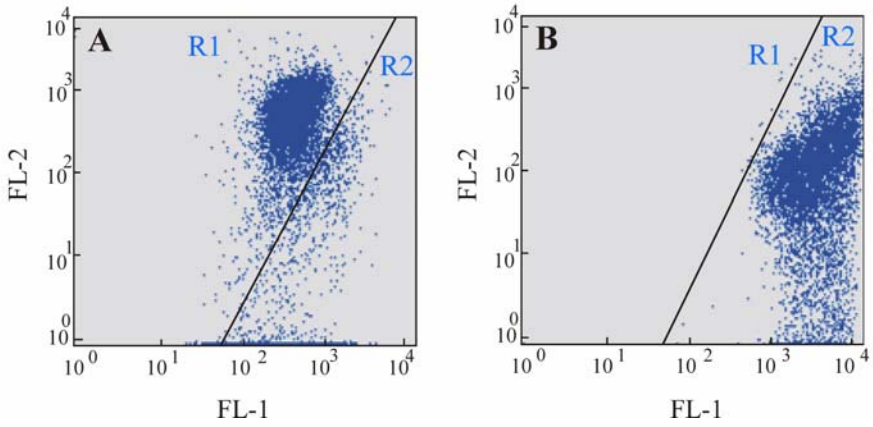


Figura 2.16. Medidas de $\Delta\Psi_m$ en presencia de JC-1. Las células cargadas con JC-1 5 μg/ml durante 10 min a 37 ºC, fueron tripsinizadas y resuspendidas en ECM con Ca^{2+} a una concentración de 3×10^5 células/ml. Los voltajes de los fotomultiplicadores para FL-1 y FL-2 se ajustaron a 419 y 381 voltios, respectivamente y las señales de fluorescencia se compensaron sustrayendo un 10 % de FL-2 a FL-1 y un 20 % de FL-1 a FL-2. La gráfica representa log FL-1 en eje *x* frente a log FL-2 en eje *y*. (A) Población de células sin tratar. (B) Células tratadas con TG 10 μM durante 2 h.

La citometría de flujo también se ha utilizado para evaluar el proceso apoptótico marcando las células con PI y midiendo el contenido en DNA (véase pág. 170).

MICROSCOPÍA CONFOCAL DE BARRIDO

La microscopía confocal de barrido es una variante de la microscopía de fluorescencia que permite analizar distintos planos de una muestra tridimensional proporcionando imágenes de gran nitidez. Esto se consigue mediante una pequeña ranura (*pinhole*) que es el elemento del microscopio que selecciona un determinado plano e impide que llegue al detector la fluorescencia que no provenga del plano seleccionado. Permite analizar cambios con el tiempo de un determinado parámetro en un punto concreto de la imagen. La utilización simultánea de distintas sondas fluorescentes hace posible obtener imágenes específicas de determinados orgánulos o moléculas. Estas imágenes pueden superponerse para determinar la localización de los distintos componentes marcados.

La Fig. 2.17 ilustra un microscopio confocal de barrido.

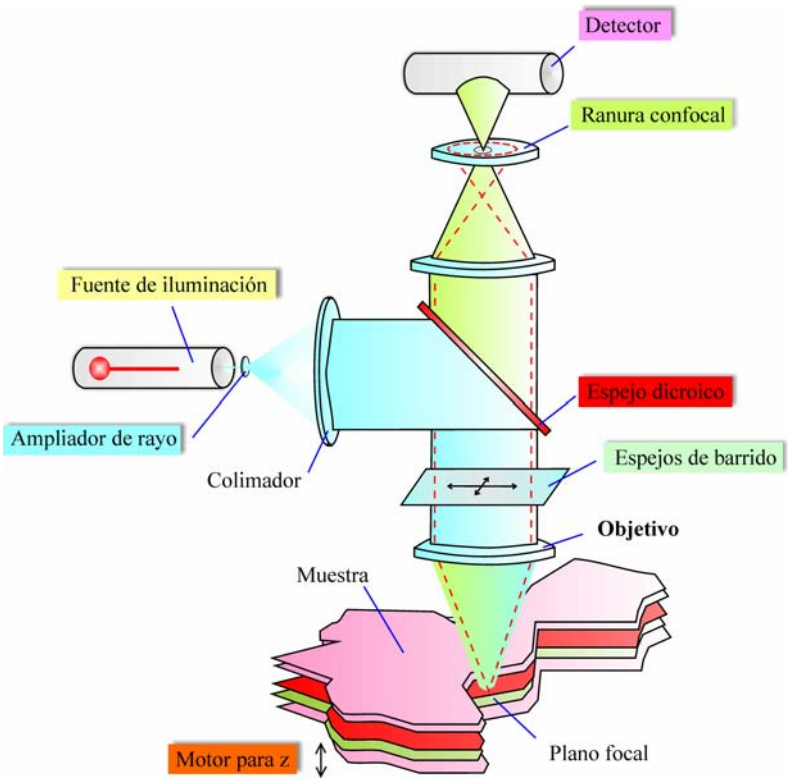


Figura 2.17. Esquema de un microscopio confocal. Los componentes esenciales de este equipo son: fuente de iluminación, ampliador del rayo de luz, espejo dicroico, espejos de barrido, objetivo, motor para z, ranura confocal y fotodetector.

Fuente de iluminación

La fuente de iluminación suele ser uno o varios rayos laser que proporcionan un haz de luz monocromática. Los laser más utilizados son: Ar UV 351, 364 nm; HeCd 442 nm; Ar 457, 488, 514 nm; ArKr 488 nm; GreNe 543 nm; Kr 568 nm y HeNe 633 nm.

Ampliador de rayo

El ampliador del rayo (*beam expander*) es una lente que ensancha el haz de luz. Su función es hacer que el laser ocupe todo el objetivo y aprovechar al máximo la apertura numérica. Un ampliador de rayo pequeño puede hacer que el haz de luz no llene por completo un determinado objetivo provocando una disminución en la resolución de la imagen. Si el ampliador del rayo es demasiado grande para un

objetivo concreto, habrá pérdida significativa de energía radiante lo cual puede ser un problema si el laser no tiene mucha energía.

El ampliador del rayo en el módulo confocal TCS SP2 (*Leica*) es variable lo que permite que pueda adecuarse al objetivo en uso. Eso es lo que se llama iluminación pupilar ajustable. Normalmente se trabaja con un ampliador de rayo 6, que es suficiente para llenar todos los objetivos, usándose el 3 y en ocasiones el 1 para ganar intensidad en la excitación. El uso de ampliadores de rayo pequeños —y en especial del 1— puede hacer perder resolución cuando se usan ciertos objetivos. Todos los microscopios confocales tienen amplificador de rayo aunque en la mayoría de los casos es fijo y por eso no se suele dar el dato.

Espejo dicroico

Este sistema dirige la luz de excitación del laser sobre la muestra y separa la fluorescencia de la muestra de la luz de excitación reflejada. El sistema confocal utilizado dispone de un distribuidor de haz acústico-óptico (*AOBS*) en lugar de espejos dicroicos (véase pág 59). El distribuidor de haz es un cristal óptico transparente que ajusta automáticamente la relación entre luz de excitación y luz de emisión mediante una señal de ultrasonido, en función de la fuente de excitación utilizada.

Si el sistema confocal dispone de un espejo dicroico convencional, se debe seleccionar el espejo apropiado para cada aplicación. Los espejos dicroicos dobles se utilizan cuando la preparación se ha marcado con dos indicadores fluorescentes y se excita con dos longitudes de onda diferentes. Los espejos dicroicos triples se seleccionan cuando la preparación se ha marcado con tres fluorocromos distintos y se excita con tres longitudes de onda distintas.

El equipo dispone de un mecanismo para seleccionar planos confocales en el eje *z* lo que permite adquirir imágenes a distintos niveles de profundidad. A cada uno de estos planos se les denomina sección óptica.

Espejos de barrido

Permite el barrido de la muestra en el plano óptico *xy*. Está formado por dos espejos oscilatorios accionados por un galvanómetro que operan a alta velocidad. En la Fig. 2.18 se muestra un esquema del funcionamiento de este sistema. Un espejo desplaza el haz de luz de izquierda a derecha en el eje *x* (espejo 1), mientras

el otro lo hace en el eje *y* (espejo 2). El movimiento simultáneo de ambos espejos permite el barrido horizontal de la muestra.

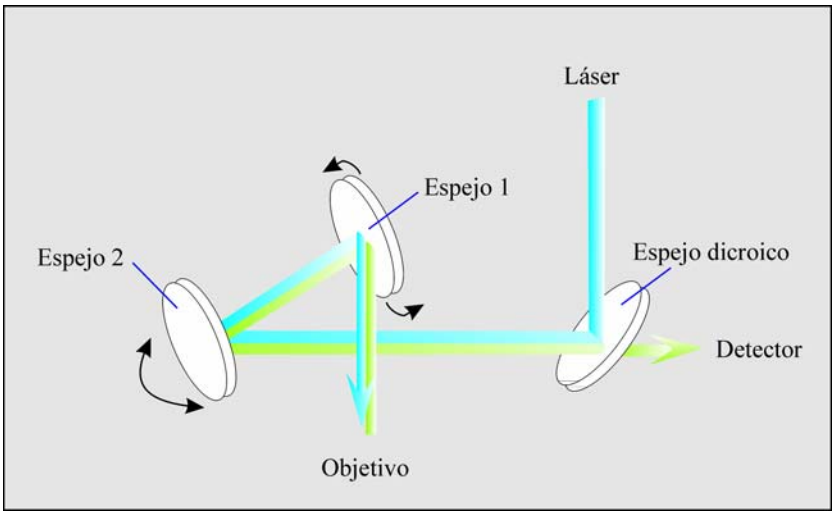


Figura 2.18. Espejos de barrido. Los dos espejos son oscilatorios y están accionados por un galvanómetro. La luz de excitación (*laser*) se refleja en un espejo dicroico y llega hasta el espejo 2 que controla el barrido en el eje *y*. El haz de luz se refleja después sobre el espejo 1 que controla el barrido en el eje *x*. La luz emitida por la muestra (*verde*), vuelve a través del objetivo por la misma ruta óptica que la luz de excitación (*azul*), hasta el detector, pasando a través del complejo de espejos. Este proceso se conoce como *descanning*.

Ranura confocal

La ranura confocal es un diafragma que excluye la luz extrafocal, es decir, la luz emitida por zonas de la muestra por encima y por debajo del plano focal. El volumen del corte óptico depende de diferentes parámetros como el diámetro de la ranura —que es variable— y la longitud de onda.

Detector

Es un fotomultiplicador. Está situado detrás de la ranura confocal y registra los datos intrafocales de cada punto de la muestra. La señal de salida analógica se digitaliza y transmite a un ordenador.

La posibilidad de modificar la ganancia del fotomultiplicador y el nivel de negro del fondo (*offset*) permite obtener imágenes con una gran intensidad de fluorescencia sobre fondo negro.

Localización de Bax activo por inmunofluorescencia

El procedimiento requiere el marcaje de las mitocondrias con el indicador fluorescente MitoTracker® Red. A continuación se realiza la fijación y permeabilización de las células antes de tratar con el intensificador de señal Image-iT™ FX (*Molecular Probes*). Por último se realiza la incubación con anticuerpos. Primero con anti-Bax 6A7 y después con anti-IgG conjugado a Alexa Fluor® 488.

Equipamiento necesario

- Baño de agua a 37 ºC
- Cronómetro/avisador
- Micropipeta de 1 ml
- Microscopio confocal de barrido (*Leica*)
- Pipetas Pasteur de vidrio

Material estéril

- Caja con puntas de pipeta
- Pipetas de 5 ml
- Placas de cultivo de vidrio de 35 mm de ∅
- Placa de cultivo de 150 mm de ∅

Muestra y medios

- Alexa Fluor® 488 anti-ratón SFX (*Molecular Probes*) compuesto por: intensificador de señal Image-iT™ FX y anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (molécula completa) conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor® 488
- Anticuerpo primario anti-Bax 6A7
- Cultivo en monocapa de H9c2
- DMEM a 37 ºC
- Me_2SO anhidro
- MitoTracker® Red CM-H_2XRos
- PBS a 37 ºC

El experimento comienza sembrando una placa de 35 mm de ∅ con 2×10^4 células en presencia de 2 ml de medio de cultivo completo. Las células se mantienen en el incubador de CO_2 durante 2 días antes de comenzar el experimento.

Carga de células con MitoTracker® Red

MitoTracker Red CM-H_2XRos es un derivado reducido de rosamina (véase pág. 105). La forma reducida del indicador —que no es fluorescente— entra en la célula donde se oxida y acumula en las mitocondrias de células vivas. La forma oxidada tiene un máximo de excitación a 579 nm y de emisión a 599 nm. Este indicador tiene la ventaja sobre otros de que permanece en el interior de las mitocondrias incluso después de fijar y permeabilizar las células.

Procedimiento

1. Disolver 50 µg de MitoTracker Red liofilizado en 100'6 µl de Me_2SO anhidro, para obtener una concentración final de 1 mM. La forma reducida del indicador fluorescente se oxida rápidamente, especialmente cuando está en disolución. Evitar su hidrólisis almacenando la disolución preparada a –20 ºC y protegida de la luz.
2. Diluir 2 µl de MitoTracker Red 1 mM en 198 µl de Me_2SO anhidro —concentración final 10 µM—. A continuación diluir 4 µl de MitoTracker Red 10 µM en 2 ml de DMEM a 37 ºC para conseguir una concentración final de 20 nM.
3. Eliminar el medio de cultivo de las placas y lavar dos veces las placas con 2 ml de PBS a 37 ºC.
4. Añadir 2 ml de DMEM. Adicionar después el agente inductor de apoptosis y mantener en las condiciones habituales de cultivo durante el tiempo necesario.
5. Aspirar el DMEM y lavar la placa con 2 ml de DMEM a 37 ºC.
6. Añadir 2 ml de MitoTracker Red 20 nM en DMEM. Incubar durante 45 min a 37 ºC en el incubador de CO_2.
7. Retirar el medio de carga y lavar dos veces con DMEM a 37 ºC.

Fijación y permeabilización de células

Procedimiento

1. Fijar las células añadiendo con cuidado 2 ml de formaldehído al 3'7 % (v/v) en DMEM a 37 ºC. Mantener durante 15 min en las condiciones habituales de cultivo. Es importante utilizar formaldehído de gran calidad.
2. Retirar el medio de fijación y lavar la placa tres veces —un min cada vez— con 2 ml de PBS.
3. Permeabilizar las células añadiendo 0'5 ml de TX-100 al 0'1 % (v/v) en PBS, a temperatura ambiente. Mantener 15 min en esas condiciones.

4. Lavar la placa tres veces —un min cada vez— con 2 ml de PBS a temperatura ambiente.

Intensificación de señal e incubación con anticuerpos

Procedimiento

1. Añadir 0’3 ml del intensificador de señal Image-iT™ FX para cubrir por completo las células de la parte central de la placa.
2. Incubar 30 min a temperatura ambiente protegido de la luz y en un ambiente húmedo —introducir las células en el interior de una placa de 150 mm de ∅ que contiene algodones humedecidos con agua Milli-Q— para evitar la evaporación del intensificador.
3. Lavar tres veces —un min cada vez— con 2 ml de PBS a temperatura ambiente.
4. Diluir 1:1.000 el anticuerpo primario anti-Bax 6A7 en PBS que contiene BSA al 1% (p/v). Incubar las células con 0’3 ml de este medio durante toda la noche a 4 ºC y manteniendo ambiente de humedad (como se ha descrito en el punto 2).
5. Lavar tres veces —cinco min cada vez— con 2 ml de PBS a temperatura ambiente.
6. Diluir 1:200 el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor® 488 en PBS a temperatura ambiente. Incubar las células con 0’3 ml de esta disolución durante 1 h a 37 ºC.
7. Lavar tres veces —cinco min cada vez— con 2 ml de PBS a temperatura ambiente.
8. Añadir 0’5 ml de PBS a temperatura ambiente y observar en el microscopio confocal.

Observación en microscopio confocal

La fluorescencia de las células se analizó con un equipo confocal de *Leica Microsystems*, formado por microscopio invertido DM IRE II acoplado a una cabeza de barrido modelo TCS SP2.

Las células se observaron a través de un objetivo de inmersión en aceite HCX PL APO de 63× y AN de 1’32. El plano confocal elegido fue el que proporcionaba un tamaño más grande del núcleo.

En todos los casos se seleccionó una ranura confocal de 140 μm que es equivalente a un grosor del plano z de ~1’1 μm. El grosor del plano z en μm se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$z(\mu m)=\sqrt{\left(\frac{0'88\times\lambda_{em}}{n-\sqrt{n^2-AN^2}}\right)^2+\left(\frac{n\times\sqrt{2}\times PH}{AN}\right)^2}$$

Donde:

- λ_{em} es longitud de onda de emisión del indicador fluorescente
  - λ_{em} (MitoTracker Red CM-H_2XRos) = 599 nm
  - λ_{em} (Alexa Fluor® 488) = 519 nm
- $PH = \frac{\text{Ranura confocal}}{\text{Aumento del objetivo}\times 0'6\times\text{Ampliador de rayo}} = \frac{140}{63\times 0'6\times 6} = 0'617$
- n es índice de refracción
  - n_{aceite} = 1'5
- AN es la apertura numérica del objetivo
  - AN (63×) = 1'32

Para observar la fluorescencia de Alexa Fluor 488 se utilizó como fuente de iluminación el laser de argon (488 nm) mientras que para la fluorescencia de MitoTracker Red se empleó el laser GreNe (543 nm). Las ventanas seleccionadas para la emisión de fluorescencia fueron 510-550 nm para Alexa Fluor 488 y 590-650 nm para MitoTracker Red.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Aislamiento de proteínas totales

Equipamiento necesario

- Baño de agua a 37 ºC
- Bomba de vacío
- Cabina de flujo laminar
- Centrífuga refrigerada Labofuge 400R (*Heraeus*)
- Cronómetro/avisador
- Ultracongelador de –80 ºC
- Hemocitómetro
- Homogeneizador ultrasónico, serie 4710 (*Cole-Parmer*)
- Microcentrífuga 4214 (*ALC*)
- Micropipetas de 0'1-1 ml

Material estéril

- Caja con puntas de pipeta
- Filtros Millex® GV
- Pipetas de vidrio de 5 y 10 ml y pipetas Pasteur de vidrio
- Tubos de 50 ml de fondo cónico sin faldón
- Tubos Eppendorf

Muestra y medios

- Mezcla de inhibidores de proteasas
- Cultivo en monocapa de H9c2
- DMEM a 37 ºC
- PBS a 4 ºC
- Medio de extracción de proteínas totales: Tris 150 mM, EGTA 1 mM, TX-100 al 1 % (v/v), desoxicolato sódico al 1 % (p/v) y SDS al 0'1 % (p/v) ajustado a pH 8'0 con HCl. Esterilizar por filtración usando filtros Millex® GV. Conservar a 4 ºC.
- Tripsina al 0'25% (v/v)

Procedimiento

El experimento comienza sembrando cuatro placas de 150 mm de ∅ con 3'5 × 10^5 células/placa en presencia de 15 ml de medio de cultivo completo. Las células se mantienen en las condiciones habituales de cultivo hasta alcanzar un 70-80 % de confluencia.

1. Eliminar el medio de cultivo de las placas y lavar dos veces cada placa con 10 ml de PBS a 37 ºC.
2. Añadir 10 ml de DMEM a cada placa. Adicionar después el agente inductor de apoptosis y mantener en las condiciones habituales de cultivo durante el tiempo requerido por el experimento.
3. Recoger el DMEM junto con las células en suspensión en un tubo cónico de 50 ml.
4. Seguir el procedimiento de subcultivo hasta el punto 7. Eliminar sobrenadante y resuspender el sedimento de células en 4 ml de PBS a 4 ºC.
5. Centrifugar a 480 ×g (1.600 rpm) durante 10 min a 4 ºC en la centrifuga refrigerada. Desechar sobrenadante y resuspender sedimento en 1 ml de PBS a 4 ºC.
6. Traspasar la suspensión a un tubo Eppendorf y centrifugar en la microcentrífuga a 480 ×g (2.400 rpm) durante 10 min a 4 ºC.

7. Eliminar sobrenadante y ajustar la concentración a 40 × 10^6 células/ml, utilizando el medio de extración de proteínas totales enfriado a 4 ºC.
8. Añadir inmediatamente la mezcla de inhibidores de proteasas a razón de 1 µl por cada 1 × 10^6 células e incubar 20 min en baño de hielo.
9. Tratar la muestra 4 veces durante 5 s —haciendo pausas de 30 s— en el homegeneizador ultrasónico. Mantener la muestra en todo momento en baño de hielo.
10. Centrifugar en la microcentrífuga a 10.000 ×g (11.000 rpm) durante 5 min a 4 ºC.
11. Recoger con cuidado el sobrenadante y guardarlo en alícuotas de 15 µl a –80 ºC, hasta el momento de determinar la concentración de proteína. Desechar la fase sólida.

Aislamiento de proteínas citosólicas

Equipamiento necesario

- Baño de agua a 37 ºC
- Bomba de vacío
- Cabina de flujo laminar
- Centrifuga refrigerada Labofuge 400R (*Heraeus*)
- Cronómetro/avisador
- Ultracongelador de –80 ºC
- Hemocitómetro
- Homogeneizador ultrasónico, serie 4710 (*Cole-Parmer*)
- Microcentrífuga 4214 (*ALC*)
- Micropipetas de 0’1-1 ml

Material estéril

- Caja con puntas de pipeta
- Pipetas de vidrio de 5 y 10 ml y pipetas Pasteur de vidrio
- Tubo de 50 ml de fondo cónico y sin faldón
- Tubos Eppendorf

Muestra y medios

- Mezcla de inhibidores de proteasas
- Cultivo en monocapa de H9c2
- ºDigitonina 20 mg/ml en Me_2SO anhidro
- DMEM a 37 ºC

- PBS a 4 ºC
- Medio de extracción de proteínas totales (descrito antes)
- Medio de permeabilización: KCl 75 mM, NaH_2PO_4 1 mM, Na_2HPO_4 8 mM y sacarosa 250 mM. Esterilizar por filtración, usando filtros Millex® GV. Conservar a 4 ºC.

Procedimiento

1. Seguir el procedimiento descrito en el protocolo de extracción de proteínas totales hasta el punto 6.
2. Eliminar el sobrenadante y ajustar la concentración de células a 40×10^6 células/ml, utilizando el medio de permeabilización.
3. Añadir inmediatamente la mezcla de inhibidores de proteasas a razón de 1 µl por cada 1×10^6 células.
4. Adicionar digitonina 600 µg/ml e incubar durante 5 min en baño de hielo. Esta concentración de digitonina añadida a la concentración de células usadas produce un 95 % de células teñidas con el colorante Azul Tripán.
5. Centrifugar a 10.000×g (11.000 rpm) durante 5 min a 4 ºC en la microcentrífuga.
6. Sacar el sobrenadante con mucho cuidado y guardarlo en alícuotas de 15 µl a –80 ºC para cuantificar después la concentración de proteínas. La fase sólida no se desecha.
7. Solubilizar la fase sólida siguiendo el procedimiento descrito en el protocolo de extracción de proteínas totales desde el punto 7 al 11.

Cuantificación de proteínas

La concentración de proteína se determinó por el método descrito por Smith y otros (1985) usando BSA como patrón.

Equipamiento necesario

- Agitador vórtex
- Baño de agua a 60 ºC
- Caja con puntas de pipeta
- Cronómetro/avisador
- Fotocolorímetro Spectronic 601 (*Milton Roy*)
- Micropipetas de 0’1-1 ml
- Tubos de ensayo
- Tubos Eppendorf

Muestra y medios

- BSA 2 mg/ml
- Disolución A: bicinconinato sódico 1g, Na_2CO_3 2 g, tartrato sódico 0'16 g, NaOH 0'4 g y $NaHCO_3$ 0'95 g. Añadir agua Milli-Q hasta 100 ml ajustando el pH a 11'25 con NaOH 10 M.
- Disolución B: $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ 0'4 g y 10 ml de agua Milli-Q

Procedimiento

1. Preparar el reactivo de trabajo mezclando 50 partes de disolución A y 1 parte de disolución B. Esta mezcla tiene color verdoso y es estable durante una semana.
2. Diluir la disolución de BSA hasta 0'5 mg/ml en agua Milli-Q.
3. Tomar 0, 4, 10, 20, 30, 40 y 50 µl de la disolución de BSA 0'5 mg/ml, equivalente a 0-25 µg de proteína y añadirlos a diferentes tubos de ensayo (Tabla 2.1).
4. Diluir dos veces la muestra problema en agua Milli-Q. Utilizar tres alícuotas de 4 µl añadiéndolas sobre otros tantos tubos de ensayo.
5. Completar el volumen de cada tubo a 0'5 ml añadiendo agua Milli-Q.
6. Añadir 0'5 ml de reactivo a cada tubo mezclando bien con el vortex.
7. Incubar durante 30 min en baño de agua a 60 ºC.
8. Enfriar los tubos hasta temperatura ambiente antes de medir absorbancia a 562 nm en el fotocolorímetro.
9. Construir la recta patrón representando µg de BSA frente a valores de absorbancia. La pendiente de la recta (µg BSA/absorbancia) se multiplica por el valor medio de la absorbancia de la muestra problema para determinar µg de proteína problema. Los µg de proteína se dividen por el volumen de muestra (4 µl) para determinar la concentración en µg de proteína/µl. Ese valor se multiplica por el factor de dilución que en este caso es 2. Las concentraciones de proteína se refieren siempre a µg de proteína total/µl.

Tabla 2.1. Procedimiento para cuantificar proteínas

Tubo	BSA 0'5mg/ml (µl)	Agua Milli-Q (µl)	Proteína problema (µl)	Reactivo de trabajo (µl)
1	------	500	------	500
2	4	496	------	500
3	10	490	------	500
4	20	480	------	500
5	30	470	------	500
6	40	460	------	500
7	50	450	------	500
8	------	496	4	500
9	------	496	4	500
10	------	496	4	500

ELECTROTRANSFERENCIA

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las proteínas extraídas se separan por técnica electroforética disociante siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli (1970).

Equipamiento necesario

- Baño de agua a 100 ºC
- Bomba peristáltica Reglo-digital (*Ismatec*)
- Caja con puntas de pipeta
- Cronómetro/avisador
- Formador de gradiente SG15 (*Hoefer*)
- Micropipetas de 0'1-1 ml
- Fuente de alimentación PowerPac 300 (*Bio Rad*)
- Sistema Mini-PROTEAN® 3 (*Bio Rad*)
- Tubos Eppendorf

Muestra y medios

- AA 30% / BisAA 0'8 % (p/v) en agua Milli-Q
- Agua Milli-Q

- PSA al 1% (p/v). Disolver en el momento de usar 0’01 g de PSA en 1 ml de agua Milli-Q.
- SDS al 1% (p/v)
- Medio de electroforesis (5×): Tris 125 mM, glicina 960 mM y SDS al 0’5% (p/v) ajustado a pH 8’3 con HCl. Diluir a (1×) en el momento de usar mezclando 100 ml de tampón de electroforesis (5×) con 400 ml de agua Milli-Q.
- Medio de desnaturalización (4×): Tris 312 mM, SDS al 12 % (p/v), β–mercaptoetanol al 20 % (v/v), glicerol al 40 % (v/v) y azul de bromofenol al 0’06 % (p/v) ajustado a pH 6’8 con HCl. Guardar en alícuotas de 500 µl a – 20 ºC hasta el momento de usar.
- TEMED
- Tris 3 M ajustado a pH 8’8 con HCl
- Tris 125 mM ajustado a pH 6’8 con HCl

Procedimiento

Cada placa de poliacrilamida está formada por dos componentes: un gel concentrador —que sirve para comprimir las bandas de proteína— y un gel separador. Sobre un molde de 7’3×8’4 cm y 0’75 mm de espesor se prepara primero el gel separador formado por una determinada concentración de AA o por un gradiente de AA del 7 al 17 %.

1. La preparación del gel separador en gradiente se realiza con los componentes que se describen en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Composición de gel separador en gradiente

Componentes	AA 7% (ml)	AA 17% (ml)
H_2O Milli-Q	0’730	0’064
AA 30%/BisAA 0’8% (p/v)	0’467	1’133
Tris-HCl 3M, pH 8’8	0’501	0’501
SDS al 1% (p/v)	0’200	0’200
PSA al 1% (p/v)	0’101	0’101
TEMED	0’0012	0’0012
Volumen final	2’000	2’000

La distribución en gradiente se consigue con un formador de gradiente conectado a una bomba peristáltica que mezcla las dos disoluciones de AA.

La composición de un gel separador formado por un sola concentración de AA al 12 ó al 15 % es la que se detalla en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Composición de geles separadores sin gradiente

Componentes	AA 12% (ml)	AA 15% (ml)
H_2O Milli-Q	0'80	0'40
AA 30%/BisAA 0'8% (p/v)	1'60	2'00
Tris-HCl 3M, pH 8'8	1'00	1'00
SDS al 1% (p/v)	0'40	0'40
PSA al 1% (p/v)	0'20	0'20
TEMED	0'0023	0'0023
Volumen final	4'00	4'00

2. Depositar la mezcla sobre el sistema de placas de vidrio con separador de 0'75 mm de espesor evitando la formación de burbujas. Añadir agua Milli-Q en la parte superior para que la superficie de polimerización sea homogénea. La AA a temperatura ambiente tarda en polimerizar al menos 30 min. Transcurrido ese tiempo, eliminar completamente la capa de agua.
3. Secar la parte superior del gel separador utilizando papel de filtro.
4. Preparar 1'5 ml de gel concentrador que contiene AA al 4 % de acuerdo con la composición que se indica en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Composición del gel concentrador

Componentes	Volumen (ml)
H_2O Milli-Q	0’2962
AA 30%/BisAA 0’8% (p/v)	0’20
Tris-HCl 125 mM, pH 6’8	0’75
SDS al 1% (p/v)	0’15
PSA al 1% (p/v)	0’100
TEMED	0’0038
Volumen final	1’500

5. Depositar esta mezcla sobre el gel separador y poner el peine para que se formen las calles donde se cargarán las muestras. Dejar polimerizar 30 min.
6. Una vez que el gel ha polimerizado, retirar el peine y limpiar las calles con medio de electroforesis (1×) para eliminar restos de AA que puedan quedar sin polimerizar.
7. Montar el sistema de electroforesis vertical —Mini-Protean® 3— y añadir el medio de electroforesis (1×).
8. Preparar las muestras de proteína problema mezclando 15 µl de la disolución de proteína con 5 µl de medio de desnaturalización (4×). Hervir entre 2 y 15 min a 100 ºC en baño de agua para evitar la agregación de proteínas. Especialmente crítico en el caso de cit c.
9. Cargar las calles con un máximo de 30 µl de muestra.
10. Hacer la electroforesis a 180 voltios durante 2 h y a temperatura ambiente.
11. Desconectar la fuente de alimentación y desmontar el molde formado con las placas de vidrio. Sacar los geles, separar el gel concentrador del gel separador quedándose con este último. Cortar la esquina superior izquierda para conocer la orientación del gel.

Electrotransferencia de proteínas

Esta técnica permite transferir proteínas separadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida a un soporte de membrana utilizando un campo eléctrico. El procedimiento seguido es el descrito por Kyhse-Andersen (1984).

Equipamiento necesario

- Cubeta de incubación de 9’5×6’5×1’5 cm
- Fuente de alimentación PowerPac HC (*Bio Rad*)
- Gel de 0’75 mm de espesor con las proteínas separadas
- Guantes sin talco
- Membrana de nitrocelulosa Protran® BA 83 de 0’2 μm ∅ de poro (*Schleicher y Schuell*)
- Filtro para transferencia *Extra Thick Blot Paper* (*Bio Rad*)
- Pinzas
- Aparato de electrotransferencia semi-seca (*Bio Rad*)
- Varilla de vidrio

Muestra y medios

- Agua Milli-Q
- Medio de transferencia: Tris 5’82 g, glicina 2’93 g y SDS 0’375 g en 200 ml de metanol. Completar el volumen a 1 l añadiendo agua Milli-Q (Bjerrum y Schafer-Nielsen, 1986). No añadir ácidos ni bases para ajustar el pH. El medio tendrá un pH entre 9’0 y 9’4 dependiendo de la calidad de los componentes.

Procedimiento

Es muy importante usar guantes sin talco y pinzas durante todo el proceso para evitar que se contamine la membrana de nitrocelulosa.

1. Equilibrar el gel en el medio de transferencia para favorecer la eliminación de sales y detergentes procedentes del medio de electroforesis. El tiempo necesario depende de cada tipo de gel —15 min para geles de 0’75 mm de grosor y AA al 15 %.
2. Cortar una membrana de nitrocelulosa con las mismas dimensiones del gel y sumergirla durante 15-30 min en medio de transferencia. El corte en la esquina superior izquierda permitirá conocer la orientación de la membrana.
3. Cortar dos piezas de filtro para transferencia con las mismas dimensiones del gel y sumergirlo durante 15-30 min en medio de transferencia.
4. Abrir la unidad de electrotransferencia.
5. Colocar los componentes a partir del ánodo tal como se muestra en la Fig. 2.19. Eliminar las burbujas de aire que se forman durante el montaje presionando con una varilla de vidrio. Evitar la aplicación de presión excesiva que puede dañar la membrana o el gel.

6. Conectar a la fuente de alimentación y transferir a 15 voltios durante 10-60 min, dependiendo del tamaño de la proteína y del porcentaje de AA del gel.
7. Una vez completada la transferencia, desconectar la fuente de alimentación y abrir la unidad. Sacar con cuidado los distintos componentes apilados.
8. Poner la membrana de nitrocelulosa en la cubeta de incubación para realizar la inmunodetección. Es importante orientar la cara de la membrana con las proteínas fijadas hacia arriba.

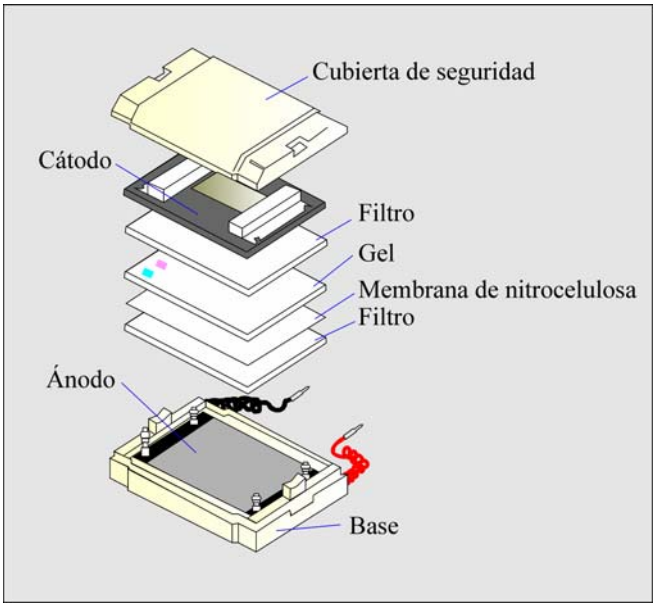


Figura 2.19. Esquema de la unidad de electrotransferencia. Se muestra el orden de apilamiento de los distintos componentes.

Inmunodetección

Este método de detección utiliza un anticuerpo específico para identificar la localización de proteínas inmovilizadas en una membrana. La especificidad de la unión antígeno-anticuerpo permite la identificación de una proteína individual en una mezcla compleja.

Equipamiento necesario

- Agitador de balanceo Mini Rocker
- Agitador orbital KS 250 basic (*IKA*)
- Bandejas para revelado fotográfico
- Caja con puntas de pipeta
- Cubeta de incubación de 9’5×6’5×1’5 cm
- Cronómetro/avisador
- Estufa para desecación Digitheat 150L (*Selecta*)
- Cassette Gevamatic, 18×24 cm (*Agfa-Gevaert*)

- Película Curix RP2 Plus, 24×30 cm (*Agfa-Gevaert*)
- Guantes sin talco
- Membrana de nitrocelulosa con las proteínas fijadas
- Micropipetas de 0’002-1 ml
- Pinzas
- Pipetas de vidrio de 1-5 ml
- Plástico transparente de uso doméstico
- Tubo de ensayo

Muestra y medios

- Agua Milli-Q
- Anticuerpos primario y secundario
- Fijador Agefix (*Agfa*)
- Medio de bloqueo: leche desnatada al 5 % (v/v) en PBST
- Medio de *stripping*: Tris 62’5 mM, SDS al 2 % (p/v) y β-mercaptoetanol 100 mM ajustado a pH 6’8 con HCl
- PBS
- PBST (véase pág. 99)
- Sensibilizador de membrana Qentix® Western Blot Signal Enhancer (*Pierce*)
- Reactivos para detección quimioluminiscente de peroxidasa CPS-1-120 (*Sigma*)
- Revelador Rodinal B&W (*Agfa*)

Sensibilización de la membrana

Una vez completada la electrotransferencia, se trata la membrana de nitrocelulosa con el kit Qentix® Western Blot Signal Enhancer para incrementar la señal de la transferencia.

Procedimiento

Todo el proceso se realiza a temperatura ambiente y en un cuarto oscuro.

1. Lavar la membrana de nitrocelulosa en la cubeta de incubación con 10 ml de agua Milli-Q. Agitar de forma manual y retirar el agua rápidamente. Repetir el lavado una segunda vez.
2. Incubar la membrana con 4 ml de medio nº 1 durante 2 min usando el agitador de balanceo.

3. Lavar con 10 ml de agua Milli-Q, agitando de forma manual y retirando el agua rápidamente. Repetir la operación cuatro veces más.
4. Incubar la membrana con 4 ml de medio nº 2, durante 10 min usando el agitador de balanceo.
5. Volver a lavar 5 veces con agua Milli-Q como se describe en el punto 3.

Incubación con anticuerpos específicos

Procedimiento

1. Incubar la membrana con 8 ml de medio de bloqueo durante 1 h, a temperatura ambiente y agitación por balanceo en la cubeta de incubación.
2. Añadir el volumen requerido de anticuerpo primario (Tabla 2.5) e incubar durante la noche a 4 ºC manteniendo la agitación por balanceo.

Tabla 2.5. Anticuerpos primarios para inmunodetección

Anticuerpo	Proveedor	N° catálogo	Isotipo	Dilución	Volumen (µl)
Anti-Bax 6A7	Sigma-Aldrich	B-8429	IgG_1 de ratón	1:70	114
Anti-Casp 12	Calbiochem	PC558	IgG de conejo	1:500	16
Anti-Casp 3	Santa Cruz Biotechnology	sc-7148	IgG de conejo	1:200	40
Anti-Casp 8	Stressgen Bioreagents	AAP-118E	IgG de conejo	1:1000	8
Anti-Casp 9	Sigma-Aldrich	C-7729	IgG de conejo	1:200	40
Anti-Cit c	BD Pharmingen	556433	IgG_{2b} de ratón	1:500	16
Anti-COX IV	Molecular Probes Invitrogen	A-21348	IgG_{2b} de ratón	1:1000	8
Anti-PARP	Santa Cruz Biotechnology	sc-7150	IgG de conejo	1:200	40
Anti-γ–Tubulina	Sigma-Aldrich	T-6557	IgG_1 de ratón	1:20.000	40 (dil.1:100)

La disolución de anticuerpo diluido se puede reutilizar hasta 4-5 días después de su preparación siempre que se guarde a 4 ºC.

3. Recoger el medio con el anticuerpo y lavar la membrana durante 5 min con 10 ml de PBST, a temperatura ambiente y agitación por balanceo. Repetir el lavado dos veces más.
4. Incubar la membrana con 8 ml de tampón de bloqueo e incubar durante 30 min a temperatura ambiente y agitación por balanceo.
5. Adicionar el volumen requerido de anticuerpo secundario (Tabla 2.6) e incubar durante 1 h a temperatura ambiente y agitación por balanceo. El anticuerpo secundario se diluye 1:100 en medio de bloqueo cuando llega al laboratorio y se almacena en alícuotas de 40 µl a –20 ºC.

Tabla 2.6. Anticuerpos secundarios para inmunodetección

Anticuerpo	Proveedor	Nº catálogo	Isotipo	Dilución	Volumen (µl)
Anti-IgG de conejo con peroxidasa	Sigma-Aldrich	A-9169	IgG de cabra	1:25.000	32 (dil.1:100)
Anti-IgG de ratón con peroxidasa	Sigma-Aldrich	A-9044	IgG de conejo	1:20.000	40 (dil.1:100)

6. Desechar el medio con el anticuerpo y lavar la membrana durante 5 min con 10 ml de PBST, a temperatura ambiente y agitación orbital. Repetir el lavado dos veces más.

Revelado de la membrana

El anticuerpo secundario está conjugado con peroxidasa de rábano picante que cataliza la formación de un producto luminiscente a partir de un derivado de luminol. La incubación con una película fotográfica permite detectar la banda correspondiente a la proteína de interés.

Procedimiento

Todo el proceso se realiza a temperatura ambiente y en un cuarto oscuro.

1. Preparar la disolución de sustrato quimioluminiscente en un tubo de ensayo mezclando 1 ml de reactivo con 1 ml de medio de reacción.

2. Preparar el medio de revelado en una bandeja diluyendo 8 ml de revelador Rodinal con 392 ml agua Milli-Q —dilución 1:50.
3. Preparar el medio de fijación en otra bandeja diluyendo 57 ml de fijador Agefix con 343 ml de agua Milli-Q —dilución 1:7.
4. Eliminar el exceso de PBST de la membrana y pasarla a otra cubeta de incubación con ayuda de unas pinzas. Es importante orientar la cara de la membrana con las proteínas fijadas hacia arriba.
5. Añadir 2 ml del sustrato quimioluminiscente preparado e incubar durante 3-4 min balanceando lentamente y de forma manual.
6. Eliminar el exceso de sustrato y envolver la membrana en plástico transparente. Es importante evitar que se seque la membrana y que se formen burbujas.
7. Exponer la membrana durante 1-30 min sobre la película fotográfica dentro de un cassette Gevamatic (*Agfa-Gevaert*) de 18×24 cm.
8. Sacar la película del cassette y sumergirla en la bandeja con 400 ml de medio de revelado. Incubar balanceando manualmente el recipiente hasta que aparezcan las bandas de interés.
9. Pasar la película a una bandeja con 400 ml de agua Milli-Q y sumergir durante 10 s.
10. Pasar la película a la bandeja con 400 ml de medio de fijación e incubar 5 min, agitando lentamente.
11. Pasar la película de nuevo a la bandeja con 400 ml de agua Milli-Q y mantenerla durante 5 min.
12. Finalmente, dejar secar la película a temperatura ambiente.

Stripping de la membrana

Una determinada membrana puede ser analizada secuencialmente con distintos anticuerpos siempre que se realice el proceso de *stripping*. Este proceso permite eliminar los anticuerpos retenidos por la membrana mediante el uso combinado de detergentes y calor.

Procedimiento

1. Preparar un baño de agua a 50 ºC para precalentar medio de *stripping* antes de comenzar el procedimiento.
2. Lavar la membrana durante 5 min con 10 ml de PBST a temperatura ambiente y agitación orbital. Repetir el lavado tres veces.

3. Incubar la membrana 30 min con 10 ml de medio de *stripping* precalentado a 50 ºC y agitación orbital. Este proceso se realiza en el interior de una estufa a 50 ºC.
4. Lavar la membrana durante 5 min con 10 ml de PBST a temperatura ambiente y agitación orbital. Repetir el lavado cinco veces.
5. Repetir el revelado de la membrana para comprobar la ausencia de señal quimioluminiscente.
6. Lavar la membrana durante 5 min con 10 ml de PBST a temperatura ambiente y agitación orbital. Repetir el lavado tres veces. La membrana está ahora preparada para ser reutilizada.

DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR

El ensayo con MTT es un método colorimétrico sensible y cuantitativo con el que se puede medir la viabilidad celular. Se basa en el poder reductor de las células vivas que a través de las deshidrogenasas mitocondriales son capaces de reducir un sustrato soluble de color amarillo —MTT— en un producto insoluble de color azul oscuro —formazano— (véase pág. 105). La cantidad de formazano que se produce es directamente proporcional al número de células.

El formazano forma cristales insolubles en agua que permanecen atrapados en el interior de las células y deben ser solubilizados con un medio orgánico antes de realizar la determinación colorimétrica.

Equipamiento necesario

- Agitador vórtex
- Cronómetro/avisador
- Incubador de CO_2
- Lector de placas mod. MCC/340 (*Multiscan*)
- Micropipetas de 0’1-1 ml
- Pipeta de 12 canales y 20-300 µl

Material estéril

- Caja con puntas de pipeta
- Placas de 24 pocillos
- Placas de 96 pocillos

Muestra y medios

- Cultivo en monocapa de H9c2
- Me_2SO

- MTT 1 mg/ml. Disolver 100 mg de MTT en 100 ml de DMEM sin rojo fenol. Incubar a 37 ºC para facilitar la disolución de MTT. Eliminar restos insolubles filtrando y guardar protegido de la luz a 4 ºC por un tiempo no superior a un mes.
- DMEM a 37 ºC
- PBS a 37 ºC
- Tris 2 M ajustado a pH 10'5 con HCl

Procedimiento

Las células se cultivan en placas de 24 pocillos. Se siembran ~15 × 10^3 células/pocillo en 0'5 ml de medio de cultivo completo y se dejan crecer en el incubador de CO_2 durante 4-5 días.

1. Aspirar el medio de cultivo de cada pocillo y lavar las células con 0'5 ml de PBS. Repetir el lavado con PBS.
2. Añadir 0'5 ml de DMEM a cada pocillo. Adicionar después el agente inductor de apoptosis que corresponda y mantener el cultivo en el incubador de CO_2 el tiempo requerido por el experimento.
3. Retirar el DMEM con el agente inductor de apoptosis y lavar dos veces las células con PBS. El ensayo control se realiza de la misma forma pero en ausencia del agente inductor de apoptosis.

Los siguientes pasos se realizan en la oscuridad.

4. Añadir 0'5 ml de la disolución de MTT a cada pocillo e incubar 30 min a 37 ºC en el incubador de CO_2.
5. Aspirar la disolución de MTT y añadir 0'25 ml de Me_2SO a cada pocillo para solubilizar el formazano. Mantener 5 min a temperatura ambiente y agitación orbital.
6. Añadir ahora en cada pocillo 0'025 ml de Tris 2 M a pH 10'5. La concentración final de Tris es 0'2 M.
7. Transferir 0'2 ml del contenido de cada pocillo a una placa de 96 pocillos.
8. Medir absorbancia en el lector de placas lo antes posible porque la lectura varía con el tiempo. Seleccionar 570 nm como longitud de onda de medida y 690 nm como longitud de onda de referencia.
9. Realizar un ensayo en blanco añadiendo 0'5 ml de la disolución de MTT sobre un pocillo en ausencia de células. Restar la absorbancia obtenida a cada uno de los valores registrados.

MATERIAL FUNGIBLE

Tabla 2.7. Referencias de material fungible

Material fungible	Proveedor (N° Catálogo)
Algodón hidrófilo	Cotoni
Criotubos de 2 ml	Sarstedt (72.694.006)
Cubre-objetos para pocillos de 13 mm ∅	Sarstedt (83.1840.002)
Filtros Millex® GV	Millipore (SLGV033RS)
Filtros para electrotransferencia	Bio-Rad (1703969)
Frascos cultivo de 175 cm^2	Sarstedt (83.1812.002)
Frascos cultivo de 75 cm^2	Sarstedt (83.1813.002)
Guantes latex sin talco	Unigloves®
Membrana nitrocelulosa 0'2 µm ∅ poro	Protran (FC0224-1)
Pipetas de vidrio	Brand
Pipetas Pasteur de vidrio	Brand (747720)
Placas cultivo de 150 mm de ∅	Sarstedt (18.1803)
Placas cultivo de 35 mm de ∅ (vidrio)	MatTek (P35G-1,5-14-C)
Placas cultivo de 24 pocillos	Sarstedt (83.1836)
Placas cultivo de 96 pocillos	Sarstedt (83.1835)
Porta-objetos	Menzel-Glaser (1191050050)
Tubos 15 ml de fondo cónico	Sarstedt (62.553.542)
Tubos 50 ml de fondo cónico	Sarstedt (62.547.254)
Tubos Eppendorf	Daslab® (17-5508-N)

MATERIAL BIOLÓGICO

El material de partida consistió en hembras adultas de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) de raza Nueva Zelanda. Los ejemplares tenían un peso aproximado de 2 kg y se adquirieron en una granja local (Cabezo Cortado, Murcia) antes de cada preparación. El material biológico se preparó para obtener vesículas de RS, siguiendo el método descrito por Eletr e Inesi (1972). La enzima purificada se preparó por extracción selectiva con desoxicolato, de acuerdo con el método 2 de Meissner y otros (1973). Las vesículas de RS y la proteína purificada se repartió en alícuotas y se guardó en un congelador a –80 ºC.

La línea celular H9c2 se obtuvo de la Colección Europea de Cultivos Celulares (*www.ecacc.org.uk*), estando registrada con el número 88092904. Procedían de un pase 18 y tenían una viabilidad del 90 %. Esta línea celular proporciona un modelo experimental adecuado para el estudio de la apoptosis celular en el músculo cardíaco.

PRODUCTOS QUÍMICOS

Tabla 2.8. Referencias de reactivos

Reactivos	Proveedor (N° catálogo)
A23187	Sigma-Aldrich (C-7522)
Ácido acético glacial	J.T. Baker (6003)
Bicinconinato sódico	Sigma-Aldrich (D-8284)
Ácido desoxicólico (sal de sodio)	Sigma-Aldrich (D-6750)
Ácido plurónico	Molecular Probes (P-6867)
Ácido succínico	Sigma-Aldrich (S-7501)
AA	Serva (10675)
Azul de bromofenol	Sigma-Aldrich (B-5525)
Azul Tripán 0’4%	Sigma-Aldrich (T-8154)
ATP	Sigma-Aldrich (A7699)
[γ-^{32}P]ATP	PerkinElmer (NEG502Z)
BHQ	Aldrich (11,297-6)
Biocidal ZF	Cymit química (WAK-ZF-1)

BSA	Sigma-Aldrich (A-9418)
CCCP	Sigma-Aldrich (C-2759)
Cóctel de inhibidores de proteasas	Sigma-Aldrich (P-8340)
CsA	Sigma-Aldrich (C-3662)
$CuSO_4 \cdot 5 \cdot H_2O$	Sharlau (CO0096)
Digitonina	Sigma-Aldrich (D-141)
Disolución L-glutamina-penicilina-estreptomicina	Gibco (10378-016)
Disolución L-glutamina 200 mM	Gibco (25030-024)
Disolución de montaje para microscopía	Sigma-Aldrich (M-1289)
Disolución patrón de Ca^{2+} Tritisol®	Merck (1.09943)
DMEM (glucosa baja) con rojo fenol	Gibco (31885-023)
DMEM (glucosa baja) sin rojo fenol	Gibco (11880-028)
EGTA	Sigma-Aldrich (E-4378)
ST	Sigma-Aldrich (S-4400)
Etanol	J.T. Baker (8229)
Fijador Agefix	Agfa-Gevaert (89476 W)
Fluo-3/AM	Molecular Probes (F-1242)
Fluo-4/AM	Molecular Probes (F-14201)
Formaldehido	J.T. Baker (7040)
Fosfoenol piruvato	Sigma-Aldrich (P0564)
Fura-2/AM	Molecular Probes (F-1221)
Glicerol	Sigma-Aldrich (G-2025)
Glicina	Sigma-Aldrich (G-8898)
Glucosa	Sigma-Aldrich (G-8270)
$[H^3]$Glucosa	DuPont/NEN (NET-100)
HCl	J.T. Baker (6081)
Hepes	Sigma-Aldrich (H-3375)
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich (H-6024)
IO	Sigma-Aldrich (I-0634)

JC-1	Molecular Probes (T-3168)
KCl	Sigma-Aldrich (P-5405)
KH_2PO_4	Sigma-Aldrich (P-5379)
Leche desnatada en polvo	Carrefour
Marcadores peso molecular preteñidos para electrotransferencia	Sigma-Aldrich (C-2242)
β-Mercaptoetanol	Serva (28625)
Me_2SO ≤0.1 % agua	Sigma-Aldrich (154938)
Me_2SO anhidro	Sigma-Aldrich (151874)
Metanol	J.T. Baker (8402)
Metavanadato amónico	Acros Organics (194910500)
Mezcla centelleo líquido	Sigma-Aldrich (S-4023)
MitoTracker Red CM-H_2XRos	Molecular Probes (M-7513)
$MgCl_2$	Sigma-Aldrich (M-8266)
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	Scharlau (0084)
Molibdato amónico	Sigma-Aldrich (A-7302)
Mops	Sigma-Aldrich (M-1254)
MTT	Sigma-Aldrich (M-5655)
N,N´-Metilenbisacrilamida	Serva (29195)
$NaBH_4$	Sigma-Aldrich (452882)
NaCl	Sigma-Aldrich (S-5886)
Na_2CO_3	Sigma-Aldrich (S7795)
$NaHCO_3$	Sigma-Aldrich (S-5761)
Na_2HPO_4	Sigma-Aldrich (S-5136)
NaH_2PO_4	Fluka BioChemika (71505)
NaOH	Sigma-Aldrich (S-8045)
AO	Sigma-Aldrich (A-6014)
$NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$	Sigma-Aldrich (N-6136)
PSA	Sigma-Aldrich (A-3678)

Piruvato quinasa	Sigma-Aldrich (P-1506)
pNPP	Roche Mol. Biochemicals (107 905)
p-Nitrofenol	Roche Mol. Biochemicals
Qentix® Western Blot Signal Enhancer	Pierce (21050)
Reactivo Folin-Ciocalteu	Sigma-Aldrich (F-9252)
Revelador Rodinal	Agfa-Gevaert
Rhod-2/AM	Molecular Probes (R-1245)
Rianodina	Sigma-Aldrich (R-6017)
RNasa A	Sigma-Aldrich (R-6513)
Sacarosa	Sigma-Aldrich (S-9378)
SDS	Sigma-Aldrich (L-4390)
Suero fetal bovino	Gibco (10270-106) #Lot. 40F0741K
Sulfinpirazona	Sigma-Aldrich (S-9509)
Sustrato quimioluminiscente para peroxidasa	Sigma-Aldrich (CPS1-120)
Tartrato sódico	Sharlau (21452)
TEMED	Gibco (25050-014)
TG	Sigma-Aldrich (T-9033)
TM	Sigma-Aldrich (T-7765)
TMRM	Fluka (87919)
Tripsina 0’25 %	Gibco (25050-014).
Tris	Sigma-Aldrich (T-6066)
Tween 20	Sigma-Aldrich (P-1379)
TX-100	Sigma-Aldrich (T-8532)
Verde malaquita	Sigma-Aldrich (M-9636)
VP	Sigma-Aldrich (V-9879)

Yoduro de propidio	Sigma-Aldrich (P-4170)
z-IETD-fmk	Bachem (N-1830)
z-LEHD-fmk	BD Pharmingen (550381)
z-VAD-fmk	Bachem (N-1560)

MEDIOS TAMPONADOS Y DISOLUCIONES GENERALES

Tampón fosfato salino (PBS)

Disolver los componentes que se indican en la Tabla 2.9 en 800 ml de agua Milli-Q.

Tabla 2.9. Composición del medio PBS

Componentes	g/mol	g/L	mM
NaCl	58’44	8’00	136’90
KCl	74’56	0’20	2’68
Na_2HPO_4	142’00	1’44	10’14
KH_2PO_4	136’10	0’24	1’76

Ajustar el pH a 7’4 con HCl y completar el volumen a 1 litro. Distribuir en dos alícuotas de 500 ml y esterilizar en autoclave durante 20 min a 121 ºC haciendo un ciclo de esterilización sin secado. Guardar a 4 ºC.

Tampón fosfato salino con Tween-20 (PBST)

Disolver 0’5 ml de Tween-20 en 1 l de PBS para dar una concentración final de 0’05 %. Conservar a 4 ºC.

Medio de Hank

Preparar la disolución A de acuerdo con la composición que se describe en la Tabla 2.10. Disolver en 400 ml de agua Milli-Q.

Tabla 2.10. Composición disolución A

Componentes	g/mol	g/L	mM
NaCl	58'44	8'00	136'90
KCl	74'56	0'40	5'40
$CaCl_2$	111'00	0'14	1'30
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246'40	0'20	0'81

Preparar la disolución B con los componentes que se indican en la Tabla 2.11. Disolver en 400 ml de agua Milli-Q.

Tabla 2.11. Composición disolución B

Componentes	g/mol	g/L	mM
$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$	574'14	0'12	0'21
KH_2PO_4	136'10	0'06	0'44
$NaHCO_3$	84'01	0'35	4'20
Glucosa	180'00	1'00	5'00

Mezclar ambas disoluciones y completar el volumen a 1 l con agua Milli-Q.

ECM con Ca^{2+}

Este medio de incubación está formado por: Hepes 10 mM, NaCl 121 mM, KCl 4'7 mM, $CaCl_2$ 1 mM, $MgSO_4$ 1'2 mM, $NaHCO_3$ 5 mM, KH_2PO_4 1'2 mM, glucosa 10 mM y BSA al 0'25 % (p/v). Ajustar el pH a 7'4 con NaOH y esterilizar por filtración con un filtro Millex® GV. Conservar a 4 ºC.

ECM con EGTA

La composición del medio es: Hepes 10 mM, NaCl 121 mM, KCl 4'7 mM, EGTA 2'2 mM, $MgSO_4$ 1'2 mM, $NaHCO_3$ 5 mM, KH_2PO_4 1'2 mM, glucosa 10 mM y BSA al 0'25 % (p/v). Ajustar el pH a 7'4 con NaOH y esterilizar por filtración con un filtro Millex® GV. Conservar a 4 ºC.

A los medios ECM se les añade sulfinpirazona 0'2 mM antes de ajustar el pH cuando se van a utilizar en medidas de Ca^{2+} citosólico con los indicadores Fura-2, Fluo-3 ó Fluo-4.

MEDIOS DE CULTIVO

DMEM con glucosa baja

El medio de cultivo DMEM se utiliza para inducir el estado quiescente de las células antes de realizar cualquier experimento. Se suplementa siempre con L-glutamina 2 mM añadida en el momento de abrir la botella. La botella abierta se conserva a 4 ºC por un tiempo no superior a 15 días. La composición del medio DMEM se describe en la Tabla 2.12.

Tabla 2.12. Composición de DMEM

	Componentes	mg/l
Sales inorgánicas:	$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	264'00
	$Fe(NO_3)\ 9\ H_2O$	0'10
	KCl	400'00
	$MgSO_4\ 7\ H_2O$	200'00
	NaCl	6.400'00
	$NaHCO_3$	3.700'00
	$NaHPO_4\ 2\ H_2O$	141'00
Aminoácidos:	Ácido L-Aspártico	48'00
	Glicina	30'00
	L-Arginina · HCl	84'00
	L-Fenilalanina	66'00
	L-Glutamina	580'00
	L-Histidina HCl · H_2O	42'00
	L-Isoleucina	105'00

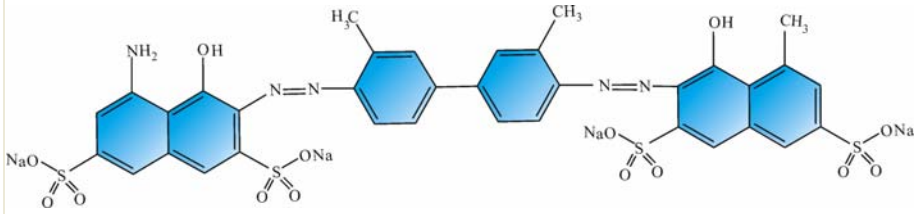
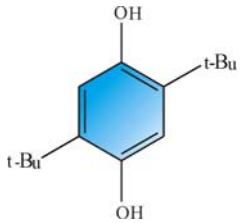
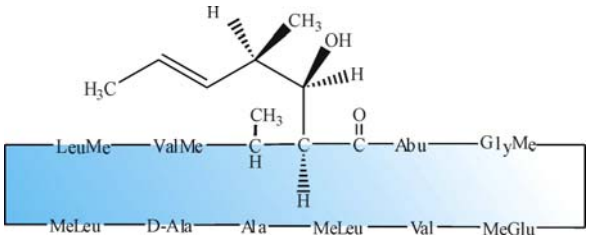
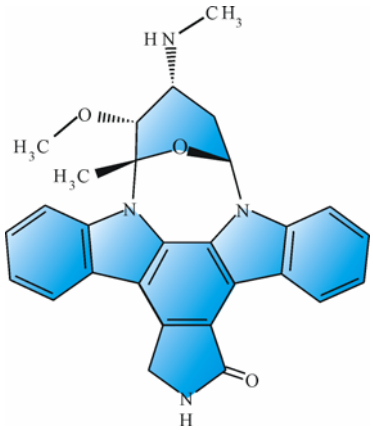
Aminoácidos:	L-Leucina	105’00
	L-Lisina · HCl	146’00
	L-Metionina	30’00
	L-Serina	42’00
	L-Tirosina	72’00
	L-Treonina	95’00
	L-Triptófano	16’00
	L-Valina	94’00
Vitaminas:	Ácido Fólico	4’00
	Cloruro de colina	4’00
	D-Pantotenato Ca^{2+}	4’00
	i-Inositol	7’20
	Nicotinamida	4’00
	Piridoxina HCl	4’00
	Riboflavina	0’40
	Tiamina HCl	4’00
Otros componentes:	D-Glucosa	1.000’00
	Piruvato sódico	110’00
	Rojo fenol	15’00

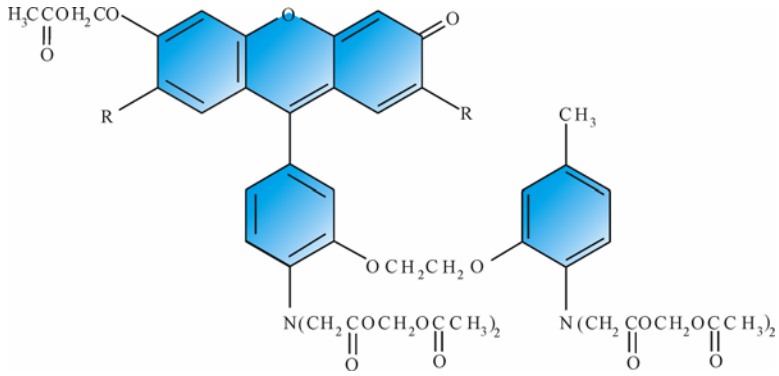
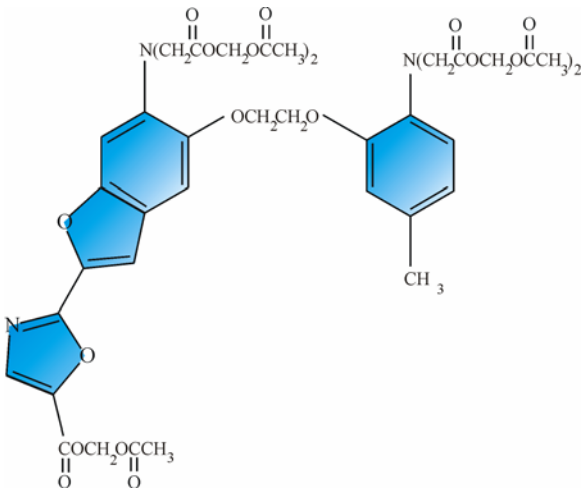
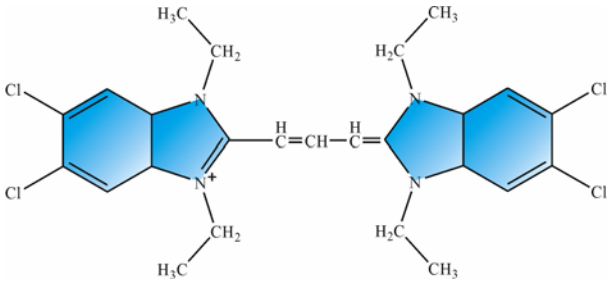
Medio de cultivo completo

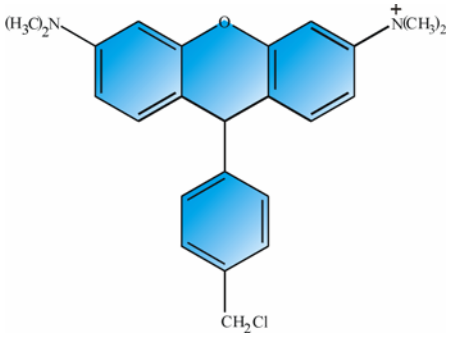
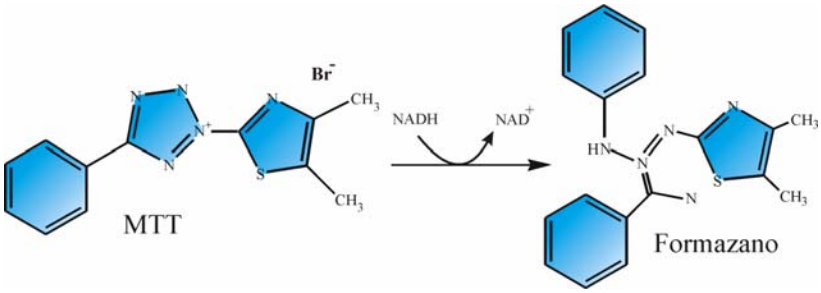
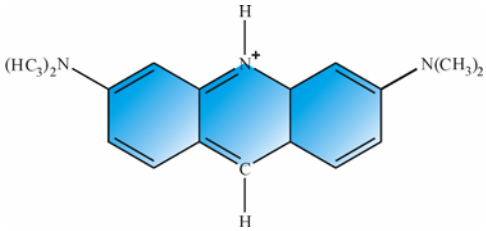
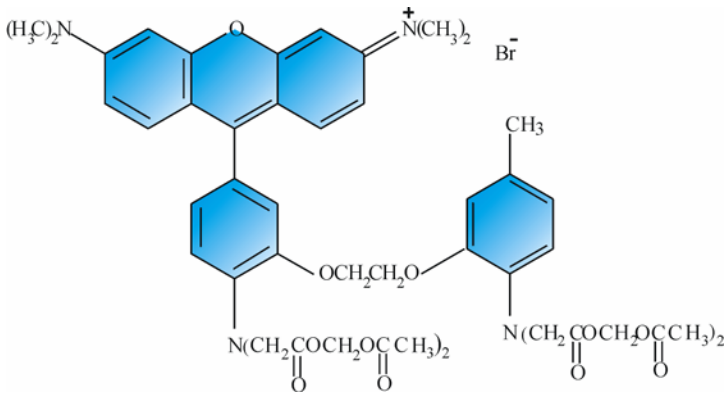
Este medio permite el crecimiento exponencial del cultivo y consiste en DMEM al que se añade L-glutamina 2 mM, suero fetal bovino al 10% (v/v), penicilina 100 unidades/ml y estreptomicina 100 μg/ml.

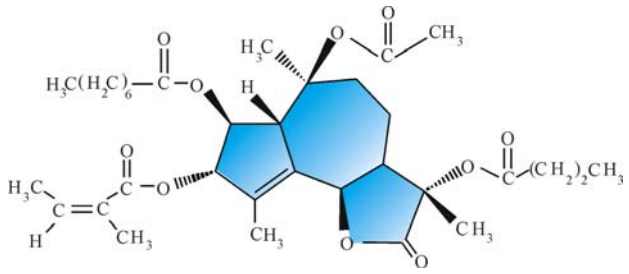
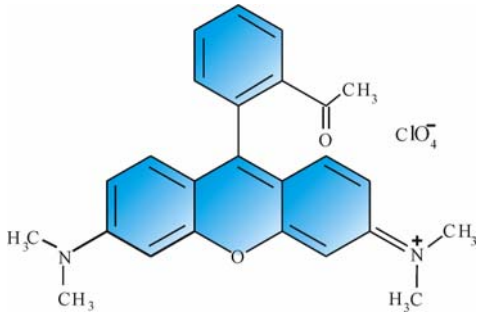
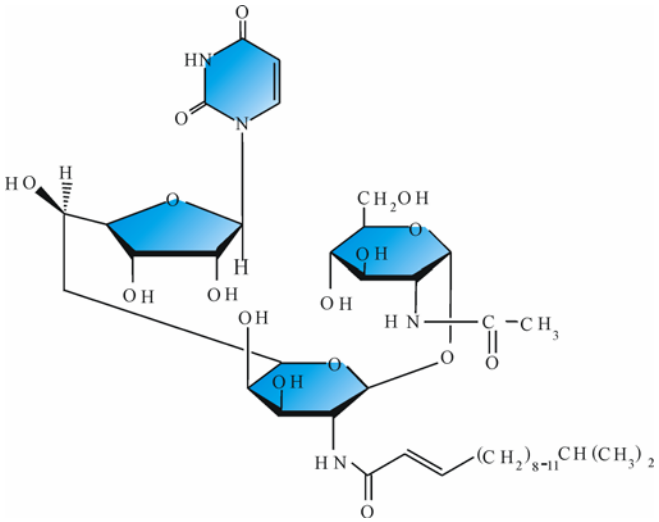
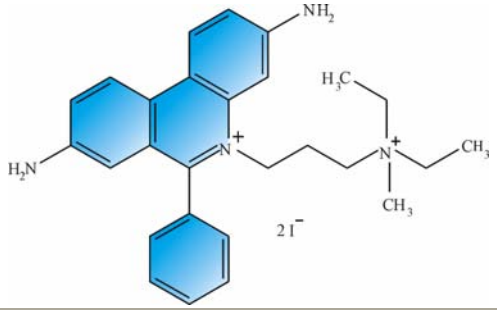
ESTRUCTURAS QUÍMICAS

Tabla 2.13. Estructura de algunos compuestos

Azul Tripán	
BHQ	
CsA	
ST	

Fluo-3/AM (R=Cl) Fluo-4/AM (R=F)	
Fura-2/AM	
JC-1	

MitoTracker Red	
MTT	
AO	
Rhod-2/AM	

TG	
TMRM	
TM	
Yoduro propidio	

3

Ca^{2+}-ATPasa en ausencia de Ca^{2+}....

Vermont Trees. David Lorenz Winston

RESUMEN

La hidrólisis de ATP que se observa al poner vesículas de RS en presencia de Mg^{2+} y ausencia de Ca^{2+} se debe a la actividad catalítica de la enzima Ca^{2+}-ATPasa. La velocidad de hidrólisis de ATP —medida a pH neutro y en presencia de Mg^{2+} 5 mM— muestra una dependencia hiperbólica cuando se expresa en función de la concentración de ATP. La hidrólisis del sustrato ATP-Mg^{2+} se inhibe tanto por Mg^{2+} libre como por ATP libre pero no se ve afectada por la presencia de vanadato. La velocidad de hidrólisis del pseudo-sustrato pNPP en ausencia de Ca^{2+} no se altera por la presencia de análogos no hidrolizables de ATP. La afinidad de unión de ATP a la enzima —a pH neutro y ausencia de Ca^{2+}— aumenta con la concentración de Mg^{2+}, pero disminuye con la de vanadato cuando Mg^{2+} está presente. Los resultados obtenidos indican que: (i) la unión de Ca^{2+} al enzima no es un requerimiento necesario para observar una hidrólisis lenta de ATP; (ii) la hidrólisis de ATP-Mg^{2+} en ausencia de Ca^{2+} requiere un cambio conformacional de la enzima que permita la aproximación de los dominios citosólicos; (iii) la actividad hidrolítica independiente de Ca^{2+} es importante cuando la concentración de Ca^{2+} en el citosol es muy baja —nivel basal o estado de reposo de la célula— o cuando la unión de Ca^{2+} a la enzima está bloqueada. Esta última situación está relacionada con el mecanismo de inhibición por TG y por otros muchos inhibidores de la enzima.

INTRODUCCIÓN

La proteína Ca^{2+}-ATPasa de RS también conocida con el acrónimo SERCA juega un papel fundamental en el mecanismo de relajación muscular. Acopla el transporte activo de Ca^{2+} desde el citosol al interior del RS al tiempo que hidroliza ATP en el citosol.

El modelo de Post-Albers propuesto para explicar el funcionamiento de la Na^+,K^+-ATPasa se basa en la existencia de dos conformaciones enzimáticas diferentes. La extrapolación de ese modelo a la Ca^{2+}-ATPasa de RS supone la existencia de una conformación enzimática que une Ca^{2+} con alta afinidad o forma E_1Ca_2 y otra conformación sin Ca^{2+} unido o forma E_2 (de Meis y Vianna, 1979). El mecanismo catalítico y de transporte requiere que el proceso de fosforilación de la enzima sea selectivo, es decir, que la conformación E_1Ca_2 se pueda fosforilar por ATP pero no por P_i mientras que E_2 se pueda fosforilar por P_i pero no por ATP.

Estudios sobre la estructura tridimensional de la enzima —obtenidos por difracción de rayos X— confirman la existencia de estados conformacionales diferentes dependiendo de que el Ca^{2+} esté o no unido. Los dominios citosólicos de la enzima están muy separados entre sí cuando la molécula se encuentra unida a dos iones Ca^{2+} (Toyoshima y otros, 2000) lo que produce un estado conformacional llamado conformación abierta. La disociación del Ca^{2+} produce un cambio conformacional de la proteína al hacer que los dominios citosólicos se agrupen para dar una estructura más compacta (Toyoshima y Nomura, 2002) o conformación cerrada. La transición desde la conformación cerrada hasta la conformación abierta tiene lugar cuando el Ca^{2+} se une a la enzima y satura los sitios de transporte de Ca^{2+}: $E_2 + 2Ca^{2+} \rightarrow E_1Ca_2$. La presencia de una molécula de ATP provoca el acercamiento de los dominios citosólicos para que se produzca la fosforilación: $E_1Ca^{2+} + ATP \rightarrow E_1PCa_2 + ADP$ y el posterior transporte de Ca^{2+}.

El esquema convencional de reacción contempla una secuencia cíclica de etapas parciales que determinan el transporte de dos iones Ca^{2+} por cada ATP que se hidroliza. Las medidas de hidrólisis de ATP en estado estacionario proporcionan valores de acoplamiento entre Ca^{2+} transportado y ATP hidrolizado inferiores a dos (Meltzer y Berman, 1984; Yu e Inesi, 1995) y la sustitución de ATP por pseudo-sustratos provoca un mayor desacoplamiento intramolecular (de Meis y Fialho de Mello, 1973; Rossi y otros, 1979; Fortea y otros, 2000). Los datos experimentales también confirman la existencia de una baja velocidad de hidrólisis de ATP cuando las vesículas de RS se incuban en presencia de Mg^{2+} y ausencia de Ca^{2+}. El origen de esta actividad independiente de Ca^{2+} —que también se conoce como actividad basal— ha sido una cuestión de debate ya que no quedaba claro si la actividad se debía a la Ca^{2+}-ATPasa o a otra proteína diferente (Hasselbach, 1964; Fernández y otros, 1980; Carvalho-Alves y Scofano, 1987). Esta cuestión permanece sin aclarar y lo que suele hacerse es restar la actividad independiente de Ca^{2+} de la actividad hidrolítica total para expresar la actividad dependiente de Ca^{2+}.

El objetivo de este capítulo es caracterizar la actividad independiente de Ca^{2+} estudiando el efecto de diferentes ligandos que interaccionan con el centro catalítico de la Ca^{2+}-ATPasa como Mg^{2+}, AMP-PNP, pNPP y vanadato. Para ello hemos utilizado preparaciones microsomales de RS o Ca^{2+}-ATPasa purificada a las que hemos sometido a diferentes situaciones experimentales. Analizando la unión e hidrólisis de ATP en ausencia de Ca^{2+} se puede obtener información sobre el centro

catalítico y el mecanismo de acción. Los datos obtenidos se han interpretado utilizando el modelo atómico de la Ca^{2+}-ATPasa y permiten proponer una ruta alternativa para la hidrólisis de ATP en la que no intervienen cambios conformacionales dependientes de Ca^{2+}. La contribución de esta ruta puede ser significativa cuando la enzima se encuentra en presencia de niveles bajos de Ca^{2+} o está bloqueada su capacidad para unir Ca^{2+}.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Los compuestos radiactivos [γ–^{32}P]ATP y [^{3}H]glucosa se obtuvieron de PerkinElmer Life Sciences y DuPont/NEN, respectivamente. Los reactivos de grado analítico y la mezcla de centelleo líquido se obtuvieron de Sigma. pNPP (sal disódica) y p-nitrofenol se adquirieron de Roche Molecular Biochemicals. La disolución estándar de Ca^{2+} Titrisol® fue de Merck. El metavanadato amónico se obtuvo de Acros Organics. La disolución patrón de ortovanadato 1 mM se preparó a partir de metavanadato amónico añadiendo agua ultrapura (grado milli-Q) y ajustando a pH 10 con NaOH. La disolución no contenía cantidades apreciables de decavanadato como lo demuestra la ausencia de color amarillo anaranjado (Hua y otros, 1999). Filtros de nitrocelulosa con ∅ de poro de 0’45 μm procedentes de Millipore y una unidad de filtración a vacío de Amersham Biosciences (GE Healthcare) se utilizaron en los experimentos de unión de ATP a la enzima.

Concentración de Ca^{2+} libre

La concentración de Ca^{2+} libre en el medio de reacción se ajustó añadiendo determinados volúmenes de disoluciones patrón de EGTA y/o $CaCl_2$ y teniendo en cuenta la presencia del Ca^{2+} contaminante (Fabiato, 1988). Los valores teóricos se calcularon utilizado un programa informático que considera la constante de estabilidad absoluta para el complejo Ca^{2+}-EGTA (Schwartzenbach y otros, 1957), los equilibrios de protonación para el EGTA (Blinks y otros, 1982), la presencia de ligandos de Ca^{2+} y el pH del medio. El “medio sin Ca^{2+}” se preparó añadiendo EGTA 1 mM. La denominación “medio sin Ca^{2+}” indica que la concentración de Ca^{2+} es lo suficientemente baja que no permite la activación de la enzima.

Preparación de muestras

Las vesículas de RS se aislaron a partir de músculo blanco de contracción rápida de las patas traseras de conejo. Los animales utilizados fueron hembras adultas de la raza Nueva Zelanda. Los ejemplares con peso aproximado de 2–2'5 kg procedían de una granja local y se adquirieron antes de cada preparación. El procedimiento de preparación fue el descrito por Eletr e Inesi (1972).

La purificación de la proteína Ca^{2+}-ATPasa se realizó a partir de vesículas de RS por extracción selectiva con desoxicolato, de acuerdo con el método 2 de Meissner y otros (1973).

Las vesículas de RS y la proteína purificada se distribuyeron en alícuotas y se guardaron en un ultracongelador a −80 ºC.

La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry y otros (1951) utilizando BSA como proteína patrón.

Hidrólisis de ATP en ausencia de Ca^{2+} y K^{+}

La actividad hidrolítica de vesículas de RS o de Ca^{2+}-ATPasa purificada se estudió a 25 ºC en presencia de un sistema regenerador de ATP. El medio típico de reacción para medir la hidrólisis de ATP contenía: Mops 20 mM, pH 7'0, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 1 mM, fosfoenolpiruvato 2 mM, piruvato quinasa 6 UI/ml, y 0'2 mg/ml de vesículas de RS o enzima purificada. La cantidad de P_i liberado a distintos tiempos tras la adición de ATP se evaluó por el método de Lanzetta y otros (1979).

La hidrólisis enzimática del sustrato pNPP en ausencia de Ca^{2+} se midió sin sistema regenerador de sustrato y utilizando una concentración de Mg^{2+} 20 mM. La reacción de hidrólisis se detuvo a diferentes tiempos mezclando 1 ml del medio de reacción con 0'2 ml de ácido tricloroacético al 10 % (p/v). Las muestras se centrifugaron posteriormente a 8.700 ×g (10.000 rpm) durante 5 min a 4 ºC. Un ml de cada sobrenadante se alcalinizó añadiendo 50 µl de NaOH 10 N para dar una concentración final de NaOH 0'5 N. El p-nitrofenol en el sobrenadante se cuantificó midiendo la absorbancia a 420 nm y usando como coeficiente de extinción molar $\varepsilon = 1'62 \times 10^4\ M^{-1}\ cm^{-1}$ (Fernández-Belda y otros, 2001).

Hidrólisis de ATP en presencia de Ca^{2+} y K^{+}

Las velocidades iniciales de hidrólisis de ATP se evaluaron a 25 ºC en un medio formado por: Mops 20 mM, pH 7'0, KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 1 mM, $CaCl_2$ 0'986 mM —equivalente a Ca^{2+} libre 10 μM—, fosfoenolpiruvato 2 mM, piruvato quinasa 6 UI/ml, A23187 1'5 μM y 0'2 mg/ml de vesículas de RS. La reacción se inició añadiendo una determinada concentración de ATP al medio de ensayo y la hidrólisis de ATP se midió evaluando la acumulación de P_i en el medio por el método de Lanzetta y otros (1979).

Unión de ATP en ausencia de Ca^{2+}

La unión de ATP a la enzima en condiciones de equilibrio se midió mediante técnica radiactiva y filtración de las muestras. El procedimiento permite distinguir entre unión específica y no específica de [γ-^{32}P]ATP utilizando doble marcaje radiactivo (Champeil y Guillain, 1986). Para ello se utiliza un segundo marcador radiactivo con espectro energético claramente distinto del de ^{32}P. En nuestro caso hemos utilizado [^{3}H]glucosa. Los experimentos se realizaron a 25 ºC incubando 0'4 mg/ml de vesículas de RS en un medio compuesto por: Mops 20 mM, pH 7'0, $MgCl_2$ 1 mM y EGTA 1 mM. A continuación, alícuotas de 1 ml de este medio se depositaron sobre filtros de nitrocelulosa que estaban previamente humedecidos con agua Milli-Q y puestos en un colector de filtración conectado a una bomba de vacío. Los filtros se perfundieron rápidamente con 1 ml de medio que contenía: Mops 20 mM, pH 7'0, $MgCl_2$ 1 mM, EGTA 1 mM, [^{3}H]glucosa 1 mM (~1.000 cpm/nmol) y una concentración de [γ-^{32}P]ATP comprendida entre 1 y 50 μM (~30.000 cpm/nmol). La hidrólisis de ATP durante el tiempo de perfusión es despreciable. Tras la perfusión, los filtros se introdujeron en viales de polietileno de 5 ml y se les añadió 3 ml de mezcla de centelleo. La radiactividad de los isótopos ^{32}P y ^{3}H se midió en un contador de centelleo líquido modelo 2100TR de Packard. El efecto del Mg^{2+} sobre la unión de ATP a la enzima se ensayó usando $MgCl_2$ 5 ó 20 mM, tanto en el medio de incubación como en el de perfusión. La ausencia de Mg^{2+} en el medio de ensayo se consiguió incluyendo EDTA 10 mM y no añadiendo $MgCl_2$.

El efecto de vanadato sobre la unión de ATP se ensayó utilizando un protocolo similar. En este caso, el medio de preincubación y el de perfusión contenían una determinada concentración de vanadato comprendida entre 1 y 100 μM y la concentración de $MgCl_2$ fue de 5 mM en lugar de 1 mM.

Presentación de los datos

Los datos experimentales corresponden a la media de al menos tres experimentos —realizados por duplicado— y muestran la desviación estándar. Las curvas de unión de ATP se ajustaron a la ecuación de Hill:

$$Y = \frac{Y_{máx}\left[ATP\right]^n}{\left(K^n_{0'5} + \left[ATP\right]^n\right)}$$

donde Y e $Y_{máx}$ corresponden a unión de ATP y unión máxima de ATP, respectivamente. $K_{0'5}$ es la concentración que proporciona la mitad de la unión máxima y *n* es el coeficiente de Hill. La ecuación de Hill también se aplicó a medidas cinéticas:

$$v = \frac{V_{máx}\left[ATP\right]^n}{\left(K^n_{0'5} + \left[ATP\right]^n\right)}$$

El ajuste se realizó mediante regresión no lineal usando la versión 8.0 del programa informático Sigma Plot (*Jandel Scientific*).

Modelos moleculares

Los datos estructurales de la proteína en presencia de Ca^{2+} (Toyoshima y otros, 2000) o en ausencia de Ca^{2+} (Toyoshima y Nomura, 2002) se obtuvieron de los códigos 1EUL y 1IWO, respectivamente que se encuentran en el *Protein Data Bank*. Las coordenadas atómicas y los cálculos se realizaron con el programa informático DS ViewerPro 5.0 de *Accelrys Inc.* (San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

Las preparaciones microsomales de vesículas de RS son capaces de hidrolizar ATP en ausencia de Ca^{2+} y presencia de Mg^{2+}. Esta actividad enzimática se estudió a 25 ºC en un medio de reacción que contenía: Mops 20 mM, pH 7’0, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 1 mM y 0’2 mg/ml de vesículas de RS. La concentración de ATP varió entre 1 μM y 1 mM —siempre inferior a la concentración de Mg^{2+}—. La concentración de ATP durante el tiempo de medida se mantuvo constante incluyendo en el medio de reacción un sistema regenerador de ATP formado por fosfoenolpiruvato y piruvato quinasa.

En primer lugar se estudió el efecto de la concentración de ATP sobre la actividad hidrolítica de ATP, en presencia de $MgCl_2$ 5 mM y ausencia de Ca^{2+}. Al representar la velocidad de hidrólisis en función de la concentración de ATP —en escala lineal— se observa una dependencia hiperbólica (Fig. 3.1, panel A). Para demostrar que la enzima responsable de esta actividad es la Ca^{2+}-ATPasa, repetimos este mismo experimento con enzima purificada. La dependencia obtenida es la misma que se observa con vesículas de RS.

En un segundo ensayo comparamos la velocidad de hidrólisis de ATP —en ausencia y en presencia de Ca^{2+} libre 10 μM— frente a concentraciones crecientes de ATP (Fig. 3.1, panel B). En este caso, la concentración de ATP se representa en escala logarítmica. El ensayo pone en evidencia que la actividad enzimática en presencia de Ca^{2+} muestra una dependencia sigmoidal que es claramente diferente a la obtenida en ausencia de Ca^{2+}. La actividad hidrolítica en presencia de Ca^{2+} es 10 veces mayor que la actividad hidrolítica en ausencia de Ca^{2+} cuando la concentración de ATP es 1 mM.

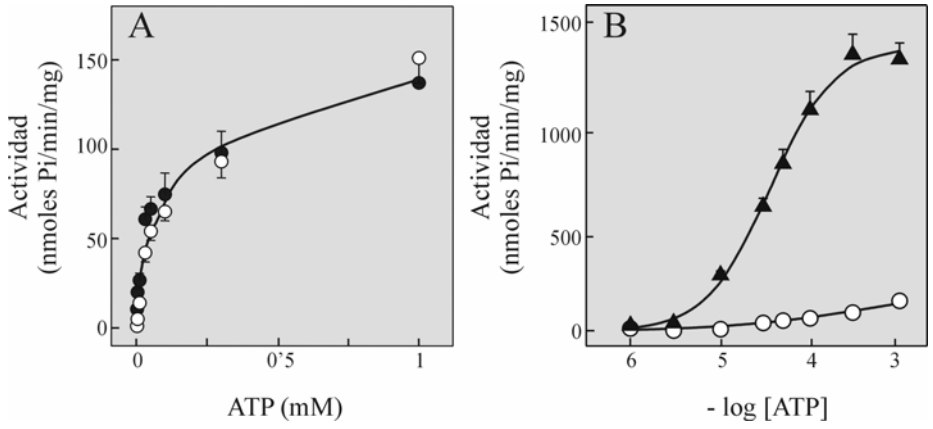


Figura 3.1.- Efecto del ATP sobre la velocidad de hidrólisis de ATP. (A) Los experimentos se realizaron a 25 ºC en un medio sin Ca^{2+} compuesto por: Mops 20 mM, pH 7'0, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 1 mM, fosfoenolpiruvato 2 mM, piruvato quinasa 6 UI/ml y 0'2 mg/ml de vesículas de RS (○) o ATPasa purificada (●). La reacción de hidrólisis se inició añadiendo una determinada concentración de ATP. Alícuotas de 20 μl se sacaron a diferentes tiempos y se añadieron sobre tubos con 0'8 ml de reactivo de Lanzetta para detener la reacción enzimática. Tras 1 min se añadió 0'1 ml de citrato al 34 % esperando 30 min a temperatura ambiente antes de medir la absorbancia a 660 nm. (B) Los experimentos se realizaron a 25 ºC en un medio con Ca^{2+} libre 10 μM compuesto por: Mops 20 mM, pH 7'0, KCl 80 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 1 mM, $CaCl_2$ 0'986 mM, fosfoenolpiruvato 2 mM, piruvato quinasa 6 UI/ml, A23187 1'5 μM y 0'2 mg/ml de vesículas de RS (▲). Los datos de hidrólisis de ATP en ausencia de Ca^{2+} (○) son los mismos que se muestran en el panel A con círculos blancos.

Las vesículas de RS a 25 ºC y pH neutro se incubaron con concentraciones de Mg^{2+} entre 10 µM y 100 mM para determinar el efecto de la concentración de Mg^{2+} sobre la actividad hidrolítica. El medio contenía exceso de EGTA para asegurar la ausencia de Ca^{2+} y se utilizaron concentraciones de ATP de 0'2 mM, 0'5 mM ó 1 mM. La velocidad de hidrólisis —para cada una de las concentraciones de ATP— muestra una dependencia en forma de campana al representar la concentración de Mg^{2+} en escala logarítmica (Fig. 3.2). La velocidad máxima que corresponde al valor máximo de las curvas es dependiente de la concentración de ATP. Aumenta al elevar la concentración de ATP desde 0'2 a 0'5 y 1 mM. Los resultados también muestran que el efecto inhibidor que produce Mg^{2+} es dependiente de la concentración de ATP. El tramo descendente de la curva se observa cuando la concentración de Mg^{2+} es superior a la concentración de ATP.

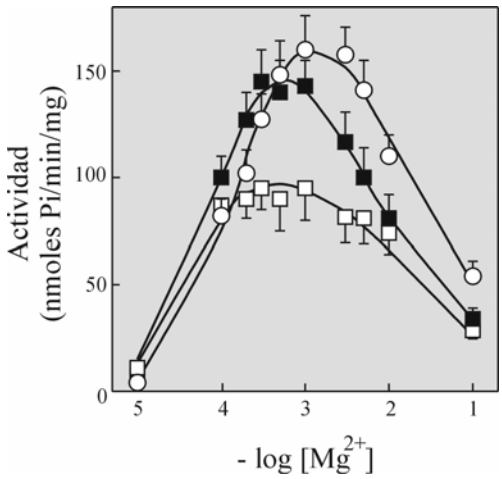


Figura 3.2.- Efecto del Mg^{2+} sobre la velocidad de hidrólisis de ATP en ausencia de Ca^{2+} a diferentes concentraciones de ATP. El medio de reacción a 25 ºC contenía: Mops 20 mM, pH 7'0, una determinada concentración de $MgCl_2$, EGTA 1 mM, fosfoenolpiruvato 2 mM, piruvato quinasa 6 UI/ml y 0'2 mg/ml de vesículas de RS. Las reacciones se iniciaron añadiendo ATP 0'2 (□), 0'5 (■) ó 1 mM (○) al medio de reacción.

Las vesículas de RS también su utilizaron para estudiar el efecto de la concentración de ATP sobre la actividad hidrolítica en ausencia de Ca^{2+} y su relación con la concentración de Mg^{2+}. La concentración de ATP en estos experimentos varió entre 100 µM y 10 mM y se utilizaron tres concentraciones diferentes de Mg^{2+}: 0'2, 1 ó 20 mM. Al representar la velocidad de hidrólisis frente al logaritmo de la concentración de ATP se observa una dependencia con forma de

campana cuando la concentración de Mg^{2+} es 0'2 ó 1 mM (Fig. 3.3). El tramo descendente de la curva —que corresponde a un efecto inhibidor de ATP— aparece cuando la concentración de ATP supera a la concentración de Mg^{2+}. Al utilizar la concentración más elevada de Mg^{2+} (20 mM) solo se observa el tramo ascendente de la curva.

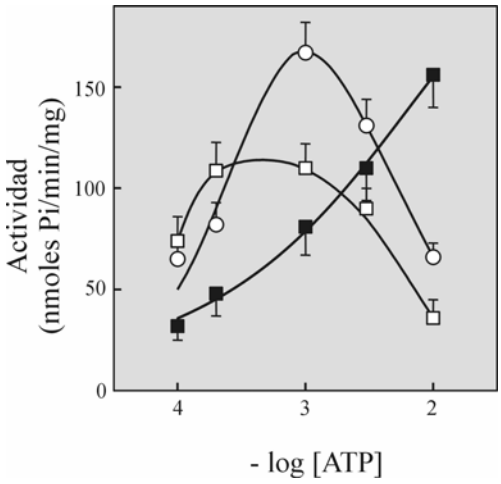


Figura 3.3.- Efecto del ATP sobre la velocidad de hidrólisis en ausencia de Ca^{2+} al usar diferentes concentraciones de Mg^{2+}. El medio de reacción estuvo compuesto por: Mops 20 mM, pH 7'0, EGTA 1 mM, fosfoenolpiruvato 2 mM, piruvato quinasa 6 UI/ml, 0'2 mg/ml de vesículas de RS y $MgCl_2$ 0'2 (□), 1 (○) ó 20 mM (■). Los experimentos se realizaron 25 ºC y se iniciaron añadiendo ATP a una determinada concentración comprendida entre 0'1 y 10 mM.

En otra serie de ensayos se estudió el efecto de determinados compuestos que interaccionan con la Ca^{2+}-ATPasa y modifican sus propiedades catalíticas. Este es el caso de vanadato, que es un análogo estructural de P_i (Dupont y Bennett, 1982; Pick 1982) y de AMP-PNP que es un análogo no hidrolizable de ATP. En estos experimentos se incubaron vesículas de RS a 25 ºC y pH neutro en un medio sin Ca^{2+} que contenía Mg^{2+} 5 mM. La presencia de un sistema regenerador de ATP permitió mantener constante la concentración del nucleótido. La dependencia que muestra la velocidad de hidrólisis de ATP respecto a la concentración de ATP —cuando ésta se representa en escala logarítmica— es la misma en ausencia o en presencia de vanadato 0'1 mM (Fig. 3.4). Por el contrario, la dependencia de la actividad respecto a la concentración de ATP se desplaza hacia concentraciones mayores de ATP cuando el medio de reacción incluye AMP-PNP 0'1 mM.

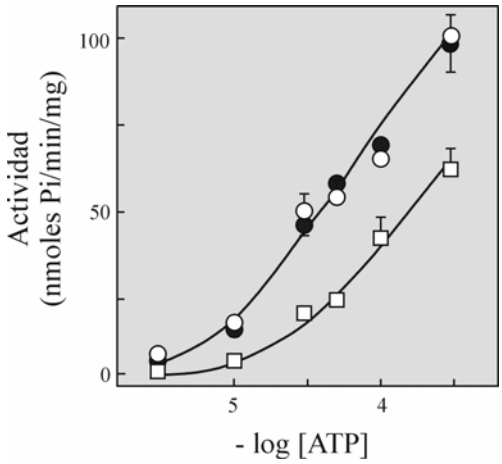


Figura 3.4.- Actividad ATPasa en ausencia de Ca^{2+} al variar la concentración de ATP: efecto de vanadato o AMP-PNP. La reacción de hidrólisis se estudió a 25 ºC en un medio formado por: Mops 20 mM, pH 7'0, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 1 mM, fosfoenolpiruvato 2 mM, piruvato quinasa 6 UI/ml y 0'2 mg /ml de vesículas de RS (●). El medio de reacción se completó con vanadato 0'1 mM (○) o AMP-PNP 0'1 mM (□) antes de añadir el ATP.

La Ca^{2+}-ATPasa es capaz de hidrolizar *in vitro* sustratos fosforilantes distintos de ATP como son UTP (Fortea y otros, 2000), acetilfosfato (Soler y otros, 2002) y pNPP (Fernández-Belda y otros, 2001). Para estudiar el efecto de vanadato o de AMP-PNP sobre la velocidad de hidrólisis de pNPP en ausencia de Ca^{2+} se utilizaron vesículas de RS a pH neutro y 25 ºC. La concentración de Mg^{2+} fue 20 mM y la concentración de pNPP varió entre 1 y 20 mM. Al representar la velocidad de hidrólisis de pNPP respecto a la concentración de pNPP —en escala logarítmica— se observa un aumento de la velocidad al elevar la concentración de pNPP (Fig. 3.5). Los datos también indican que el perfil de hidrólisis no se modifica por la presencia de AMP-PNP 0'1 mM en el medio de ensayo. El resultado fue distinto al incluir vanadato 1 μM en lugar de AMP-PNP. En este caso, el perfil de hidrólisis de pNPP muestra valores más bajos de actividad requiriéndose concentraciones más altas de sustrato para conseguir un determinado nivel de actividad.

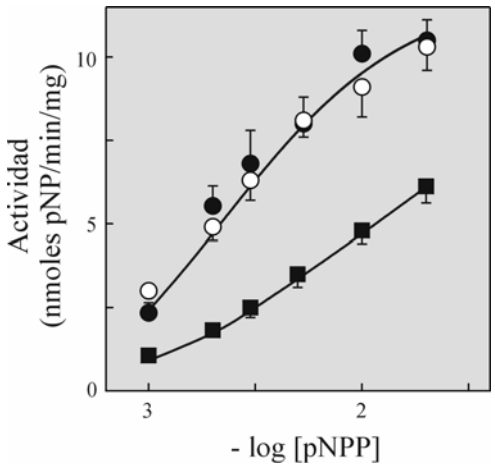


Figura 3.5.- Efecto de vanadato o AMP-PNP sobre la hidrólisis de pNPP en ausencia de Ca^{2+} al variar la concentración de sustrato. La reacción de hidrólisis de pNPP se midió a 25 ºC en un medio compuesto por: Mops 20 mM, pH 7'0, $MgCl_2$ 20 mM, EGTA 1 mM y 0'2 mg/ml de vesículas de RS (●). La reacción se inició añadiendo una determinada concentración de pNPP. El medio de reacción se completó cuando se indica con vanadato 1 μM (■) o AMP-PNP 0'1 mM (○) añadidos antes que el pNPP.

El efecto de vanadato sobre la hidrólisis de diferentes sustratos fosforilantes en ausencia de Ca^{2+} también fue objeto de estudio. La adición de concentraciones crecientes de vanadato —hasta 100 μM— no afecta a la velocidad de hidrólisis cuando el sustrato es ATP 10 μM (Fig. 3.6). Estos experimentos se realizaron en presencia del sistema regenerador de ATP. Por el contrario, la velocidad de hidrólisis es muy sensible a vanadato al utilizar pNPP 10 mM como sustrato fosforilante. La inhibición máxima se alcanza a una concentración de vanadato de 10 μM.

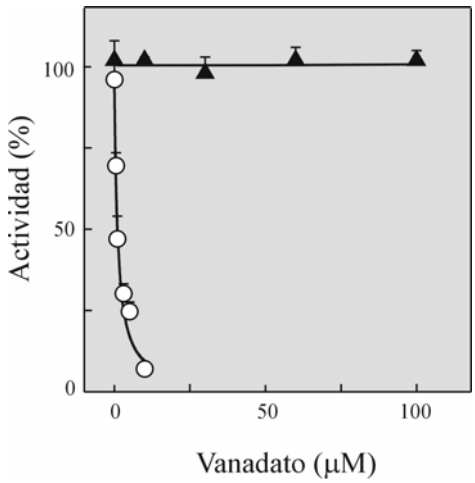


Figura 3.6.- Efecto de vanadato sobre la hidrólisis de sustrato en ausencia de Ca^{2+}. La actividad hidrolítica se midió a 25 ºC en un medio que contenía: Mops 20 mM, pH 7'0, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 1 mM, fosfoenolpiruvato 2 mM, piruvato quinasa 6 UI/ml, 0'2 mg/ml de vesículas de RS y ATP 10 μM (▲) ó Mops 20 mM, pH 7'0, $MgCl_2$ 20 mM, EGTA 1 mM, 0'2 mg/ml de vesículas de RS y pNPP 10 mM (○). El medio de reacción se completó con las concentraciones de vanadato que se indican en la figura.

Estudiando el efecto de Mg^{2+} sobre la unión de ATP a la enzima en condiciones de equilibrio también se obtiene información sobre el centro catalítico de la Ca^{2+}-ATPasa. Este ensayo se realizó con vesículas de RS incubadas en un medio sin Ca^{2+} y en presencia de una determinada concentración de Mg^{2+}. El protocolo experimental consistió en perfundir rápidamente las muestras depositadas en filtros con un medio que contenía diferentes concentraciones de [γ-^{32}P]ATP. Después se evaluaba la radiactividad asociada a las vesículas usando un contador de centelleo líquido. La afinidad aparente de unión de ATP disminuye claramente en presencia de un exceso de EDTA, añadido al medio para eliminar la presencia de Mg^{2+} contaminante (Fig. 3.7). La afinidad de unión del ATP aumenta cuando la concentración de Mg^{2+} es 1 mM y es todavía algo mayor con Mg^{2+} 5 mM. El aumento de la concentración de Mg^{2+} a 20 mM da lugar a una pequeña disminución de la afinidad de unión de ATP.

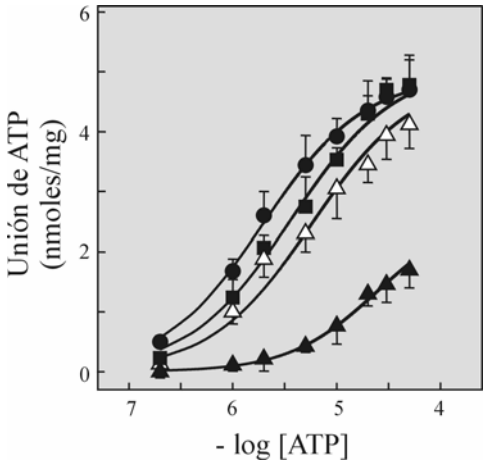


Figura 3.7.- Efecto del Mg^{2+} sobre la unión de ATP a la enzima en condiciones de equilibrio y ausencia de Ca^{2+}. El medio de incubación a 25 ºC contenía: Mops 20 mM, pH 7'0, $MgCl_2$ 1 mM, EGTA 1 mM y 0'4 mg/ml de vesículas de RS. El medio de perfusión fue: Mops 20 mM, pH 7'0, $MgCl_2$ 1 mM, EGTA 1 mM, [^{3}H]glucosa 1 mM y una determinada concentración de [γ-^{32}P]ATP comprendida entre 0'2 y 50 µM (△). Las medidas se hicieron filtrando alícuotas de 1 ml y lavando rápidamente los filtros de modo manual con 1 ml de medio de perfusión que contenía el ATP radiactivo. La radiactividad retenida en los filtros se utilizó para evaluar la unión específica de ATP por la técnica de doble marcaje radiactivo. Los experimentos se repitieron usando Mg^{2+} 5 (●) ó 20 mM (■) en los medios de incubación y perfusión. La ausencia de Mg^{2+} (▲) se consiguió incluyendo EDTA 10 mM en los medios de incubación y perfusión sin añadir $MgCl_2$.

La unión de ATP al centro catalítico también se estudió en presencia de vanadato. La concentración de Mg^{2+} en estos experimentos fue 5 mM y el vanadato

estuvo presente tanto en el medio de incubación como en el medio de perfusión. La curva de unión de ATP a pH neutro no se afecta cuando vanadato 1 μM está presente junto con el ATP radiactivo en el medio de perfusión (Fig. 3.8). Sin embargo, la presencia de vanadato 10 μM produce una clara disminución en la afinidad de unión de ATP. Este efecto es aún mayor al aumentar la concentración de vanadato a 100 μM.

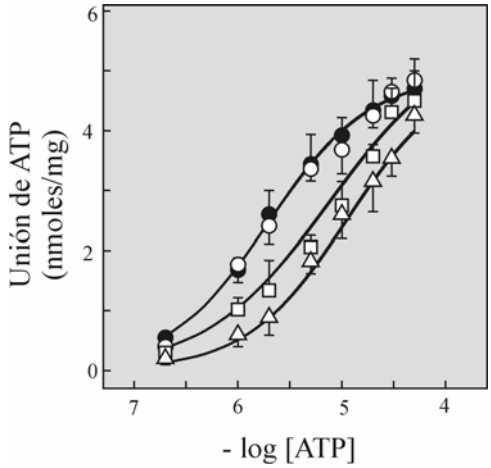


Figura 3.8.- Efecto de vanadato sobre la unión de ATP a la enzima en condiciones de equilibrio y ausencia de Ca^{2+}. El medio de incubación a 25 ºC contenía: Mops 20 mM, pH 7'0, $MgCl_2$ 5mM, EGTA 1 mM y 0'4 mg/ml de vesículas de RS. Alícuotas de 1 ml se filtraron y se lavaron rápidamente con un medio compuesto por: Mops 20 mM, pH 7'0, $MgCl_2$ 1 mM, EGTA 1 mM, [3H]glucosa 1 mM y una determinada concentración de [γ-^{32}P]ATP. Las medidas se hicieron en ausencia (●) o presencia de vanadato 1(○), 10 (□) ó 100 μM (△).

DISCUSIÓN

La velocidad de hidrólisis de ATP en presencia de Ca^{2+} muestra una dependencia sigmoidal respecto a la concentración de ATP (Fig. 3.1, panel B). La respuesta cinética implica una etapa limitante de velocidad que habitualmente está asociada con el proceso de translocación de Ca^{2+} (Inesi y otros, 1982; Champeil y Guillain, 1986). Por el contrario, la actividad ATPasa en ausencia de Ca^{2+} presenta una dependencia hiperbólica con respecto a la concentración de ATP cuando se muestra en escala lineal (Fig. 3.1, panel A). Es importante señalar que la actividad hidrolítica en ausencia de Ca^{2+} representa ~10 % del valor de la actividad dependiente de Ca^{2+} cuando se mide en las condiciones mostradas y en presencia de

ATP 1 mM. La velocidad de hidrólisis en ausencia de Ca^{2+} no muestra efecto de saturación cuando el ATP se eleva hasta 1 mM (Figs. 3.1, panel B y 3.4).

El análisis de los experimentos realizados con diferentes concentraciones de ATP y en ausencia de Ca^{2+} también muestra que la actividad hidrolítica tiene el mismo comportamiento si se usan vesículas de RS o enzima purificada (Fig. 3.1, panel A). Esto indica que podemos atribuir la actividad observada a la Ca^{2+}-ATPasa de RS y por tanto la unión de Ca^{2+} no es un requerimiento indispensable para que se produzca hidrólisis de ATP a baja velocidad. Esta observación es incompatible con el ciclo de reacción acoplado donde la fosforilación por ATP requiere la especie E_1Ca_2 pero es consistente con resultados previos obtenidos en diferentes condiciones experimentales (Carvalho-Alves y Scofano, 1987; Fernández-Belda y otros, 2001; Soler y otros, 2002).

La actividad ATPasa independiente de Ca^{2+} representa un pequeño porcentaje si se compara con la actividad hidrolítica máxima medida en presencia de Ca^{2+} cuando el sustrato es ATP (Fig. 3.1, panel B). Sin embargo, la situación es diferente cuando se utilizan otros sustratos fosforilantes y/u otras condiciones experimentales. La actividad independiente de Ca^{2+} puede suponer en ciertos casos hasta un 50 % de la actividad hidrolítica total o incluso más (Fortea y otros, 2000; Fernández-Belda y otros, 2001; Soler y otros, 2002). Una actividad ATPasa baja cuando se mide en ausencia de Ca^{2+} indica que las constantes cinéticas de las etapas limitantes de velocidad son significativamente más bajas que cuando se mide en presencia de Ca^{2+}. Sin embargo, cuando la enzima está en ausencia de Ca^{2+} o el proceso de unión de Ca^{2+} este bloqueado toda la población enzimática está obligada a seguir esta ruta.

La preparación de enzima purificada que hemos utilizado muestra una sola banda proteica cuando se somete a separación electroforética en presencia de detergente (Fortea y otros, 2001). Es importante señalar que esta preparación expresa actividad ATPasa independiente de Ca^{2+} y produce acumulación de un intermedio fosforilado con masa molecular análoga a la de Ca^{2+}-ATPasa de RS cuando se utiliza UTP como sustrato fosforilante y se incluye Me_2SO en el medio de ensayo (Fortea y otros, 2000). Esto permite descartar la participación de una Mg^{2+}-ATPasa descrita como componente minoritario de las membranas de los túbulos transversales. Esta Mg^{2+}-ATPasa es una glicoproteína de 105 kDa que no guarda relación estructural con la Ca^{2+}-ATPasa de RS. De hecho, es muy sensible a la inactivación por la mayoría de detergentes y se diferencia de la Ca^{2+}-ATPasa en

que es resistente a la inactivación por 5'-isotiocianato de fluoresceína (Kirley, 1988).

La actividad ATPasa en ausencia de Ca^{2+} se inhibe por Mg^{2+} libre o por ATP libre (Figs. 3.2 y 3.3). Esto se puede explicar si aceptamos que el sustrato de la enzima es ATP-Mg^{2+}. Otra posible explicación es que la actividad catalítica de la enzima necesite Mg^{2+} libre —que se elimina por exceso de ATP— o ATP libre —que se elimina por exceso de Mg^{2+}. Esta segunda opción requeriría la existencia de sitios adicionales para la unión de estos ligandos libres cosa que no está apoyada por los datos cristalográficos de la proteína.

La hidrólisis de ATP en ausencia de Ca^{2+} se inhibe por la presencia de AMP-PNP —que es un análogo estructural de ATP— pero no por vanadato. Por el contrario, la hidrólisis de pNPP se inhibe por vanadato mientras que AMP-PNP no tiene efecto (Figs. 3.4 y 3.5). Estos resultados indican que ATP y vanadato o bien AMP-PNP y pNPP pueden acomodarse simultáneamente dentro del sitio catalítico, pero no así ATP y AMP-PNP o pNPP y vanadato. Esta conclusión está apoyada por el efecto inhibidor que ejerce vanadato sobre la hidrólisis de pNPP pero no sobre la hidrólisis de ATP que se mide en ausencia de Ca^{2+} (Fig. 3.6).

El aumento de la afinidad de unión de ATP que ejerce Mg^{2+} (Fig. 3.7) puede atribuirse a un descenso de la repulsión electrostática que permite que el fosfato γ del ATP pueda acercarse al anión carboxilato de Asp351 para desencadenar el ataque nucleofílico. Esta explicación también permite entender la necesidad de Mg^{2+} para la fosforilación de E_2 por P_i, la baja afinidad de unión de P_i en ausencia de Mg^{2+} y su dependencia del pH. La disminución de la afinidad de unión de ATP que produce vanadato (Fig. 3.8) puede atribuirse a la repulsión electrostática entre cargas negativas que se produce en el sitio catalítico.

La K_m para la hidrólisis de ATP en ausencia de Ca^{2+} es 0'5 mM (Fig. 3.1, panel A) mientras que la unión de ATP en ausencia de Ca^{2+} y presencia de Mg^{2+} 5 mM muestra una K_d 3 μM (Fig. 3.7). Estas diferencias se deben a que K_m no es una medida directa de la afinidad de unión del sustrato ya que también depende de otras constantes cinéticas. La falta de correlación entre los valores de K_m y K_d es mucho mayor para la actividad ATPasa independiente de Ca^{2+} que para la actividad dependiente de Ca^{2+}. Por otra parte, la hidrólisis de ATP en ausencia de Ca^{2+} no es sensible a inhibición por vanadato (Fig. 3.6) mientras que vanadato sí inhibe la

unión de ATP a la enzima (Fig. 3.8). Una situación similar es la que se observa en el caso de TG que es capaz de inhibir la unión en equilibrio de ATP a la enzima (DeJesus y otros, 1993) pero ese efecto no tiene reflejo cuando se mide la actividad ATPasa en un medio libre de Ca^{2+} (Fortea y otros, 2001). También se sabe que fosfolambano —proteína que regula la actividad Ca^{2+}-ATPasa en células de músculo cardíaco— aumenta el valor de K_m para la activación por Ca^{2+} cuando está sin fosforilar pero no afecta a la K_d para la unión de Ca^{2+} (Lee, 2003).

Datos de la bibliografía indican que el efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad hidrolítica no depende de la presencia o ausencia de Ca^{2+} cuando el sustrato es arilazido-ATP (Oliveira y otros, 1988). El sustrato trinitrofenil-ATP también presenta un comportamiento similar (Watanabe e Inesi, 1982; Dupont y otros, 1985) lo que indica que un incremento de la aromaticidad en la molécula de ATP favorece la utilización del sustrato a través de la ruta independiente de Ca^{2+}, incluso cuando el medio de reacción contiene Ca^{2+}. Esto pone de relieve que las actividades hidrolíticas dependiente e independiente de Ca^{2+} son intercambiables y ambas pueden atribuirse a la enzima Ca^{2+}-ATPasa (Soler y otros, 2002).

El ciclo de reacción acoplado se basa en que los procesos de fosforilación de la enzima e hidrólisis de ATP están asociados al transporte de Ca^{2+} (ciclo E_1-E_2 en Fig. 3.9). Este ciclo de reacción acoplado se desacopla por la acumulación de Ca^{2+} libre en el interior del RS (Meltzer y Berman, 1984; Yu e Inesi, 1995; Fortea y otros, 2000). Las observaciones descritas en este capítulo demuestran la existencia de otra vía de desacoplamiento que procede de la hidrólisis de ATP cuando los sitios de unión de Ca^{2+} están vacíos (ciclo E_2). Este ciclo desacoplado no permite la acumulación de EP en las condiciones habituales de medida aunque sí se observa cierta acumulación al aumentar la concentración de sustrato (Oliveira y otros, 1988) o la hidrofobicidad del medio (Carvalho-Alves y Scofano, 1987; Soler y otros, 2002).

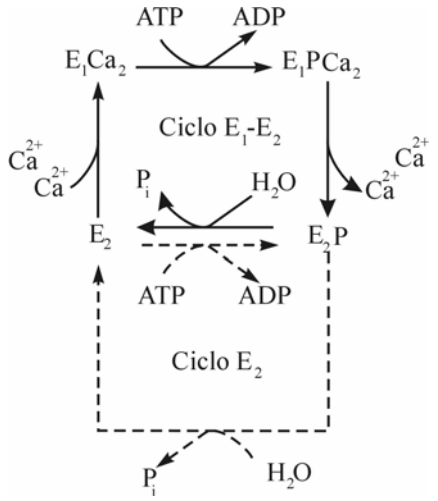


Figura. 3.9.- Rutas catalíticas de la Ca^{2+}-ATPasa. La adición de ATP a la enzima en presencia de Ca^{2+} (E_1Ca_2) permite la formación del intermedio fosforilado E_1PCa_2. Este intermedio sufre un cambio conformacional que conduce a la liberación de Ca^{2+} dentro del RS y a la acumulación de E_2P. La hidrólisis de E_2P libera P_i y forma E_2 que puede comenzar un nuevo ciclo. Esta ruta —representada con línea continua— corresponde a un ciclo de reacción acoplado o ciclo E_1-E_2. La adición de ATP en ausencia de Ca^{2+} o cuando el proceso de unión de Ca^{2+} está inhibido, produce formación de EP sin Ca^{2+} unido (E_2P) que no se acumula y posterior hidrólisis a E_2 y P_i. Esta ruta —línea discontinua— corresponde a un ciclo de reacción desacoplado o ciclo E_2.

El ciclo E_2 puede funcionar en condiciones de reposo celular cuando el Ca^{2+} libre en el citosol está próximo a 0'1 μM. Esta ruta desacoplada también estaría involucrada en la hidrólisis de ATP cuando la conformación E_2 se estabiliza frente a la conformación E_1Ca_2. Este comportamiento se produce cuando la enzima se encuentra en presencia de determinados inhibidores de la actividad ATPasa dependiente de Ca^{2+} como es el caso de TG (Sagara e Inesi, 1991; Fortea y otros, 2001) o cuando se eleva la hidrofobicidad del medio de reacción (Carvalho-Alves y Scofano, 1987; Oliveira y otros, 1988; Soler y otros, 2002).

La unión de ATP a la conformación E_1Ca_2 deja al sustrato fosforilante relativamente lejos del centro de fosforilación. Esto implica que el ATP debe inducir un cambio conformacional para permitir que su fosfato γ se acerque al grupo carboxilo de Asp351 (Toyoshima y otros, 2000; Ma y otros, 2003). El efecto de ATP sobre la conformación E_2 no se conoce pero se puede analizar utilizando el modelo atómico de la enzima cristalizada en presencia de TG que da lugar a la estabilización de E_2TG (Toyoshima y Nomura, 2002).

Los datos sobre estructura de la proteína sin Ca^{2+} indican que la distancia entre Lys492 —que está en el dominio N— y Asp351 —que está en el dominio P— es de 19'3 Å mientras que la distancia entre Lys515 y Asp351 es de 23'8 Å (Tabla 3.1). Datos previos sobre la estructura de la Ca^{2+}-ATPasa indican que el anillo de purina del ATP interacciona con el dominio N cerca de Lys492 y Lys515. Esto significa que el fosfato γ tras la unión del ATP queda lejos del centro de fosforilación (Fig. 3.10, panel A). Por tanto, resulta necesaria una modificación de la conformación E_2 para permitir la aproximación del dominio N al dominio P lo cual explicaría la existencia de actividad ATPasa en ausencia de Ca^{2+}. El modelo molecular de la Ca^{2+}–ATPasa en ausencia de Ca^{2+} sugiere un proceso de ajuste inducido por el sustrato tal como se ha descrito para otras enzimas como adenilato quinasa (Sinev y otros, 1996) que también utilizan ATP.

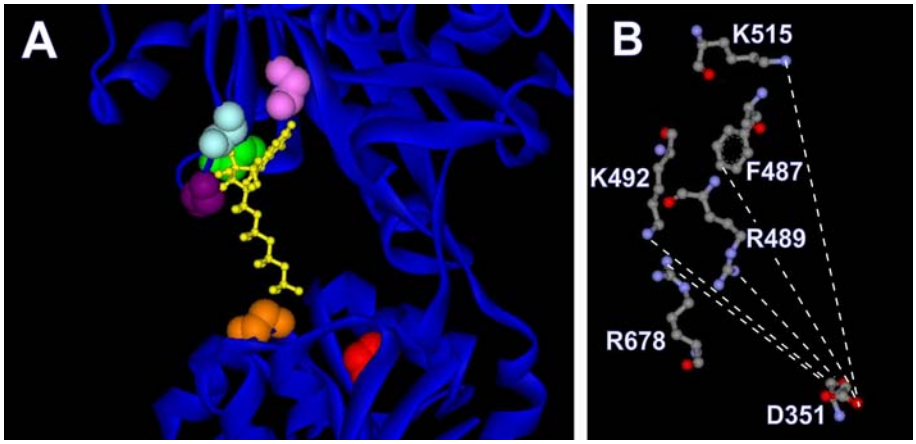


Figura 3.10.- Centro activo de la Ca^{2+}-ATPasa en el estado E_2TG. (A) Detalle de la región citosólica donde se encuentra el centro catalítico. La estructura covalente corresponde a la cinta azul e incluye con relleno espacial algunos residuos importantes: Asp351 (*rojo*), Phe487 (*azul claro*), Arg489 (*violeta*), Lys492 (*verde*), Lys515 (*rosa*) y Arg678 (*naranja*). Para mayor claridad se han omitido las cadenas laterales de los aminoácidos. La molécula de ATP —con la adenina en conformación *anti* y los tres grupos fosfato extendidos— se muestra en amarillo. El anillo de purina interacciona con el dominio N cerca de Lys492 y Lys515. (B) Localización de residuos importantes representados con el modelo de bolas y varillas. Atomos de C (*gris*), N (*azul*) y O (*rojo*). La cadena lateral de Asp351 aparece unida a residuos importantes del dominio N mediante líneas discontinuas.

Tabla 3.1. Distancias interatómicas en el sitio catalítico de la Ca^{2+}-ATPasa de RS[a]

	F487	R489	K492	K515	R678
D351	30’5	33’9	30’9	30’2	18’0
	19’4	14’5	19’3	23’8	16’2

[a]Los datos estructurales se han obtenido de los códigos de identificación 1EUL y 11WO del *Protein Data Bank*. La fila superior corresponde a distancias en la conformación E_1Ca_2 mientras que la fila inferior recoge las distancias en E_2TG. Los valores se expresan en Å y están tomados entre átomos del extremo de la cadena lateral de D351 y de los otros residuos que se muestran en la tabla. Las líneas discontinuas que se muestran en la Fig. 3.10, panel B corresponden a distancias interatómicas en la conformación E_2TG.

4

Depósitos intracelulares y flujos de Ca^{2+} en células H9c2 ....

Among the Aspen. Bill Atkinson

RESUMEN

La caracterización de depósitos intracelulares y flujos de Ca^{2+} en células H9c2 se ha realizado con ayuda de indicadores fluorescentes y compuestos que movilizan Ca^{2+}. VP da lugar a un aumento transitorio de Ca^{2+} citosólico, siendo 6 nM la concentración que produce la mitad del efecto máximo mientras que 3 nM es la concentración de TG que produce la mitad del efecto máximo. La despolarización de la MIM mediante un protonóforo también ocasiona un aumento en el nivel de Ca^{2+} citosólico. El ionóforo IO induce un pequeño descenso del $\Delta\Psi_m$ que se mantiene a lo largo del tiempo mientras que TG provoca un descenso pequeño que es transitorio. El depósito de Ca^{2+} sensible a TG es también sensible a IO mientras que el depósito sensible a protonóforo no lo es. El aumento transitorio del Ca^{2+} mitocondrial no se inhibe por CsA cuando la descarga reversible del depósito del RSE se produce mediante la adición de VP. Sin embargo, el aumento transitorio del Ca^{2+} mitocondrial se inhibe por CsA cuando se produce una descarga irreversible del Ca^{2+} almacenado en el RSE mediante TG. Estas observaciones indican que la mitocondria es capaz de interpretar las señales de Ca^{2+} citosólico que se generan en el depósito intracelular del RSE.

INTRODUCCIÓN

El ión Ca^{2+} es capaz de actuar como mensajero intracelular en el control de numerosos procesos celulares. Su papel modulador requiere la acción coordinada de numerosos transportadores y moléculas reguladoras (Clapham, 1995; Berridge y otros, 2003). Los primeros estudios en los que se medían niveles de Ca^{2+} citosólico mostraron que algunos de los aumentos de Ca^{2+} eran transitorios y tenían amplitud y duración variables (Allen y Blinks, 1978; Yue y otros, 1986) mientras que otros mostraban un patrón oscilatorio (Woods y otros, 1986). La señal de Ca^{2+} que controla el latido cardíaco constituye un buen ejemplo de fenómeno oscilatorio inducido por Ca^{2+} (Berridge, 2003).

El avance de las técnicas de imagen para medir la evolución de los flujos intracelulares de Ca^{2+} (Rudolf y otros, 2003) ha confirmado que la respuesta final que transmite una señal de Ca^{2+} depende no solo de la amplitud sino también de su distribución en el espacio y el tiempo. La idea actual es que cada señal de Ca^{2+} se forma a partir de una combinación de elementos que tiene como base la interacción específica de señales locales de Ca^{2+} con determinadas moléculas diana (Bootman y otros, 2001).

La elevación de Ca^{2+} citosólico que actúa como señal intracelular puede deberse a la salida de Ca^{2+} de depósitos intracelulares y/o a la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular. El RSE es el mayor depósito intracelular de Ca^{2+} y el Ca^{2+} almacenado en este orgánulo es esencial para el plegamiento y maduración de las proteínas. Otra función importante del Ca^{2+} almacenado en el RSE es servir como señal para inducir el proceso de la contracción muscular (Berridge, 2002). Estudios realizados en la última década (Duchen, 2000) han demostrado que el Ca^{2+} que almacena la mitocondria es también un componente importante en la generación de señales citosólicas de Ca^{2+}. A ello habría que añadir la existencia de otros depósitos intracelulares de Ca^{2+} —cuya función no se conoce con detalle— entre los que se encuentran el núcleo (Echevarría y otros, 2003) y el aparato de Golgi (Pinton y otros, 1998; Missiaen y otros, 2001).

La complejidad de la señal de Ca^{2+} la hace apropiada para regular una gran variedad de procesos fisiológicos. Es por ello que cualquier fallo en el control de la señal activa procesos tales como alteración funcional de orgánulos, desorganización del citoesqueleto, fragmentación de cromatina y otros efectos autodestructivos que conducen a la muerte celular por apoptosis (Orrenius y otros, 2003).

La alteración de la homeostasis intracelular del Ca^{2+} se asocia a varias enfermedades cardiacas incluyendo el daño isquémico. En este sentido, las células H9c2 constituyen un modelo adecuado para investigar la isquemia cardiaca *in vitro* (Mestril y otros, 1994; He y otros, 1999; Mizukami y otros, 2000; Tanno y otros, 2003) ya que disponen de los mecanismos de señalización presentes en los miocitos adultos. En este capítulo hemos analizado respuestas de Ca^{2+} citosólico y mitocondrial así como la relación entre señal de Ca^{2+} y $\Delta\Psi_m$ en presencia de diferentes compuestos movilizadores de Ca^{2+}. Los experimentos se han realizado con células H9c2 y tienen como objetivo caracterizar flujos y depósitos intracelulares de Ca^{2+} que están implicados en la generación de señales intracelulares de Ca^{2+}.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Las células H9c2 procedentes de miocitos de corazón embrionario de rata se obtuvieron de la Colección Europea de Cultivos Celulares (*www.ecacc.org.uk*).

Reactivos y medios

Los derivados AM de Fura-2, Rhod-2 y Fluo-3 así como ácido plurónico® F-127 y TMRM se adquirieron de Molecular Probes™ (Invitrogen). VP, TG, BHQ, CCCP, IO de *Streptomyces conglobatus*, CsA y otros reactivos de grado analítico se obtuvieron de Sigma-Aldrich. La disolución patrón de Ca^{2+} fue de Merck. DMEM con baja glucosa, L-glutamina, suero fetal bovino, la disolución penicilina-estreptomicina-L-glutamina y otros reactivos usados para el cultivo fueron de Gibco® (Invitrogen).

El medio de cultivo completo estaba compuesto por: DMEM, suero fetal bovino al 10 % (v/v), L-glutamina 2 mM, penicilina 100 unidades/ml y estreptomicina 100 μg/ml. El medio de tripsinización fue de Gibco® y contenía tripsina al 0'25 % (v/v). ECM con Ca^{2+} estaba compuesto por: Hepes 10 mM, NaCl 121 mM, KCl 4'7 mM, $CaCl_2$ 1 mM, $MgSO_4$ 1'2 mM, $NaHCO_3$ 5 mM, KH_2PO_4 1'2 mM, glucosa 10 mM y BSA al 0'25 % (p/v) ajustado a pH 7'4. El pH del medio se reajustaba siempre al añadir sulfinpirazona 0'2 mM. ECM con EGTA —que es un medio en ausencia de Ca^{2+}— se preparó sustituyendo $CaCl_2$ 1 mM por EGTA 2'2 mM. El medio para cargar células con una sonda fluorescente que detecta Ca^{2+} citosólico fue ECM con Ca^{2+} al que se añadía 2 μM de la correspondiente sonda, ácido plurónico al 0'02 % (p/v) y sulfinpirazona 0'2 mM. El medio ECM con Ca^{2+} para cargar células con TMRM o Rhod-2 carecía de sulfinpirazona.

Cultivo de células H9c2

Los cultivos se mantuvieron a 37 ^{o}C y en atmósfera húmeda con CO_2 al 5 % en medio de cultivo completo. Las células se sembraban en placas de cultivo de plástico de 150 mm de ∅ que se subcultivaban o utilizaban para realizar experimentos al alcanzar una confluencia del 70–80 %. Las células se sembraban en placas de vidrio de 35 mm de ∅ cuando se iban a examinar con el microscopio confocal.

Preparación de dihidroRhod-2/AM

Las medidas de Ca^{2+} mitocondrial se realizaron con el indicador Rhod-2. En este caso es necesario conseguir que la señal fluorescente que procede del Ca^{2+} citosólico sea nula o mínima. Esto se consigue reduciendo Rhod-2 a dihidroRhod-2 antes de realizar la carga. La forma reducida —que no es fluorescente— entra en la

célula y se oxida de forma selectiva dentro de la mitocondria para dar Rhod-2 —que es fluorescente— y sirve como sonda de Ca^{2+} mitocondrial. El procedimiento se realizó a temperatura ambiente y oscuridad de acuerdo con un protocolo previamente establecido (Hajnóczky y otros, 1995).

Procedimiento

1. Disolver 50 μg de Rhod-2/AM en 100 μl de Me_2SO anhidro. La concentración final de Rhod-2/AM es de 0'4 mM.
2. Añadir una pequeña cantidad de $NaBH_4$ sólido. La reducción del indicador fluorescente hace que la disolución cambie de color rojo a incoloro. Utilizar inmediatamente para preparar el medio de carga.

Carga de los indicadores fluorescentes

Las células en cultivo se incubaron a 37 ^{o}C durante 30 min con el medio de carga que contenía la forma éster del indicador de Ca^{2+} correspondiente a una concentración de 2 μM.

Las medidas fluorimétricas de Ca^{2+} se realizaron con células cargadas con Fura-2 o dihidroRhod-2. Las células despegadas de las placas tras la carga se lavaron y después se resuspendieron a una concentración de ~2−4 × 10^6 células/ml en ECM con Ca^{2+}. La suspensión de células se mantuvo a 25 ^{o}C durante 30 min para permitir la desesterificación intracelular del indicador fluorescente.

Las medidas fluorimétricas del $\Delta\Psi_m$ se realizaron con células cargadas con TMRM. La carga se realizó despegando las células e incubándolas a 37 ^{o}C durante 15 min en ECM con Ca^{2+} y TMRM 0'2 μM.

Las medidas de fluorescencia se realizaron durante un tiempo máximo de 3 h después de la desesterificación de las sondas.

En todos los casos, las células se resuspendieron en ECM con Ca^{2+} a 25 ºC antes de las medidas.

Las células preparadas para ser observadas en el microscopio se cargaron con Fluo-3 o dihidroRhod-2, se lavaron dos veces y se volvieron a incubar durante otros 30 min a 25 ^{o}C en ECM con Ca^{2+} para permitir la desesterificación intracelular del indicador fluorescente.

Imágenes confocales

La fluorescencia se analizó con un equipo de microscopía confocal de barrido de Leica-Microsystems formado por un microscopio invertido de fluorescencia DM IRE II acoplado a un modulo TCS SP2. Las muestras se observaron a través de un objetivo HCX PL APO 63× de inmersión de aceite y AN de 1'32. Los planos confocales seleccionados fueron los que presentaban un diámetro mayor de los núcleos. La excitación del Fluo-3 se hizo con el laser de argon y la emisión se recogió en el intervalo 504-530 nm. La excitación de Rhod-2 y TMRM se hizo con el laser GreNe. Los intervalos de longitud de onda de emisión fueron 574-611 nm para Rhod-2 ó 570-643 nm para TMRM. La apertura confocal fue de 140 μm lo que proporcionó una profundidad de campo en el eje z de 1'1 μm.

Fluorescencia de muestras en suspensión

Las medidas se realizaron a 25 ^{o}C con agitación continua en un espectrofluorímetro de doble longitud de onda Aminco-Bowman serie 2. Las células cargadas con indicador fluorescente se diluyeron en la cubeta de medida inmediatamente antes de empezar a registrar la señal. La concentración de células tras la dilución fue de ~2×10^5 células/ml en los experimentos con Fura-2 y de ~3×10^5 células/ml cuando se utilizaba Rhod-2 o TMRM. Este procedimiento se aplicó cuando el indicador fluorescente era Fura-2 y el medio de dilución era ECM con EGTA o ECM con Ca^{2+} y Ni^{2+} 10 mM. En los experimentos donde el medio de dilución era ECM con Ca^{2+} pero sin Ni^{2+}, la suspensión de células se centrifugó a 480 ×g durante 10 min para eliminar el indicador del medio extracelular y luego se resuspendió en ECM con Ca^{2+} antes de cada medida. La concentración final de Ca^{2+} libre después de la dilución fue 2'5 nM cuando el medio de dilución era ECM con EGTA, lo que para nuestros propósitos equivale a un medio sin Ca^{2+}. Los medios de dilución o resuspensión contenían sulfinpirazona 0'2 mM cuando se utilizaba Fura-2 como indicador fluorescente.

Las medidas con los indicadores Fura-2 y TMRM se hicieron en modo *ratio*. En las medidas con Fura-2, las células se excitaron a 340 y 380 nm y la emisión se seleccionó a 510 nm. Para las medidas con TMRM se seleccionaron longitudes de onda de excitación de 546 y 573 nm y como longitud de onda de emisión 590 nm.

Las longitudes de onda de excitación y emisión en los experimentos con Rhod-2 fueron 550 y 580 nm, respectivamente.

La concentración de Ca^{2+} libre en el citosol se determinó aplicando la ecuación descrita por Grynkiewicz y otros (1985):

$$\left[Ca^{2+}\right]=K_d \times Q \times \frac{(R-R_{mín})}{(R_{máx}-R)}$$

El procedimiento detallado está descrito en el *Capítulo* 2. La determinación de la constante aparente de disociación del complejo Ca^{2+}-Fura-2 y la distribución de Fura-2 entre citosol y compartimentos intracelulares también se describen en el *Capítulo* 2.

El Ca^{2+} mitocondrial se expresa en unidades arbitrarias ($\Delta F/F \times 100$) debido a que Rhod-2 no se puede medir en modo *ratio* y por tanto su calibración es difícil e imprecisa (Hajnóczky y otros, 1995; Monteith y Blaustein, 1999). Las medidas realizadas con TMRM se expresan en forma de cociente (F_{573}/F_{546}) o mediante la constante de velocidad de primer orden (1-100k).

Concentración de Ca^{2+} libre

La concentración de Ca^{2+} libre se ajustó variando la proporción de $CaCl_2$ y EGTA que se añade al medio (Fabiato, 1988). El cálculo de los valores teóricos se realizó con un programa de ordenador que tiene en cuenta la constante de estabilidad absoluta del complejo Ca^{2+}-EGTA (Schwartzenbach y otros, 1957), los equilibrios de protonación del EGTA (Blinks y otros, 1982), la presencia de agentes capaces de unir Ca^{2+} y el pH del medio.

Presentación de datos

Los registros que se muestran en las figuras son resultados representativos tras realizar cinco o más ensayos. Los trazos experimentales originales se trataron con un programa de ordenador basado en el algoritmo de Savitsky-Golay para reducir el ruido. Los valores de las gráficas que muestran datos en forma de puntos corresponden a la media de al menos tres ensayos independientes. También se representa la desviación estándar positiva o negativa de cada valor. El ajuste de datos experimentales y el cálculo de constantes de velocidad se realizaron con la versión 8.0 del programa informático Sigma-Plot (*Jandel Scientific*).

RESULTADOS

La señal intracelular de Ca^{2+} se ha estudiado en diferentes tipos de células utilizando indicadores fluorescentes y la técnica de microscopía confocal (Cheng y otros, 1993; Koizumi y otros, 1999; Thomas y otros, 2000). En este estudio hemos cargado las células H9c2 con el indicador Fluo-3 durante 30 min a 37 ºC. Las células cargadas con Fluo-3 e incubadas en ECM con Ca^{2+} muestran una fluorescencia débil (Fig. 4.1, panel A). La fluorescencia aumenta en intensidad cuando se añade el ionóforo IO para colapsar los gradientes de Ca^{2+} (Fig. 4.1, panel B). El indicador Rhod-2 —que permite observar el depósito de Ca^{2+} mitocondrial— muestra una distribución punteada, no homogénea y que está ausente de la región nuclear. (Fig. 4.1, panel C). Un patrón similar de distribución granulada se observa en células cargadas con TMRM que es un indicador del $\Delta\Psi_m$ (Fig. 4.1, panel D).

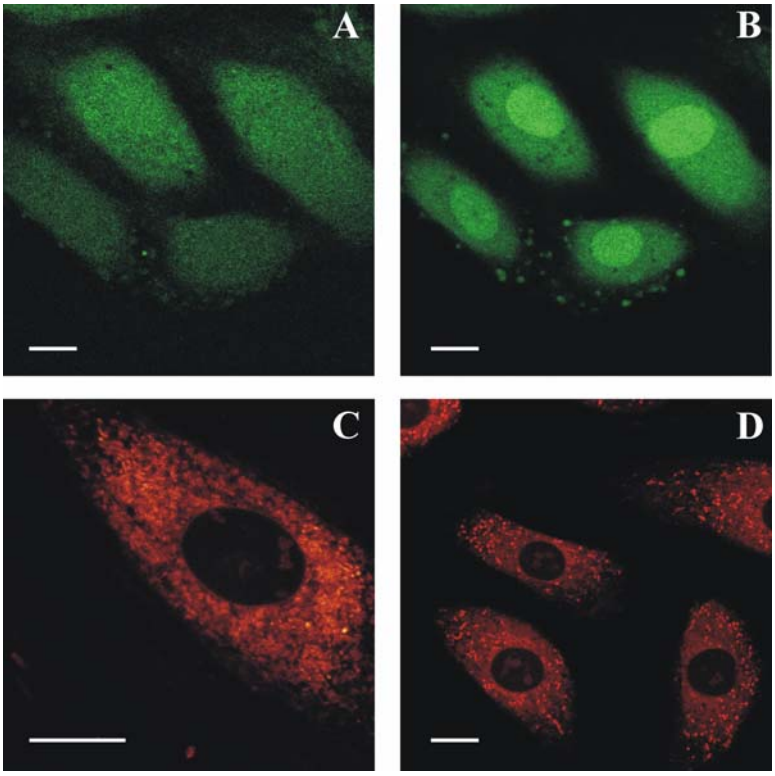


Figura 4.1.- Imágenes confocales de células H9c2. Las células equilibradas en ECM con Ca^{2+} se cargaron con Fluo-3 (paneles A y B), dihidroRhod-2 (panel C) o TMRM (panel D). Las células cargadas con Fluo-3 y sin estimular muestran fluorescencia débil distribuida por citosol y núcleo (A). El mismo campo se observó 5 s después de añadir IO 5 μM (B). La fluorescencia de Rhod-2 muestra una distribución punteada compatible con su localización mitocondrial. (C). El indicador TMRM permite observar el $\Delta\Psi_m$ de células vivas (D). El tamaño de la barra es 50 μm. Las imágenes confocales muestran planos que atraviesan los núcleos.

Los siguientes experimentos se diseñaron para hacer un estudio cuantitativo del Ca^{2+} citosólico. Para ello utilizamos el indicador Fura-2 que permite realizar medidas de fluorescencia en modo *ratio*. La permeabilización selectiva de la membrana plasmática con digitonina indica que la localización predominante de Fura-2 es el citosol (véase Capítulo 2).

También hemos estudiado la capacidad de distintos compuestos para movilizar Ca^{2+} de los depósitos intracelulares de células H9c2. Los experimentos se realizaron sometiendo las células cargadas con Fura-2 a distintos tratamientos. Estudios de otros autores usando otros tipos de células han mostrado que concentraciones fisiológicas de la hormona VP producen salida de Ca^{2+} del RSE al activar la ruta del IP_3 (Thomas y otros, 1984; Chen y Chen, 1999; Szalai y otros, 2000). En el caso de células H9c2 resuspendidas en ECM con Ca^{2+} se observa que el nivel de Ca^{2+} libre en el citosol es de 80 nM (Fig. 4.2, panel A). La adición de VP 50 nM produce un aumento transitorio de Ca^{2+} citosólico que origina un registro en forma de pico asimétrico. El aumento de Ca^{2+} citosólico es más rápido que el descenso.

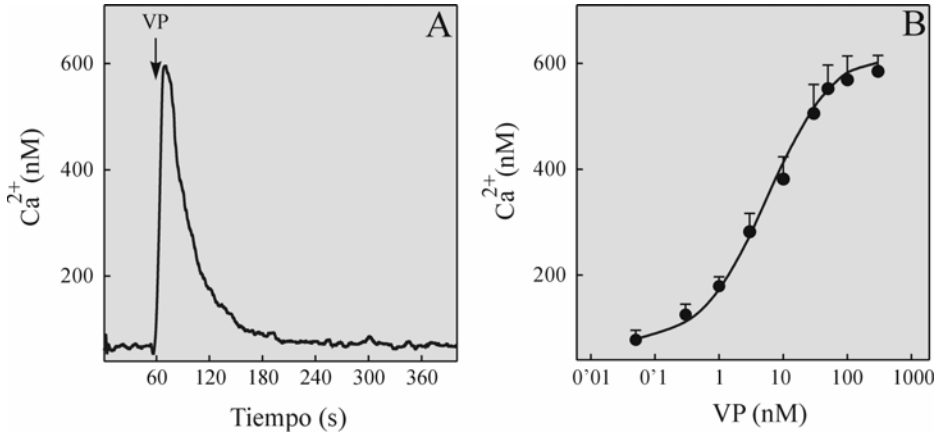


Figura 4.2.- Efecto de VP sobre el Ca^{2+} citosólico en células H9c2. Las células cargadas con Fura-2 se resuspendieron en ECM con Ca^{2+} antes de medir. El medio de medida fue: Hepes 10 mM, pH 7'4, NaCl 121 mM, KCl 4'7 mM, $CaCl_2$ 1 mM, $MgSO_4$ 1'2 mM, $NaHCO_3$ 5 mM, KH_2PO_4 1'2 mM, glucosa 10 mM, BSA 0'25% (p/v), sulfinpirazona 0'2 mM y ~2×10^5 células/ml. Los experimentos se realizaron a 25 ºC en un espectrofluorímetro de doble longitud de onda. (A) Señal de Ca^{2+} citosólico al adicionar VP 50 nM. (B) Curva de dosis-respuesta al añadir diferentes concentraciones de VP. Los datos que se representan son valores máximos obtenidos de los correspondientes picos de Ca^{2+}.

En otra serie de experimentos se determinó la respuesta del Ca^{2+} citosólico al añadir distintas concentraciones de VP. Esto permitió determinar la concentración

umbral de VP y la concentración que produce la mitad del efecto máximo, que fueron 0'3 nM y 6 nM respectivamente (Fig. 4.2, panel B). También se observa que el efecto máximo de VP aumenta el nivel de Ca^{2+} citosólico hasta ~6 veces.

Rianodina es un conocido activador del canal de Ca^{2+} del RS. Sin embargo, adiciones sucesivas de rianodina sobre la suspensión celular no tienen efecto sobre el Ca^{2+} citosólico (Fig. 4.3).

TG es un sesquiterpeno de origen natural y estructura de lactona que se comporta como un potente inhibidor de la Ca^{2+}-ATPasa de RSE (Sagara e Inesi, 1991; Lytton y otros, 1991).

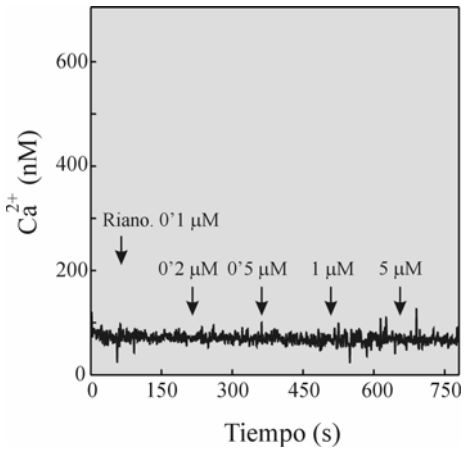


Figura 4.3.- Efecto de rianodina sobre el Ca^{2+} citosólico. Las células H9c2 cargadas con Fura-2 se sometieron al protocolo descrito en la Fig. 4.2. El trazo muestra el nivel de Ca^{2+} citosólico antes y después de añadir distintas concentraciones de rianodina. Las adiciones de rianodina se indican con flechas.

Experimentos similares a los descritos antes se realizaron para estudiar el efecto de TG sobre el depósito de Ca^{2+} del RSE. Al añadir TG 3 µM a células cargadas con Fura-2 se observa una elevación rápida del Ca^{2+} citosólico aunque la evolución del registro es dependiente de la composición del medio. Cuando las células se resuspenden en ECM con Ca^{2+}, la concentración de Ca^{2+} citosólico se estabiliza en un nivel más alto que el nivel basal del inicio (Fig. 4.4, panel A). Por el contrario, si las células se resuspenden en ECM con Ca^{2+} que también tiene Ni^{2+} 10 mM, la concentración del Ca^{2+} citosólico vuelve al nivel basal del inicio (Fig. 4.4, panel B). La sustracción de los valores de Ca^{2+} citosólico en las dos condiciones experimentales —presencia o ausencia de Ni^{2+} 10 mM— muestra un aumento lento del Ca^{2+} citosólico hasta llegar a una fase de meseta (línea de puntos en Fig. 4.4, panel B).

El aumento de Ca^{2+} citosólico también se midió utilizando diferentes concentraciones de TG y un medio de dilución compuesto por ECM con Ca^{2+} y Ni^{2+} 10 mM. La curva de dosis-respuesta indica que la concentración umbral y la mitad de la respuesta máxima se obtienen con concentraciones de TG de 0'2 nM y 3 nM, respectivamente (Fig. 4.5, panel A). El efecto máximo de TG hace que el nivel basal de Ca^{2+} citosólico se eleve hasta ~2'5 veces.

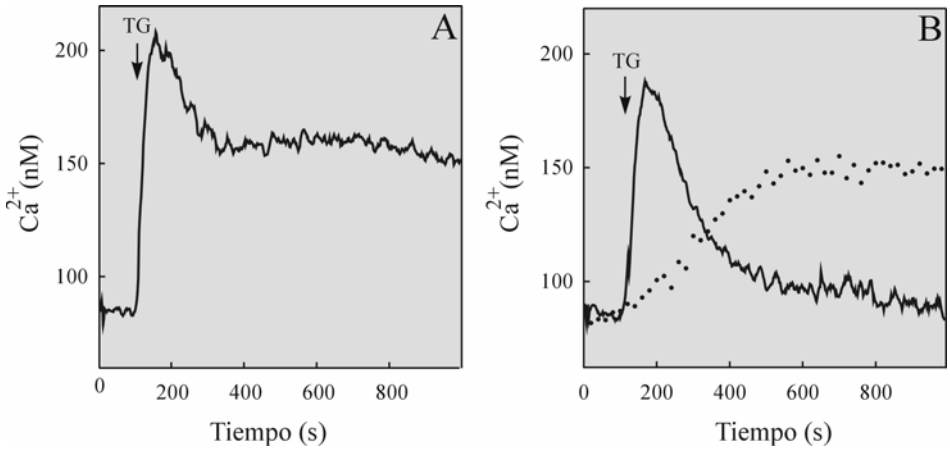


Figura 4.4.- Efecto de TG sobre el Ca^{2+} citosólico. Los experimentos se realizaron a 25 ºC utilizando células cargadas con Fura-2. (A) Las células se diluyeron diez veces en ECM con Ca^{2+} antes de añadir TG 3 μM. (B) Las células se diluyeron diez veces en ECM con Ca^{2+} y $NiCl_2$ 10 mM. La flecha indica la adición de TG 3 μM. La línea de puntos (panel B) corresponde a la sustracción de las señales de Ca^{2+} que se muestran en los dos paneles.

El depósito de Ca^{2+} del RSE también es sensible a BHQ —otro inhibidor específico de la Ca^{2+}-ATPasa de RSE (Kass y otros, 1989). Los experimentos realizados utilizando ECM con Ca^{2+} y Ni^{2+} 10 mM como medio de dilución indican que la concentración umbral de BHQ es 100 nM y que la mitad de la respuesta máxima se alcanza con BHQ 3 μM (Fig. 4.5, panel B). El efecto máximo de BHQ aumenta ~2'5 veces el nivel basal de Ca^{2+}.

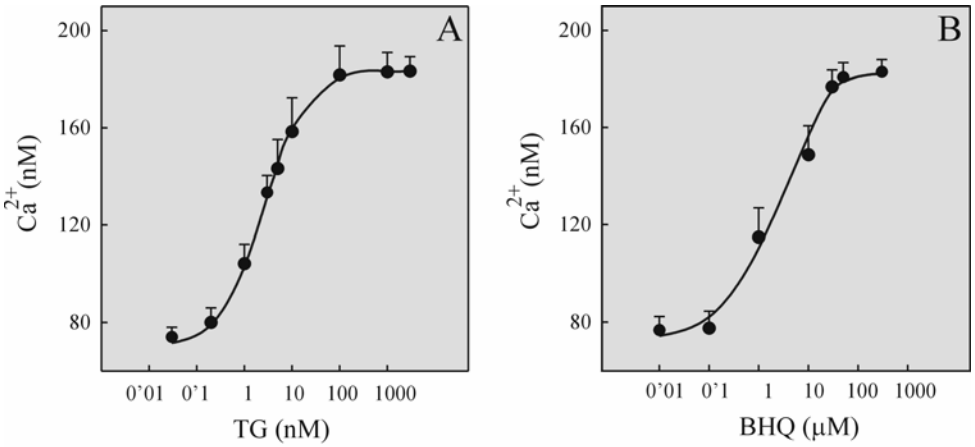


Figura 4.5- Curvas de dosis-respuesta al añadir compuestos movilizadores del Ca^{2+} en el RSE. Las células cargadas con Fura-2 se diluyeron 10 veces en ECM con Ca^{2+} y Ni^{2+} 10 mM al comienzo de cada experimento. El medio de dilución también contenía sulfinpirazona 0'2 mM. El valor máximo de Ca^{2+} citosólico a 25 ºC se representa en función de la concentración de TG (panel A) o BHQ (panel B).

Parte del Ca^{2+} que se almacena en las mitocondrias puede liberarse añadiendo CCCP que es un ionóforo de H^+ (Babcock y otros, 1997). La salida de Ca^{2+} mitocondrial inducida por CCCP se examinó midiendo el efecto que provoca sobre el Ca^{2+} citosólico y sobre el $\Delta\Psi_m$. El medio de dilución en estos experimentos fue ECM con Ca^{2+} y Ni^{2+} 10 mM. Las medidas de aumento de Ca^{2+} citosólico en células cargadas con Fura-2 proporcionan una concentración umbral de CCCP de 1 μM y 4 μM es la concentración que provoca la mitad del efecto máximo (Fig. 4.6, panel A). El $\Delta\Psi_m$ se midió de forma indirecta con ayuda del indicador fluorescente TMRM (Scaduto y Grotyohann, 1999). La fluorescencia de células cargadas con TMRM disminuye al añadir CCCP al medio de incubación. Esto permite obtener una familia de curvas cuando se utilizan distintas concentraciones de CCCP. El análisis cinético de estas curvas permite calcular la constante de velocidad de primer orden correspondiente a cada una de ellas. Al representar valores de las constantes de velocidad frente a concentración de CCCP, en escala logarítmica, se observa una dependencia sigmoidal creciente. Por tanto, al representar 1- k frente a CCCP se obtiene un descenso sigmoidal. La Fig. 4.6 (panel B) muestra una representación de 1-100k frente a la concentración de CCCP en escala logarítmica.

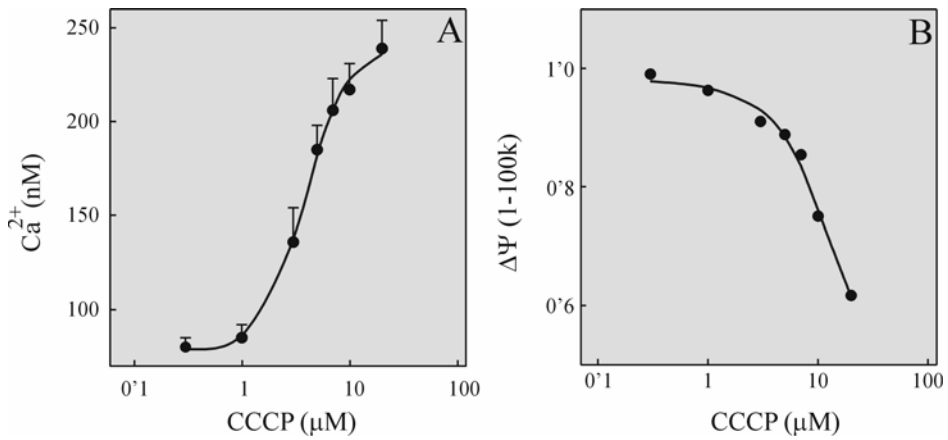


Figura 4.6.- Efecto de CCCP sobre Ca^{2+} citosólico y $\Delta\Psi_m$. (A) Las células cargadas con Fura-2 en ECM con Ca^{2+} se diluyeron al comienzo de cada experimento a ~2 × 10^5 células/ml usando ECM con Ca^{2+} que también contenía $NiCl_2$ 10 mM y sulfinpirazona 0'2 mM. La concentración máxima de Ca^{2+} en el citosol se determinó después de añadir distintas concentraciones de CCCP. (B) Las células cargadas con TMRM se diluyeron a ~3 × 10^5 células/ml, usando ECM con Ca^{2+} y $NiCl_2$ 10 mM. La constante de velocidad de primer orden del proceso de pérdida de fluorescencia se determinó para cada concentración de CCCP. Las constantes de velocidad expresadas como 1-100k se representan frente a la concentración de CCCP. Todas las medidas se realizaron a 25 ºC.

El efecto de los compuestos que movilizan Ca^{2+} también se estudió al añadirlos de forma secuencial sobre una misma muestra de células. Como ya se ha descrito antes, el nivel basal de Ca^{2+} citosólico es 80 nM cuando las células se diluyen en ECM con Ca^{2+} y Ni^{2+} 10 mM. La adición de TG 3 μM produce un aumento transitorio del Ca^{2+} citosólico y la adición posterior de CCCP 5 μM produce otro pico de Ca^{2+} (Fig. 4.7, registro superior). Cuando el medio de dilución es ECM con EGTA, el nivel basal de Ca^{2+} baja a 45 nM. En este caso, la respuesta del Ca^{2+} citosólico al tratar las células de forma consecutiva con TG 3 μM y CCCP 5 μM es cualitativamente similar. Es decir, también se observan aumentos transitorios de Ca^{2+} citosólico aunque las cantidades liberadas son menores (Fig. 4.7, registro central). La adición posterior de IO 5 μM produce un aumento adicional de Ca^{2+}.

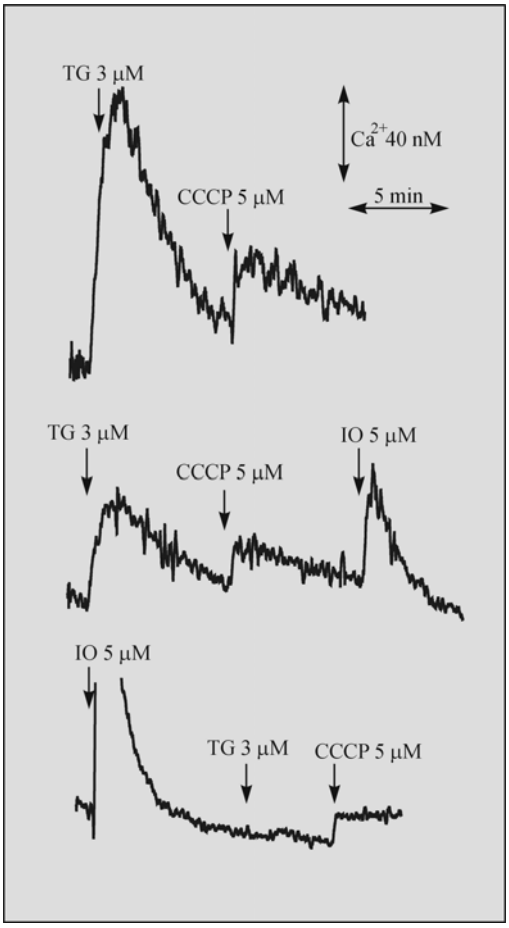


Figura 4.7.- Respuesta de depósitos intracelulares de Ca^{2+} a compuestos que movilizan Ca^{2+}. Las células cargadas con Fura-2 se diluyeron diez veces al comienzo de cada experimento (25 ºC). El medio de dilución fue ECM con Ca^{2+} y Ni^{2+} 10 mM y el nivel basal de Ca^{2+} fue 80 nM (*registro superior*). Al usar ECM con EGTA como medio de dilución el nivel basal de Ca^{2+} fue 45 nM (*registros central e inferior*). El medio ECM contenía sulfinpirazona 0'2 mM en todos los casos. Las adiciones de TG, CCCP e IO se indican con flechas.

Este experimento se repitió alterando el orden de las adiciones y utilizando ECM con EGTA como medio de dilución. En estas condiciones, si se añade primero un exceso de IO (5 μM) se produce salida de una gran cantidad de Ca^{2+} (Fig. 4.7, registro inferior) y no se observa respuesta alguna cuando se añade después TG 3 μM. Por el contrario, la adición de CCCP 5 μM provoca elevación del Ca^{2+} citosólico.

El efecto de compuestos movilizadores de Ca^{2+} sobre el $\Delta\Psi_m$ también se analizó. Estos experimentos se realizaron con células cargadas con TMRM y el medio de dilución fue ECM con Ca^{2+} para mantener llenos los depósitos intracelulares de Ca^{2+}. La adición de CCCP 5 μM produce un descenso relativamente lento pero progresivo e irreversible de la fluorescencia de TMRM (Fig. 4.8, registro superior). Sin embargo, la adición de IO 5 μM provoca un descenso rápido e irreversible de la fluorescencia pero de pequeña magnitud (Fig. 4.8, registro central). Por otra parte, el $\Delta\Psi_m$ sufre un descenso lento y de pequeña magnitud, que además es reversible, cuando el agente utilizado es TG 3 μM (Fig. 4.8, registro inferior).

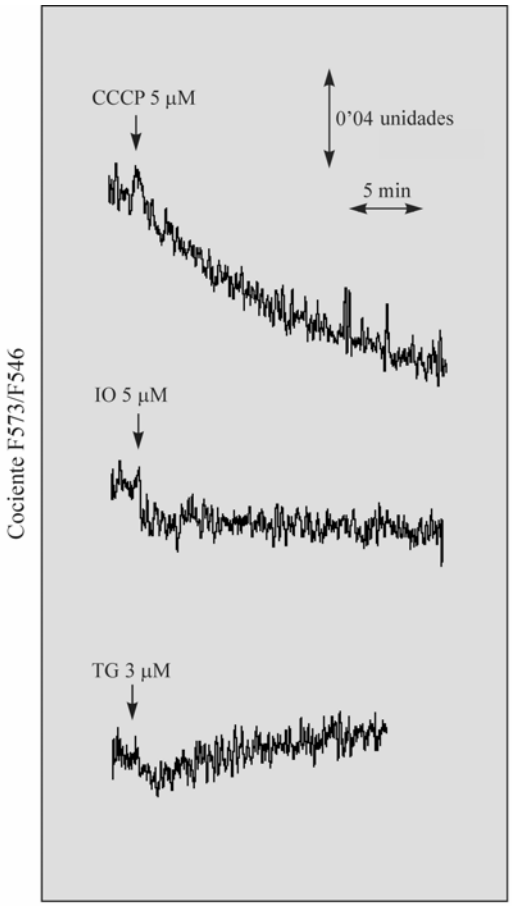


Figura 4.8.- Respuesta del $\Delta\Psi_m$ a compuestos movilizadores de Ca^{2+}. Las células cargadas con TMRM se diluyeron al comienzo de cada experimento en ECM con Ca^{2+}. Los ensayos se realizaron a 25 ºC con ~3 × 10^5 células/ml. El efecto de: CCCP 5 μM, IO 5 μM o TG 3 μM se evaluó en ensayos independientes.

Datos de la bibliografía revelan la importancia no solo del depósito de Ca^{2+} del RSE sino también del mitocondrial y su estrecha relación en condiciones fisiológicas (Hajnóczky y otros, 2000; Szalai y otros, 2000). En este capítulo hemos analizado la relación entre los dos depósitos de Ca^{2+} provocando la salida de Ca^{2+} del RSE y midiendo su efecto sobre el depósito mitocondrial. Estos experimentos se realizaron utilizando ECM con EGTA como medio de dilución para asegurarnos la ausencia de Ca^{2+} en el medio extracelular. Esto garantiza que las señales de Ca^{2+} que se observen solo procedan de depósitos intracelulares. Para ello se utilizaron células cargadas con Rhod-2 que se diluían en ECM con EGTA al comienzo del experimento. Tal como se observa, la adición de VP 50 nM provoca un pico de Ca^{2+} en la mitocondria (Fig. 4.9, panel A).

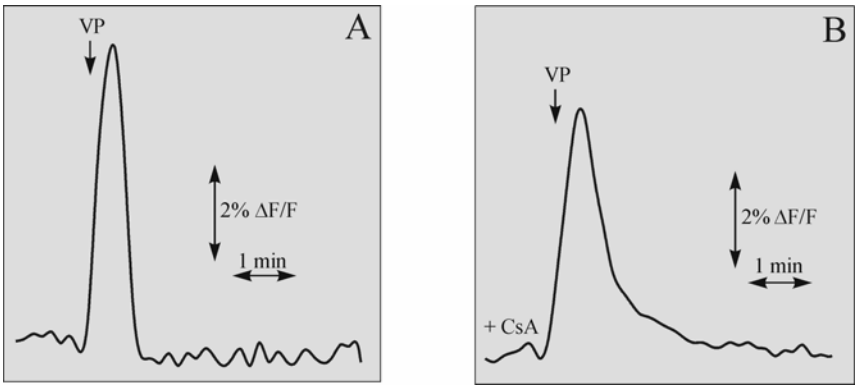


Figura 4.9.- Respuesta del Ca^{2+} mitocondrial al estimular con VP. Las células cargadas con Rhod-2 en ECM con Ca^{2+} se diluyeron al comienzo de cada experimento en ECM con EGTA. Los experimentos se realizaron a 25 ºC con ~3×10^5 células/ml. (A) Respuesta a la adición de VP 50 nM. (B) Respuesta a VP 50 nM cuando el tratamiento iba precedido de una incubación con CsA 5 μM durante 10 min.

El pico de Ca^{2+} mitocondrial se vuelve a observar cuando se repite el experimento pero se preincuban las células con CsA 5 μM durante 10 min antes de añadir VP 50 nM (Fig. 4.9, panel B).

La relación entre depósito de Ca^{2+} del RSE y depósito de Ca^{2+} mitocondrial también se estudió provocando una descarga irreversible del depósito del RSE. La descarga del RSE se realizó añadiendo TG para inhibir la Ca^{2+}-ATPasa de RSE. La adición de TG 3 μM a células cargadas con Rhod-2 y diluidas en ECM con EGTA produce un pico de Ca^{2+} en la mitocondria. (Fig. 4.10, panel A). Sin embargo, TG 3 μM provoca una elevación del Ca^{2+} mitocondrial que se prolonga en el tiempo cuando las células se preincuban con CsA 5 μM durante 10 min (Fig. 4.10, panel B). Esto indica que TG induce apertura del PTP mitocondrial. Por tanto, el nivel de Ca^{2+} mitocondrial permanece elevado cuando se añade CsA para inhibir la apertura del PTP (Broekemeier y otros, 1989; Altschuld y otros, 1992).

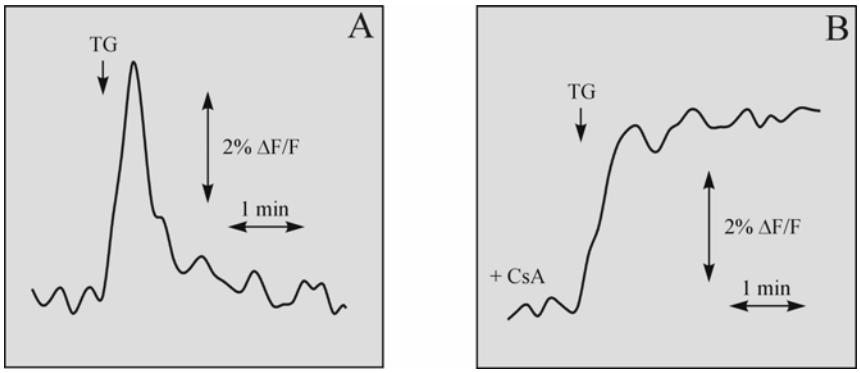


Figura 4.10.- Respuesta del Ca^{2+} mitocondrial al vaciar el RSE con TG. Las células cargadas con Rhod-2 en ECM con Ca^{2+} se diluyeron en ECM con EGTA. Los experimentos se realizaron a 25 ºC con ~3 × 10^5 células/ml. (A) Respuesta a la adición de TG 3 μM. (B) La adición de TG 3 μM estuvo precedida de una incubación con CsA 5 μM durante 10 min.

DISCUSIÓN

Las células H9c2 cargadas con el indicador fluorescente Fluo-3 presentan baja intensidad de fluorescencia en estado de reposo y la adición del ionóforo de Ca^{2+} IO provoca un aumento de la fluorescencia que es más significativa en el núcleo (Fig. 4.1, paneles A y B). La observación de una mayor intensidad de fluorescencia en el núcleo que en el citosol al utilizar Fluo-3 es un hecho constatado por otros autores en distintos tipos de células (Perez-Terzic y otros, 1997). Este hecho se atribuye a diferencias en el carácter polar de los distintos compartimentos intracelulares. Sin embargo, se ha visto que la intensidad de fluorescencia de una suspensión de células cargadas con Fluo-3 que se mide en un fluorímetro reproduce fielmente la señal de Ca^{2+} en el citosol (Gee y otros, 2000).

Cuando las células se cargan con los indicadores mitocondriales dihidroRhod-2 (Fig. 4.1, panel C) o TMRM (Fig. 4.1, panel D), el patrón de fluorescencia es diferente. En estos casos, el citoplasma aparece poblado de minúsculas zonas fluorescentes mientras que en el núcleo apenas se observa fluorescencia. La obtención de una señal fluorescente selectiva para el Ca^{2+} mitocondrial en los ensayos espectrofluorimétricos requiere cargar las células con dihidroRhod-2 para conseguir que la oxidación selectiva de la sonda se produzca en la mitocondria. Si se cargan células con Rhod-2 se obtiene una señal que de forma predominante responde a cambios en el Ca^{2+} citosólico.

VP produce una elevación rápida del Ca^{2+} citosólico seguida de un descenso rápido hasta el nivel basal de reposo (Fig. 4.2). No se observa diferencia en el pico de Ca^{2+} inducido por VP cuando las células se diluyen en ECM con Ca^{2+} o en ECM con Ca^{2+} y Ni^{2+} 10 mM (dato no mostrado).

El nivel final de Ca^{2+} citosólico después de añadir TG como agente movilizador de Ca^{2+} depende de la composición del medio de dilución. El nivel de Ca^{2+} en el citosol permanece elevado, después del pico de Ca^{2+}, cuando el medio de dilución es ECM con Ca^{2+} (Fig. 4.4, panel A). Este resultado puede atribuirse a la entrada capacitativa de Ca^{2+}. El resultado es distinto cuando al ECM con Ca^{2+} se le adiciona un exceso de Ni^{2+} (Fig. 4.4, panel B). En este caso, el Ca^{2+} citosólico vuelve a su nivel inicial de reposo debido a que el Ni^{2+} —un bloqueador de canales de Ca^{2+} (Soboloff y Berger, 2002)— inhibe la entrada de Ca^{2+} del medio externo. La entrada neta de Ca^{2+} desde el medio extracelular que se produce en función del tiempo y que se calcula por sustracción de la señal de Ca^{2+} en presencia y ausencia de Ni^{2+} corresponde a la entrada capacitativa (Fig. 4.4, panel B).

El mantenimiento del nivel fisiológico de Ca^{2+} en estado de reposo es un balance del funcionamiento de los mecanismos que introducen y sacan Ca^{2+} del citosol. Los experimentos realizados en presencia de TG demuestran que los mecanismos que sacan Ca^{2+} al exterior celular son efectivos para mantener el nivel fisiológico basal de Ca^{2+} cuando el depósito del RSE no puede almacenar Ca^{2+}, siempre que la entrada de Ca^{2+} del medio externo esté bloqueada. La situación es distinta cuando la señal de Ca^{2+} en el citosol se genera con VP. En este caso, los mecanismos que sacan Ca^{2+} desde el citosol al exterior no son tan importantes. La enzima Ca^{2+}-ATPasa que está plenamente operativa es capaz de restablecer el nivel basal de Ca^{2+} mediante transporte activo al interior del RSE tanto en presencia como en ausencia de Ni^{2+}.

La respuesta del Ca^{2+} citosólico a TG depende de la relación entre la concentración de TG y la concentración de células. Por esta razón, las variaciones en la concentración efectiva de TG que aparecen en la literatura pueden atribuirse a diferentes condiciones experimentales. Por tanto, es muy importante establecer las concentraciones de TG que son efectivas bajo condiciones de ensayo específicas. El efecto de concentraciones nM de TG sobre el Ca^{2+} citosólico (Fig. 4.5, panel A) puede atribuirse a un efecto directo sobre la Ca^{2+}–ATPasa de RSE. El uso de concentraciones más elevadas de TG producen una señal de Ca^{2+} más compleja que tiene un origen distinto (véase Capítulo 5).

El depósito de Ca^{2+} del RSE también responde a BHQ aunque con menor afinidad que TG (Fig. 4.5, panel B) y la adición de rianodina no origina respuesta del Ca^{2+} citosólico (Fig. 4.3). Este último resultado es consistente con datos de la bibliografía que muestran que los mioblastos H9c2 son insensibles a cafeína debido a la ausencia del receptor de rianodina en células embrionarias. Sin embargo, los miotubos que surgen de la fusión de mioblastos sí expresan el receptor de rianodina y por tanto responden a rianodina (Szalai y otros, 2000).

El $\Delta\Psi_m$ tiene un valor próximo a –200 mV y está formado por dos componentes: una diferencia de potencial eléctrico y un gradiente de pH. Compuestos como CCCP que disipan el gradiente de H^+ y que por tanto disminuyen el $\Delta\Psi_m$ producen aumento del Ca^{2+} citosólico (Fig. 4.6, panel A). Sin embargo, la adición de un ionóforo de Ca^{2+} como IO tiene un efecto muy pequeño sobre el $\Delta\Psi_m$ (Fig. 4.8, registro central) y no elimina la salida de Ca^{2+} inducida por CCCP (Fig. 4.7, registro inferior). Esto indica que el depósito mitocondrial de Ca^{2+} se mantiene por el $\Delta\Psi_m$ que es negativo dentro del orgánulo con respecto al citosol. También observamos que el vaciamiento del depósito del RSE por adición de TG produce una pequeña despolarización de la MIM que además es reversible (Fig. 4.8, registro inferior).

RSE y mitocondria son los principales depósitos intracelulares de Ca^{2+} (Hajnóczky y otros, 2000; Szalai y otros, 2000). Esto se confirma al analizar el efecto de compuestos movilizadores de Ca^{2+} sobre el Ca^{2+} citosólico cuando se estudia en ECM con EGTA o en ECM con Ca^{2+} y Ni^{2+} 10 mM (Fig. 4.7). La adición de un exceso de IO es capaz de vaciar por completo el depósito del RSE pero tiene poco efecto sobre el depósito mitocondrial (Fig. 4.7, registro inferior). Incluso al añadir IO después de TG y CCCP también se observa liberación de Ca^{2+} al citosol (Fig. 4.7, registro central). Este resultado puede deberse a una descarga incompleta de los depósitos del RSE y la mitocondria y/o a la existencia de otro depósito de Ca^{2+}. A este respecto hay que señalar la existencia de otros depósitos intracelulares de Ca^{2+} como el aparato de Golgi que también almacena Ca^{2+} y dispone de una Ca^{2+}-ATPasa que no se inhibe por TG (Pinton y otros, 1998; Missiaen y otros, 2001). Es importante recordar que estos experimentos se realizaron en un medio sin Ca^{2+} para impedir la entrada de Ca^{2+} extracelular al citosol tras la adición de IO.

La presencia de Ca^{2+} 1 mM en el medio de dilución garantiza que los depósitos intracelulares de Ca^{2+} mantengan su nivel fisiológico de llenado. Sin

embargo, no permite distinguir si la elevación del Ca^{2+} citosólico procede del medio extracelular o de depósitos intracelulares. Los experimentos realizados en presencia de ECM con EGTA evitan la entrada de Ca^{2+} extracelular pero se produce un vaciamiento lento de los depósitos intracelulares debido al gradiente que se crea. Esta es la razón por la que el nivel basal de Ca^{2+} en células diluidas en ECM con EGTA es inferior al de células diluidas en ECM con Ca^{2+} —45 nM frente a 80 nM—. Por tanto, ECM con EGTA solo permite hacer una estimación cualitativa de los depósitos intracelulares de Ca^{2+}. La mejor opción para valorar la contribución de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} es ECM con Ca^{2+} y Ni^{2+} 10 mM. Este medio previene el vaciado parcial de los depósitos intracelulares e impide la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular (Fig. 4.7).

La relación entre el RSE y la mitocondria son parte importante del mecanismo fisiológico de señalización por Ca^{2+} (Hajnóczky y otros, 1995; Szalai y otros, 2000; Csordás y Hajnóczky, 2003). Así, la transmisión de la señal de Ca^{2+} desde el RSE a la mitocondria —en células HeLa y en otros modelos celulares— es más efectiva cuando se realiza a través de IP_3 que cuando se produce por otros mecanismos (Rizzuto y otros, 1994). Estudios en hepatocitos aislados demuestran que la mitocondria es capaz de distinguir entre señales de Ca^{2+} rápidas y de gran amplitud —que están mediadas por el receptor de IP_3— y señales de Ca^{2+} lentas y de pequeña amplitud (Hajnóczky y otros, 1995). Otros estudios indican que las señales de Ca^{2+} citosólico —que se generan por diferentes mecanismos y que muestran distintos patrones de distribución en el espacio y en el tiempo— son detectadas por la mitocondria (Collins y otros, 2001).

La elevación pasajera de Ca^{2+} citosólico en células H9c2 inducida por VP tiene un reflejo directo en la mitocondria en forma de pico de Ca^{2+} (Fig. 4.9, panel A) que no se ve afectada por la preincubación con CsA (Fig. 4.9, panel B). Esto indica que la salida de Ca^{2+} de la mitocondria, que se produce tras la descarga reversible del depósito del RSE, no se produce a través del PTP mitocondrial.

La señal de Ca^{2+} citosólico que genera TG también reproduce un pico de Ca^{2+} en la mitocondria (Fig. 4.10, panel A). Sin embargo, esta señal de Ca^{2+} no es fisiológica ya que se produce por la descarga irreversible del depósito del RSE. En este caso, la preincubación con CsA transforma el pico de Ca^{2+} mitocondrial en una elevación prolongada en el tiempo (Fig. 4.10, panel B). Este dato sugiere que la salida de Ca^{2+} mitocondrial inducida por TG se produce a través del PTP

mitocondrial. En relación con esto se sabe que apertura del PTP mitocondrial y pérdida de la función mitocondrial son procesos asociados a muerte celular por apoptosis (Orrenius y otros, 2003).

El estudio de los depósitos y flujos de Ca^{2+} en nuestro modelo celular es un paso previo a la caracterización de distintas señales de Ca^{2+} que se pueden generar tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

5

Señales de Ca^{2+} citosólico y muerte celular por apoptosis en células H9c2....

Lone Maple Leaf. James Crotty

RESUMEN

La adición de TG 10 μM a células H9c2 produce un aumento transitorio de Ca^{2+} citosólico que tiene dos componentes. Experimentos realizados en un medio sin Ca^{2+} demuestran el origen intracelular de ambos componentes. El primer componente corresponde a salida de Ca^{2+} del RSE. El segundo componente está asociado a despolarización de la MIM y su aparición se evita al preincubar las células con CsA. Esto indica el origen mitocondrial de este componente y que la salida de Ca^{2+} de la mitocondria está relacionada con la apertura del PTP. El tratamiento con TG 10 μM —que da lugar a un aumento de Ca^{2+} citosólico con dos componentes— produce muerte celular antes que cuando se trata con TG 3 μM —que origina solo el primer componente—. En ambos casos se observa fragmentación de cromatina y condensación en la periferia del núcleo. Pérdida de contenido en DNA y ruptura hidrolítica de poliADP-ribosa polimerasa son otras características observadas que son dependientes de la concentración de TG y que se producen en diferentes ventanas de tiempo. La muerte apoptótica inducida por TG 10 μM se debe a apertura del PTP mitocondrial.

INTRODUCCIÓN

Los aumentos de la concentración de Ca^{2+} citosólico sirven como señales intracelulares para activar numerosos procesos intracelulares (Berridge y otros, 1998). La versatilidad de este mecanismo regulador —aparentemente simple— se basa en la generación de elevaciones locales de la concentración de Ca^{2+} (Cheng y otros, 1993; Yao y otros, 1995). Así, la apertura coordinada de grupos de canales de Ca^{2+} da lugar a señales elementales de Ca^{2+} que son responsables de la activación de diversos procesos en localizaciones subcelulares concretas. Las señales elementales se pueden agrupar para crear señales globales de Ca^{2+} (Berridge y otros, 2003) e incluso las señales globales pueden transmitirse a través de células contiguas para coordinar la actividad de órganos y tejidos (Boitano y otros, 1992; Robb-Gaspers y Thomas, 1995).

Las señales citosólicas de Ca^{2+} suelen consistir en pequeñas elevaciones que están limitadas en el espacio y en el tiempo. Hay casos en los que una sola elevación transitoria es suficiente para desencadenar una respuesta celular. Señales de Ca^{2+} más prolongadas en el espacio y en el tiempo se consiguen cuando las elevaciones transitorias se repiten y transmiten en forma de ondas (Bootman y

Berridge, 1995). El nivel basal de Ca^{2+} también lleva información de modo que un nivel basal más elevado es capaz de inducir activación del factor nuclear de células T activadas o NFAT (Dolmetsch y otros, 1977). La ruta de calcineurina/NFAT inducida por la elevación del nivel basal de Ca^{2+} citosólico se ha relacionado con la aparición de hipertrofia cardiaca en un modelo experimental transgénico (Wilkins y otros, 2004). También se sabe que un nivel elevado y sostenido de Ca^{2+} citosólico —como ocurre en la isquemia cardiaca (Lee y Allen, 1992)— es una señal que activa el programa de muerte celular por apoptosis (Duchen, 2000; Pacher y otros, 2001). En este sentido se ha observado que el proceso de muerte celular por apoptosis en cardiomiocitos está relacionado con diversos modelos experimentales de enfermedades cardiacas (Cheng y otros, 1996; Sharov y otros, 1996; Teiger y otros, 1996; Kang y otros, 2000).

Las señales de Ca^{2+} en miocitos cardiacos constituyen un caso singular ya que las elevaciones transitorias de Ca^{2+} citosólico que se producen de forma ininterrumpida y que están relacionadas con la generación del latido cardíaco coexisten con otras muchas señales intracelulares de Ca^{2+} que controlan otros procesos. El estudio de las alteraciones de señales de Ca^{2+} en miocitos cardíacos y su relación con la apoptosis es por tanto un tema de investigación de gran interés.

El RSE es el almacén principal del Ca^{2+} intracelular y juega un papel clave en las rutas de señalización por Ca^{2+} aunque la mitocondria también está involucrada en esa regulación debido a su capacidad para almacenar y liberar Ca^{2+} (Duchen, 2000). Las señales de Ca^{2+} procedentes del RSE están mediadas por la activación de receptores de rianodina o de IP_3 mientras que la recuperación del nivel basal de Ca^{2+} se debe a la actuación de la proteína Ca^{2+}-ATPasa que está en la membrana del RSE. La alteración de alguno de estos sistemas de transporte conlleva la perturbación de la homeostasis del Ca^{2+} citosólico.

Estudios iniciales del efecto de TG sobre células incubadas en un medio sin Ca^{2+} pusieron de relieve la aparición de un aumento rápido en la concentración de Ca^{2+} citosólico y que este efecto era dependiente de la concentración de TG (Thastrup y otros, 1987; Jackson y otros, 1988). La evidencia experimental también ha confirmado que la Ca^{2+}-ATPasa de RSE es la diana de TG en células musculares cardíacas (Kirby y otros, 1992). La relación entre aumento de Ca^{2+} citosólico inducido por TG y activación de apoptosis también se ha observado en diferentes

tipos de células (Jiang y otros, 1994; Furuya y otros, 1994; Qi y otros, 1997) aunque el mecanismo por el que se produce no está aclarado del todo.

En este capítulo mostramos un estudio detallado de depósitos intracelulares de Ca^{2+} que son sensibles a TG y la relación de señales de Ca^{2+} inducidas por TG con muerte celular por apoptosis. Los experimentos que se describen están realizados con la línea celular de origen cardiaco H9c2. En este modelo experimental hemos medido flujos de Ca^{2+} y respuestas de TMRM bajo diferentes condiciones experimentales. También hemos evaluado algunos parámetros morfológicos y funcionales relacionados con el proceso de muerte celular por apoptosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y reactivos

TG, BHQ, IO, CsA de *Tolypocladium inflatum*, MTT, AO, PI, medio de montaje y otros reactivos de grado analítico se obtuvieron de Sigma-Aldrich. TMRM, ácido plurónico® F-127 y los derivados AM de Fura-2, Rhod-2 y Fluo-4 se adquirieron de Molecular Probes™ (Invitrogen). Los indicadores de Ca^{2+} se disolvieron en Me_2SO anhidro. DMEM con baja glucosa, L-glutamina, suero fetal bovino, disolución de penicilina-estreptomicina-L-glutamina y otros reactivos usados para el cultivo fueron de Gibco® (Invitrogen). La disolución patrón de $CaCl_2$ (Tritisol®) se obtuvo de Merk. El anticuerpo policlonal anti-humano de PARP de conejo se adquirió de Santa Cruz Biotechnology. El anticuerpo secundario de cabra anti-IgG (molécula completa) de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante, el anticuerpo secundario de conejo anti-IgG (molécula completa) de ratón conjugado con peroxidasa, el anticuerpo monoclonal anti-γ-tubulina de ratón, marcadores de peso molecular, sustrato para peroxidasa y cóctel de inhibidores de proteasas se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Las membranas de nitrocelulosa Protran® BA 83 para la electrotransferencia se obtuvieron de Schleicher y Schuell BioScience. El kit Qentix™ *Western Blot Signal Enhancer* fue de Pierce y la película fotográfica Curix RP2 plus se adquirió de Agfa.

Manipulación de células en cultivo

Las células H9c2 procedentes de miocitos embrionarios de corazón de rata se obtuvieron de la Colección Europea de Cultivos Celulares (*www.ecacc.org.uk*). Los cultivos se mantuvieron a 37 ^{o}C y atmósfera húmeda en un incubador de CO_2 (véase Capítulo 2). Las células se subcultivaron o se recogieron para realizar experimentos al alcanzar una confluencia aproximada del 70 %. El medio de cultivo completo fue: DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 unidades/ml y estreptomicina 100 μg/ml (Lax y otros, 2005). Todos los experimentos se realizaron en ausencia de suero fetal bovino y antibióticos. El estrés celular causado por la ausencia de suero —cuando el tratamiento con TG se prolonga durante horas o días— se corrigió realizando un control en ausencia de TG. En determinados experimentos las células se incubaron o diluyeron en ECM con Ca^{2+} que estaba compuesto por: Hepes 10 mM, NaCl 121 mM, KCl 4'7 mM, $CaCl_2$ 1 mM, $MgSO_4$ 1'2 mM, $NaHCO_3$ 5 mM, KH_2PO_4 1'2 mM, glucosa 10 mM y BSA al 0'25 % (p/v) ajustado a pH 7'4. ECM con EGTA se preparó sustituyendo $CaCl_2$ 1 mM por EGTA 2'2 mM. Cuando el medio de dilución era ECM con EGTA, la concentración final de Ca^{2+} libre fue 2'5 nM. Para nuestros propósitos, esta concentración puede considerarse un "medio sin Ca^{2+}".

Imágenes confocales

Las células (~2×10^4) se sembraron en placas de vidrio de 35 mm de ∅ y se mantuvieron a 37 ºC durante 4 días en el incubador de CO_2. Las células adheridas se cargaron a 37 ^{o}C y en la oscuridad durante 30 ó 60 min con el derivado AM de Fluo-4 a una concentración de 2 μM. Las células se lavaron después y se mantuvieron durante 30 min a 25 ºC en ECM con Ca^{2+} para permitir la desesterificación intracelular del indicador fluorescente.

La fluorescencia se observó con un equipo de microscopía confocal de barrido de Leica-Microsystems que consistió en un microscopio invertido de fluorescencia DM IRE II acoplado a un modulo TCS SP2. Las muestras se observaron a temperatura ambiente a través de un objetivo de inmersión de aceite HCX PL APO 63× y AN de 1'32. El indicador Fluo-4 se excitó a 488 nm con el laser de argon y la emisión se recogió en el intervalo 504-530 nm. La apertura confocal fue de 140 μm lo que proporcionó una profundidad de campo en el eje z de 1'1 μm. Los planos

confocales seleccionados fueron aquellos que mostraban más grandes los diámetros de los núcleos.

Medidas de fluorescencia con indicadores de Ca^{2+}

El medio de carga fue ECM con Ca^{2+} suplementado con 2 μM del correspondiente derivado AM del indicador fluorescente para Ca^{2+} (Fura-2 o dihidroRhod-2) y ácido plurónico al 0'02 % (p/v). Los medios de carga y dilución para Fura-2 contenían sulfinpirazona 0'2 mM para evitar la salida de la forma ácida del indicador fluorescente.

El derivado AM del indicador Rhod-2 se redujo a dihidroRhod-2 antes de incubarlo con las células (véase Capítulo 4). El indicador —que tiene carga positiva— se acumula en la mitocondria gracias al $\Delta\Psi_m$ y allí se oxida a Rhod-2 que responde a Ca^{2+}.

Las células en placas de 150 mm de ∅ se incubaron a 37 ºC durante 30 min y en la oscuridad con el medio que contenía el indicador de Ca^{2+}. Las células se despegaron de las placas tras la carga, se lavaron y resuspendieron a una concentración de ~2-4 × 10^6 células/ml en ECM con Ca^{2+}. La suspensión de células se mantuvo a 25 ^oC durante 30 min para permitir la desesterificación del indicador. Las células cargadas con indicador fluorescente se diluyeron en la cubeta de medida inmediatamente antes de empezar a registrar la señal. La concentración de células tras la dilución fue ~2 × 10^5 células/ml en los experimentos con Fura-2 y ~3 × 10^5 células/ml cuando se utilizaba Rhod-2. En los ensayos que se utilizaba ECM con Ca^{2+} pero sin Ni^{2+}, la suspensión celular se centrifugaba a 480 ×g durante 10 min para eliminar el indicador del medio extracelular y luego se resuspendía en ECM con Ca^{2+} antes de cada medida. Este procedimiento elimina la señal fluorescente del medio externo debida a salida pasiva de Fura-2. Cuando las muestras se diluían en ECM con EGTA o ECM con Ca^{2+} y Ni^{2+} 10 mM, la contribución de la fluorescencia extracelular es despreciable (Lax y otros, 2005).

Las medidas se realizaron a 25 ^oC con agitación continua en un espectrofluorímetro de doble longitud de onda Aminco-Bowman serie 2. Las longitudes de onda para la excitación de células cargadas con Fura-2 fueron 340 y 380 nm mientras que la emisión se recogió a 510 nm. La determinación de la K_d aparente del complejo Ca^{2+}-Fura-2 y el cálculo de la concentración de Ca^{2+} libre en el citosol se describen en Capítulo 2.

Los experimentos con Rhod-2 se realizaron excitando las células a 550 nm y recogiendo la emisión a 580 nm. El Ca^{2+} mitocondrial se expresó en forma de unidades arbitrarias ($\Delta F/F \times 100$) debido a que Rhod-2 no permite utilizar la técnica de doble longitud de onda y por tanto su calibración es difícil e imprecisa (Hajnóczky y otros, 1995; Monteith y Blaustein, 1999).

Medidas de fluorescencia con TMRM

Las células crecidas en placas de 150 mm de ∅ se sometieron a tripsinización y se resuspendieron en ECM con Ca^{2+} a una concentración de ~3×10^6 células/ml. La carga se realizó a 37 ºC durante 15 min en ECM con Ca^{2+} que contenía TMRM 0'2 μM y ácido plurónico al 0'02 % (p/v). La señal de fluorescencia se evaluó a 25 ºC después de diluir diez veces la suspensión de células en ECM con Ca^{2+}. Las longitudes de onda para la excitación fueron 546 y 573 nm y la emisión se midió a 590 nm. La intensidad de fluorescencia se expresa en modo *ratio* (F_{573}/F_{546}) respecto a la de emisión a 590 nm.

Viabilidad celular

El ensayo se basa en la capacidad de las células vivas para reducir el compuesto MTT (Mosmann, 1983). Las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de ~15×10^3 células/pocillo y se incubaron a 37 ºC durante 4 días hasta alcanzar una confluencia del 70-80 %. Las células se lavaron dos veces con PBS a 37 ºC antes de incubarlas con TG 3 ó 10 μM en DMEM durante periodos de tiempo establecidos. La incubación de las células se hizo a 37 ºC en el incubador de CO_2. Después de retirar el medio, las células se lavaron de nuevo con PBS y se añadió MTT 1 mg/ml. El cultivo a 37ºC se mantuvo durante 30 min. A continuación se aspiró el medio y se añadió 250 μl de Me_2SO a cada pocillo. Las células se agitaron durante 5 min a temperatura ambiente y oscuridad para solubilizar el precipitado de formazano. Posteriormente se añadió 25 μl de Tris 2 M, pH 10'5 a cada pocillo. Alícuotas de 0'2 ml de cada pocillo se utilizaron para medir absorbancia a 570 nm usando un lector de placas Multiscan modelo MCC/340 (*Labsystem*). La absorbancia a 690 nm se tomó como longitud de onda de referencia y se restó de cada medida.

Microscopía de epifluorescencia

Las células (~18 × 10^3 /pocillo) se sembraron sobre cubre-objetos circulares en placa de 24 pocillos y se cultivaron a 37 ºC durante 4-5 días en el incubador de CO_2. Antes de comenzar los experimentos, las células se lavaron dos veces con PBS a 37 ºC. El protocolo del experimento consistió en incubar células a 37 ºC en el incubador de CO_2 con TG 3 μM disuelto en DMEM durante periodos de tiempo establecidos. Después se fijaron las células a temperatura ambiente durante 15 min usando ácido acético/metanol (1:3). La tinción del material genético se realizó incubando las células a temperatura ambiente y oscuridad durante 10 min con AO 5 μg/ml y formaldehído al 4 % (v/v) en PBS. Los cubre-objetos se sacaron de los pocillos de la placa y se invirtieron sobre porta-objetos con una gota de medio de montaje. Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio de epifluorescencia modelo DMRB (*Leica*) equipado con un bloque de filtros I3. Las imágenes tomadas con una cámara digital Leica DC500 se analizaron usando la versión 1.2 del programa informático IM50.

Citometría de flujo con PI

Las células se cultivaron en placas de 100 mm de ∅ hasta alcanzar una confluencia aproximada del 70 %. Las células se lavaron dos veces con PBS a 37 ºC y se incubaron a 37 ºC en el incubador de CO_2 con TG 3 ó 10 μM en DMEM durante periodos de tiempo establecidos. Para cada ensayo se utilizo una placa de cultivo con ~8 × 10^5 células. El tratamiento con TG provoca que las células se despeguen de la placa por lo que el medio de incubación que contenía células despegadas se combinó con las células despegadas por tripsinización. Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con PBS. La fijación se realizó incubando las células durante 15 min con etanol a –20 ºC. Después se recogieron de nuevo por centrifugación, se resuspendieron en PBS y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 min. La permeabilización de las células y la tinción del DNA se realizó incubando con PI 5 μg/ml, TX-100 al 0'1 % (v/v) y RNasa A 50 μg/ml en PBS durante 30 min, a temperatura ambiente y en la oscuridad. Las medidas se hicieron con un citómetro de flujo modelo FACSort® de Becton Dickinson que utiliza un laser de argon a 488 nm para la excitación. La señal de fluorescencia se detectó en el canal FL-2 equipado con un filtro de paso de banda 545-625 nm. Los agregados y restos celulares de las muestras se descartaron antes mediante procedimiento electrónico utilizando los valores de dispersión frontal y lateral de la

luz. Cada medida se realizó con ~20.000 células. El programa de ordenador utilizado para la adquisición y análisis de datos fue CellQuest™ de Becton Dickinson. La población de células en la región sub-G_1 se asignó a células apoptóticas.

Inmunodetección de PARP

Las células cultivadas en placas de 150 mm de ∅ hasta alcanzar una confluencia próxima al 70 % se lavaron dos veces con PBS a 37 ºC y se pusieron en DMEM. Las células se pasaron de nuevo al incubador de CO_2 manteniéndolas en presencia de TG 3 ó 10 μM durante periodos de tiempo establecidos. Para la preparación de cada muestra se utilizaron cuatro placas de cultivo con ~1'5 × 10^6 células/placa. Las células tratadas se despegaron por tripsinización, se lavaron con PBS frío a 4 ºC y se resuspendieron a una concentración de ~40 × 10^6 células/ml en medio de extracción de proteínas compuesto por: Tris 150 mM, EGTA 1 mM, TX-100 al 1 % (v/v), desoxicolato sódico al 1 % (p/v) y SDS al 0'1 % (p/v) ajustado a pH 8'0 y que se mantenía a 4 ºC. Inmediatamente después se añadió el cóctel de inhibidores de proteasas diluido 100 veces y se incubó 20 min en un baño de hielo. El medio resultante de la lisis celular se trató con un homogeneizador ultrasónico y se centrifugó a 10.000 ×g durante 5 min a 4 ºC. La concentración de proteína del sobrenadante se determinó por el método de Smith y otros (1985) usando BSA como patrón. Las muestras se guardaron en un ultracongelador a –80 ºC hasta el momento de usarlas.

La preparación de muestras para electroforesis comenzó calentándolas a 100 ºC durante 2 min en medio de desnaturalización que contenía: Tris 62'5 mM, SDS al 2 % (p/v), β-mercaptoetanol al 5 % (v/v), glicerol al 7'5 % (v/v) y azul de bromofenol al 0´0003 % (p/v) ajustado a pH 6´8. Se utilizó un gel de poliacrilamida en gradiente del 7 al 17 % (p/v) que contenía SDS (Laemmli, 1970) y las calles del gel se cargaron con 30 μg de proteína. Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por medio de un aparato de electrotransferencia semi-seca (*Bio-Rad*). La eficacia de la transferencia se comprobó con marcadores preteñidos de peso molecular. La membrana se trató con el sensibilizador de membrana Qentix™ *Western Blot Signal Enhancer* para reforzar la señal de detección y después se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con medio de bloqueo compuesto por: leche desnatada al 5 % (p/v) y Tween-20 al 0'05 % (v/v) en

PBS. Los anticuerpos anti-PARP y anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante se diluyeron en medio de bloqueo 1:200 y 1:25.000, respectivamente. El revelado de la membrana se realizó con un kit para detección de quimioluminiscencia. El contenido en γ-tubulina se determinó en la misma membrana después de someterla a incubación a 50 ºC durante 30 min en medio de *stripping* compuesto por: Tris 62'5 mM, SDS al 2 % (p/v) y β-mercaptoetanol 100 mM, pH 6'8. Los anticuerpos anti-γ-tubulina y anti-IgG se diluyeron 1:20.000. La incubación con el anticuerpo primario se realizó a 4 ºC durante toda la noche, mientras que la incubación con el anticuerpo secundario se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 h. En ambos casos la agitación fue por balanceo.

Presentación de datos

Los registros de fluorescencia que se muestran en las figuras son representativos de cinco o más ensayos. Los registros originales se trataron con un programa de ordenador basado en el algoritmo de Savitsky-Golay para reducir el ruido. Los valores mostrados en las gráficas de barras corresponden a la media de al menos cuatro ensayos independientes e incluyen la desviación estándar correspondiente. El análisis estadístico se realizó con el test de la t de Student usando la versión 8.0 del programa Sigma-Plot (*Jandel Scientific*). Se consideraron valores significativos cuando $p < 0'05$. Los registros de citometría de flujo y de inmunodetección corresponden a ensayos representativos de experimentos repetidos con muestras diferentes.

RESULTADOS

Las señales de Ca^{2+} citosólico se pueden estudiar con ayuda de indicadores fluorescentes. Estas medidas se ven afectadas por la distribución intracelular del indicador, que a su vez depende del tipo de célula y de las condiciones de incubación. Por este motivo se empezó evaluando la compartimentalización que sufre Fluo-4 en células H9c2 cuando éstas se incuban a 37 ^{o}C con el derivado AM del indicador que es permeable a las membranas. La distribución intracelular del indicador medida por técnica de microscopía confocal indica que es claramente dependiente del tiempo de carga. La fluorescencia en el citoplasma es menos intensa que en el núcleo después de 30 min de carga (Fig. 5.1, panel A) aunque en algunas células se observa lo contrario. Al aumentar el tiempo de carga a 60 min se

observa una mayor intensidad de la fluorescencia en el citoplasma aunque su distribución no es homogénea sino que aparece finamente punteada (Fig. 5.1, panel B). Algunos núcleos también muestran esa misma distribución como consecuencia de la prolongación del tiempo de carga.

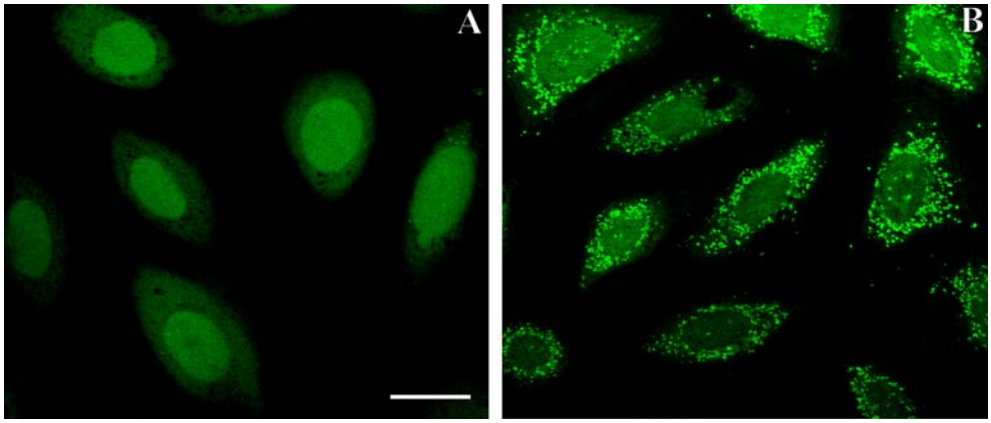


Figura 5.1. Evolución de la fluorescencia con el tiempo en células H9c2. Las células incubadas en ECM con Ca^{2+} se cargaron a 37 ºC durante 30 min (A) ó 60 min (B) con Fluo-4/AM 2 μM. Después, se mantuvieron a 25 ºC durante 30 min en ECM con Ca^{2+} para permitir la desesterificación del indicador. Las imágenes confocales corresponden a células H9c2 vivas sometidas a dos tiempos de carga pero al mismo tiempo de desesterificación. La longitud de la barra en el panel A es 50 μm.

La fluorimetría de doble longitud de onda es una técnica que permite realizar medidas cuantitativas de Ca^{2+} citosólico. El indicador Fura-2 es adecuado ya que permite la obtención de medidas en el denominado modo *ratio* de excitación (véase Capítulo 2). Las condiciones de carga del indicador se eligieron teniendo en cuenta las observaciones descritas antes (Fig. 5.1). Así, las células se cargaron a 37 ºC durante 30 min con Fura-2/AM en ECM con Ca^{2+} y la compartimentalización del indicador se valoró tratando las células con digitonina. La adición de digitonina libera ~80 % de la fluorescencia lo que indica que la localización mayoritaria del indicador es el citosol (véase Capítulo 2).

El procedimiento para cuantificar el Ca^{2+} citosólico consistió en diluir la suspensión concentrada de células en la cubeta de medida y la adición posterior del agente movilizador de Ca^{2+}. La concentración de Ca^{2+} libre en el citosol que se mide al comienzo de los experimentos es ~80 nM cuando el medio de dilución es ECM con Ca^{2+}. La adición de una concentración elevada de TG como 10 μM provoca la

aparición de un pico de Ca^{2+} citosólico que tiene dos componentes (Fig. 5.2, registro superior). El nivel de Ca^{2+} en el citosol después del pico depende de la composición del medio de dilución (compárense registros superior y central en Fig. 5.2). Cuando el medio de dilución con Ca^{2+} contiene también Ni^{2+} —para evitar la entrada capacitativa de Ca^{2+}— el Ca^{2+} citosólico vuelve a su nivel inicial de reposo (Lax y otros, 2005). Otros experimentos se hicieron utilizando ECM con EGTA como medio de dilución. En este caso, el Ca^{2+} citosólico al comienzo del ensayo es ~45 nM y el aumento transitorio del Ca^{2+} citosólico es menor (compárense registros superior y central con registro inferior en Fig. 5.2).

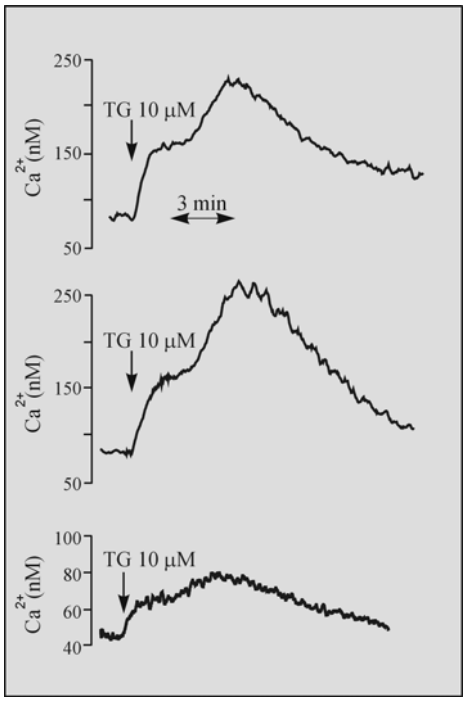


Figura 5.2. Efecto de TG 10 μM sobre el Ca^{2+} citosólico. Las células cargadas con Fura-2 2 μM en placas de cultivo y tripsinizadas se resuspendieron en ECM con Ca^{2+}. Las medidas de fluorescencia se realizaron a 25 ºC tras diluir las células a una concentración de ~2 × 10^5 células/ml al comienzo de cada experimento. La adición de TG se indica con una flecha. El medio de dilución fue ECM con Ca^{2+} (*registro superior*), ECM con Ca^{2+} y $NiCl_2$ 10 mM (*registro central*) o ECM con EGTA (*registro inferior*). Los medios de carga y dilución contenían sulfinpirazona 0'2 mM en todos los casos.

La respuesta del Ca^{2+} citosólico al añadir TG 10 μM es inesperada si se compara con la que induce TG 3 μM (*Capítulo 4*). Para entender la respuesta obtenida se utilizó BHQ —otro inhibidor de la Ca^{2+}-ATPasa— que también es capaz de vaciar el depósito del RSE (Kass y otros, 1989). La adición de BHQ 50 μM a células diluidas en ECM con Ca^{2+} y Ni^{2+} 10 mM provoca la aparición de un solo pico de Ca^{2+} citosólico (Fig. 5.3, registro superior). Al añadir después TG 10 μM aparece entonces un pico de Ca^{2+} con un solo componente. El resultado es cualitativamente similar cuando se añade BHQ 50 μM y después TG 10 μM utilizando ECM con EGTA como medio de dilución aunque las cantidades de Ca^{2+} liberadas son menores. La adición posterior de IO 5 μM todavía provoca salida de

Ca^{2+} de depósitos intracelulares (Fig. 5.3, registro central). La respuesta del Ca^{2+} citosólico también se estudió en células diluidas en ECM con EGTA añadiendo primero BHQ 50 μM y después TG 3 μM. En este caso, la adición de TG 3 μM no produce respuesta alguna después del pico de Ca^{2+} que induce BHQ 50 μM. Sin embargo, la adición de IO 5 μM es de nuevo capaz de liberar Ca^{2+} de depósitos intracelulares (Fig. 5.3, registro inferior).

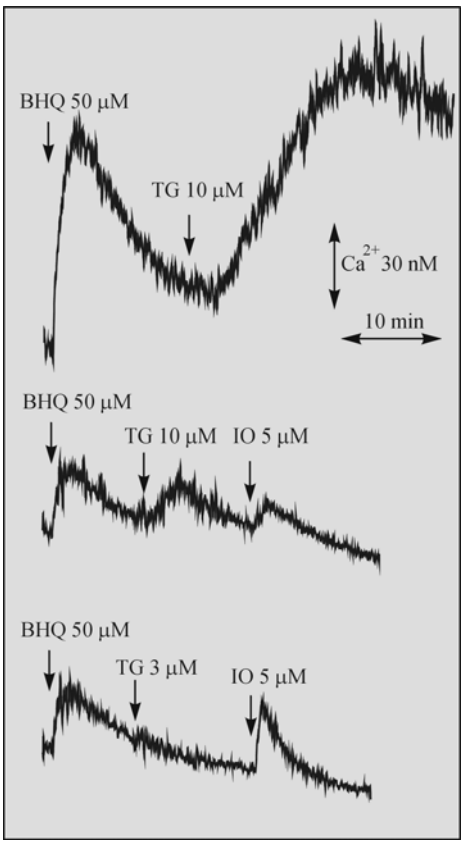


Figura 5.3. Respuesta del Ca^{2+} citosólico a agentes movilizadores de Ca^{2+}. Las células se cargaron con Fura-2 y resuspendieron en ECM con Ca^{2+}. Los experimentos a 25 ºC se iniciaron diluyendo diez veces para dar una concentración de ~2 × 10^5 células/ml. El medio de dilución fue ECM con Ca^{2+} que contenía Ni^{2+} 10 mM (*registro superior*) o ECM con EGTA (*registros central e inferior*). La adición de TG, BHQ o IO se indica con flechas. Los medios de carga y dilución contenían sulfinpirazona 0'2 mM en todos los casos.

Una cuestión importante fue identificar el origen del segundo componente en la respuesta de Ca^{2+} citosólico inducida por TG 10 μM. Con este fin, células diluidas en ECM con Ca^{2+} y Ni^{2+} 10 mM se incubaron con CsA 5 μM durante 10 min —un inhibidor del PTP mitocondrial (Crompton y otros, 1988)— antes de añadir TG 10 μM. En este caso, TG 10 μM provoca la aparición de un solo pico de Ca^{2+} que corresponde al primer componente de la señal antes descrita. Por tanto, la preincubación con CsA anula la aparición del segundo componente del pico de Ca^{2+} (Fig. 5.4, panel A, registro superior). En otro experimento se añadió BHQ 50 μM y después TG 10 μM pero las células se habían incubado previamente con CsA 5 μM durante 10 min. La adición de BHQ provocó la aparición del primer componente de

la señal de Ca^{2+} mientras que TG 10 μM no produjo respuesta alguna (Fig. 5.4, panel A, registro inferior).

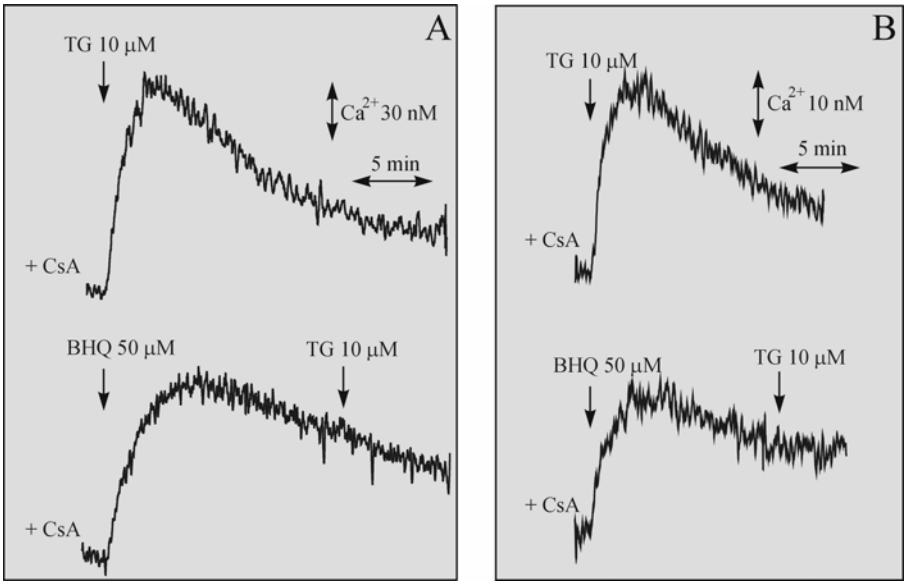


Figura 5.4. Respuesta del Ca^{2+} citosólico a agentes movilizadores de Ca^{2+} tras preincubación de células con CsA. Las células cargadas con Fura-2 se diluyeron diez veces al comienzo de cada experimento. (A) El medio de dilución fue ECM con Ca^{2+} suplementado con Ni^{2+} 10 mM. (B) El medio de dilución fue ECM con EGTA. CsA 5 μM se añadió después de la dilución y se incubó durante 10 min antes de agregar TG o BHQ. El medio de dilución contenía sulfinpirazona 0'2 mM en todos los casos.

El papel del Ca^{2+} extracelular en estos experimentos se analizó utilizando ECM con EGTA como medio de dilución y manteniendo la preincubación de células con CsA 5 μM durante 10 min antes del tratamiento. La respuesta del Ca^{2+} citosólico es cualitativamente similar a la observada cuando se usa ECM con Ca^{2+} y Ni^{2+} 10 mM. Es decir, la adición de TG 10 μM solo provoca la aparición del primer componente de la señal de Ca^{2+}. Sin embargo, la adición de TG 10 μM no tiene efecto cuando las células preincubadas con CsA 5 μM se tratan primero con BHQ 50 μM (Fig. 5.4, panel B).

La respuesta del Ca^{2+} mitocondrial se estudió usando Rhod-2 como indicador. Estos ensayos se realizaron utilizando ECM con EGTA como medio de dilución para evitar la contribución del Ca^{2+} extracelular. La adición de TG 10 μM provoca la aparición de un pico de Ca^{2+} mitocondrial. El pico consiste en un aumento inicial rápido de Ca^{2+} seguido de un descenso lento (Fig. 5.5, registro superior). Al repetir el experimento con células preincubadas con CsA 5 μM durante 10 min, la adición

de TG 10 μM produce un aumento rápido de Ca^{2+} mitocondrial que se mantiene elevado durante los minutos siguientes (Fig. 5.5, registro inferior).

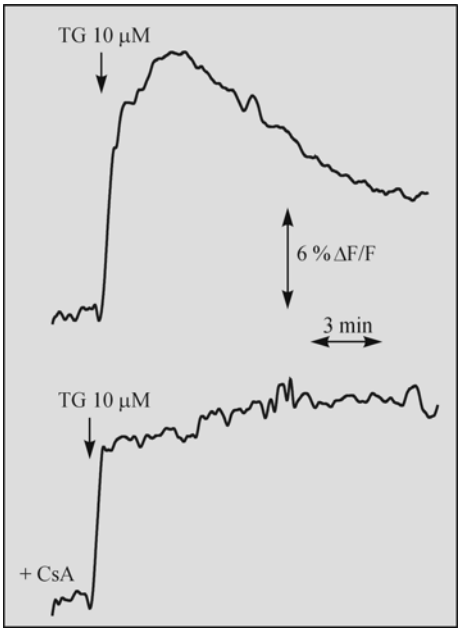


Figura 5.5. Efecto de TG 10 μM sobre el Ca^{2+} mitocondrial. Las células cargadas con dihidroRhod-2 se resuspendieron en ECM con Ca^{2+}. Al comienzo de cada experimento se diluye diez veces en ECM con EGTA para dar ~3 × 10^5 células/ml. La concentración de Ca^{2+} libre en el medio tras la dilución fue 2'5 nM. La adición de TG 10 μM se indica con una flecha. El registro inferior corresponde a un experimento donde las células se incubaron con CsA 5 μM durante 10 min antes de añadir TG 10 μM.

En otro experimento relacionado con la respuesta mitocondrial a TG 10 μM se midió la fluorescencia de células cargadas con TMRM. Este es un indicador que aporta información sobre el $\Delta\Psi_m$ (Scaduto y Grotyohann, 1999). La Fig. 5.6 muestra la evolución de la fluorescencia de TMRM con el tiempo cuando se excita en modio *ratio* (F_{573}/F_{546}) y se registra a 590 nm. La adición de TG 10 μM a células cargadas con TMRM y diluidas en ECM con Ca^{2+} provoca una disminución progresiva de la fluorescencia. El proceso se desarrolla en una escala de min (Fig. 5.6, registro superior). Al repetir el ensayo exponiendo las células a preincubación con CsA 5 μM durante 10 min se observa que la adición de TG 10 μM no provoca respuesta (Fig. 5.6, registro inferior).

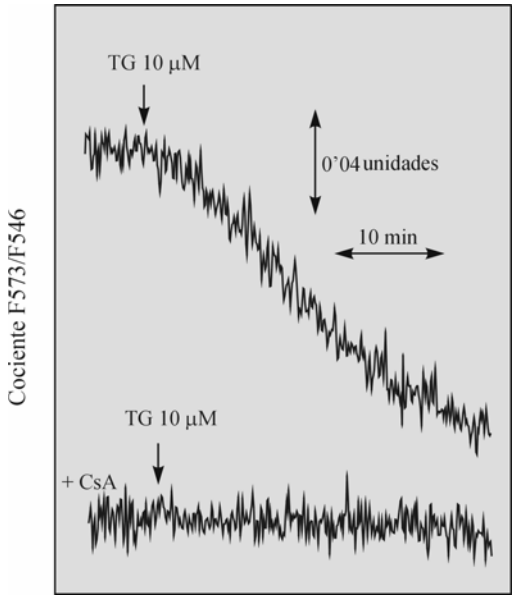


Figura 5.6. Efecto de TG 10 μM sobre la fluorescencia de TMRM. Las células cargadas con TMRM 0'2 μM se resuspendieron en ECM con Ca^{2+}. El experimento comienza con una dilución en ECM con Ca^{2+} para quedar a ~3×10^5 células/ml. Las muestras se excitaron a 573 y 546 nm y la emisión se registró a 590 nm. La adición de TG 10 μM se indica con una flecha. El registro inferior muestra el comportamiento de células preincubadas con CsA 5 μM durante 10 min antes de añadir TG 10 μM.

El efecto de TG sobre el daño celular se estudió mediante el ensayo del MTT que valora la viabilidad. Los experimentos se realizaron en ausencia de suero para impedir la proliferación de las células. La ausencia de suero provoca cierta pérdida de viabilidad celular que es más evidente a los tiempos de incubación más largos (Fig 5.7, paneles A y B, cilindros verdes). La incubación de células con TG 3 μM (Fig. 5.7, panel A, cilindros rojos) o con TG 10 μM (Fig. 5.7, panel B, cilindros rojos) produce descenso de la viabilidad celular con una cinética que depende de la concentración de TG. La pérdida total de viabilidad inducida por TG 3 μM se produce tras ~72 h de tratamiento mientras que la inducida por TG 10 μM se alcanza en ~8 h.

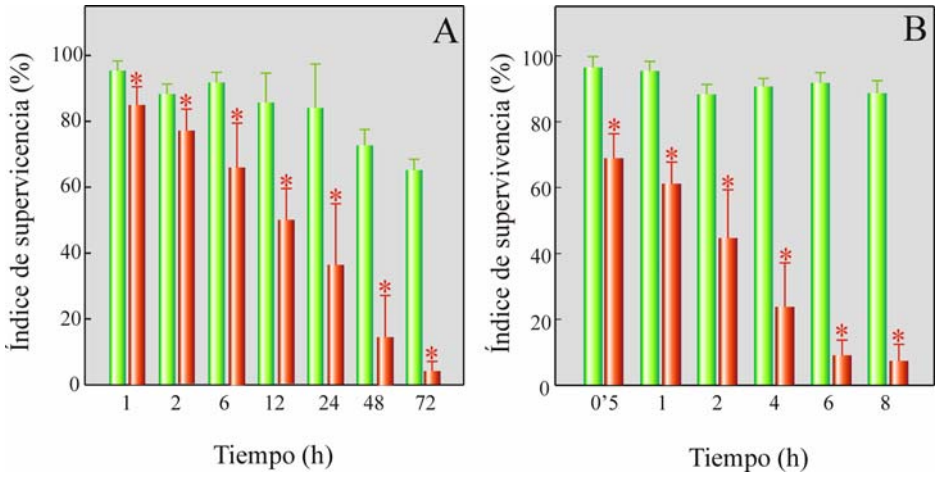


Figura 5.7. Daño celular causado por TG. Las células en placas de 24 pocillos se trataron a 37 ºC y en DMEM con TG 3 µM (A) ó 10 µM (B). La incubación se prolongó durante los tiempos indicados. Las muestras se procesaron para cuantificar el formazano acumulado. Se muestra el comportamiento de células tratadas con TG (*cilindros rojos*) o células sujetas al mismo procedimiento pero en ausencia de TG (*cilindros verdes*). El índice de supervivencia se expresa como porcentaje respecto a células control a tiempo cero. Se indica con (*) cuando la diferencia entre células tratadas con TG y controles es estadísticamente significativa.

El ensayo con MTT informa de la pérdida de viabilidad que sufre la población celular pero no revela el mecanismo de muerte celular. La condensación y fragmentación de la cromatina son características del proceso de muerte celular cuando se produce por apoptosis. Estas características del proceso apoptótico se pueden estudiar por microscopía de fluorescencia (McGahon y otros, 1995). Los experimentos se realizaron incubando células a 37 ºC con TG 3 ó 10 µM durante diferentes intervalos de tiempo. Tras la incubación las células se fijaron y después se marcaron con AO. El examen de células tratadas con TG 3 µM durante 48 h revela un porcentaje significativo de células con morfología típica de núcleos apoptóticos (Fig. 8, panel principal). La ampliación y selección de imágenes con un objetivo de mayor aumento permite observar la morfología nuclear con más detalle (Fig. 8, paneles pequeños). El tratamiento con TG 10 µM provoca la misma alteración de la morfología nuclear aunque en un espacio de tiempo menor (dato no mostrado).

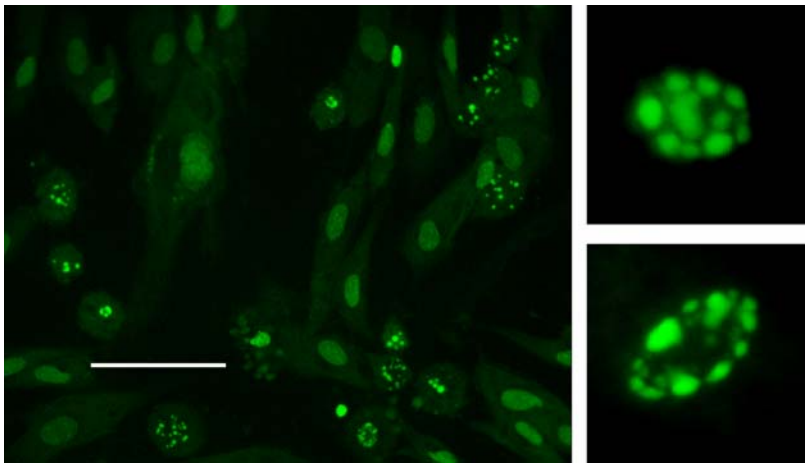


Figura 5.8. Efecto de TG sobre morfología nuclear en presencia de AO. Las células se incubaron a 37 ºC durante 48 h con TG 3 μM en DMEM. A continuación, se fijaron con acético/metanol y se tiñeron con AO 5 μg/ml durante 10 min. La fluorescencia verde se observó en un microscopio de epifluorescencia. Los paneles pequeños de la derecha muestran en detalle la morfología nuclear. La barra en el panel principal equivale a 50 μm.

Las células apoptóticas experimentan descenso en el contenido en DNA que se puede cuantificar por citometría de flujo si se marca previamente la cromatina con PI (McGahon y otros, 1995). Los experimentos se realizaron incubando células a 37 ºC con TG 3 ó 10 μM durante distintos intervalos de tiempo y evaluando después la señal fluorescente de PI. La población de células de interés se seleccionó antes mediante procedimiento electrónico (véase *Capítulo* 2). La Fig. 9, panel A muestra un experimento control de células incubadas durante 48 h en ausencia de TG. Los valores de fluorescencia, mostrados en forma de histograma, indican que la mayor parte de la población corresponde a células diploides —pico G_1— con una pequeña población de células hiperdiploides —fases S y G_2/M— y de células hipodiploides —población sub-G_1. La población sub-G_1 en el ensayo control corresponde al 3 % del total de células y se atribuye al proceso de apoptosis espontánea inducido por la ausencia de suero durante el experimento. El panel B (Fig. 9) muestra datos de células tratadas durante 48 h con TG 3 μM. La proporción de células apoptóticas que se evalúa en la población sub-G_1 se eleva hasta el 26 %.

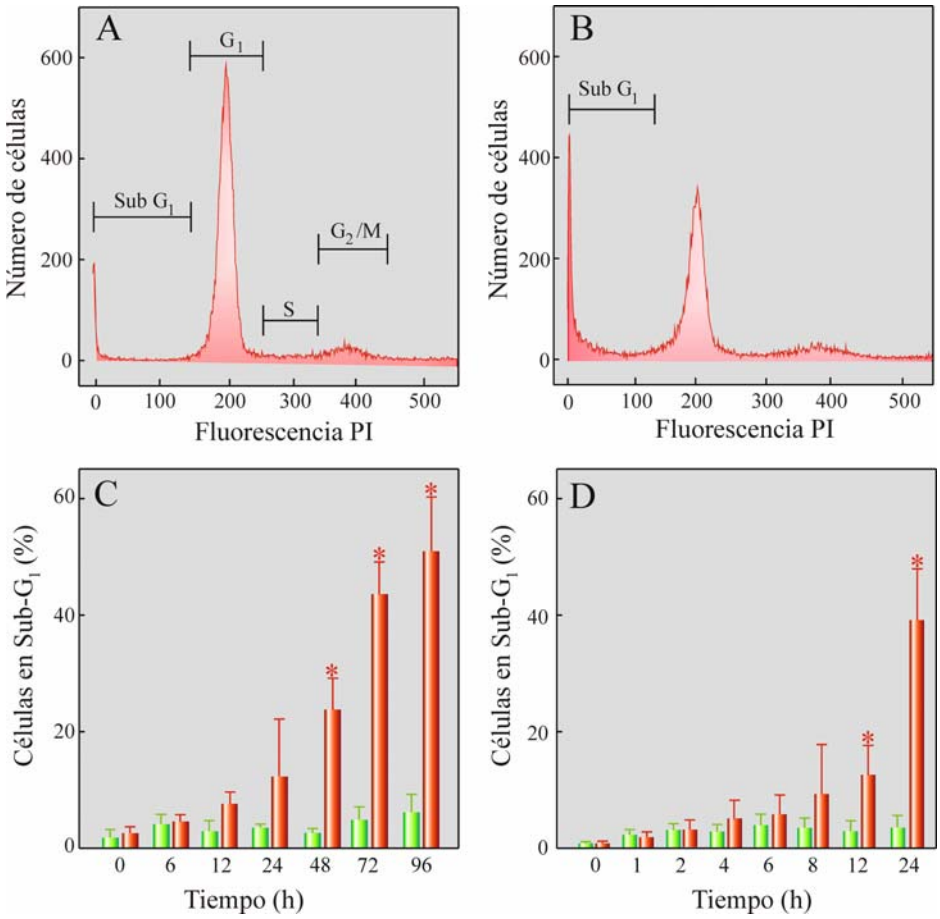


Figura 5.9. Efecto de TG sobre el contenido en DNA de las células. Las células se incubaron a 37 ºC con TG 3 ó 10 μM en DMEM durante diferentes intervalos de tiempo. Una vez tripsinizadas se fijaron con etanol frío y se trataron con TX-100, PI y RNasa A en PBS. La población de células de interés se seleccionó midiendo dispersión de luz. Se muestran medidas representativas del contenido en DNA de células incubadas con TG 3 μM durante 48 h (B) o células sujetas al mismo tratamiento pero en ausencia de TG (A). La proporción de células apoptóticas en función del tiempo de tratamiento con TG 3 μM (C) o TG 10 μM (D) también se muestran. Los cilindros rojos corresponden a valores de apoptosis en presencia de TG y los verdes son controles realizados en ausencia de TG. Se indican con (*) los casos en los que la diferencia entre células tratadas con TG y controles eran estadísticamente significativas.

El desarrollo del proceso apoptótico puede valorarse estudiando la evolución de la población sub-G_1. La proporción de células apoptóticas aumenta con el tiempo al alargarse la duración del tratamiento con TG 3 μM (Fig. 5.9, panel C, cilindros rojos). La progresión de la apoptosis es más rápida al utilizar una concentración 10 μM de TG (Fig. 5.9, panel D, cilindros rojos). La muerte celular por apoptosis en ausencia de TG también se evaluó y sirvió como control. La proporción de células que experimentan apoptosis espontánea a los distintos tiempos de incubación es siempre pequeña (Figura 5.9, paneles C y D, cilindros verdes).

La proteolísis específica de la enzima nuclear PARP por casp 3 es una característica destacada de la fase de ejecución del proceso apoptótico (Tewari y otros, 1995). PARP tiene masa molecular de 116 kDa y su ruptura hidrolítica produce la acumulación de un fragmento de 85 kDa que se puede identificar por inmunodetección. La ruptura de PARP se observa después de ~12 h de tratamiento con TG 3 μM (Fig. 5.10, panel superior). Sin embargo, la acumulación del fragmento p85 es evidente a las ~3 h de tratamiento cuando las células se exponen a TG 10 μM (Fig. 5.10, panel inferior).

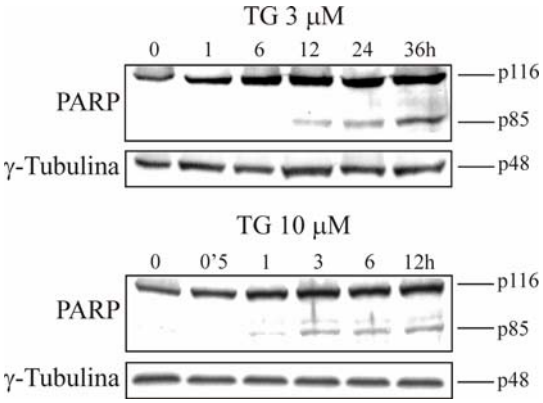


Figura 5.10. Efecto de TG sobre PARP. Las células a 37 ºC y en DMEM se expusieron a TG 3 ó 10 μM durante diferentes intervalos de tiempo. Alícuotas de los lisados celulares se sometieron a electrotransferencia para la inmunodetección de PARP. La posición de PARP (p116) y del fragmento mayor tras su hidrólisis (p85) aparece indicada. La carga de proteína se valoró con anti-γ-tubulina después de someter a *stripping* las membranas utilizadas para la inmunodetección de PARP.

Los datos mostrados hasta ahora indican que la muerte apoptótica se produce antes con TG 10 μM que con TG 3 μM y que TG 10 μM produce despolarización de la MIM. Los experimentos que siguen tratan de establecer la conexión entre muerte apoptótica precoz y alteración mitocondrial. En la siguiente figura (Fig. 5.11, panel A) se muestra el descenso de viabilidad celular al tratar con TG 10 μM. Ahora bien, si las células se preincuban con CsA 5 μM durante 10 min antes de añadir TG 10 μM se observa un claro efecto protector que disminuye al prolongar el tiempo de tratamiento con TG. Esta pérdida de protección puede deberse al pequeño efecto nocivo de CsA. Los datos de supervivencia mostrados a cada tiempo se expresan respecto al correspondiente valor de células no tratadas y mantenidas en DMEM, es decir, en ausencia de suero.

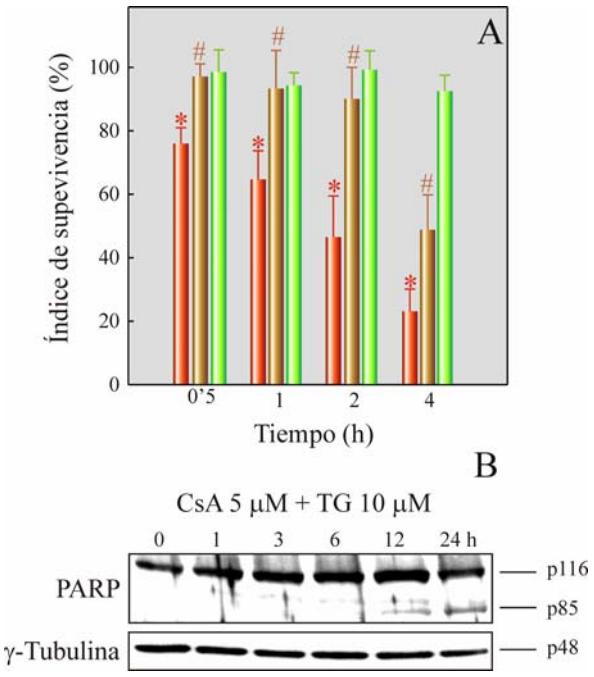


Figura 5.11. Efecto de CsA sobre daño celular y procesamiento de PARP que induce TG 10 μM. (A) Las células a 37 ºC en DMEM se expusieron a tratamiento durante diferentes intervalos de tiempo y después se procesaron para detectar reducción de MTT. Al medio de incubación se adicionó TG 10 μM (*cilindros rojos*), TG 10 μM precedido de preincubación con CsA 5 μM durante 10 min (*cilindros marrones*), o preincubación con CsA 5 μM durante 10 min (*cilindros verdes*). El índice de supervivencia a cada tiempo está referido al valor correspondiente del experimento control realizado en DMEM. Se indica con (*) cuando la diferencia entre células tratadas con TG y células incubadas durante el mismo intervalo de tiempo en ausencia de TG es estadísticamente significativa. Cuando la diferencia entre células preincubadas con CsA antes de añadir TG y células tratadas con TG en ausencia de CsA es estadísticamente significativa se indica con (#). (B) Ruptura de PARP inducida por TG 10 μM en células incubadas a 37 ºC en DMEM y preincubadas con CsA 5 μM durante 10 min. Se indica la posición de PARP (p116) y del fragmento mayor tras su hidrólisis (p85). La proteína γ-tubulina (p48) se utilizó como control de carga de cada muestra.

El segundo ensayo consistió en analizar el efecto de CsA sobre la hidrólisis de PARP inducida por TG 10 μM. El fragmento p85 se acumula claramente a partir de ~3 h de tratamiento con TG 10 μM (Fig. 5.10, panel inferior). Sin embargo, la preincubación de células con CsA 5 μM durante 10 min —antes de añadir TG 10 μM— retrasa la aparición del fragmento hasta ~12 h (Fig. 5.11, panel B). Es interesante señalar que el procesamiento de PARP que induce TG 10 μM cuando se hace preincubación con CsA coincide en el tiempo de procesamiento de PARP que induce TG 3 μM (Fig. 5.10, panel superior).

DISCUSIÓN

La microscopía confocal de barrido permite seguir el proceso de entrada del indicador Fluo-4 en las células. La señal fluorescente en el citoplasma es débil y difusa a los 30 min de carga debido a la baja concentración de Ca^{2+} en el estado basal (Fig. 5.1, panel A). La región nuclear aparece más brillante lo que se atribuye al comportamiento del indicador en los distintos compartimentos intracelulares (Perez-Terzic y otros, 1997). Sin embargo, la señal de fluorescencia en el citoplasma es más intensa y muestra una distribución granulada al aumentar el tiempo de carga a 60 min (Fig. 5.1, panel B). Este patrón de distribución es compatible con la compartimentalización del indicador y la elevada concentración de Ca^{2+} en algunos depósitos intracelulares especialmente el RSE y la mitocondria.

El indicador Fluo-4 es adecuado para observar su distribución intracelular pero no permite realizar medidas cuantitativas de Ca^{2+} con precisión. Sin embargo, el indicador Fura-2 —que experimenta desplazamiento en su espectro de excitación por la presencia de Ca^{2+}— permite utilizar el modo *ratio* para la determinación rigurosa de concentraciones citosólicas de Ca^{2+}.

La inhibición de Ca^{2+}-ATPasa de RSE por TG es un proceso muy bien caracterizado que produce aumento del Ca^{2+} citosólico (Furuya y otros, 1994; Jiang y otros, 1994). Sin embargo, el efecto de TG depende de la concentración utilizada. Concentraciones subnanomolares de TG producen inhibición total de Ca^{2+}-ATPasa de RSE (Sagara e Inesi, 1991) aunque esas mismas concentraciones también estimulan la actividad de la glicoproteína-P —ATPasa responsable de la resistencia a fármacos— (Xu y otros, 2004). Concentraciones más elevadas de TG pueden afectar a otras dianas subcelulares (Vercesi y otros, 1993; Korge y Weiss, 1999).

La inhibición total de Ca^{2+}-ATPasa de RSE se consigue con una concentración de TG equimolar respecto a la concentración de enzima. Estudios realizados en nuestro laboratorio indican que concentraciones de TG 100 nM o superiores producen liberación máxima de Ca^{2+} cuando se añaden a una suspensión celular de $\sim 2\times10^6$ células/ml. El aumento de la concentración de TG hasta 3 μM sigue produciendo la misma respuesta que se manifiesta como un solo pico de Ca^{2+} (Lax y otros, 2005) (véase Capítulo 4). El presente estudio revela que la adición de TG 10 μM induce la aparición de un pico de Ca^{2+} con dos componentes (Fig. 5.2). La amplitud y duración del primer componente coincide con el que induce TG 3 μM

mientras que el segundo componente aparece más tarde y se solapa parcialmente con el primero. La obtención de la misma señal de Ca^{2+} tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} en el medio de dilución confirma su origen intracelular.

Experimentos similares muestran que la elevación máxima del Ca^{2+} citosólico en células H9c2 se produce con concentraciones de BHQ ≥ 50 μM (Lax y otros, 2005) (véase *Capítulo 4*). De tal forma que si se descarga primero el depósito de Ca^{2+} del RSE con BHQ 50 μM y se añade después TG 10 μM aparece un solo pico de Ca^{2+} que no depende de la presencia de Ca^{2+} en el medio de dilución. Sin embargo, si se añade TG 3 μM en lugar de TG 10 μM no se observa respuesta (Fig. 5.3). La desaparición de la respuesta al añadir TG 3 μM después de BHQ 50 μM no se debe a que los depósitos intracelulares de Ca^{2+} estén vacíos ya que si se añade después IO se observa la aparición de un pico de Ca^{2+}. Estos datos confirman que BHQ y TG 3 μM actúan sobre el mismo depósito de Ca^{2+} —el RSE—.

El uso de CsA ha permitido determinar el origen de la compleja señal de Ca^{2+} inducida por TG 10 μM. La preincubación de células con CsA —para bloquear el PTP mitocondrial— hace que la adición posterior de TG 10 μM produzca un solo pico de Ca^{2+} citosólico (Fig. 5.4). Es la misma respuesta que se obtiene cuando se añade TG 3 μM (Lax y otros, 2005) (véase *Capítulo 4*). Estos datos indican que el efecto de TG 10 μM es específico sobre el depósito del RSE si el PTP mitocondrial está bloqueado. Por otra parte, al preincubar las células con CsA y añadir después BHQ 50 μM —para descargar el depósito de Ca^{2+} del RSE— la adición posterior de TG 10 μM no produce respuesta. Es importante resaltar que estos resultados fueron cualitativamente similares con independencia de la presencia o no de Ca^{2+} externo. Como conclusión podemos decir que el segundo componente de la señal de Ca^{2+} inducida por TG 10 μM es de origen mitocondrial.

La respuesta mitocondrial a la adición de TG 10 μM consistió en una entrada de Ca^{2+} que provocó elevación transitoria con tendencia a disminuir lentamente (Fig. 5.5). La preincubación con CsA evitó la liberación de Ca^{2+} mitocondrial. Estos datos indican que TG 10 μM induce la apertura del PTP mitocondrial y facilita la salida lenta de Ca^{2+} mitocondrial. Esta conclusión está apoyada por la sensibilidad que muestra el segundo componente del pico de Ca^{2+} citosólico a CsA. Por tanto, el segundo componente de la señal de Ca^{2+} inducida por TG 10 μM se puede atribuir a la acción directa de TG sobre la mitocondria. Otra posibilidad sería la de un efecto indirecto a través del RSE, debido a la estrecha conexión entre mitocondria y RSE,

pero podemos descartarla ya que la descarga selectiva del depósito de Ca^{2+} del RSE inducida por BHQ no es capaz de reproducir el segundo componente en ninguna circunstancia.

Las medidas de fluorescencia con TMRM también corroboran la idea de que TG 10 μM es inductor de la apertura del PTP mitocondrial. La presencia de TG 10 μM produjo una despolarización amplia y prolongada de la MIM (Fig. 5.6) y la preincubación de células con CsA anuló el efecto de TG sobre el $\Delta\Psi_m$. En este sentido, la adición de TG 3 μM —que tiene efecto específico sobre el RSE— originó una respuesta distinta consistente en una pequeña caída del $\Delta\Psi_m$ que era reversible (Lax y otros, 2005).

Algunos autores han descrito liberación de Ca^{2+} mitocondrial asociada a disminución del $\Delta\Psi_m$ en mitocondrias aisladas de hígado de rata y en *Trypanosoma brucei* al utilizar concentraciones de TG >10 μM (Vercesi y otros, 1993). Otros estudios han mostrado que la salida de Ca^{2+} inducida por TG 15-20 μM en mitocondrias aisladas de hígado y de corazón puede inhibirse por CsA (Korge y Weiss, 1999). Estas evidencias coinciden con nuestras observaciones y demuestran que la liberación de Ca^{2+} mitocondrial inducida por TG se produce a través del PTP mitocondrial.

Las señales de Ca^{2+} citosólico inducidas por TG afectan de forma diferente a la viabilidad celular ya que dependen de la concentración de TG usada (Fig. 5.7). La pérdida total de viabilidad se alcanzó antes con TG 10 μM que con TG 3 μM y en ambos casos el mecanismo de muerte celular es apoptosis. Esta conclusión está apoyada por distintas evidencias experimentales tales como: fragmentación de cromatina y condensación en la periferia nuclear (Fig. 5.8), pérdida de material genético (Fig. 5.9) y proteolisis específica de PARP que es sustrato de casp 3 (Fig. 5.10).

El inicio de la apoptosis ocurre antes en presencia de TG 10 μM que en presencia de TG 3 μM. Este resultado sugiere que las dianas moleculares de TG son diferentes dependiendo de la concentración usada. Una concentración más baja de TG —como es 3 μM— afecta al depósito de Ca^{2+} del RSE e induce muerte celular. Cuando se eleva la concentración de TG a 10 μM se produce efecto directo sobre el PTP mitocondrial lo que supone una señal más enérgica y rápida de muerte celular.

La relación entre apertura del PTP mitocondrial y mayor rapidez en el desarrollo de la apoptosis se confirma estudiando el efecto de CsA cuando se añade antes del tratamiento con TG 10 μM. CsA retrasa el daño celular y la progresión de la apoptosis cuando se mide viabilidad celular y ruptura de PARP respectivamente (Fig. 5.11). La protección del daño celular por CsA es temporal y el descenso en la protección que se observa claramente a las 4 h se debe a que el bloqueo de la apertura del PTP mitocondrial es transitorio (Zamzami y Kroemer, 2001) y a que el proceso apoptótico más lento provocado por el primer componente del pico de Ca^{2+} citosólico empieza a manifestarse. El uso de CsA para demostrar la participación del PTP mitocondrial debe tomarse con cierta precaución porque hay descritas otras dianas y otros efectos celulares para CsA. Sin embargo, al evaluar el efecto de CsA 5 μM sobre la viabilidad celular se observa que el daño celular inducido por el fármaco durante las primeras horas de tratamiento es muy pequeño.

La apertura del PTP mitocondrial y la consiguiente liberación del contenido mitocondrial tienen relación con el desarrollo de patologías cardíacas. Varios estudios han mostrado que la apertura del PTP mitocondrial juega un papel clave en los daños por reperfusión que se producen después de un periodo de isquemia (Griffiths y Halestrap, 1993; Duchen y otros, 1993; Di Lisa y otros, 2001). De hecho, el tratamiento con CsA antes de la reperfusión puede proteger frente al daño cardiaco (Griffiths y Halestrap, 1993; Duchen y otros, 1993; Di Lisa y otros, 2001).

6

Estrés en el retículo sarcoplásmico y muerte celular ....

Golden Ears Provincial Park. Adam Gibbs

RESUMEN

El daño producido por TG 3 μM ó TM 1 μg/ml sobre el RS ocasiona la pérdida de viabilidad de la población celular en aproximadamente 72 h. La liberación de cit c de la mitocondria ocurre inmediatamente después del daño siendo simultánea o posterior a la translocación de Bax a la mitocondria. La liberación de cit c no está relacionada con despolarización mitocondrial ni con activación de caspasas. El daño irreversible producido sobre el RS —detectado por la activación de casp 12 en la fase inicial del proceso — provoca la activación de la ruta apoptótica mitocondrial. La preincubación de células con un inhibidor selectivo para casp 8 ó casp 9 bloquea la proteolisis selectiva de casp 3 mientras que la preincubación con un inhibidor de casp 9 bloquea la activación de casp 8. Esto indica que casp 8 forma parte de un bucle de retroalimentación positiva que produce amplificación de la cascada de activación de caspasas. La inhibición de caspasas con un inhibidor general no protege de la muerte celular lo que sugiere la existencia de mecanismos alternativos de muerte que no son dependientes de caspasas.

INTRODUCCIÓN

La apoptosis es un proceso celular muy regulado que utilizan los organismos multicelulares para la eliminación fisiológica de células. Juega un papel esencial durante el desarrollo embrionario aunque también es importante después del nacimiento, participando en la renovación y homeostasis de los tejidos (Danial y Korsmeyer, 2004). Las células eucariotas están dotadas de mecanismos para detectar y responder a determinados daños. Cuando estos mecanismos de respuesta son insuficientes y se superan los límites de tolerancia las células mueren por apoptosis. Receptores de la membrana plasmática (Ashkenazi y Dixit, 1998) y la mitocondria (Wang, 2001) fueron los primeros sensores identificados con capacidad para detectar señales específicas de daño que provocan muerte celular. Otras estructuras subcelulares como núcleo, RE —o RS que es su equivalente en células musculares— y aparato de Golgi también pueden detectar e iniciar respuestas de muerte celular (Ferri y Kroemer, 2001). Parece que las células se mantienen vivas mediante un balance de señales opuestas que determinan supervivencia o muerte celular (Datta y otros, 1999).

El miocardio adulto es un tejido formado mayoritariamente por células musculares totalmente diferenciadas y que por tanto tienen escasa capacidad

regenerativa. La inducción de apoptosis en este tipo de células es de esperar que tenga un impacto significativo sobre la capacidad contráctil del corazón. De hecho la apoptosis de cardiomiocitos es un factor determinante en el desarrollo de diversas patologías cardíacas como son: infarto (Cheng y otros, 1996), daño por isquemia-reperfusión (Gottlieb y otros, 1994), sobrecarga de presión (Teiger y otros, 1996) e insuficiencia cardíaca crónica (Sharov y otros, 1996) aunque no está del todo clara cual es la verdadera contribución de la apoptosis en el desarrollo y evolución de estos procesos.

Las señales citosólicas de Ca^{2+} que están implicadas en la contracción rítmica del corazón se originan en el RS de los cardiomiocitos. El RS es también el lugar donde se produce la síntesis, plegamiento y maduración de las proteínas de secreción y de membrana. Un descenso en el contenido de ATP intracelular —como ocurre durante un episodio de isquemia— reduce el contenido de Ca^{2+} del RS lo que limita la función de algunos chaperones del RS (Logue y otros, 2005). La síntesis de proteínas, su plegamiento y las modificaciones postraduccionales como glicosilación también se ven afectadas (Logue y otros, 2005). La alteración funcional del RE o "estrés en el RE" activa una respuesta celular que se llama "respuesta de la proteína desplegada" que está destinada a corregir esas alteraciones (Rutkowski y Kaufman, 2004). Cuando los mecanismos de protección que pone en marcha la célula no pueden restablecer el equilibrio funcional de la célula se activa un programa de suicidio que está vinculado con el estrés en el RE. Se supone que la alteración funcional del RS desencadena la misma respuesta. El conocimiento de este complejo proceso que se desarrolla en diferentes etapas es bastante limitado. Por otra parte, la mayoría de datos disponibles se han obtenido en otros tipos de células que no son cardiomiocitos, desconociéndose si las respuestas son similares.

La identificación de posibles dianas terapéuticas requiere conocer los procesos apoptóticos que se producen en las células del miocardio y alteran el equilibrio funcional cardíaco. La inducción de daño en el RS se puede lograr experimentalmente utilizando un sesquiterpeno de origen natural con estructura de lactona que se llama TG y que es inhibidor selectivo de la Ca^{2+}-ATPasa de RSE (Sagara e Inesi, 1991) o bien un antibiótico como TM que inhibe la N-glicosilación de proteínas en el RSE. Una clara ventaja de utilizar TG es que produce alteración directa e irreversible del depósito de Ca^{2+} del RS sin afectar al contenido intracelular de ATP, evitando así efectos colaterales sobre otros importantes procesos que requieren energía.

El modelo utilizado para estudiar apoptosis inducida por estrés irreversible en el RS ha sido un cultivo de células H9c2. Esta línea celular inmortal presenta rasgos morfológicos típicos de cardiomiocitos embrionarios inmaduros pero expresa muchos rasgos funcionales característicos de miocitos cardíacos adultos, entre los que se encuentran sus rutas de señalización. Las células H9c2 se han utilizado para estudiar respuestas bioquímicas relacionadas con determinadas condiciones patológicas del corazón. Así por ejemplo se ha estudiado el papel de la ruta de la quinasa del extremo NH_2 de c-jun (JNK) en la muerte apoptótica inducida por estrés oxidativo (Turner y otros, 1998), la participación de la ruta de las quinasas de proteínas activadas por mitógenos durante la reperfusión que sigue a un episodio isquémico (Mizukami y otros, 2000) o la respuesta hipertrófica inducida por sobrecarga que está mediada por la activación de la expresión del factor de crecimiento transformante β (Huang y otros, 2004).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Las células H9c2 (Kimes y Brandt, 1976) se obtuvieron de la Colección Europea de Cultivos Celulares. La membrana de nitrocelulosa Protran® BA 83 para electrotransferencia se obtuvo de Schleicher y Schuell BioScience. El intensificador de señal para inmunofluorescencia Image-iT™ FX se adquirió de Molecular Probes™ (Invitrogen). Los marcadores preteñidos de peso molecular y el sustrato para peroxidasa se obtuvieron de Sigma-Aldrich. La señal de inmunodetección se potenció con el kit Qentix™ *Western Blot Signal Enhancer* de Pierce. La película fotográfica Curix, RP2 plus se adquirió de Agfa.

Reactivos y medios

DMEM con baja glucosa, L-glutamina, suero fetal bovino, la disolución penicilina-estreptomicina-L-glutamina y otros reactivos usados para el cultivo de células fueron de Gibco® (Invitrogen). TG, TM de *Streptomyces sp*, CsA y la mezcla de inhibidores de proteasas se adquirieron de Sigma-Aldrich. Las sondas fluorescentes JC-1 y MitoTracker® Red CM-H_2XRos se obtuvieron de Molecular Probes™ (Invitrogen). Los inhibidores de caspasas z-VAD-fmk y z-IETD-fmk fueron de Bachem mientras que el inhibidor z-LEHD-fmk se obtuvo de BD

Pharmingen. Los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico y también se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

El medio para permeabilizar células con digitonina fue: KCl 75 mM, NaH_2PO_4 1 mM, Na_2HPO_4 8 mM y sacarosa 250 mM. El medio de extracción de proteínas totales —después del tratamiento con digitonina— estaba compuesto por: Tris 150 mM, EGTA 1 mM, TX-100 al 1 % (v/v), desoxicolato sódico al 1 % (p/v) y SDS al 0'1 % (p/v) ajustado a pH 8'0 con HCl. El medio de desnaturalización estaba formado por: Tris 62'5 mM, SDS al 2 % (p/v), β-mercaptoetanol al 5 % (v/v), glicerol al 7'5 % (v/v) y azul de bromofenol al 0'0003 % (p/v). El medio PBS estuvo compuesto por: NaCl 137 mM, KCl 2'7 mM, Na_2HPO_4 10'14 mM y KH_2PO_4 1'76 mM, ajustado a pH 7'4 con HCl. El medio PBST se preparó añadiendo Tween-20 al 0'05 % (v/v) a PBS. El medio de bloqueo estaba compuesto por PBST más un 5 % (p/v) de leche desnatada en polvo. El medio para realizar el *stripping* de las membranas fue: Tris 62'5 mM, SDS al 2 % (p/v) y β-mercaptoetanol 100 mM ajustado a pH 6'8 con HCl. ECM con Ca^{2+} estaba compuesto por: Hepes 10 mM, NaCl 121 mM, KCl 4'7 mM, $CaCl_2$ 1 mM, $MgSO_4$ 1'2 mM, $NaHCO_3$ 5 mM, KH_2PO_4 1'2 mM, glucosa 10 mM y BSA al 0'25 % (p/v), pH 7'4.

Anticuerpos

El anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra cit c se obtuvo de BD Pharmingen. El anticuerpo monoclonal de ratón anti-COX IV y el anticuerpo secundario de cabra contra IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor® 488 se obtuvieron de Molecular Probes™ (Invitrogen). El anticuerpo policlonal de conejo contra casp 12 se obtuvo de Calbiochem mientras que el anticuerpo policlonal de conejo contra casp 3 fue de Santa Cruz Biotechnology. Stressgen Bioreagents proporcionó el anticuerpo policlonal de conejo contra casp 8. El anticuerpo monoclonal de ratón contra Bax, el anticuerpo monoclonal de ratón anti-γ-tubulina y los anticuerpos secundarios de conejo y cabra conjugados con peroxidasa de rábano picante y dirigidos contra IgG de ratón e IgG de conejo, respectivamente se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

Cultivo de células H9c2

Los cultivos celulares se mantuvieron a temperatura de 37 ^{o}C y atmósfera húmeda con un contenido en CO_2 ajustado al 5 % (véase *Capítulo* 2). El medio de cultivo completo fue: DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10 % (v/v), L-glutamina 2 mM, penicilina 100 unidades/ml y estreptomicina 100 μg/ml (Lax y otros, 2005). Las células se subcultivaron o se recogieron para realizar experimentos al alcanzar una confluencia próxima al 70-80 %. La inducción de apoptosis se hizo exponiendo células en DMEM a TG 3 μM ó TM 1 μg/ml durante diferentes periodos de tiempo.

Viabilidad celular

La viabilidad se determinó mediante el ensayo con MTT (véase *Capítulo* 2). La siembra de células se realizó por cuadriplicado a una densidad de ~15 × 10^3 células/pocillo en placas de 24 pocillos. Las células crecieron durante 4-5 días a 37 ºC en medio de cultivo completo. El cultivo celular se expuso al agente inductor de apoptosis —TG 3 μM o TM 1 μg/ml en DMEM—. En algunos casos, las células se sometieron a preincubación con el inhibidor general de caspasas: z-VAD-fmk 20 μM durante 1 h. El medio de cultivo DMEM se retiró después del tratamiento para inducir estrés en el RS y las células tratadas así como las no tratadas —que sirvieron de control— se lavaron dos veces con PBS a 37 ºC. El potencial redox de las células se evaluó tras añadir 0’3 ml de MTT 1 mg/ml a cada pocillo e incubar durante 30 min a 37 ºC. El precipitado de formazano se disolvió añadiendo 0’25 ml de Me_2SO a cada pocillo y manteniendo la placa a temperatura ambiente y con agitación orbital durante 5 min. Después se añadió 0’025 ml de Tris 2 M, pH 10’5 a cada pocillo. La absorbancia de cada muestra se determinó utilizando 570 nm como longitud de onda de medida y 690 nm como longitud de onda de referencia. El índice de supervivencia —para cada condición experimental— se expresa en forma de porcentaje tomando como 100 % el ensayo control a tiempo cero.

Carga de células con JC-1 y citometría de flujo

La siembra de células se realizó a una densidad de ~3’5 × 10^5 células/placa en placas de 150 mm de ∅. Las células crecieron durante 4-5 días a 37 ºC en medio de cultivo completo hasta alcanzar una confluencia del 70-80 %. Las células se sometieron después al protocolo de inducción de apoptosis como se ha descrito antes. Células tratadas así como células no tratadas —que sirvieron de control— se

cargaron a 37 ºC con JC-1 5 μg/ml en DMEM durante 10 min. Las células se lavaron dos veces con PBS a 37 ºC y se tripsinizaron antes de resuspenderlas a ~3 × 10^5 células/ml en ECM con Ca^{2+} a 25 ºC. Las medidas se realizaron en un citómetro modelo FACSort™ de *Becton Dickinson* inmediatamente después de la carga usando el laser de argon a 488 nm para la excitación. La fluorescencia verde y roja emitida por JC-1 se detectó en los canales FL-1 y FL-2, respectivamente. El solapamiento de fluorescencias en los canales de medida se compensó de acuerdo con un procedimiento descrito en la bibliografía (Cossarizza y otros, 1993). Los agregados y restos celulares se descartaron antes del análisis midiendo dispersión frontal y lateral de la luz. Para el análisis de cada muestra se utilizaron 20.000 células. El programa informático para la adquisición y análisis de datos fue CellQuest™ de *Becton Dickinson*.

Localización de Bax activo por inmunofluorescencia

La siembra de células se realizó a una densidad de ~2 × 10^4 células/placa en placas de cultivo de vidrio de 35 mm de ∅. Las células en medio de cultivo completo se mantuvieron a 37 ºC en el incubador de CO_2 durante 2 días antes de comenzar el experimento. El medio de cultivo de cada placa se retiró antes de lavar las células dos veces con PBS a 37 ºC y de exponerlas a TG 3 μM en medio DMEM durante 30 min, 1 ó 2 h. Células tratadas y células no tratadas —control— se cargaron a 37 ºC durante 45 min con el indicador fluorescente MitoTracker® Red 20 nM en DMEM. Las células se fijaron con formaldehído antes de permeabilizarlas con TX-100 y se expusieron al intensificador de señal Image-iT™ FX (véase Capítulo 2). A continuación, las células se incubaron a 4 ºC durante toda la noche con el anticuerpo anti-Bax 6A7 (dilución 1:1000) y posteriormente a 37 ºC durante 1 hora con anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor® 488 (dilución 1:200). La fluorescencia de las células se analizó con un equipo confocal de *Leica Microsystems* formado por microscopio invertido DM IRE II acoplado a una cabeza de barrido modelo TCS SP2. Se usó un objetivo de inmersión en aceite HCX PL APO de 63× con AN de 1'32. Alexa Fluor® 488 se excitó con un laser de argon mientras que para MitoTracker® Red se empleó el laser GreNe. Las ventanas para recoger la fluorescencia fueron 510-550 nm para Alexa Fluor® 488 y 590-650 nm para MitoTracker® Red. La apertura confocal fue de 140 μm lo que proporcionó una profundidad de campo en el eje z de 1'1 μm.

Muestras para la extracción y detección de proteínas

La siembra de células se realizó a una densidad de ~3'5 × 10^5 células/placa en cuatro placas de cultivo de 150 mm de ∅. Las células en medio de cultivo completo se mantuvieron a 37 ºC en el incubador de CO_2 hasta alcanzar el 70-80 % de confluencia (~1'5-2 × 10^6 células/placa). Las células se sometieron después al correspondiente protocolo de inducción de apoptosis como se ha descrito antes o se dejaron sin tratar —control—. Las células recogidas en el momento oportuno se procesaron para obtener los extractos celulares S-10 y P-10. Las muestras con los extractos celulares se mantuvieron a – 80 ºC hasta el momento de su utilización. Cit c se estudió en las fracciones S-10 y P-10, Bax en la fracción P-10 y las caspasas se analizaron en la fracción S-10.

Extractos celulares

La preparación de muestras para detectar proteínas se basó en el método descrito por Gottlieb y Granville (2002) (véase *Capítulo* 2). El procedimiento requiere la permeabilización selectiva de la membrana plasmática con una baja concentración del detergente digitonina. Para ello, las células tripsinizadas se centrifugaron antes de lavarlas dos veces con PBS a 4 ºC y resuspenderlas en medio de permeabilización a 4 ºC ajustando la concentración a ~4 × 10^4 células/µl. Después se añadió la mezcla de inhibidores de proteasas a razón de 1 µl/1 × 10^6 células y digitonina 600 µg/ml y se incubó 5 min en baño de hielo. Esta concentración de digitonina produjo un 95 % de células teñidas con el colorante Azul Tripán. Las células se centrifugaron a 10.000 ×g durante 10 min a 4 ºC. El sobrenadante obtenido se denominó fracción S-10 y se guardó a – 80 ºC. La fase sólida se solubilizó utilizando un volumen de medio de extracción de proteínas totales igual al utilizado para la permeabilización selectiva. Inmediatamente después se añadió la mezcla de inhibidores de proteasas a razón de 1 µl/1 × 10^6 células. La muestra se trató en un homogeneizador ultrasónico durante 4 períodos de 5 s cada uno —haciendo pausas de 30 s— y manteniendo siempre la muestra en baño de hielo. Posteriormente, se centrifugó de nuevo a 10.000 ×g durante 5 min a 4 ºC. El sobrenadante obtenido se denominó fracción P-10 y también se guardó a – 80 ºC.

Cuantificación de proteínas

La concentración de proteína se determinó por el método de Smith y otros (1985) usando BSA como patrón (véase *Capítulo* 2).

Separación y detección de proteínas

La separación y detección de proteínas se realizó siguiendo procedimientos estándares (véase Capítulo 2). Primero se hirvieron las muestras entre 2 y 15 min en medio de desnaturalización para evitar la agregación de proteínas —especialmente crítico para cit c—. Geles de poliacrilamida del 12 ó 15 % se utilizaron para separar proteínas de acuerdo con el protocolo descrito por Laemmli (1970). Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa usando un equipo de electrotransferencia semi-seca (*Bio Rad*). La eficacia de la transferencia se comprobó usando marcadores preteñidos de peso molecular. La membrana de nitrocelulosa se trató con el kit Qentix® *Western Blot Signal Enhancer* (Pierce) para aumentar la señal de detección y después se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 h en medio de bloqueo. La incubación con el anticuerpo primario se realizó a 4 ºC durante toda la noche y con agitación por balanceo. Las diluciones para los anticuerpos contra cit c, casp 12 y γ-tubulina fueron 1:500. Los anticuerpos contra COX IV y casp 8 se diluyeron 1:1000, mientras que los anticuerpos contra casp 3 o Bax se usaron a 1:200 ó 1:70, respectivamente. La membrana se lavó después tres veces durante 5 min cada vez con PBST y se incubó de nuevo a temperatura ambiente durante 30 min con el medio de bloqueo. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó durante 1 h a temperatura ambiente. Se usaron dos tipos de anticuerpos secundarios —teniendo en cuenta la especie de procedencia del anticuerpo primario— anti-IgG de ratón y anti-IgG de conejo, que se usaron a una dilución de 1:20.000 y 1:25.000, respectivamente. La membrana se lavó tres veces con PBST y las bandas de proteína se detectaron mediante reacción de quimioluminiscencia siguiendo el protocolo proporcionado por Sigma-Aldrich. Para detectar una segunda proteína con otro anticuerpo se realizó una incubación de la membrana a 50 ºC durante 30 min en medio de *stripping*. La membrana se expuso después al anticuerpo primario anti-γ-tubulina y en los casos en los que se indica a anti-COX IV. En ambos casos, el anticuerpo secundario fue anti-IgG de ratón unido a peroxidasa de rábano picante.

Presentación de datos

Los datos experimentales que se muestran en los histogramas corresponden a la media de al menos cinco ensayos independientes. La barra de error representa la desviación estándar en cada grupo de cinco ensayos. El análisis estadístico se realizó con la prueba de la t de Student usando la versión 8.0 de Sigma-Plot (*Jandel*

Scientific). Se consideraron significativos valores con p < 0'05. Los datos de electrotransferencia corresponden a ensayos representativos de experimentos repetidos con muestras diferentes y se han reproducido utilizando la versión 4.0 del programa informático Adobe Photoshop. El tratamiento de imágenes fue nulo o mínimo y se hizo siguiendo las normas aceptadas por la comunidad científica (Rossner y Yamada, 2004). Los datos de citometría de flujo que se presentan en forma de gráfica de puntos corresponden a experimentos representativos de varios ensayos independientes.

RESULTADOS

El daño que provoca TG o TM sobre la integridad celular es dependiente de la intensidad y duración de la agresión. El daño celular ocasionado por los tratamientos con TG o TM se valoró utilizando el ensayo de MTT. Los experimentos se realizaron en ausencia de suero para evitar que la proliferación celular enmascarase el efecto del tratamiento. La incubación de células H9c2 en DMEM con TG 3 μM produce un daño celular creciente que es dependiente del tiempo de exposición, alcanzando el efecto máximo a ~72 h (cilindros rojos en Fig. 6.1, panel A, véase también Capítulo 5).

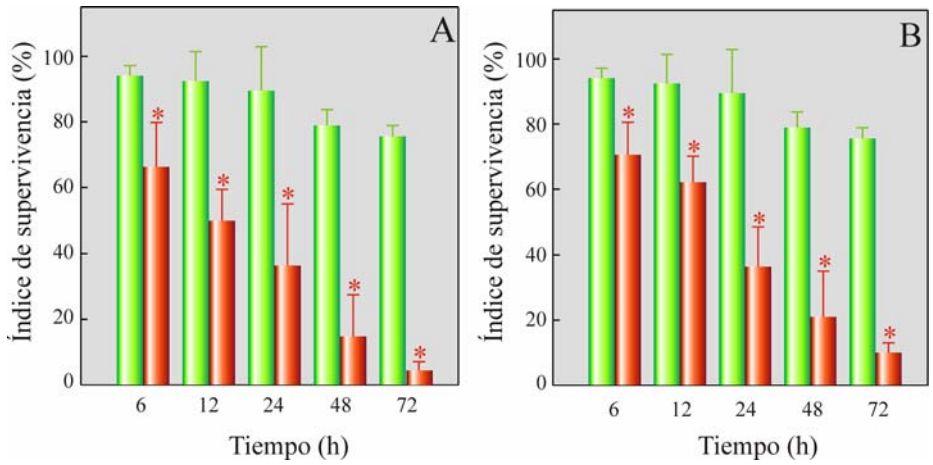


Figura 6.1. Daño celular inducido por TG 3 μM o TM 1 μg/ml. Células en DMEM a 37 ºC se expusieron a tratamiento. La incubación se prolongó durante los tiempos indicados. Las células se procesaron después para cuantificar el formazano acumulado. Se muestran células tratadas con TG 3 μM (A) o TM 1 μg/ml (B) (*cilindros rojos*) y células sujetas al mismo procedimiento pero en ausencia de agente inductor de apoptosis (*cilindros verdes*). El índice de supervivencia se expresa como porcentaje respecto a células control a tiempo cero. Se indica con (*) cuando la diferencia entre células tratadas y controles es estadísticamente significativa.

El ensayo también pone de manifiesto que la dependencia del daño celular inducido por TM 1 μg/ml respecto al tiempo (cilindros rojos en Fig. 6.1, panel B) es similar al que produce TG 3 μM. Los experimentos controles —células sin tratar con TG o TM— muestran una pequeña aunque progresiva pérdida de viabilidad celular debida a la ausencia de suero en el medio (cilindros verdes en Fig. 6.1).

La mitocondria no solo actúa como productora de la mayor parte de la energía de la célula sino que también desempeña un papel importante en la muerte celular por apoptosis ya que mantiene secuestrado un potente cóctel de proteínas pro-apoptóticas. La permeabilización de la MEM permite la liberación al citosol de cit c y otras proteínas que inician la denominada ruta intrínseca o mitocondrial de apoptosis. Por esta razón procedimos a determinar la distribución subcelular de cit c antes y después de iniciar el tratamiento de células con TG o TM. La detección de cit c en las fracciones S-10 y P-10 se hizo por procedimiento inmunológico tras separación electroforética de las proteínas. La fracción S-10 corresponde al sobrenadante obtenido al centrifugar a 10.000 ×g después de permeabilizar con digitonina mientras que la fracción P-10 corresponde a la parte soluble de la fase sólida que se obtiene en esa centrifugación. Cit c se localiza en la fracción P-10 pero no en la S-10 antes de iniciar el tratamiento con TG o TM —tiempo cero en el proceso de inducción de apoptosis— (Fig. 6.2). El tratamiento con TG o TM provoca un aumento dependiente del tiempo de cit c en la fracción S-10. Cit c es detectable a partir de 1 h cuando el tratamiento se hace con TG 3 μM mientras que la aparición de cit c en la fracción S-10 es patente después de 30 min de incubación con TM 1 μg/ml. La validez de estos resultados requiere demostrar la ausencia de componentes mitocondriales en la fracción S-10. Esto se hizo utilizando la proteína COX IV como marcador mitocondrial. Para ello la membrana con las proteínas transferidas se sometió a un proceso de *stripping* y después se incubó con un anticuerpo anti-COX IV. La banda correspondiente a COX IV solo aparece en la fracción P-10 confirmando la ausencia de contaminación mitocondrial en la fracción S-10. La membrana se sometió de nuevo a *stripping* para determinar el contenido de γ-tubulina que sirvió como control de carga en las calles del gel.

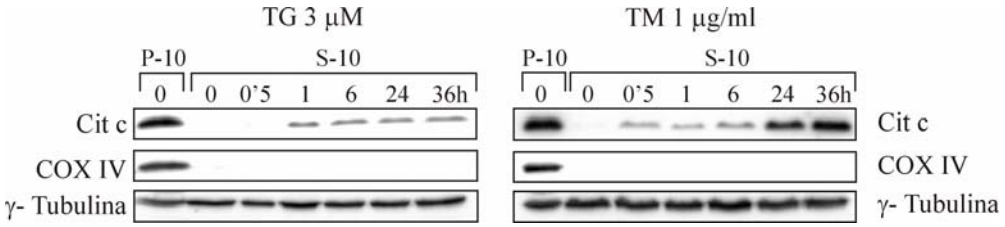


Figura 6.2. Liberación de cit c mitocondrial inducida por TG 3 μM o TM 1 μg/ml. Células a 37 ºC en DMEM se expusieron a TG 3 μM o TM 1 μg/ml durante los tiempos que se indican. Las células se trataron con digitonina antes de aislar las fracciones S-10 y P-10. La centrifugación a 10.000 ×g permite aislar la fracción citosólica en el sobrenadante ya que la membrana plasmática se permeabiliza de forma selectiva con digitonina. La presencia de cit c (p12), COX IV (p19'6) y γ-tubulina (p48) se analizó en ambas fracciones mediante inmunodetección. La proteína γ-tubulina se utilizó como control de carga proteica.

La siguiente cuestión fue conocer si la liberación de cit c desde la mitocondria al citosol era consecuencia de una despolarización mitocondrial. Para ello utilizamos el indicador fluorescente JC-1 y la técnica de citometría de flujo (Cossarizza y otros, 1993). Esta sonda de naturaleza catiónica se acumula en la mitocondria debido al $\Delta\Psi_m$ lo que provoca su agregación y da lugar a emisión de fluorescencia roja (Cossarizza y otros, 1993). La salida de la sonda que se produce cuando hay despolarización de la MIM da lugar a la forma monomérica que tiene fluorescencia verde. Los datos obtenidos con células no tratadas muestran que la mayoría de células emiten fluorescencia roja intensa (Fig. 6.3, panel A). El 96 % de la población celular se localiza en la región R1 mientras que solo el 6 % está en la región R2. Esto confirma la existencia de un $\Delta\Psi_m$ elevado en la mayoría de células sin tratar. Como control positivo del ensayo se estudió la respuesta del indicador JC-1 al tratar células con CCCP 5 μM —un protonóforo que produce descenso rápido del $\Delta\Psi_m$— durante 30 min. Como puede observarse, la mayoría de células muestran un claro descenso de fluorescencia roja y un aumento de fluorescencia verde (Fig. 6.3, panel B). Solo el 0'5 % de la población celular permanece en la región R1 mientras que el 99'5 % aparece en la región R2.

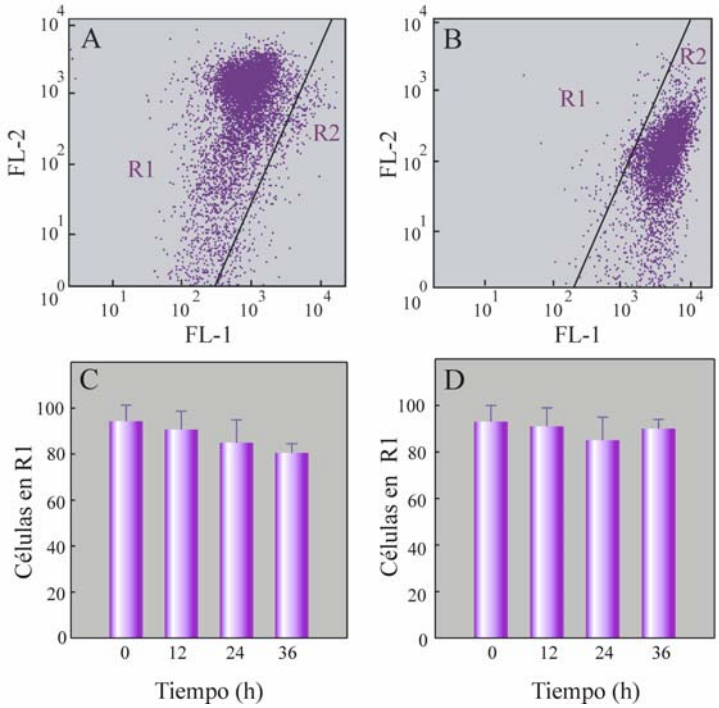


Figura 6.3. Comportamiento del $\Delta\Psi_m$ utilizando JC-1 como indicador. Células a 37 ºC en DMEM se expusieron a TG 3 μM o TM 1 μg/ml. El agente inductor de apoptosis estuvo ausente en los ensayos control. La incubación se prolongó durante los tiempos que se indican. Las células se cargaron después con JC-1 antes de tripsinizarlas y resuspenderlas. La fluorescencia verde y roja se detectó en los canales FL-1 y FL-2, respectivamente de un citómetro FACSort™ de BD. La selección de la población celular de interés se hizo midiendo dispersión frontal y lateral de la luz. (A) Comportamiento de células no tratadas que sirven de control. Las mayoría de células están en la región R1 y tienen valores altos de $\Delta\Psi_m$. (B) Comportamiento de células tratadas con CCCP 5 μM durante 30 min. La mayoría de células están en la región R2 y tienen valores bajos de $\Delta\Psi_m$. (C) Evolución del $\Delta\Psi_m$ con el tiempo al tratar con TG 3 μM. (D) Evolución del $\Delta\Psi_m$ con el tiempo al tratar con TM 1 μg/ml.

El experimento se repitió incubando las células con TG 3 μM durante diferentes intervalos de tiempo. La población de células en la región R1 no se altera después de 12 h de tratamiento y desciende muy ligeramente cuando los tiempos de exposición son más prolongados (Fig.6.3, panel C). Los datos obtenidos al utilizar TM 1 μg/ml como agente inductor de apoptosis indican que un tratamiento durante 12 h tampoco afecta a la población de células en la región R1 respecto a la respuesta de un experimento control (Fig. 6.3, panel D). Incluso después de 36 h de tratamiento el efecto es despreciable.

La proteína Bax forma parte de la subfamilia de proteínas pro-apoptóticas multidominio. Datos de la bibliografía señalan a Bax como responsable de la liberación de cit c de la mitocondria en distintas condiciones experimentales y en distintos tipos de células (Manon y otros, 1997; Eskes y otros, 1998). Para estudiar

la posible relación entre cit c y Bax en nuestro sistema experimental hemos estudiado la translocación de Bax a la mitocondria mediante detección inmunológica (Tikhomirov y Carpenter, 2005). Los datos obtenidos muestran que Bax está ausente de la fracción P-10 antes de añadir TG 3 μM o TM 1 μg/ml a las células pero no después de la adición. La presencia de Bax en la fracción P-10 se detecta 30 min después de haber comenzado el estímulo apoptótico (Fig. 6.4)

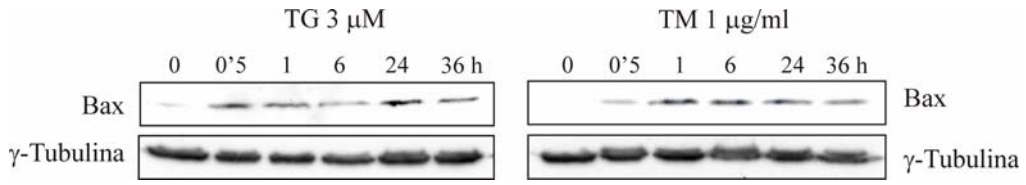


Figura 6.4. Translocación de Bax a P-10 inducida por TG 3 μM o TM 1 μg/ml. Células a 37 ºC en DMEM se sometieron a tratamiento con TG 3 μM o TM 1 μg/ml durante los tiempos indicados. La presencia de Bax (p21) en la fracción P-10 se evaluó mediante inmunodetección. La proteína γ-tubulina (p48) se utilizó como control de carga.

Este resultado nos llevó a estudiar la activación de Bax utilizando la técnica de microscopía confocal. En este caso, las células se sometieron a tratamiento con TG 3 μM durante diferentes intervalos de tiempo. Después, las células se cargaron con el indicador MitoTracker® Red para detectar la presencia de mitocondrias. La posterior fijación y permeabilización de las células permitió detectar la proteína Bax activa con ayuda del anticuerpo 6A7 (Tikhomirov y Carpenter, 2005). Los resultados que se muestran corresponden a células sin tratar o a células tratadas. La fluorescencia verde corresponde a la forma activa de Bax y aparece en células tratadas con TG (Fig. 6.5, paneles D, G y J) pero no en células sin tratar (Fig. 6.5, panel A). La proteína Bax activa muestra una distribución punteada, no homogénea, más abundante en la periferia celular y prácticamente ausente en la región próxima al núcleo (Fig. 6.5, paneles D, G y J). La fluorescencia roja corresponde a MitoTracker® Red y aparece con una distribución punteada y extendida en todo el plano focal a excepción del núcleo (Fig. 6.5, paneles B, E, H y K).

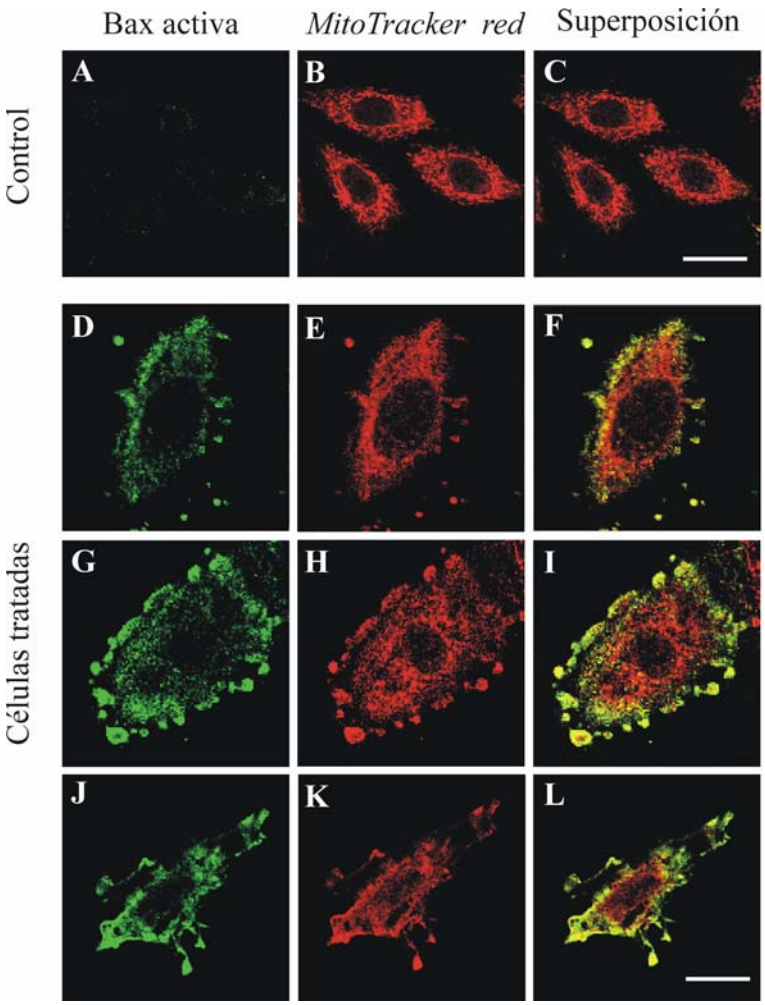


Figura 6.5. Localización de Bax activa en células apoptóticas. Imágenes de microscopía confocal de barrido de células sin tratar (A-C) o tratadas con TG 3 μM (D-L). Las células se cargaron con MitoTracker® Red para detectar mitocondrias (*fluorescencia roja*) y después se procesaron para detectar Bax activa por inmunofluorescencia (*fluorescencia verde*). La ubicación mayoritaria de Bax activa en mitocondrias se determinó por la aparición de color amarillo al superponer imágenes de la primera y segunda columna (F, I y L). Las imágenes de cada columna están tomadas con la misma sensibilidad para permitir la comparación. El tamaño de la barra en el panel C es 60 μm y es aplicable a los paneles A y B. La barra del panel L equivale a 20 μm y es aplicable a los paneles D-K.

La colocalización de fluorescencia verde y fluorescencia roja se identifica por el color amarillo (Fig. 6.5, paneles F, I y L). La superposición de ambas fluorescencias pone de relieve que la distribución de Bax activa se solapa en gran medida con la extensa red mitocondrial que poseen estas células.

Las caspasas son un grupo de proteasas esenciales en los procesos de muerte por apoptosis. Están reguladas a nivel postraduccional, lo que asegura una activación rápida. Otro de nuestros objetivos ha sido conocer la participación de

determinadas caspasas en la respuesta al daño irreversible en el RS. El proceso de activación de caspasas se analizó, después de hacer separación y electrotransferencia de proteínas, mediante el uso de anticuerpos que detectan el precursor inactivo de la caspasa y uno de los fragmentos escindidos. Nuestros datos indican que casp 12 está asociada a la membrana del RS al igual que ocurre con el RE (Nakagawa y otros, 2000) aunque se detecta más claramente en la fracción S-10 (Fig. 6.6) que en la P-10 (dato no mostrado). Esto se debe a que el revelado muestra un menor número de bandas inespecíficas en la fracción S-10. En células no sometidas a tratamiento, casp 12 se detecta mayoritariamente como una banda de 53 kDa (p53) que corresponde a la forma inactiva de la enzima, aunque también aparecen niveles basales del fragmento escindido (p35) (Fig. 6.6).

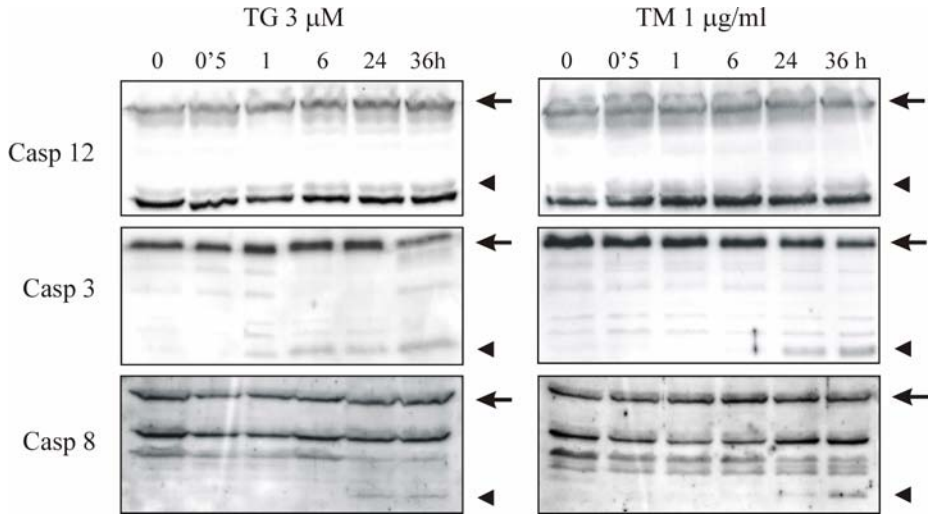


Figura 6.6. Activación de casp 12, casp 3 y casp 8 inducida por TG 3 μM o TM 1 μg/ml. Las células H9c2 se sometieron a estímulo apoptótico —TG 3 μM o TM 1 μg/ml— durante diferentes intervalos de tiempo. La activación de caspasas se estudió en la fracción S-10. Las formas inactivas de casp 12 (p53), casp 3 (p32) y casp 8 (p55) aparecen marcadas con flechas. Los fragmentos escindidos de casp 12 (p35), casp 3 (p17) y casp 8 (p25) se indican mediante puntas de flecha. La aparición de bandas inespecíficas se debe a sobre-exposición en el revelado para detectar fragmentos escindidos de caspasas.

El tratamiento con TG 3 μM o TM 1 μg/ml se traduce en un aumento en la acumulación de p35. Por otra parte, la forma inactiva de casp 3 —que corresponde a una banda de 32 kDa (p32)— está presente en la fracción S-10 de células no tratadas y no se detecta el fragmento escindido de 17 kDa (p17) (Fig. 6.6). La inducción de apoptosis da lugar al procesamiento de casp 3 que es dependiente del tiempo y la consiguiente acumulación de p17. Este proceso se produce más

rápidamente en células tratadas con TG que con TM. La fracción S-10 también contiene la forma inactiva de casp 8 que corresponde a una banda de 55 kDa (p55) y que sufre activación proteolítica generando un fragmento de 25 kDa (p25) en presencia de estímulo apoptótico (Fig. 6.6). En este caso, la acumulación de p25 no se observa hasta después de 24 h de tratamiento.

A la vista de los resultados de liberación de cit c y activación de casp 3 en respuesta a estrés irreversible en el RS modificamos las condiciones de ensayo incluyendo CsA —inhibidor del PTP mitocondrial (Crompton y otros, 1988)— o z-VAD-fmk —inhibidor general de caspasas—. Para determinar la concentración óptima de z-VAD-fmk como inhibidor se evaluó la activación de casp 3 en su presencia. El control positivo del ensayo consistió en tratar células con TG 3 μM durante 6 h y el control negativo fue células sin tratar (Fig. 6.7, panel A; calles uno y dos). El aumento de la concentración de z-VAD-fmk —añadido en preincubación 1 h antes del tratamiento con TG— provoca la disminución progresiva en la acumulación del fragmento p17 de casp 3. La inhibición total del procesamiento de casp 3 se observa al utilizar concentraciones de z-VAD-fmk superiores a 10 μM.

Como se ha visto antes, cit c está presente en la fracción S-10 de células tratadas con TG 3 μM durante 6 h pero es indetectable en células sin tratar (Fig. 6.7, panel B; calles uno y dos; también en Fig. 6.2). De igual forma, el procesamiento de casp 3 es evidente después de 6 h de tratamiento con TG pero no antes (Fig. 6.7, panel B; calles uno y dos; también en Fig. 6.6). Lo que ahora se muestra es que la preincubación de células con CsA 5 μM durante 10 min no impide la liberación de cit c ni la activación de casp 3 (Fig. 6.7, panel B; calle tres). Sin embargo, la preincubación con z-VAD-fmk 20 μM durante 1 h sí evita la activación de casp 3 pero no la liberación de cit c (Fig. 6.7, panel B; calle cuatro). La preincubación de células con CsA 5 μM durante 10 min sin tratamiento posterior no tiene efecto alguno y sirve como control adicional (Fig. 6.7, panel B; calle cinco).

Experimentos realizados tratando células con TM 1 μg/ml durante 24 h proporcionaron resultados similares a los descritos para TG 3 μM (Fig. 6.7, panel C). La liberación de cit c y la activación de casp 3 es evidente en la fracción S-10 de células tratadas, mientras que no se detecta cit c ni activación de casp 3 en la fracción S-10 de células sin tratar (Fig. 6.7, panel C; calles uno y dos). De igual forma, la preincubación de células con CsA 5 μM no bloquea la liberación de cit c ni la activación de casp 3 (Fig. 6.7, panel C; calle tres).

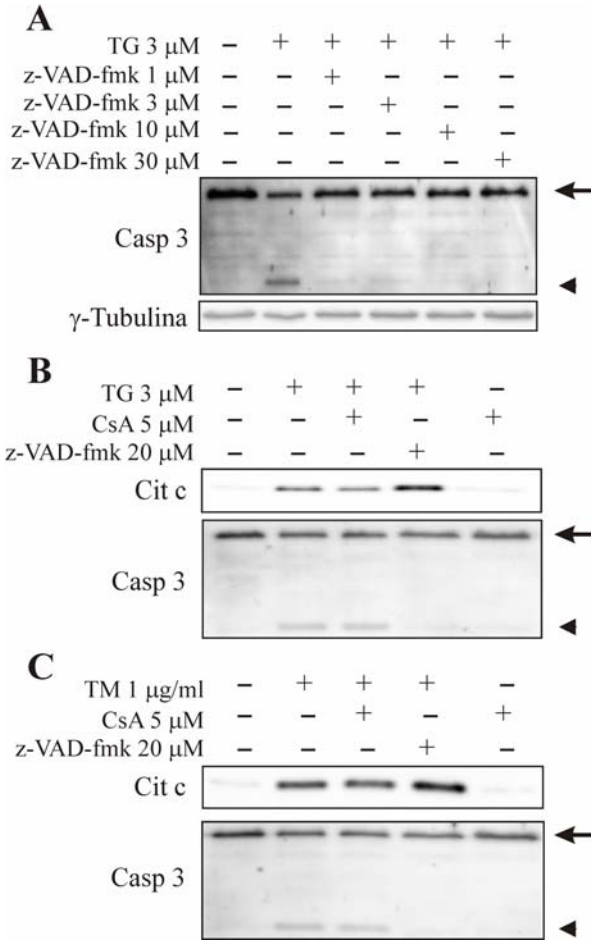


Figura 6.7. Efecto de CsA o z-VAD-fmk sobre liberación de cit c y activación de casp 3. Las células se expusieron a TG 3 μM durante 6 h ó TM 1 μg/ml durante 24 h. Las células se preincubaron cuando se indica con CsA 5 μM durante 10 min o con una determinada concentración de z-VAD-fmk durante 1 h. La detección de cit c (p12), forma inactiva de casp 3 (p32) y forma activa de casp 3 (p17) se estudió en la fracción S-10. (A) Activación de casp 3 inducida por TG 3 μM en células preincubadas con diferentes concentraciones de z-VAD-fmk. γ-Tubulina (p48) se utilizó como control de carga. (B) Efecto de TG 3 μM sobre liberación de cit c de la mitocondria o sobre activación de casp 3 antes o después de preincubar con CsA 5 μM ó z-VAD-fmk 20 μM. (C) Efecto de TM 1 μg/ml sobre liberación de cit c o activación de casp 3 antes o después de preincubar las células con CsA ó z-VAD-fmk.

Sin embargo, la preincubación de células con z-VAD-fmk 20 μM durante 1 h es incapaz de bloquear la liberación de cit c pero sí impide la activación de casp 3 (Fig. 6.7, panel C; calle cuatro). La preincubación de células con CsA en ausencia de estímulo apoptótico no tiene efecto alguno (Fig. 6.7, panel C; calle cinco).

Para caracterizar el orden jerárquico en la cascada de activación de caspasas se recurrió a una herramienta de gran utilidad como es la inhibición selectiva de caspasas. El experimento que sirvió de control positivo fue el tratamiento con TG 3 μM durante 6 h que provoca la aparición de p17 en la fracción S-10 mientras que en

el control negativo que son células sin tratar no se detecta (Fig. 6.8, calles uno y dos en panel superior izquierdo; también en Fig. 6.6). Ahora bien, la preincubación de células con z-LEHD-fmk 20 μM —inhibidor selectivo de casp 9— durante 1 h antes de exponerlas a TG 3 μM durante 6 h bloquea la aparición de p17 (Fig. 6.8, calle tres en panel superior izquierdo). También se observa que cuando las células se preincuban con z-IETD-fmk 20 μM —inhibidor selectivo de casp 8— el resultado es similar, es decir, no se observa presencia de cantidades significativas de p17 (Fig. 6.8, calle cuatro en panel superior izquierdo). A continuación se repitieron los experimentos utilizando TM como inductor de apoptosis. La preincubación de células con z-LEHD-fmk 20 μM ó z-IETD-fmk 20 μM durante 1 h —antes del tratamiento con TM 1 μg/ml durante 24 h — impide la activación de casp 3 (Fig. 6.8, calles tres y cuatro en panel superior derecho).

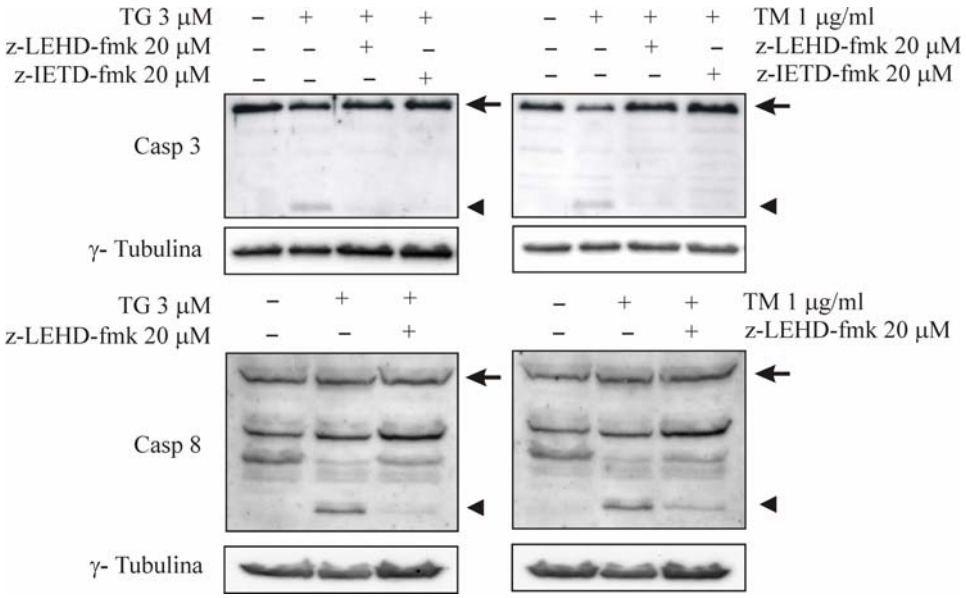


Figura 6.8. Dependencias de la activación de casp 3 y casp 8 en situaciones de estrés en el RS. La activación de casp 3 se estudió tratando células con TG 3 μM durante 6 h ó TM 1 μg/ml durante 24 h (*paneles superiores*). La activación de casp 8 se estudió después de 36 h de tratamiento con un inductor de apoptosis (*paneles inferiores*). El tratamiento con agente inductor de apoptosis fue precedido, cuando se indica, de preincubación con un inhibidor permeable, irreversible y específico de caspasas durante 1 h. Casp 3 y casp 8 se estudiaron en la fracción S-10. Procasp 3 (p32) y procasp 8 (p55) aparecen marcadas con flechas. Fragmentos de casp 3 (p17) y casp 8 (p25) están marcados con puntas de flechas. γ-Tubulina (p48) se utilizó como control de carga

También se estudió la activación de casp 8 cuando se inhibe selectivamente casp 9. Los resultados muestran que el tratamiento de células con TG 3 μM ó TM 1

μg/ml durante 36 h produce la acumulación de p25 cosa que no ocurre cuando se utilizan células sin tratar (Fig. 6.8, calles uno y dos en paneles inferiores; véase también Fig. 6.6). Sin embargo, también se observa que la preincubación de células con z-LEHD-fmk 20 μM durante 1 h antes de tratar con TG 3 μM bloquea la activación de casp 8 (Fig. 6.8, calle tres en panel inferior izquierdo). De forma análoga, la preincubación de células con z-LEHD-fmk 20 μM durante 1 h antes del tratamiento con TM 1 μg/ml impide de forma sustancial la activación de casp 8 (Fig. 6.8, calle tres en panel inferior derecho).

Como la activación de caspasas está asociada al proceso de muerte celular inducida por estrés en el RS estudiamos si la inhibición selectiva de caspasas era capaz de bloquear la apoptosis. Para ello estudiamos daño celular mediante el ensayo con MTT (véase *Capítulo* 2) y comparamos el comportamiento de células sometidas a estímulo apoptótico durante diferentes periodos de tiempo con células preincubadas con z-VAD-fmk 20 μM durante 1 h antes del tratamiento. La capacidad de células tratadas con TG 3 μM para reducir el MTT desciende progresivamente con el tiempo de exposición a TG como se ha visto antes (cilindros rojos en Fig. 6.9, panel A; véase también Fig. 6.1, panel A). Al repetir el experimento pero preincubando las células con z-VAD-fmk 20 μM durante 1 h antes del tratamiento se observa un perfil de supervivencia similar al obtenido sin preincubar con el inhibidor general de caspasas (comparar cilindros marrones y rojos en Fig. 6.9, panel A). También se muestra un control negativo que corresponde a células incubadas en DMEM durante los mismos periodos de tiempo pero sin exponerlas a TG (cilindros verdes en Fig. 6.9, panel A). Cuando se estudia el comportamiento de las células al tratar con TM 1 μg/ml se observa un resultado similar al descrito para TG (Fig. 6.9, panel B) lo que indica que la inhibición de caspasas no tiene efecto protector de la muerte celular.

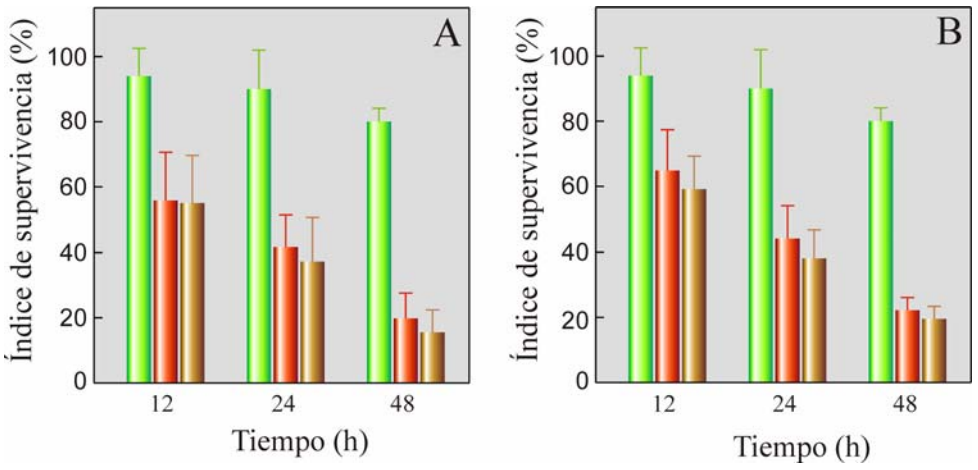


Figura 6.9.- Efecto de la inhibición de caspasas sobre el daño celular inducido por TG 3 μM o TM 1μg/ml. Las células cultivadas a 37 °C en DMEM se expusieron a TG 3 μM (A) o TM 1 μg/ml (B). El daño celular se evaluó con el ensayo del MTT. Las células se trataron durante diferentes períodos de tiempo (*cilindros rojos*) o se preincubaron con z-VAD-fmk 20 μM durante 1 h antes del tratamiento (*cilindros marrones*). Las células se mantuvieron en DMEM y sin tratamiento durante los mismos intervalos de tiempo (*cilindros verdes*). Las diferencias entre células sometidas a tratamiento apoptótico en presencia o ausencia de z-VAD-fmk no alcanzaron significación estadística (p> 0'05) para ninguno de los tiempos de ensayo.

DISCUSIÓN

La descarga irreversible del depósito de Ca^{2+} del RS inducida por TG o la inhibición de la N-glicosilación de proteínas en el RS provocada por TM origina daño celular. La evolución temporal del daño observado es similar en ambos casos (Fig. 6.1). Este resultado plantea la duda de si dos señales inductoras de muerte celular que actúan sobre el mismo orgánulo como es el RS dan lugar a la misma ruta apoptótica.

El tratamiento de células con TG 3 μM o TM 1 μg/ml provoca la rápida liberación de cit c mitocondrial (Fig. 6.2) mientras que el descenso del $\Delta\Psi_m$ en la población celular ocurre mucho después y es relativamente pequeño (Fig. 6.3). Estos resultados indican que la liberación de cit c producida por estrés en el RS no se produce por despolarización de la MIM. Esta conclusión está avalada por los resultados de liberación de cit c en células preincubadas con CsA en los que no se aprecia efecto protector al bloquear el PTP mitocondrial (Fig. 6.7, paneles B y C).

La activación de proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak en mitocondrias y RE son elementos esenciales en la iniciación del proceso apoptótico inducido por daño en el RE (Wei y otros, 2001; Scorrano y otros, 2003). Nuestros datos indican que la activación de Bax y su translocación a la mitocondria ocurren al comienzo del

proceso apoptótico cuando las células H9c2 se someten a estrés en el RS (Fig. 6.4 y Fig. 6.5).

Daños intensos y/o prolongados como los que provocan TG o TM son detectados por las proteínas PERK, IRE1 y ATF6 que se encuentran ancladas en la membrana del RE. También sabemos que si la respuesta adaptativa no es suficiente para aliviar la situación de estrés, se activan moléculas intermediarias como CHOP, JNK y proteínas de la familia Bcl-2 que conducen al suicidio celular (Szegezdi y otros, 2006). Una cuestión sin resolver es conocer como se integran los componentes de la maquinaria apoptótica que determinan el destino de la célula y cual es su secuencia de actuación en respuesta a una situación de estrés en el RE. No se sabe si existe un único evento pro-apoptótico que controla a todos los demás o si coexisten múltiples eventos que simultáneamente activan el proceso de muerte celular. Hay que señalar que los modelos experimentales utilizados hacen uso de agentes químicos que inducen de forma sincrónica daños muy severos en el RE. Este es nuestro caso donde los tratamientos con TG o TM desencadenan respuestas apoptóticas que comparten los mismos eventos básicos. Se desconoce si señales más moderadas de estrés en el RE —que previsiblemente experimentan las células *in vivo*— pueden desencadenar respuestas que transcurran a través de diferentes rutas o pueden originar diferentes respuestas apoptóticas.

Hay datos bibliográficos que indican que casp 12 es la caspasa iniciadora en roedores cuando la apoptosis se induce por daño en el RE. En este sentido, se ha demostrado activación de casp 12 en fibroblastos de ratón sometidos a tratamiento con TG o TM y supresión parcial de apoptosis en células deficientes en casp 12 (Nakagawa y otros, 2000). Sin embargo, otros estudios señalan que z-VAD-fmk inhibe la activación de casp 12 al tratar con TG pero no la activación de casp 9 y casp 3, lo que demuestra el papel relevante de la mitocondria (Kitamura y otros, 2003). Estudios más recientes muestran que la apoptosis inducida por estrés en el RE puede producirse sin participación de casp 12 (Obeng y Boise, 2005; Di Sano y otros, 2006) lo que pone en duda que juegue un papel clave. También se ha descrito la participación de otros mediadores como son: calpaínas, receptores de muerte, ruta independiente de caspasas, etc. Nuestros datos indican que la inducción de estrés en el RS produce en su fase inicial la activación de casp 12 (Fig. 6.6). También se observa liberación de cit c mitocondrial que se produce incluso en presencia de un inhibidor general de caspasas como z-VAD-fmk (Fig. 6.7, paneles B y C). Esto indica que la activación de la apoptosis no es dependiente de caspasas y el proceso

crítico que marca el "punto sin retorno" tiene lugar en una etapa previa. Otro resultado importante es que la translocación de Bax a la mitocondria se produce antes o de forma simultánea a la liberación de cit c (véase Fig. 6.2 y Fig. 6.4). Por tanto, podemos afirmar que la mitocondria participa en la fase inicial de la apoptosis inducida por daño en el RS sin que se produzca alteración del $\Delta\Psi_m$.

La activación de caspasas iniciadoras permite que éstas procesen las formas inactivas de las caspasas efectoras. Esta serie de reacciones en cascada culmina con el desmantelamiento rápido y ordenado de la célula. Los anticuerpos disponibles no han permitido detectar la activación de casp 9 que previsiblemente debe ocurrir tras la liberación cit c. Esto puede deberse a que los niveles de activación son muy bajos ya que es una caspasa iniciadora. Sin embargo, la activación de casp 3 y casp 8 se manifiesta claramente (Fig. 6.6). Los datos sobre activación de casp 3 y liberación de cit c indican que ambos procesos son independientes de la apertura del PTP mitocondrial. Además, el inhibidor general de caspasas bloquea la activación de casp 3 pero no la liberación de cit c mitocondrial (Fig. 6.7, paneles B y C) lo que confirma que casp 3 se activa después de la liberación de cit c. La utilización de inhibidores específicos de caspasas también proporciona resultados interesantes. Así, el inhibidor de casp 9 impide la activación de casp 3 como era de esperar. Un resultado menos esperado fue que el inhibidor de casp 8 también bloquea la activación de casp 3 (Fig. 6.8). Esto permite establecer que casp 3 forma parte de la misma secuencia de reacciones que casp 9 y casp 8 aunque en una etapa posterior. Por otra parte, el hecho de que la activación de casp 8 sea inhibible por un inhibidor de casp 9 (Fig. 6.8) sugiere que casp 8 se encuentra en la misma cascada de activación pero en una etapa posterior a casp 9 y casp 3. Estos resultados indican que casp 3 y casp 8 forman parte de un bucle de amplificación que potencia la fase de ejecución de la apoptosis. La existencia de este bucle ha sido descrita en otros sistemas experimentales (Slee y otros, 2000; Tang y otros, 2000).

La inhibición de la activación de caspasas se ha asociado con resistencia a muerte celular porque retrasa o evita la fragmentación del material genético (Yue y otros, 1998; Holly y otros, 1999). Sin embargo, nuestros datos muestran que z-VAD-fmk no evita el daño celular cuando se evalúa mediante el ensayo con MTT (Fig. 6.9). Esto confirma que la muerte de las células no necesariamente está vinculada a la activación de caspasas. Cabe señalar que la liberación de cit c del espacio intermembranal de la mitocondria va acompañada de la liberación de otras proteínas que son efectores de muerte pero que son independientes de caspasas

(Kroemer y Martin, 2005). Este mecanismo alternativo de muerte celular muestra características morfológicas diferentes a las observadas cuando intervienen caspasas y es responsable de que el proceso de apoptosis se convierta en otras formas de muerte, incluyendo la necrosis (Kroemer y Martin, 2005).

Las caspasas son mediadores importantes de la muerte celular por apoptosis cuando se induce por daño en el RS pero no ejercen el control del proceso. Una cuestión por conocer es la identificación del evento molecular que desencadena el inicio de la apoptosis.

Daño mitocondrial y muerte celular ....

Autumn Leaves. Bill Atkinson

RESUMEN

La adición de TG 10 μM a células H9c2 produce liberación de cit c de la mitocondria que está asociada a una rápida disminución del $\Delta\Psi_m$. En cambio, la liberación de cit c inducida por ST 50 nM está mediada por la activación de Bax sin que se altere el $\Delta\Psi_m$. La acumulación de cit c en el citosol alcanza niveles similares en ambos casos, lo que indica que la magnitud de la liberación es independiente del mecanismo de permeabilización de la MEM. Cualquiera de los dos inductores de apoptosis produce activación de casp 9— caspasa iniciadora— y casp 3 —caspasa efectora— así como del bucle de amplificación de la fase ejecutora de la apoptosis en el que interviene casp 8. La liberación de cit c que produce alteración funcional de la mitocondria se produce antes cuando se induce con TG 10 μM que con ST 50 nM. Sin embargo, las alteraciones morfológicas de la célula y la condensación de cromatina se desarrollan antes cuando se incuba con ST 50 nM. El inhibidor general de caspasas no protege de la condensación de cromatina inducida por ST 50 nM. Por tanto, la alteración funcional de la mitocondria está directamente relacionada con la cinética de liberación de cit c pero el hecho de que TG 10 μM provoque antes que ST 50 nM la alteración mitocondrial no significa que las alteraciones estructurales de la célula se produzcan antes en presencia de TG. Esto sugiere la existencia de programas de muerte celular que son independientes de caspasas.

INTRODUCCIÓN

La mitocondria es la central energética de la célula que se encarga de producir la mayor parte de la energía que utiliza. También es el lugar donde se producen muchas reacciones del metabolismo intermediario y otros procesos importantes como la modificación de xenobióticos y la regulación intracelular de Ca^{2+}. La mitocondria es también orgánulo diana de diversas señales pro-apoptóticas y contiene una serie de proteínas efectoras que son capaces de promover la muerte celular (Kroemer y Reed, 2000; Ferri y Kroemer, 2003).

La integridad de las membranas mitocondriales es esencial para la supervivencia de la célula de tal forma que la permeabilización de la MEM se considera un "punto sin retorno" en la muerte celular por apoptosis (Kroemer y Reed, 2000). Numerosos estímulos fisiológicos y patológicos son capaces de inducir permeabilización de la MEM aunque el mecanismo de acción es todavía objeto de debate (Green y Kroemer, 2004). Básicamente podemos distinguir dos mecanismos. En un caso, proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2

permeabilizan selectivamente la MEM sin alterar el $\Delta\Psi_m$ mientras que en el otro caso la apertura del PTP mitocondrial produce pérdida del $\Delta\Psi_m$ e hinchamiento de la matriz mitocondrial lo que provoca ruptura de la MEM. La actuación de uno u otro mecanismo depende de la naturaleza del inductor de apoptosis y también del tipo de célula.

La permeabilización de la MEM da lugar a la liberación de proteínas pro-apoptóticas desde el espacio intermembranal de la mitocondria hasta el citosol. Se ha visto que la acumulación de cit c en el citosol se produce durante un intervalo de tiempo que varía de min a h cuando se mide en una población celular, debido a que el inicio de la liberación en cada célula es un proceso aleatorio. Estudios sobre cinética de liberación de cit c en células individuales indican que el proceso es rápido y se produce en todas las mitocondrias a la vez (Goldstein y otros, 2000; Goldstein y otros, 2005) cosa que parece incompatible con el mantenimiento de la producción de energía y del $\Delta\Psi_m$ que en muchos casos se observa. Esta aparente contradicción se ha explicado sugiriendo que el cit c podría volver al espacio intermembranal después de la liberación o bien aceptando la existencia de una población de células en las que el cit c no se libera (Goldstein y otros, 2000). Otros estudios indican que la liberación de cit c es un proceso bifásico debido a que existen dos depósitos mitocondriales de cit c que son funcionalmente diferentes. Una pequeña fracción de cit c puede liberarse tras un estímulo apropiado mientras que la otra fracción, que es mucho mayor, permanece secuestrada en las invaginaciones de la membrana interna —crestas mitocondriales— (Bernardi y otros, 1999; Scorrano y otros, 2002). Por tanto, la permeabilización selectiva de la MEM se traduce en la liberación de sólo ~10-15 % del cit c total con efecto mínimo sobre el $\Delta\Psi_m$ y la producción de energía. La liberación de una mayor cantidad de cit c requeriría hinchamiento de la matriz mitocondrial y descenso del $\Delta\Psi_m$ (Bernardi y otros, 1999) o bien apertura pasajera del PTP mitocondrial sin producir colapso del $\Delta\Psi_m$ y remodelación de las crestas mitocondriales (Scorrano y otros, 2002). La liberación bifásica de cit c se ha explicado postulando la existencia de diferentes bucles de amplificación (Garrido y otros, 2006). Se desconoce la posible relación entre cantidad de cit c liberado y mecanismo de permeabilización de la MEM. Es por ello que el estudio de la cinética y magnitud del cit c liberado bajo diferentes condiciones experimentales puede proporcionar información valiosa para determinar el efecto que tiene el daño mitocondrial sobre el proceso apoptótico.

El contenido en mitocondrias de los miocitos cardiacos viene a representar aproximadamente un 30 % del volumen celular. Este elevado contenido en mitocondrias asegura una elevada capacidad para sintetizar ATP y es indispensable para cubrir las necesidades energéticas del corazón. Esta circunstancia hace que los cardiomiocitos sean muy vulnerables al daño mitocondrial (Regula y otros, 2003). De hecho, el daño mitocondrial en cardiomiocitos y el consiguiente proceso apoptótico se ha relacionado con diversas enfermedades cardíacas (Regula y otros, 2003).

En este capítulo hemos caracterizado la relación entre daño mitocondrial y muerte celular usando compuestos con capacidad de inducir apoptosis a través de la ruta mitocondrial. Es el caso de ST —inhibidor de amplio espectro de quinasas de proteínas— (Bossy-Wetzel y otros, 1998; Heiskanen y otros, 1999) y de TG —inhibidor de Ca^{2+}-ATPasa de RSE— (Sagara e Inesi, 1991) que ejerce un efecto directo sobre las mitocondrias cuando se usa a concentraciones relativamente elevadas (Vercesi y otros, 1993; Korge y Weiss, 1999; Lax y otros, 2006). Los experimentos se han realizado en células H9c2 y se han diseñado para caracterizar: liberación mitocondrial de cit c, cambios en $\Delta\Psi_m$, activación de Bax, procesamiento de determinadas caspasas y cambios en el aspecto morfológico de las células.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Las células H9c2 procedentes de miocitos de corazón embrionario de rata se obtuvieron de la Colección Europea de Cultivos Celulares. El sustrato para peroxidasa y los marcadores preteñidos de peso molecular se obtuvieron de Sigma-Aldrich. La membrana de nitrocelulosa Protran® BA 83 para electrotransferencia se obtuvo de Schleicher y Schuell BioScience. El kit Qentix™ *Western Blot Signal Enhancer* fue de Pierce y la película fotográfica Curix RP2 plus se adquirió de Agfa.

Reactivos y medios

El medio completo de cultivo estaba formado por: DMEM suplementado con un 10 % de suero fetal bovino, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 unidades/ml y estreptomicina 100 μg/ml. La composición de PBS fue: NaCl 137 mM, KCl 2’7 mM, Na_2HPO_4 10’14 mM y KH_2PO_4 1’76 mM ajustado a pH 7’4 con HCl. ECM

con Ca^{2+} estaba compuesto por: Hepes 10 mM, NaCl 121 mM, KCl 4'7 mM, $CaCl_2$ 1 mM, $MgSO_4$ 1'2 mM, $NaHCO_3$ 5 mM, KH_2PO_4 1'2 mM, glucosa 10 mM y BSA al 0'25 % (p/v), ajustado a pH 7,4 con NaOH. El medio para permeabilizar células con digitonina fue: KCl 75 mM, NaH_2PO_4 1 mM, Na_2HPO_4 8 mM y sacarosa 250 mM. El medio de extracción de proteínas —después del tratamiento con digitonina— estaba compuesto por: Tris 150 mM, EGTA 1 mM, TX-100 al 1 % (v/v), desoxicolato sódico al 1 % (p/v) y SDS al 0'1 % (p/v) ajustado a pH 8'0 con HCl. El medio de desnaturalización estaba formado por: Tris 62'5 mM, SDS al 2 % (p/v), β-mercaptoetanol al 5 % (v/v), glicerol al 7'5 % (v/v) y azul de bromofenol al 0'0003 % (p/v), pH 6'8. El medio PBST se preparó disolviendo Tween-20 en PBS hasta alcanzar una concentración de 0'05 % (v/v). El medio de bloqueo estaba compuesto por PBST que contenía leche desnatada al 5 % (p/v). El medio para el *stripping* de las membranas fue: Tris 62'5 mM, SDS al 2 % (p/v) y β-mercaptoetanol 100 mM ajustado a pH 6'8 con HCl.

Cultivo de células H9c2

Los cultivos se mantuvieron a 37 ^{o}C y en atmósfera húmeda con CO_2 al 5 % (véase Capítulo 2). Las células se subcultivaron o se utilizaron para realizar experimentos al alcanzar una confluencia próxima al 70-80 %. Todos los experimentos se realizaron en ausencia de suero fetal bovino y antibióticos. El daño mitocondrial se indujo incubando las células con TG 10 μM o ST 50 nM.

Viabilidad celular

El ensayo se basa en la capacidad de las células vivas para reducir el reactivo MTT (Mosmann, 1983). Las células se sembraron por cuadriplicado en placas de 24 pocillos a una densidad de ~15×10^3 células/pocillo y se incubaron a 37 ºC durante 4 días en medio de cultivo completo. Las células se lavaron 2 veces con PBS a 37 ºC y se expusieron a TG 10 μM o ST 50 nM en DMEM durante periodos de tiempo establecidos. La incubación se realizó a 37 ºC en el incubador de CO_2. Después se retiró el medio y las células se lavaron de nuevo con PBS antes de añadir MTT 1 mg/ml. Las células se mantuvieron a 37 ºC durante 30 min. El ensayo colorimétrico —para evaluar la reducción de MTT— se describe en Capítulo 2. El índice de supervivencia de células tratadas o sin tratar, para cada intervalo de tiempo, corresponde al porcentaje con respecto a un control realizado a tiempo cero.

Apariencia morfológica

Las células se sembraron en placas de cultivo de plástico de 100 mm de ∅ y se mantuvieron a 37 ºC en atmósfera húmeda con CO_2 al 5 %. Las células en cultivo se lavaron dos veces con PBS a 37 °C antes de incubarlas con TG 10 μM o ST 50 nM en DMEM durante distintos periodos de tiempo. La incubación se hizo a 37 ºC en el incubador de CO_2. Las células se observaron mediante la técnica de contraste de fases con un microscopio invertido Leica DM IL y las imágenes se digitalizaron con una cámara Leica DC300 F antes de analizarlas con la versión 1.2 del programa informático IM50 de Leica.

Tinción de cromatina

Las células se sembraron sobre cubre-objetos de vidrio de 13 mm de ∅ colocados en placas de 24 pocillos y se cultivaron a 37 ºC durante 4-5 días en el incubador de CO_2. Las células se lavaron dos veces con PBS a 37 ºC antes de incubarlas en DMEM con el correspondiente agente inductor de daño mitocondrial. La incubación a 37 ºC en el incubador de CO_2 se prolongó durante 1 ó 2 h. En algunos casos, la adición del agente inductor de daño mitocondrial estuvo precedida de una incubación con z-VAD-fmk 20 μM durante 1 h. La fijación y tinción de células adheridas a los cubre-objetos se describe en *Capítulo* 2. Cada cubre-objetos se lavó tres veces con PBS a 37 ºC y se colocó invertido sobre un porta-objetos de vidrio con una gota de medio de montaje. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio de epifluorescencia Leica modelo DMRB equipado con un bloque de filtros I3. Las imágenes se digitalizaron con ayuda de una cámara Leica DC500 y después se analizaron con la versión 1.2 del programa informático IM50.

Medidas del $\Delta\Psi_m$

Las células crecieron en placas de 150 mm de ∅ hasta alcanzar una confluencia próxima al 70-80 %. Las células en cultivo se lavaron dos veces con PBS a 37 ºC y después se trataron con el correspondiente agente inductor de daño mitocondrial. El tratamiento se hizo a 37 ºC en el incubador de CO_2 durante determinados periodos de tiempo y el medio utilizado fue DMEM. En algunos casos, la adición de TG 10 μM estuvo precedida de una incubación con CsA 5 μM durante 10 min. Células tratadas y células sin tratar —que sirvieron de control— se incubaron a 37 ºC con JC-1 5 μg/ml en DMEM durante 10 min. Tras la carga, las células se lavaron dos veces con PBS a 37 ºC y se despegaron de la placa por

tripsinización antes de resuspenderlas a una concentración de ~3 × 10^5 células/ml en ECM con Ca^{2+} a 25 ºC. Las medidas se realizaron, inmediatamente después de la carga, en un citómetro de flujo FACSort™ de Becton Dickinson que utiliza un laser de argon a 488 nm para la excitación. La fluorescencia verde y roja emitida por el indicador JC-1 se detectó en los canales FL-1 y FL-2, respectivamente. Se estableció una compensación en los canales de medida debido al solapamiento de las dos señales fluorescentes (Cossarizza y otros, 1993). Los agregados y restos celulares se descartaron antes del análisis mediante procedimiento electrónico utilizando los parámetros de dispersión frontal y lateral de la luz. Cada medida se realizó con ~20.000 células a una velocidad de 200 células/s. La adquisición y análisis de datos se hizo con el programa de ordenador CellQuest™ de Becton Dickinson.

Preparación de extractos celulares

Las células cultivadas en placas de 150 mm de ∅ hasta alcanzar una confluencia próxima al 70 % se lavaron dos veces con PBS a 37 ºC antes de ponerlas en DMEM. Las células se pusieron después en presencia del agente inductor de daño mitocondrial manteniéndolas en el incubador de CO_2 durante periodos de tiempo establecidos. La adición del agente inductor de daño mitocondrial estuvo precedida cuando se indica de una incubación con CsA 5 μM durante 10 min o z-VAD-fmk 20 μM durante 1 h. Las células tratadas se despegaron por tripsinización y sedimentaron por centrifugación a 480 ×g durante 10 min a 4 ºC. A continuación, las células se lavaron con PBS frío a 4 ºC y se resuspendieron a una concentración de ~40 × 10^6 células/ml en medio de permeabilización. Inmediatamente después se añadió la mezcla de inhibidores de proteasas a razón de 1 μl/1 × 10^6 células y digitonina 600 μg/ml para conseguir una permeabilización selectiva de la membrana plasmática (Gottlieb y Granville, 2002) incubando en baño de hielo durante 5 min. La concentración de digitonina utilizada produjo un 95 % de células teñidas con Azul Tripán. El medio resultante se centrifugó a 10.000 ×g durante 10 min a 4 ºC y el sobrenadante obtenido se denominó fracción S-10 y se guardó a – 80 ºC. La fase sólida se solubilizó añadiendo un volumen de medio de extracción de proteínas totales igual al utilizado para la permeabilización selectiva. Inmediatamente después se añadió 1 μl de la mezcla de inhibidores de proteasas por cada 10^6 células antes de someterlas a tratamiento en un homogeneizador ultrasónico y a centrifugación a 10.000 ×g

durante 5 min a 4 ºC. El sobrenadante obtenido se denominó fracción P-10 y también se guardó a – 80 ºC. Cit c se analizó en las fracciones S-10 y P-10, Bax en la fracción P-10 y las caspasas se analizaron en la fracción S-10.

Cuantificación de proteínas

La concentración de proteína de las muestras se determinó por el método de Smith y otros (1985) usando BSA como patrón.

Separación y detección de proteínas

Las muestras se cargaron en minigeles de poliacrilamida que contenían SDS. Electroforesis, electrotransferencia y detección de proteínas se realizaron según los procedimientos descritos en Capítulo 2. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-cit c monoclonal de ratón que se obtuvo de BD Pharmingen™, anti-COX IV monoclonal de ratón que procedía de Molecular Probes™ (Invitrogen); anti-casp 3 policlonal de Santa Cruz Biotechnology y anti-casp 8 policlonal de conejo que era de Stressgen Bioreagents. Anti-Bax (clon 6A7) monoclonal de ratón, anti-casp 9 de conejo, anti-γ-tubulina monoclonal de ratón y los anticuerpos secundarios de conejo y cabra —conjugados con peroxidasa de rábano picante— anti-IgG de ratón y anti-IgG de conejo, respectivamente se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El revelado de las membranas se realizó con un kit para detección de quimioluminiscencia de Sigma-Aldrich siguiendo el protocolo correspondiente. En la detección de caspasas aparecen bandas inespecíficas debido a la sobreexposición que es necesaria para visualizar los fragmentos proteolíticos de interés. La prueba de carga para las calles del gel se valoró con un anticuerpo anti-γ-tubulina.

Presentación de datos

Los datos que se muestran en los histogramas corresponden a la media de al menos cinco ensayos independientes incluyendo la desviación estándar correspondiente. El análisis estadístico se realizó con la prueba de la t de Student usando la versión 8.0 del programa Sigma-Plot de *Jandel Scientific*. Se consideraron valores significativos cuando $p < 0'05$. Las imágenes de células y las de inmunodetección corresponden a ensayos representativos de experimentos repetidos con muestras diferentes. Están reproducidos usando la versión 4.0 del programa Adobe Photoshop. El tratamiento de las imágenes fue nulo o mínimo y siempre de acuerdo con procedimientos aceptados (Rossner y Yamada, 2004). La

cuantificación de cit c se hizo mediante análisis densitométrico. Los registros de citometría de flujo que se presentan en forma de gráfica de puntos corresponden a ensayos representativos de experimentos repetidos con muestras diferentes. Los registros de evolución con el tiempo corresponden a la media de al menos tres ensayos independientes representados como porcentaje con respecto a la población estudiada.

RESULTADOS

La incubación de células H9c2 con TG 10 μM o ST 50 nM en medio DMEM causa daño celular que aumenta progresivamente con el tiempo de exposición y que se detecta mediante el ensayo con MTT. Concretamente, TG 10 μM disminuye un 55 % la actividad reductasa mitocondrial a las 2 h de exposición y el daño se acerca al 100 % en ~ 6 h (Fig. 7.1, panel A). El deterioro celular producido por ST 50 nM requiere un período de tiempo más largo ya que la función mitocondrial solo disminuye un 30 % después de 2 h de tratamiento y el efecto máximo requiere prolongar la incubación hasta 8 h (Fig. 7.1, panel B). La ausencia de suero produce un daño despreciable en las células debido a que los tiempos de incubación son cortos (Fig. 7.1).

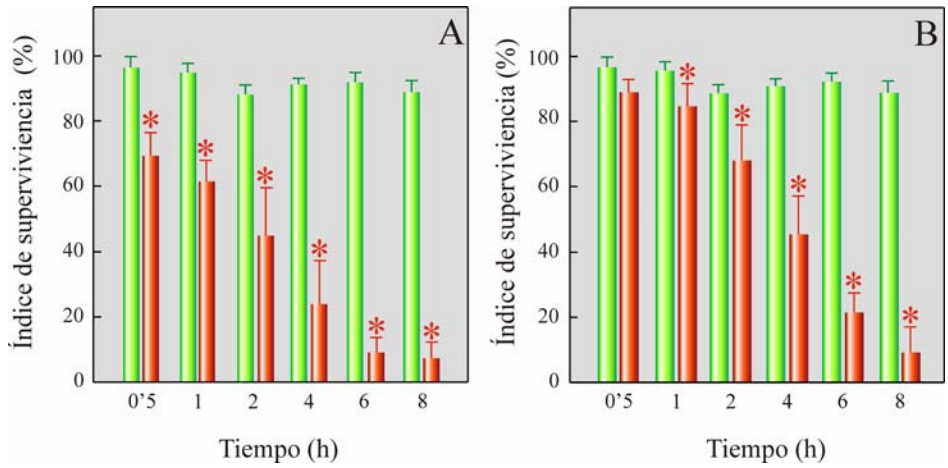


Figura 7.1. Daño mitocondrial causado por TG o ST. Las células en DMEM a 37 ºC se expusieron a TG 10 μM (A) ó ST 50 nM (B). La incubación se prolongó durante los tiempos indicados. Se muestra el comportamiento de células tratadas con TG o ST (*cilindros rojos*) y de células sujetas al mismo procedimiento pero sin TG o ST (*cilindros verdes*). El índice de supervivencia se expresa como porcentaje respecto a células control a tiempo cero. Se indica con (*) cuando la diferencia entre células tratadas y controles es estadísticamente significativa.

El ensayo con MTT solo informa de la pérdida de viabilidad de la población celular como consecuencia del daño mitocondrial. Para desvelar el mecanismo de muerte celular desencadenado por TG o ST se evaluaron distintos parámetros relacionados con apoptosis. La liberación de cit c al citosol es un proceso clave en la ruta mitocondrial de apoptosis. Esta determinación se realizó tras electroforesis y electrotransferencia de las fracciones celulares obtenidas por centrifugación diferencial después de tratar con digitonina. Los resultados indican que cit c solo se localiza en la fracción P-10 de los cultivos sin tratar y está ausente en S-10. Sin embargo, la adición de TG 10 μM provoca la aparición de cit c en la fracción S-10 siendo evidente a partir de 30 min de tratamiento y aumentando con el tiempo (Fig. 7.2). Las membranas de electrotransferencia se sometieron después a un proceso de *stripping* antes de incubarlas con anti-COX IV. La banda correspondiente a COX IV —que se utiliza como marcador mitocondrial— solo aparece en la fracción P-10 confirmando la ausencia de contaminación mitocondrial en la fracción S-10. La carga en cada pocillo se comprobó utilizando anti-γ-tubulina después de someter las membranas a un nuevo proceso *stripping*.

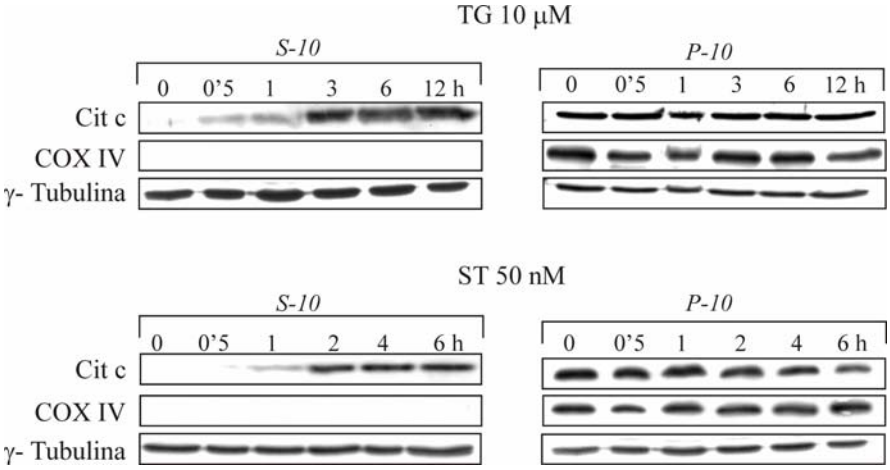


Figura 7.2. Efecto de inductores de daño mitocondrial sobre la liberación de cit c. Muestras de las fracciones S-10 y P-10 se sometieron a electrotransferencia para la detección inmunológica de cit c (p12), COX IV (p19'6) y γ-tubulina (p48). S-10 es el sobrenadante de células tratadas con digitonina y centrifugadas a 10000 ×g durante 10 min. P-10 corresponde a la fracción solubilizada del precipitado que es rica en núcleos y mitocondrias.

La redistribución de cit c desde la mitocondria al citosol también se observa en presencia de ST 50 nM. En este caso, la presencia de cit c en la fracción S-10 es evidente tras 1 h de exposición y también muestra un aumento con el tiempo. El

stripping y posterior tratamiento de las membranas con anti-γ-tubulina revela que la cantidad de muestra cargada en los pocillos es similar.

Otra característica de la ruta mitocondrial de apoptosis es la alteración del $\Delta\Psi_m$ que se puede cuantificar por citometría de flujo usando la sonda fluorescente JC-1 (Cossarizza y otros, 1993; Soler y otros, 2007). La acumulación de JC-1 en las mitocondrias de células vivas produce aumento de fluorescencia roja debido a la formación de agregados.

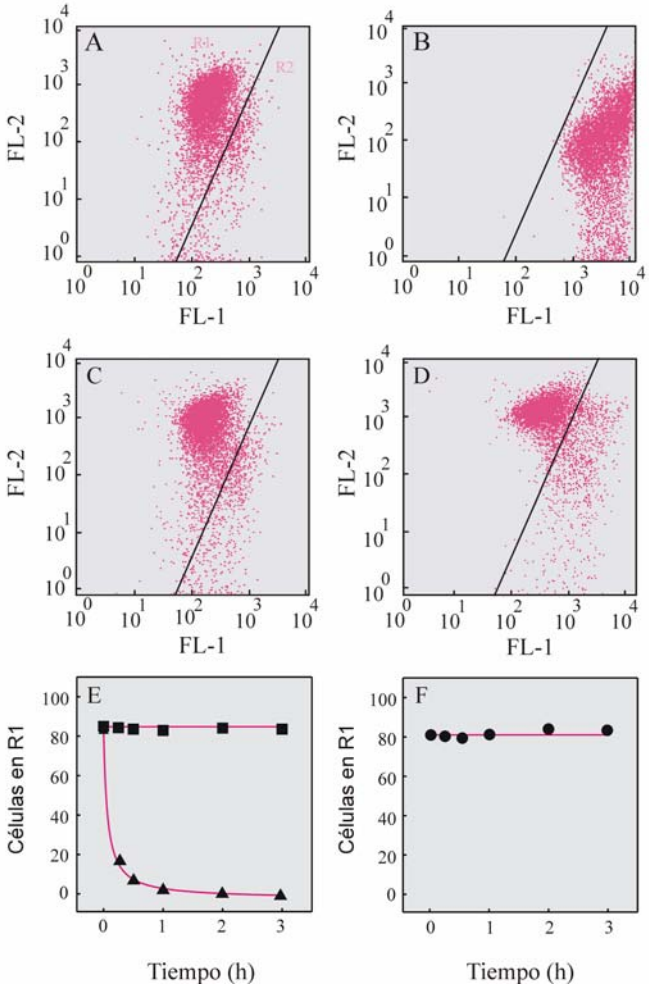


Figura 7.3. Comportamiento del $\Delta\Psi_m$ utilizando JC-1. Células tratadas y sin tratar se cargaron con JC-1 antes de las medidas. La población de células de interés se seleccionó mediante medidas de dispersión frontal y lateral de la luz. Las fluorescencias verde y roja se detectaron en los canales FL-1 y FL-2, respectivamente. (A) Representación de células sin tratar. (B) Representación de células tratadas con TG 10 μM durante 2 h. (C) Representación de células preincubadas con CsA 5 μM durante 10 min antes del tratamiento con TG 10 μM. (D) Representación de células tratadas con ST 50 nM durante 2 h. (E) Evolución del $\Delta\Psi_m$ con el tiempo cuando las células se exponen a TG 10 μM en ausencia (▲) o precedida de preincubación con CsA 5 μM durante 10 min (■). (F) Evolución del $\Delta\Psi_m$ con el tiempo cuando las células se exponen a ST 50 nM.

El descenso del $\Delta\Psi_m$ provoca salida de la sonda dando lugar a la forma monomérica que tiene fluorescencia verde. Los datos obtenidos muestran que la mayoría de células sin tratar cargadas con JC-1 presentan mucha fluorescencia roja y poca fluorescencia verde debido a que las mitocondrias están polarizadas (Fig. 7.3, panel A). Concretamente, el 87'4 % de la población celular está en la región R1 mientras que el 12'6 % está en la región R2. Cuando las células se exponen a TG 10 μM durante 2 h se produce una clara disminución de la fluorescencia roja que va acompañada por un aumento de la fluorescencia verde (Fig. 7.3, panel B). Solo el 0'7 % de la población celular permanece en la región R1 después del tratamiento con TG mientras que el 99'3 % se localiza en la región R2. La preincubación de células con CsA 5 μM durante 10 min, antes de añadir TG 10 μM, produce un claro efecto protector ya que la mayoría de células mantienen una señal elevada de fluorescencia roja (Fig. 7.3, panel C).

En estas condiciones, el 84'1 % de la población celular permanece en la región R1 frente al 15'9 % que aparece en la región R2. Experimentos análogos se realizaron para evaluar el efecto de ST sobre el $\Delta\Psi_m$. La incubación de células con ST 50 nM durante 2 h muestra una distribución de las señales fluorescentes de JC-1 (Fig. 7.3, panel D) muy similar a la de células sin tratar (Fig. 7.3, panel A).

El estudio de la evolución temporal de la fluorescencia de JC-1 proporciona una información más completa. Esto permite conocer que la adición de TG 10 μM provoca una caída inmediata del $\Delta\Psi_m$ que puede evitarse si se preincuban las células con CsA (Fig. 7.3, panel E). La situación es diferente en el caso de ST, ya que la adición de ST 50 nM no altera el $\Delta\Psi_m$, al menos durante las primeras 3 h de exposición (Fig. 7.3, panel F).

Bax es un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2 que está directamente involucrado en permeabilización de la MEM y liberación de proteínas apoptóticas (Jürgensmeier y otros, 1998; Eskes y otros, 1998). La detección de Bax después de la separación y electrotransferencia de proteínas se estudió en la fracción P-10 —que contiene mitocondrias— utilizando el anticuerpo monoclonal 6A7 (Tikhomirov y Carpenter, 2005). La detección inmunológica de γ-tubulina se utilizó como control de carga para garantizar que las muestras que se comparan tienen cantidades similares de proteína. La proteína Bax no se detecta en la fracción P-10 de células sin tratar pero su acumulación es evidente después de añadir TG 10 μM (Fig. 7.4, panel A). La banda inmunoreactiva de Bax es visible a los 30 min y se puede observar incluso después de 12 h de tratamiento. La incubación de células

con ST 50 nM también provoca translocación de Bax a la mitocondria. La aparición de Bax en la fracción P-10 se observa a los de 30 min de exposición (Fig. 7.4, panel B).

Para identificar el origen del Bax que se incorpora a la mitocondria se procedió a incubar células con TG 3 ó 10 μM durante diferentes períodos de tiempo y comparar las cantidades de Bax que se acumulan en la fracción P-10. En este caso, las muestras de ambos tratamientos se procesaron al mismo tiempo y las cantidades de muestras cargadas en las calles del gel fueron similares para poder comparar los resultados. Tal como se observa, la intensidad de la banda inmunorreactiva de Bax en la fracción P-10 cuando se añade TG 3 μM a las células es muy similar a la que se ve cuando se añade TG 10 μM (Fig. 7.4, panel C).

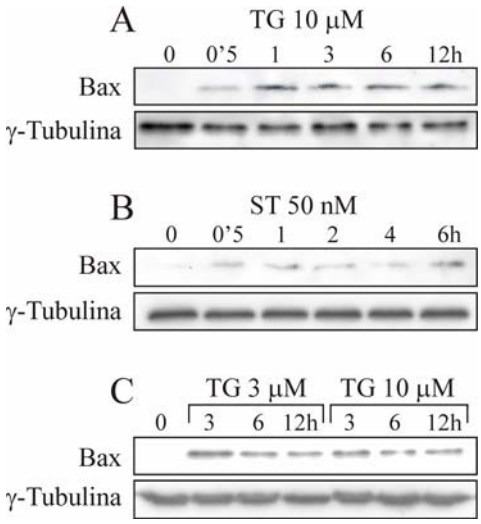


Figura 7.4. . Efecto del daño mitocondrial sobre translocación de Bax a la mitocondria. Alícuotas de la fracción P-10 con cantidades equivalentes de proteína se sometieron a separación y electrotransferencia para detectar Bax (p21). (A) Efecto de TG 10 μM. (B) Efecto de ST 50 nM. (C) Efecto comparativo de TG 3 ó 10 μM. γ-Tubulina (p48) se utilizó como control de carga.

Cit c es un transportador inocuo de electrones cuando está en la mitocondria pero es un componente del apoptosoma que está implicado en la activación de casp 9 cuando se libera al citosol (Li y otros, 1997). Los siguientes experimentos se diseñaron para estudiar el efecto de los inductores de daño mitocondrial sobre la activación de caspasas. Casp 9 se sintetiza como precursor inactivo denominado procasp 9 que sufre hidrólisis selectiva para tener actividad. El primer corte se produce a continuación de Asp315 y genera el fragmento p35 que a su vez activa a casp 3. Casp 3 puede entonces cortar a procasp 9 después de Asp330 para generar el fragmento p37 (Chandra y Tang, 2003).

La adición de TG 10 μM estimula el procesamiento de procasp 9 que se detecta en la fracción S-10 por la acumulación de los fragmentos p35 y p37 (Fig. 7.5). ST 50 nM también produce la aparición de los fragmentos activos de casp 9.

Por su parte, procasp 3 sufre procesamiento inicial a continuación de Asp175 generando la subunidad mayor con el prodominio N- terminal (p24) y la subunidad menor (p12). Otro corte después de Asp9 que está en el fragmento grande genera p20 que a su vez puede sufrir procesamiento a la altura de Asp28 para producir la acumulación del fragmento p17 (Chandra y Tang, 2003). La adición de TG 10 μM induce la activación de casp 3 que se detecta por la presencia de p17 en la fracción S-10. La acumulación de p17 es evidente a las 3 h de tratamiento (Fig. 7.5). Experimentos análogos realizados en presencia de ST 50 nM proporcionan resultados similares. En este caso, el fragmento p17 se detecta a las 2 h de tratamiento.

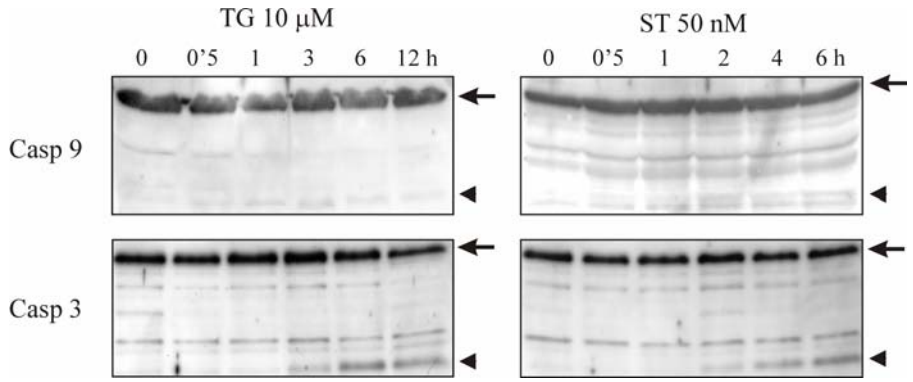


Figura 7.5. Efecto de inductores de daño mitocondrial sobre la activación de casp 9 y casp 3. La activación de caspasas se estudió en la fracción S-10 mediante electrotransferencia e inmunodetección. Las formas inactivas de casp 9 (p46) y casp 3 (p32) aparecen marcadas con flechas. Los fragmentos de casp 9 (p37/p35) y casp 3 (p17) se indican mediante puntas de flecha.

Los datos mostrados hasta ahora indican que TG 10 μM y ST 50 nM inducen liberación de cit c de la mitocondria y activación de casp 9 y casp 3. Los siguientes experimentos tratan de analizar los mecanismos de liberación de cit c y activación de casp 3 inducidos por daño mitocondrial. Para ello utilizamos CsA —bloqueador de la apertura del PTP mitocondrial— y el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk. Como se ha visto antes, la incubación de células con TG 10 μM durante 6 h induce acumulación de cit c en la fracción S-10 (Fig. 7.6, véase también Fig. 7.2). Sin embargo, cuando las células se preincuban con CsA 5 μM durante 10 min antes

de la exposición a TG 10 μM se reduce considerablemente la acumulación de cit c aunque no se elimina del todo. También se ve que la preincubación de células con z-VAD-fmk 20 μM durante 1 h resulta ineficaz para prevenir la liberación de cit c inducida por TG. Si solo se preincuban células con CsA no se produce respuesta alguna. Experimentos análogos realizados para estudiar la activación de casp 3 muestran acumulación del fragmento p17 en la fracción S-10 cuando el tratamiento con TG 10 μM se prolongan durante 6 h (Fig. 7.6, véase también Fig. 7.5). Es interesante señalar que la activación de casp 3 inducida por TG se produce incluso cuando las células se preincuban con CsA 5 μM durante 10 min. En cambio, la activación de casp 3 es inhibida de forma drástica cuando las células se preincuban con z-VAD-fmk 20 μM durante 1 h. La adición de CsA 5 μM sobre células sin tratar no produce activación de casp 3.

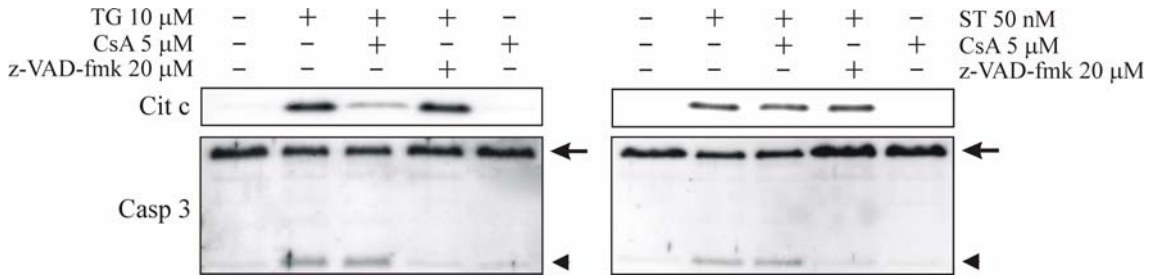


Figura 7.6. Comportamiento de mediadores apoptóticos sometidos a daño mitocondrial. Los paneles de la izquierda muestran detección de cit c y casp 3 en la fracción S-10 de células: sin tratar; incubadas con TG 10 μM durante 6 h; preincubadas con CsA 5 μM durante 10 min antes del tratamiento con TG 10 μM o preincubadas con z-VAD-fmk 20 μM durante 1 h antes del tratamiento con TG 10 μM. Los paneles de la derecha muestran detección de cit c y casp 3 en la fracción S-10 de células tratadas con ST 50 nM durante 6 h de forma análoga a la descrita para TG. La forma inactiva de casp 3 (p32) aparece indicada con una flecha, el fragmento (p17) se indica con una punta de flecha.

La incubación de células con ST 50 nM durante 6 h también produce la acumulación de cit c en la fracción S-10. En este caso, la preincubación de células con CsA 5 μM durante 10 min o con z-VAD-fmk 20 μM durante 1 h no altera la liberación de cit c. Por otra parte, el tratamiento con ST induce la activación de casp 3 que no se afecta por preincubación con CsA pero sí es inhibida por preincubación con z-VAD-fmk.

Estudios comparativos indican que la acumulación de cit c en la fracción S-10 evaluada a diferentes intervalos de tiempo cuando se hace un tratamiento con TG

10 μM es similar a la que se observa al tratar con ST 50 nM (Fig. 7.7, paneles A y B). Sin embargo, la acumulación de cit c provocada por TG 3 μM es considerablemente menor que la provocada por TG 10 μM (Fig. 7.7, paneles C y D). Un resultado interesante es que la acumulación de cit c en el citosol inducida por TG 3 μM es similar a la que induce TG 10 μM si las células se preincuban con CsA 5 μM durante 10 min (Fig. 7.7, paneles E y F).

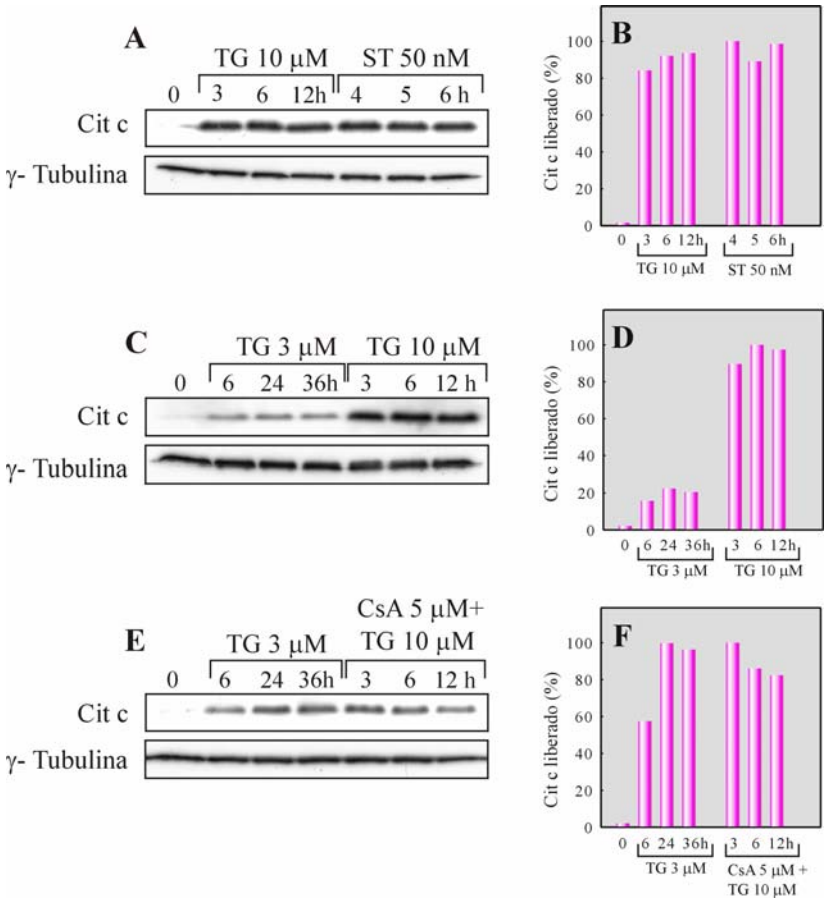


Figura 7.7. Valoración de cit c en células sometidas a diferentes tratamientos. Cit c se detectó en la fracción S-10 de células sometidas a diferentes tratamientos. Efecto producido por TG 10 μM y ST 50 nM (*A* y *B*). Efecto producido por TG 3 μM y TG 10 μM (*C* y *D*). Efecto producido por TG 3 μM y TG 10 μM cuando este último tratamiento está precedido por preincubación con CsA 5 μM durante 10 min (*E* y *F*). La proteína γ-tubulina se utilizó como control de carga. La cuantificación de cit c se hizo por densitometría (*B*, *D* y *F*). Los niveles de cit c se presentan corregidos respecto al contenido en γ-tubulina y se expresan en escala relativa.

Casp 8 es la caspasa iniciadora en la ruta de los receptores de muerte pero también participa en la fase de ejecución (Tang y otros, 2000). El procesamiento de procasp 8 comienza con la formación de los fragmentos p43 y p10. El fragmento

p43 sufre un procesamiento posterior que conduce a la acumulación de p25 y p18. Los experimentos se realizaron utilizando la fracción S-10 y un anticuerpo que reconoce a procasp 8 (p55) y al fragmento p25. Las células sin tratar tienen presencia de casp 8 en su forma inactiva (p55). La exposición de células a TG 10 μM da lugar a la activación y consiguiente acumulación del fragmento p25 en un proceso dependiente del tiempo (Fig. 7.8, panel superior izquierdo). El tratamiento con ST 50 nM produce un comportamiento similar (Fig. 7.8, panel superior derecho). También se realizaron experimentos en presencia del inhibidor general de caspasas para conocer el origen de la activación de casp 8. Como se acaba de ver, el fragmento p25 de casp 8 no está presente en la fracción S-10 cuando las muestras están sin tratar y la incubación de células con TG 10 μM durante 6 h provoca la acumulación de p25 (Fig. 7.8, panel inferior izquierdo). Lo que ahora se muestra es que la acumulación de p25 se elimina cuando las células se preincuban con z-VAD-fmk 20 μM durante 1 h antes de la exposición a TG 10 μM. Resultados similares se obtuvieron al utilizar ST. El tratamiento con ST 50 nM durante 6 h produce la activación de casp 8, proceso que se bloquea cuando las células se preincuban con z-VAD-fmk 20 μM durante 1 h (Fig. 7.8, panel inferior derecho).

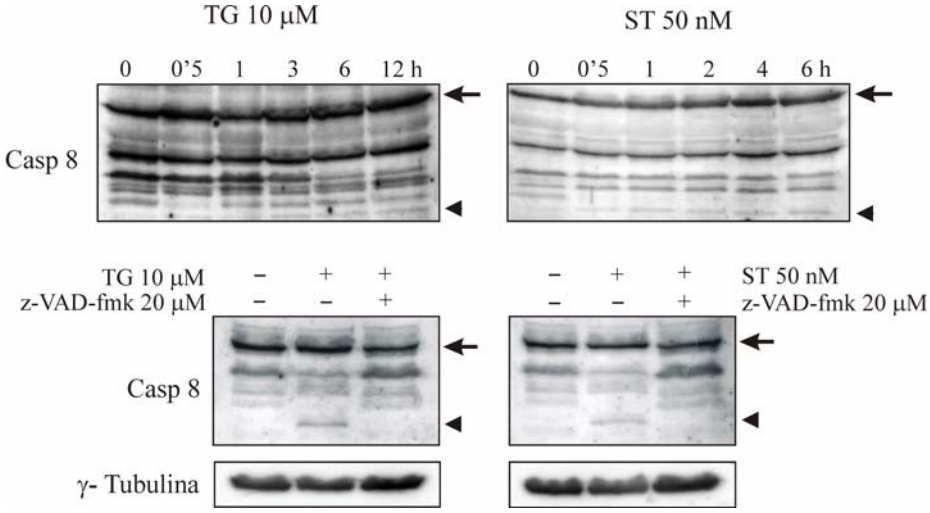


Figura 7.8. Efecto de inductores de daño mitocondrial sobre la activación de casp 8 y dependencia de la activación. Los paneles superiores muestran perfiles de activación de casp 8 al exponer las células a TG 10 μM o ST 50 nM. Células tratadas y sin tratar se procesaron para obtener la fracción S-10. Procasp 8 (p55) se indica con una flecha mientras que el fragmento activo p25 se indica con una punta de flecha. El panel inferior izquierdo muestra la detección de casp 8 en la fracción S-10 de células: sin tratar; tratadas con TG 10 μM durante 6 h o preincubadas con z-VAD-fmk 20 μM durante 1 h antes del tratamiento con TG 10 μM. El panel inferior derecho muestra el efecto de ST 50 nM durante 6 h cuando se aplican tratamientos similares a los descritos para TG. γ-Tubulina (p48) sirvió como control de carga.

Al tomar imágenes mediante contraste de fase antes y después de inducir daño mitocondrial se observa que la morfología de las células está claramente alterada a los 30 min de exposición a ST 50 nM cosa que no ocurre cuando el tratamiento se hace con TG 10 μM (Fig. 7.9, primera fila).

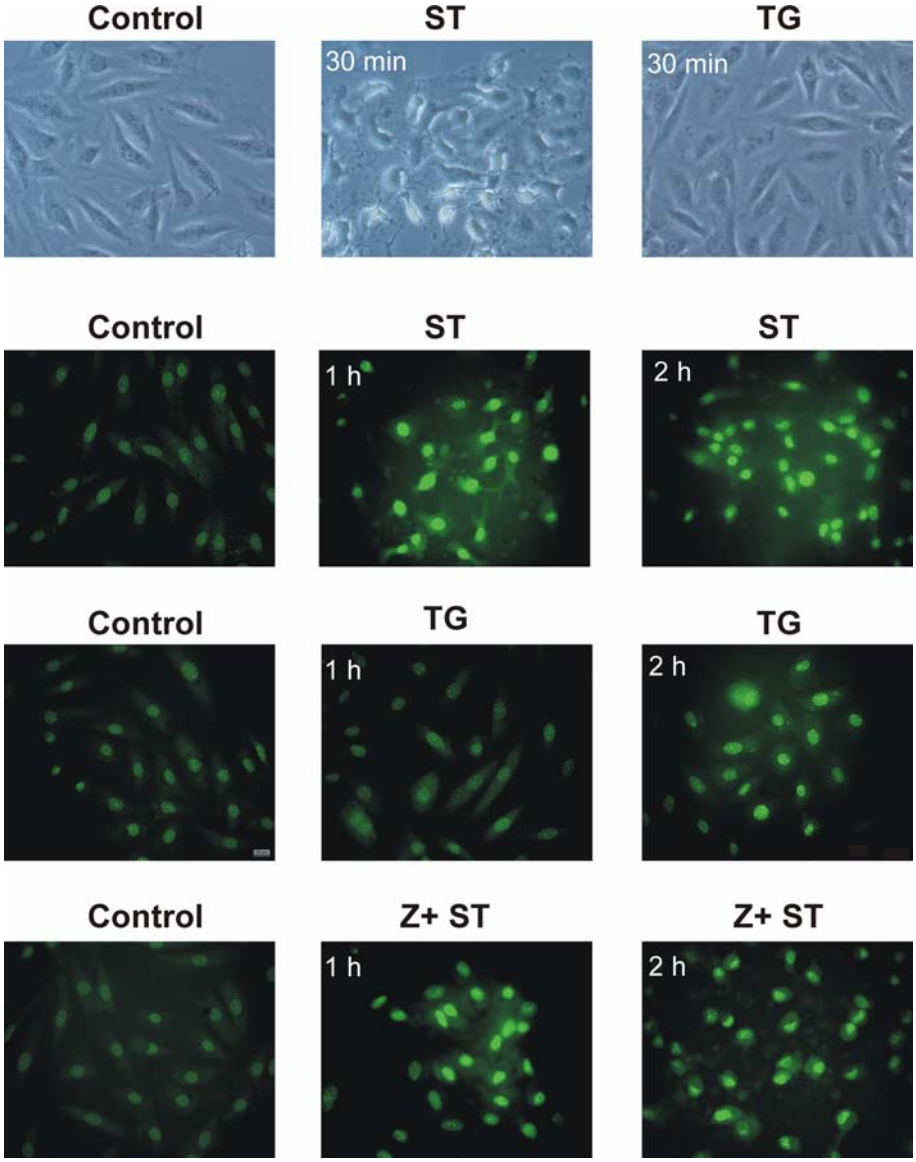


Figura 7.9. Efectos morfológicos en células expuestas a daño mitocondrial. Imágenes de contraste de fase de células sin tratar o expuestas a ST 50 nM ó TG 10 μM durante 30 min (*primera fila*). Imágenes de fluorescencia en presencia de AO antes y después de los siguientes tratamientos: células incubadas con ST 50 nM durante 1 ó 2 h (*segunda fila*), células incubadas con TG 10 μM durante 1 ó 2 h (*tercera fila*), células preincubadas con z-VAD-fmk 20 μM (Z) durante 1 h antes del tratamiento con ST 50 nM durante 1 ó 2 h (*cuarta fila*).

Para que TG 10 μM afecte a la morfología celular se requiere al menos 2 h de exposición (dato no mostrado). La microscopía de fluorescencia en presencia del fluorocromo AO revela que el tratamiento con ST 50 nM durante 1 h es suficiente para provocar condensación nuclear (Fig. 7.9, segunda fila). La condensación de cromatina va acompañada de una clara disminución del número de células adheridas cuando la exposición a ST se prolonga durante 2 h (Fig. 7.9, segunda fila). Sin embargo, la incubación de células con TG 10 μM durante 1 h no altera la morfología fusiforme ni el aspecto de la cromatina. Hay que prolongar el tratamiento con TG 10 μM hasta 2 h para observar el cambio a una morfología celular más redondeada y condensación de cromatina (Fig. 7.9, tercera fila). Con el fin de establecer si la condensación de cromatina inducida por ST 50 nM —que se produce antes que en presencia de TG 10 μM— es dependiente de la activación de caspasas se repitió el tratamiento pero en presencia de inhibidor. La preincubación de células con z-VAD-fmk 20 μM durante 1 h antes de exponerlas a ST 50 nM durante 1 ó 2 h, es claramente incapaz de impedir la condensación de cromatina (Fig. 7.9, última fila).

DISCUSIÓN

Cuando el daño mitocondrial se evalúa mediante el ensayo con MTT se observa que tanto TG 10 μM como ST 50 nM producen un deterioro rápido de las células (Fig. 7.1). El efecto que ejercen estos compuestos sobre las mitocondria se corresponde con una pronta liberación de cit c (Fig. 7.2).

Diversos estudios asocian el daño mitocondrial con acumulación de cit c en el citosol y colapso del $\Delta\Psi_m$ aunque la relación entre estos dos parámetros es todavía motivo de controversia. Por ejemplo, el daño mitocondrial provocado por ST 1 μM en linfoblastos T humanos origina liberación de cit c sin que se produzca alteración del $\Delta\Psi_m$ (Bossy-Wetzel y otros, 1998). Sin embargo, el tratamiento de células de feocromocitoma-6 de rata con ST 5 μM provoca liberación de cit c como consecuencia de un rápido descenso del $\Delta\Psi_m$ (Heiskanen y otros, 1999). Nuestros datos indican que la liberación de cit c inducida por TG 10 μM (Fig. 7.2) está asociada a una caída rápida del $\Delta\Psi_m$ (Fig. 7.3, panel E) mientras que la liberación inducida por ST 50 nM se produce sin alteración del $\Delta\Psi_m$ (compárese Figs. 7.2 y 7.3, panel F). Podemos concluir que TG y ST, actuando sobre el mismo modelo celular, producen liberación de cit c a través de mecanismos diferentes. Debemos también destacar que diferentes concentraciones del mismo agente inductor de

apoptosis, actuando sobre el mismo modelo celular, pueden dar lugar a respuestas diferentes. Un ejemplo es la liberación de cit c inducida por TG 10 μM que se asocia con una caída rápida del $\Delta\Psi_m$ (Figs. 7.2 y 7.3) mientras que la liberación de cit c inducida por TG 3 μM se produce sin que se altere el $\Delta\Psi_m$ (Soler y otros, 2007).

La cantidad de cit c que se libera al tratar con TG 10 μM es mayor que la que se libera al tratar con TG 3 μM (Fig. 7.7, paneles C y D). Sin embargo, la preincubación de células con CsA antes del tratamiento con TG 10 μM hace que la cantidad de cit c que se libera coincida con la que induce TG 3 μM (Fig. 7.7, paneles E y F). Este resultado prueba que la liberación de cit c inducida por TG 10 μM es en gran medida —aunque no totalmente— sensible a CsA (Figs. 7.6 y 7.7). Por tanto, la mayor parte del cit c que se libera al tratar con TG 10 μM es sensible a CsA y puede atribuirse a la apertura irreversible del PTP mitocondrial y al colapso del $\Delta\Psi_m$. El componente menor es insensible a CsA (Fig. 7.7, paneles E y F) y corresponde al cit c que se libera en ausencia de despolarización de la mitocondria (Soler y otros, 2007). Hay que tener en cuenta que TG 10 μM tiene un efecto rápido y directo sobre la mitocondria que se superpone con otro efecto más lento e indirecto que actúa a través del RSE y que se puede evaluar utilizando una concentración baja de TG como es 3 μM (Soler y otros, 2007). Por el contrario, la liberación de cit c mitocondrial que induce ST 50 nM es totalmente insensible a CsA (Fig. 7.6).

El tratamiento de células con TG 10 μM produce niveles de Bax en la fracción P-10 similares a los que se obtienen al tratar con TG 3 μM (Fig. 7.4, panel C). Este resultado indica que TG 10 μM no induce una mayor traslocación de Bax a la mitocondria que la producida por TG 3 μM. Por tanto, podemos afirmar que la liberación de cit c inducida por TG 10 μM (Fig. 7.2) está relacionada con el descenso rápido del $\Delta\Psi_m$ que se observa (Fig. 7.3, panel E) y ocurre sin la participación de Bax. Sin embargo, la liberación de cit c causada por ST 50 nM está inducida por Bax que produce permeabilización de la MEM sin ocasionar despolarización de la mitocondria (Fig. 7.3, panel F).

La acumulación de cit c en el citosol inducida por TG 10 μM es similar a la que induce ST 50 nM (Fig. 7.7, paneles A y B). Este resultado sugiere que la apertura del PTP mitocondrial asociada a la caída rápida del $\Delta\Psi_m$ no libera más cit c que la permeabilización selectiva de la MEM que lleva a cabo Bax.

Los datos de daño mitocondrial y activación de caspasas con el tiempo ponen de manifiesto que la pérdida de la función mitocondrial es anterior a la activación proteolítica de caspasas. De hecho, la liberación de cit c inducida por TG 10 μM o ST 50 nM no se inhibe por el inhibidor general de caspasas lo que indica que se produce en una etapa anterior al procesamiento de caspasas (Fig. 7.6). En relación con esto, la activación de casp 9, casp 3 y casp 8 se observa después de iniciar el tratamiento con TG o ST (Figs. 7.5 y 7.8) como es de esperar cuando se activa la ruta mitocondrial de apoptosis (Slee y otros, 1999). Curiosamente, la activación de casp 8 queda bloqueada cuando las células se preincuban con z-VAD-fmk. Esto confirma que casp 8 no es caspasa iniciadora sino componente del bucle de amplificación de la fase ejecutora de la apoptosis (Slee y otros, 2000; Tang y otros, 2000; von Haefen y otros, 2003).

La alteración funcional de la mitocondria se produce antes en presencia de TG 10 μM que en presencia de ST 50 nM (Fig. 7.1). Este resultado se explica porque la liberación de cit c inducida por TG 10 μM se produce antes que la inducida por ST 50 nM (Fig. 7.2). Sin embargo, la situación es diferente si comparamos parámetros morfológicos de la célula. En este caso, la alteración morfológica inducida por ST 50 nM se produce antes que la inducida por TG 10 μM (Fig. 7.9, primera fila). Esto explica la imposibilidad de detectar proteínas mediante técnica inmunológica cuando las células se exponen a ST 50 nM durante más de 6 h cosa que no ocurre cuando se tratan con TG 10 μM donde es posible detectar proteínas incluso después de 12 h de tratamiento. De igual forma, la condensación de cromatina y el despegue de las células se observa antes con ST 50 nM (Fig. 7.9, segunda fila) que con TG 10 μM (Fig. 7.9, tercera fila) y además la preincubación de células con z-VAD-fmk no impide la condensación de cromatina cuando se hace el tratamiento con ST 50 nM (Fig. 7.9, cuarta fila). Esto pone de relieve que ST pone en marcha un programa de muerte celular alternativo, muy activo y que es independiente de caspasas (Déas y otros, 1998; Belmokhtar y otros, 2001).

En definitiva, la alteración de la función mitocondrial está directamente relacionada con la cinética de liberación de cit c proceso que puede o no estar asociado a un descenso del $\Delta\Psi_m$. Sin embargo, el hecho de que TG 10 μM provoque la alteración funcional de la mitocondria antes que ST 50 nM no significa que las alteraciones morfológicas de la célula también ocurran antes en presencia de TG. La falta de correlación entre parámetros bioquímicos de la apoptosis y cambios

estructurales de la célula es un hecho que puede darse y está descrito en la bibliografía (Galluzzi y otros, 2007). Esta situación es compatible con la existencia de vías alternativas y mecanismos de compensación que permiten garantizar la ejecución del proceso de muerte celular.

8

Resumen y conclusiones ....

Fog and Trees at Wunder Lich. Bill Atkinson

Los resultados descritos en los capítulos precedentes de esta memoria se presentan aquí de forma resumida junto con las conclusiones que de ellos se derivan.

Capítulo 3

- La proteína SERCA en su estado nativo o después de purificarla hidroliza ATP en ausencia de Ca^{2+}.
- La actividad ATPasa en ausencia de Ca^{2+} muestra dependencia hiperbólica respecto a la concentración de ATP a diferencia de la actividad dependiente de Ca^{2+} que es sigmoidal.
- Vanadato no inhibe la hidrólisis del sustrato ATP-Mg^{2+} en ausencia de Ca^{2+}.
- Análogos no hidrolizables de ATP no inhiben la actividad hidrolítica en ausencia de Ca^{2+} cuando el sustrato es pNPP.
- Mg^{2+} aumenta la afinidad de unión de ATP a la enzima mientras que vanadato disminuye la afinidad de unión de ATP.
- La unión de ATP a la conformación E_2 de SERCA deja al fosfato terminal lejos del sitio de fosforilación de la proteína.

La Ca^{2+}-ATPasa de RS puede hidrolizar ATP a través de una ruta alternativa en la que solo intervienen conformaciones de la proteína que no unen Ca^{2+}. El mecanismo molecular de esta actividad hidrolítica implica un cambio conformacional inducido por ATP que produce aproximación de los dominios citosólicos.

Capítulo 4

- Las células H9c2 disponen de depósitos intracelulares de Ca^{2+} que son sensibles a la hormona VP y al inhibidor de SERCA TG.
- VP produce un aumento transitorio del Ca^{2+} citosólico que depende de la concentración usada.
- TG produce una elevación de Ca^{2+} citosólico que es de menor intensidad pero más prolongada en el tiempo.
- La adición de un ionóforo de H^+ provoca aumento del Ca^{2+} citosólico que está asociado con despolarización de la MIM.

- El depósito de Ca^{2+} sensible a TG también lo es a IO mientras que el depósito sensible al ionóforo de H^{+} no es sensible a IO.
- La señal de Ca^{2+} en el citosol inducida por VP da lugar a un aumento transitorio del Ca^{2+} mitocondrial que no se altera por la presencia de CsA.
- La señal de Ca^{2+} citosólico que induce TG da lugar a un aumento transitorio del Ca^{2+} mitocondrial que se inhibe por CsA.

El uso de indicadores fluorescentes y compuestos que movilizan Ca^{2+} permite caracterizar flujos y depósitos intracelulares de Ca^{2+} que están implicados en la generación de señales intracelulares de Ca^{2+} en células H9c2. La mitocondria es capaz de interpretar señales citosólicas de Ca^{2+} que se generan en el RSE.

Capítulo 5

- TG 10 μM induce un aumento de la concentración de Ca^{2+} en el citosol que consta de dos componentes.
- El primer componente coincide con la salida de Ca^{2+} desde el RSE.
- El segundo componente corresponde a la salida de Ca^{2+} desde la mitocondria y su aparición está relacionada con la apertura del PTP mitocondrial.
- TG induce muerte celular por apoptosis caracterizada por fragmentación y condensación de cromatina, pérdida de material genético y fragmentación de PARP.
- La muerte celular por apoptosis se produce antes cuando se induce con TG 10 μM que cuando se induce con TG 3 μM.

El efecto apoptótico que se observa en presencia de TG es dependiente de la concentración usada. La muerte celular se produce antes cuando TG provoca apertura del PTP mitocondrial.

Capítulo 6

- La salida de cit c inducida por TG 3 μM o TM 1 μg/ml se produce sin que se afecte el $\Delta\Psi_m$ y antes de la activación de caspasas.
- La salida de cit c es simultánea con la translocación de Bax a la mitocondria o se produce inmediatamente después.
- La activación de casp 3 se bloquea al preincubar las células con un inhibidor selectivo de casp 9 o de casp 8.
- La activación de casp 8 se bloquea cuando las células se preincuban con un inhibidor de casp 9.
- La preincubación de células con z-VAD-fmk no protege de la muerte celular.

TG 3 μM ó TM 1 μg/ml provocan estrés irreversible en el RSE de células H9c2. El daño producido en el RSE activa la ruta apoptótica mitocondrial con participación de casp 8 en un lazo que amplifica la cascada degradativa de las caspasas. Las células disponen de mecanismos alternativos de muerte celular en los que no participan caspasas.

Capítulo 7

- La salida de cit c inducida por TG 10 μM está asociada a la caída del $\Delta\Psi_m$.
- La salida de cit c inducida por ST 50 nM se debe a la activación de Bax y se produce sin que se altere el $\Delta\Psi_m$.
- La liberación de cit c produce alteración funcional de la mitocondria y se produce antes en presencia de TG 10 μM.
- La liberación de cit c, en ambos casos, es de la misma magnitud.
- La liberación de cit c tiene lugar antes que la activación de casp 9, casp 3 y el bucle de amplificación mediado por casp 8.
- La alteración morfológica de la célula y la condensación de cromatina se observa antes en presencia de ST 50 nM que en presencia de TG 10 μM.
- El inhibidor general de caspasas no impide la pronta condensación de cromatina que induce ST 50 nM.

TG 10 μM ó ST 50 nM afectan directamente la función mitocondrial aunque lo hacen a través de mecanismos distintos. La cantidad de cit c que se libera de la mitocondria no depende del mecanismo de salida. La alteración funcional de la mitocondria no siempre se produce antes que las alteraciones morfológicas de la célula y el material genético. Esta situación se produce cuando se activan programas de muerte celular en los que no intervienen caspasas.

Bibliografía ....

Northern Lights. Jorma Luhta

Adams J.M. y Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem. Sci. 26 (2001), 61-66.*

Allen D.G. y Blinks J.R. Calcium transients in aequorin-injected frog cardiac muscle. *Nature 273 (1978), 509-513.*

Altschuld R.A., Hohl C.M., Castillo L.C., Garles A.A., Starling R.C. y Brierley G.P. Cyclosporin inhibits mitochondrial calcium efflux in isolated adult rat ventricular cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. 262 (1992), H1699-H1704.*

Antonsson B. y Martinou J.C. The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res. 256 (2000), 50-57.*

Antonsson B., Montessuit S., Sanchez B. y Martinou J.C. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J. Biol. Chem. 276 (2001), 11615-11623.*

Ashkenazi A. y Dixit V.M. Death receptors: Signaling and modulation. *Science 281 (1998), 1305–1308.*

Atlante A., Calissano P., Bobba A., Azzariti A., Marra E. y Passarella S. Cytochrome c is released from mitochondria in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion and can operate as a ROS scavenger and as a respiratory substrate in cerebellar neurons undergoing excitotoxic death. *J. Biol. Chem. 275 (2000), 37159-37166.*

Babcock D.F., Herrington J., Goodwin P.C., Park Y.B. y Hille B. Mitochondrial participation in the intracellular Ca^{2+} network. *J. Cell Biol. 136 (1997), 833-844.*

Bandala E., Espinosa M., Maldonado V. y Melendez-Zajgla J. Inhibitor of apoptosis-1 (IAP-1) expression and apoptosis in non-small-cell lung cancer cells exposed to gemcitabine. *Biochem. Pharmacol. 62 (2001), 13-19.*

Bao Q. y Shi Y. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ. 14 (2007), 56-65.*

Belmokhtar C.A., Hillion J. y Ségal Bendirdjian E. Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene 20 (2001), 3354-3362.*

Bernardi P., Scorrano L., Colonna R., Petronilli V. y Di Lisa F. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur. J. Biochem. 264 (1999), 687-701.*

Berridge MJ. Neuronal calcium signaling. *Neuron 21 (1998), 13-26.*

Berridge M.J. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signalling organelle. *Cell Calcium 32 (2002), 235-249.*

Berridge M.J. Cardiac calcium signalling. *Biochem. Soc. Trans. 31 (2003), 930-933.*

Berridge M.J., Bootman M.D. y Lipp P. A life and death signal. *Nature 395 (1998), 645-648.*

Berridge M.J., Bootman M.D. y Roderick H.L. Calcium signalling: dynamic, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4 (2003), 517-529.*

Blinks J.R., Wier W.G., Hess P. y Prendergast F.G. Measurement of Ca^{2+} concentrations in living cells. *Prog. Biophys. Mol. Biol. 40 (1982), 1-114.*

Block B.A., O'Brien J. y Meissner G. Characterization of the sarcoplasmic reticulum proteins in the thermogenic muscles of fish. *J. Cell Biol. 127 (1994), 1275-1287.*

Boatright K.M. y Salvesen G.S. Mechanisms of caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol. 15 (2003), 725-731.*

Boitano S., Dirksen E.R. y Sanderson M.J. Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate. *Science 258 (1992), 292-295.*

Bootman M.D. y Berridge M.J. The elemental principles of calcium signalling. *Cell 83 (1995), 675-678.*

Bootman M.D., Lipp P. y Berridge M.J. The organisation and functions of local Ca^{2+} signals. *J. Cell Sci. 114 (2001), 2213-2222.*

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

Breckenridge D.G., Stojanovic M., Marcellus R.C. y Shore G.C. Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J. Cell Biol. 160 (2003), 1115-1127.*

Bree R.T., Stenson-Cox C., Grealy M., Byrnes L., Gorman A.M. y Samali A. Cellular longevity: role of apoptosis and replicative senescence. *Biogerontology 3 (2002), 195-206.*

Broekemeier K.M., Dempsey M.E. y Pfeiffer D.R. Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J. Biol. Chem. 264 (1989), 7826-7830.*

Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J. Cell. Mol. Med. 7 (2003), 249-257.*

Carvalho-Alves P.C. y Scofano H.M. The hydrolytic cycle of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase in the absence of calcium. *J. Biol. Chem. 262 (1987), 6610-6614.*

Chae H.J., Kim H.R., Xu C., Bailly-Maitre B., Krajewska M., Krajewski S., Banares S., Cui J., Digicaylioglu M., Ke N., Kitada S., Monosov E., Thomas M., Kress C.L., Babendure J.R., Tsien R.Y., Lipton S.A. y Reed J.C. BI-1 regulates an apoptosis pathway linked to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell 15 (2004), 355-366.*

Chai J., Du C., Wu J.W., Kyin S., Wang X. y Shi Y. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature 406 (2000), 855-862.*

Champeil P. y Guillain F. Rapid filtration study of the phosphorylation-dependent dissociation of calcium from transport sites of purified sarcoplasmic reticulum ATPase and ATP modulation of the catalytic cycle. *Biochemistry 25 (1986), 7623-7633.*

Chan DC. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell 125 (2006), 1241-1252.*

Chan S.L. y Mattson M.P. Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J. Neurosci. Res. 58 (1999), 167-190.*

Chandra D. y Tang D.G. Mitochondrially localized active caspase-9 and caspase-3 result mostly from translocation from the cytosol and partly from caspase-mediated activation in the organelle. *J. Biol. Chem. 278 (2003), 17408-17420.*

Chen L., Willis S.N., Wei A., Smith B.J., Fletcher J.I., Hinds M.G., Colman P.M., Day C.L., Adams J.M. y Huang D.C. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol. Cell 17 (2005), 393-403.*

Chen W.-C. y Chen C.-C. Signal transduction of arginine vasopressin-induced arachidonic acid release in H9c2 cardiac myoblasts: role of Ca^{2+} and the protein kinase C-dependent activation of p42 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology 140 (1999), 1639-1648.*

Cheng H., Lederer W.J. y Cannell M.B. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science 262 (1993), 740-744.*

Cheng W., Kajstura J., Nitahara J.A., Li B., Reiss K., Liu Y., Clark W.A., Krajewski S., Reed J.C., Olivetti G. y Anversa P. Programmed myocyte cell death affects the viable myocardium after infarction in rats. *Exp. Cell Res. 226 (1996), 316-327.*

Chinet A., Decrouy A. y Even P.C. Ca^{2+}-dependent heat production under basal and near-basal conditions in the mouse soleus muscle. *J. Physiol. 455 (1992), 663-678.*

Clapham D.E. Calcium signalling. *Cell 80 (1995), 259-2268.*

Collins T.J., Lipp P., Berrigge M.J. y Bootman M.D. Mitochondrial Ca^{2+} uptake depends on the spatial and temporal profile of cytosolic Ca^{2+} signals. *J. Biol. Chem. 276 (2001), 26411-26420.*

Cossarizza A., Baccarani-Contri M., Kalashnikova G. y Franceschi C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazol-carbo--cyanine iodide (JC-1). *Biochem. Biophys. Res. Commun. 197 (1993), 40–45.*

Crompton M., Barksby E., Johnson N. y Capano M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death. *Biochimie 84 (2002),143-152.*

Crompton M., Ellinger H. y Costi A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca^{2+}-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem. J. 255 (1988), 357-360.*

Csordás G. y Hajnóczky G. Plasticity of mitochondrial calcium signaling. *J. Biol. Chem. 278 (2003), 42273-42282.*

D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I. y Poirier G.G. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem. J. 342 (1999), 249-268.*

Danial N.N. y Korsmeyer S.J. Cell death: critical control points. *Cell 116 (2004), 205-219.*

Datta S.R., Brunet A. y Greenberg M.E. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev. 13 (1999), 2905–2927.*

Déas O., Dumont C., McFarlane M., Rouleau M., Hebib C., Harper F., Hirsch F., Charpentier B., Cohen G.M. y Senik A. Caspase-independent cell death induced by anti-CD2 or staurosporine in activated human peripheral T lymphocytes. *J. Immunol. 161 (1998), 3375-3383.*

Degterev A. y Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9 (2008), 378-390.*

Dejesus F., Girardet J.L. y Dupont Y. Characterisation of ATP binding inhibition to the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase by thapsigargin. *FEBS Lett. 332 (1993), 229-232.*

De Meis L. Role of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase on heat production and thermogenesis. *Biosci. Rep. 21 (2001), 113-137.*

De Meis L. y Fialho de Mello M.C. Substrate regulation of membrane phosphorylation and of Ca^{2+} transport in the sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem. 248 (1973), 3691-3701.*

De Meis L. y Vianna A.L. Energy interconversion by the Ca^{2+}-dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Biochem. 48 (1979), 275-292.*

Deveraux Q.L., Roy N., Stennicke H.R., Van Arsdale T., Zhou Q., Srinivasula S.M., Alnemri E.S., Salvesen G.S. y Reed J.C. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J. 17 (1998), 2215-2223.*

Di Lisa F., Menabo R., Canton M., Barile M. y Bernardi P. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD^+ and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J. Biol. Chem. 276 (2001), 2571-2575.*

Di Sano F., Ferraro E., Tufi R., Achsel T., Piacentini M. y Cecconi F. Endoplasmic reticulum stress induces apoptosis by an apoptosome-dependent but caspase 12-independent mechanism. *J. Biol. Chem. 281 (2006), 2693–2700.*

Dolmetsch R.E., Lewis R.S., Goodnow C.C. y Healy J.I. Differential activation of transcription factors induced by Ca^{2+} response amplitude and duration. *Nature 384 (1977), 855-858.*

Donehower L.A. Does p53 affect organismal aging?. *J. Cell Physiol. 192 (2002), 23-33.*

Duchen M.R. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J. Physiol. 529 (2000), 57-68.*

Duchen M.R., McGuinness O., Brown L.A. y Crompton M. On the involvement of a cyclosporin A sensitive mitochondrial pore in myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc. Res. 27 (1993), 1790-1794.*

Dumonteil E., Barré H. y Meissner G. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase and ryanodine receptor in cold-acclimated ducklings and thermogenesis. *Am. J. Physiol. 265 (1993), C507-C513.*

Dupont Y. y Bennett N. Vanadate inhibition of the Ca^{2+}-dependent conformational change of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase. *FEBS Lett. 139 (1982), 237-240.*

Dupont Y., Pougeois R., Ronjat M. y Verjovsky-Almeida S. Two distinct classes of nucleotide sites in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase revealed by 2',3'-O-(2,4,6-trinitrocyclohexadienylidene)-ATP. *J. Biol. Chem. 260 (1985), 7241-7249.*

Echevarría W., Leite M.F., Guerra M.T., Zipfel W.R. y Nathanson M.H. Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat. Cell Biol. 5 (2003), 440-446.*

Eletr S. e Inesi G. Phospholipid orientation in sarcoplasmic membranes: spin-label ESR and proton MNR studies. *Biochim. Biophys. Acta 282 (1972), 174-179.*

Eskes R., Antonsson B., Osen-Sand A., Montessuit S., Richter C., Sadoul R., Mazzei G., Nichols A. y Martinou J.C. Bax-induced cytochrome c release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg^{2+} ions. *J. Cell Biol. 143 (1998), 217–224.*

Fabiato A. Computer programs for calculating total from specified free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Methods Enzymol. 157 (1988), 378-417.*

Fernández-Belda F., Fortea M.I. y Soler F. Testing the versatility of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase reaction cycle when p-nitrophenyl phosphate is the substrate. *J. Biol. Chem. 276 (2001), 7998-8004.*

Fernández J.L., Rosemblatt M. e Hidalgo C. Highly purified sarcoplasmic reticulum vesicles are devoid of Ca^{2+}-independent ('basal') ATPase activity. *Biochim. Biophys. Acta 599 (1980), 552-568.*

Ferri K.F. y Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat. Cell Biol. 3 (2001), E255–E263.*

Ferri K.F. y Kroemer G. Mitochondria —the suicide organelles. B*ioEssays 23 (2003), 111-115.*

Fortea M.I., Soler F. y Fernández-Belda F. Insight into the uncoupling mechanism of sarcoplasmic reticulum ATPase using the phosphorylating substrate UTP. *J. Biol. Chem. 275 (2000), 12521-12529.*

Fortea M.I., Soler F. y Fernandez-Belda F. Unravelling the interaction of thapsigargin with the conformational states of Ca^{2+}-ATPase from skeletal sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem. 276 (2001), 37266-37272.*

Furuichi T., Yoshikawa S., Miyawaki A., Wada K., Maeda N. y Mikoshiba K. Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate binding protein P400. *Nature 342 (1989), 32-38.*

Furuya Y., Lundmo P., Short A.D., Gill D.L. e Isaacs J.T. The role of calcium, pH, and cell proliferation in the programmed (apoptosis) death of androgen-independent prostatic cancer cells induced by thapsigargin. *Cancer Res. 54 (1994), 6167-6175.*

Galluzzi L., Maiuri M.C., Vitale I., Zischka H., Castedo M., Zitvogel L. y Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ. 14 (2007),1237-1243.*

Garrido C., Galluzzi L., Brunet M. Puig P.E., Didelot C. y Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ. 13 (2006), 1423-1433.*

Gee K.R., Brown K.A., Chen W-N.U., Bishop-Stewart J., Gray D. y Johnson I. Chemical and physiological characterization of Fluo-4 Ca^{2+} indicator dyes. *Cell Calcium 27 (2000), 97-106.*

Ginty D.D. Calcium regulation of gene expression: isn't that spatial?. *Neuron 18 (1997), 183-186.*

Goldstein J.C., Muñoz-Pinedo C., Ricci J.-E., Adams S.R., Kelekar A., Schuler M., Tsien R.Y. y Green D.R. Cytochrome c is released in a single step during apoptosis. *Cell Death Differ. 12 (2005), 453-462.*

Goldstein J.C., Watherhouse N.J., Juin P., Evan G.I. y Green D.R. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat. Cell Biol. 2 (2000), 156-162.*

Golstein P. y Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci. 32 (2007), 37-43.*

Gottlieb R.A., Burleson K.O., Kloner R.A., Babior B.M. y Engler R.L. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J. Clin. Invest. 94 (1994), 1621–1628.*

Gottlieb R.A. y Granville D.J. Analyzing mitochondrial changes during apoptosis. *Methods 26 (2002), 341–347.*

Green D.R. y Chipuk J.E. Stabbed in the Bax. *Nature 455 (2008)*, 1047-1049.

Green D.R. y Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science 305 (2004), 626-629.*

Griffiths E.J. y Halestrap A.P. Protection by cyclosporin A of isquemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol. 25 (1993), 1461-1469.*

Griffiths G.J., Dubrez L., Morgan C.P., Jones N.A., Whitehouse J., Corfe B.M., Dive C. y Hickman J.A. Cell damage-induced conformational changes of the proapoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J. Cell Biol. 144 (1999), 903-914.*

Gross A., Jockel J., Wei M.C. y Korsmeyer S.J. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J. 17 (1998), 3878-3885.*

Gross A., McDonnell J.M. y Korsmeyer S.J. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev. 13 (1999), 1899-1911.*

Grynkiewicz G., Poenie M. y Tsien R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem. 260 (1985), 3440-3450.*

Hajnóczky G., Csordás G., Madesh M. y Pacher P. The machinery of local Ca^{2+} signalling between sarco-endoplasmic reticulum and mitochondria. *J. Physiol. 529 (2000), 69-81.*

Hajnóczky G., Robb-Gaspers L.D., Seitz M.B. y Thomas A.P. Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell 82 (1995), 415-424.*

Harding H.P., Zhang Y. y Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature 397 (1999), 271-274.*

Hasselbach W. Relaxing factor and the relaxation of the muscle. *Prog. Biophys. Biophys. Chem. 14 (1964), 167-222.*

Haze K., Yoshida H., Yanagi H., Yura T. y Mori K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell 10 (1999), 3787-3799.*

He H., Li H.L., Lin A., y Gottlieb R.A. Activation of the JNK pathway is important for cardiomyocyte death in response to simulated ischemia. *Cell Death Differ. 6 (1999), 987-991.*

Heibein J.A., Goping I.S., Barry M., Pinkoski M.J., Shore G.C., Green D.R. y Bleackley R.C. Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members Bid and Bax. *J. Exp. Med. 192 (2000), 1391-1402.*

Heiskanen K.M., Bhat M.B., Wang H.-W., Ma J. y Nieminen A.-L. Mitochondrial depolarization accompanies cytochrome c release during apoptosis in PC6 cells. *J. Biol. Chem. 274 (1999), 5654-5658.*

Hofmann K. The modular nature of apoptotic signaling proteins. *Cell. Mol. Life Sci. 55 (1999), 1113-1128.*

Holly T.A., Drincic A., Byun Y., Nakamura S., Harris K., Klocke F.J. y Cryns V.L. Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo. *J. Mol. Cell. Cardiol. 31 (1999), 1709–1715.*

Hsu Y.T., Wolter K.G. y Youle R.J. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997), 3668-3672.*

Hua S., Fabris D. e Inesi G. Characterization of calcium, nucleotide, phosphate, and vanadate bound states by derivatization of sarcoplasmic reticulum ATPase with ThioGlo1. *Biophys. J. 77 (1999), 2217-2225.*

Huang C.-Y., Kuo W.-W., Chueh P.J., Tseng C.-T., Chou M.-Y. y Yang J.-J. Transforming growth factor-β induces the expression of ANF and hypertrophic growth in cultured cardiomyoblast cells through ZAK. *Biochem. Biophys. Res. Commun. 324 (2004), 424–431.*

Ichas F. y Mazat J.P. From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochim. Biophys. Acta 1366 (1998), 33-50.*

Inesi G. Mechanism of calcium transport. *Annu. Rev. Physiol. 47 (1985), 573-601.*

Inesi G., Kurzmack M., Kosk-Kosicka D., Lewis D., Scofano H. y Guimaraes-Motta H. Equilibrium and kinetic studies of calcium transport and ATPase activity in sarcoplasmic reticulum. *Z. Naturforsch. 37c (1982), 685-691.*

Inesi G., Prasad A.M. y Pilankatta R. The Ca^{2+} ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum: Physiological role and relevance to diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun. 369 (2008), 182-187.*

Jackson T.R. Patterson S.I., Thastrup O. y Hanley M.R. A novel tumour promoter, thapsigargin, transiently increases cytoplasmic free Ca^{2+} without generation of inositol phosphates in NG115-401L neuronal cells. *Biochem. J. 253 (1988), 81-86.*

Javelaud D. y Besancon F. Inactivation of p21WAF1 sensitizes cells to apoptosis via an increase of both p14ARF and p53 levels and an alteration of the Bax/Bcl-2 ratio. *J. Biol. Chem. 277 (2002), 37949-37954.*

Jiang S., Chow S.C., Nicotera P. y Orrenius S. Intracellular Ca^{2+} signals activate apoptosis in thymocytes: studies using the Ca^{2+}-ATPase inhibitor thapsigargin. *Exp. Cell Res. 212 (1994), 84-92.*

Jiang X. y Wang X. Cytochrome c-mediated apoptosis. *Annu. Rev. Biochem. 73 (2004), 87-106.*

Jürgensmeier J.M., Xie Z., Deveraux Q., Ellerby L., Bredesen D. y Reed J.C. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998), 4997-5002.*

Kang P.M., Haunstetter A., Aoki H., Usheva A. e Izumo S. Morphological and molecular characterization of adult cardiomyocyte apoptosis during hypoxia and reoxygenation. *Circ. Res. 87 (2000), 118-125.*

Karbowski M. y Youle R.J. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ. 10 (2003), 870-880.*

Kass G.E., Duddy S.K., Moore G.A. y Orrenius S. 2,5-Di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone rapidly elevates cytosolic Ca^{2+} concentration by mobilizing the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} pool. *J. Biol. Chem. 264 (1989), 15192-15198.*

Kaufman R.J. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev. 13 (1999), 1211-1233.*

Kaufmann S.H., Desnoyers S., Ottaviano Y., Davidson N.E. y Poirier G.G. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res. 53 (1993), 3976-3985.*

Kerr J.F., Gobé G.C., Winterford C.M. y Harmon B.V. Anatomical methods in cell death. *Methods Cell Biol. 46 (1995), 1-27.*

Kerr J.F., Wyllie A.H. y Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer 26 (1972), 239-257.*

Khan A.A., Soloski M.J., Sharp A.H., Schilling G., Sabatini D.M., Li S.H., Ross C.A. y Snyder S.H. Lymphocyte apoptosis: mediation by increased type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Science 273 (1996), 503-507.*

Kimes B.W. y Brandt B.L. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp. Cell Res. 98 (1976), 367–381.*

Kirby M.S., Sagara Y., Gaa S., Inesi G., Lederer W.J. y Rogers T.B. Thapsigargin inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump. *J. Biol. Chem. 267 (1992), 12545-12551.*

Kirley T.L. Purification and characterization of the Mg^{2+}-ATPase from rabbit skeletal muscle transverse tubule. *J. Biol. Chem. 263 (1988), 12682-12689.*

Kitamura Y., Miyamura A., Takata K., Inden M., Tsuchiya D., Nakamura K. y Taniguchi T. Possible involvement of both endoplasmic reticulum- and mitochondria-dependent pathways in thapsigargin-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J. Pharmacol. Sci. 92 (2003), 228–236.*

Koizumi S., Bootman M.D., Bobanović L.K., Schell M.J., Berridge M.J. y Lipp P. Characterization of elementary Ca^{2+} release signals in NGF-differentiated PC12 cells and hippocampal neurons. *Neuron 22 (1999), 125-137.*

Kokoszka J.E., Waymire K.G., Levy S.E., Sligh J.E., Cai J., Jones D.P., MacGregor G.R. y Wallace D.C. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature 427 (2004), 461-465.*

Korge P. y Weiss J.N. Thapsigargin directly induces the mitochondrial permeability transition. *Eur. J. Biochem. 265 (1999), 273-280.*

Krammer P.H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature 407 (2000), 789-795.*

Kroemer G. y Martin S.J. Caspase-independent cell death. *Nat. Med. 11 (2005), 725–730.*

Kroemer G. y Reed J.C. Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med. 6 (2000), 513-519.*

Kuwana T., Mackey M.R., Perkins G., Ellisman M.H., Latterich M., Schneiter R., Green D.R. y Newmeyer D.D. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell 111 (2002), 331-342.*

Kyhse-Andersen J. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods 10 (1984), 203-209.*

Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature 227 (1970), 680-685.*

Lanzetta P.A., Alvarez L.J., Reinach P.S. y Candia O.A. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal. Biochem. 100 (1979), 95-97.*

Lax A., Soler F. y Fernández-Belda F. Intracellular Ca^{2+} pools and fluxes in cardiac muscle-derived H9c2 cells. *J. Bioenerg. Biomembr. 37 (2005), 249-259.*

Lax A., Soler F. y Fernandez-Belda F. Cytoplasmic Ca^{2+} signals and cellular death by apoptosis in myocardiac H9c2 cells. *Biochim. Biophys. Acta 1763 (2006), 937–947.*

Leberer E., Timms B.G., Campbell K.P. y MacLennan D.H. Purification, calcium binding properties, and ultrastructural localization of the 53,000- and 160,000 (sarcalumenin)-dalton glycoproteins of the sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem. 265 (1990), 10118-10124.*

Lee A.G. How phospholamban could affect the apparent affinity of Ca^{2+}-ATPase for Ca^{2+} in kinetic experiments. *FEBS Lett. 551 (2003), 37-41.*

Lee J.A. y Allen D.G. Changes in intracellular free calcium concentration during long exposures to simulated ischemia in isolated mammalian ventricular muscle. *Circ. Res. 71 (1992), 58-69.*

Lei K. y Davis R.J. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (2003), 2432-2437.*

Leist M. y Jäättelä M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2 (2001), 589-598.*

Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S. y Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/Caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell 91 (1997), 479-489.*

Lin J.H., Li H., Yasumura D., Cohen H.R., Zhang C., Panning B., Shokat K.M., Lavail M.M. y Walter P. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science 318 (2007), 944-949.*

Lincz L.F. Deciphering the apoptotic pathway: all roads lead to death. *Immunol. Cell Biol. 76 (1998), 1-19.*

Liu H., Peng H.W., Cheng Y.S., Yuan H.S. y Yang-Yen H.F. Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP. *Mol. Cell. Biol. 25 (2005), 3117-3126.*

Loeffler M. y Kroemer G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp. Cell Res. 256 (2000), 19-26.*

Logue S.E., Gustafsson A.B., Samali A. y Gottlieb R.A. Ischemia/reperfusion injury at the intersection with cell death. *J. Mol. Cell. Cardiol. 38 (2005), 21–33.*

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem. 193 (1951), 265-275.*

Lutter M., Fang M., Luo X., Nishijima M., Xie X. y Wang X. Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat. Cell Biol. 2 (2000), 754-761.*

Lytton J., Westlin M. y Hanley M.R. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase family of calcium pumps. *J. Biol. Chem. 266 (1991), 17067-17071.*

Ma H., Inesi G. y Toyoshima C. Substrate-induced conformational fit and headpiece closure in the Ca^{2+}-ATPase (SERCA). *J. Biol. Chem. 278 (2003), 28938-28943.*

Maiuri M.C., Zalckvar E., Kimchi A. y Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 8 (2007), 741-752.*

Majno G. y Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol. 146 (1995), 3-15.*

Manon S., Chaudhuri B. y Guérin M. Release of cytochrome c and decrease of cytochrome c oxidase in Bax-expressing yeast cells, and prevention of these effects by coexpression of Bcl-x(L). *FEBS Lett. 415 (1997), 29–32.*

Marzo I., Brenner C., Zamzami N., Jürgensmeier J.M., Susin S.A., Vieira H.L.A., Prévost M.-C., Xie Z., Matsuyama S., Reed J.C. y Kroemer G. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science 281 (1998), 2027-2031.*

Matlib M.A., Zhou Z., Knight S., Ahmed S., Choi K.M., Krause-Bauer J., Phillips R., Altschuld R., Katsube Y., Sperelakis N. y Bers D,M. Oxygen-bridged dinuclear ruthenium amine complex specifically inhibits Ca2+ uptake into mitochondria in vitro and in situ in single cardiac myocytes. *J. Biol. Chem. 273 (1998), 10223-10231.*

McGahon A.J., Martin S.J., Bissonnette R.P., Mahboubi A., Shi Y., Mogil R.J., Nishioka W.K. y Green D.R. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. *Methods Cell Biol. 46 (1995), 153-185.*

Meissner G., Conner G.E. y Fleischer S. Isolation of sarcoplasmic reticulum by zonal centrifugation and purification of Ca^{2+}-pump and Ca^{2+}-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta 298 (1973), 246-269.*

Meltzer S. y Berman M.C. Effects of pH, temperature, and calcium concentration on the stoichiometry of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem. 259 (1984), 4244-4253.*

Merry D.E. y Korsmeyer S.J. Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci. 20 (1997), 245-267.*

Mestril R., Chi S.H., Sayen M.R., y Dillmann W.H. Isolation of a novel inducible rat heat-shock protein (HSP70) gene and its expression during ischaemia/hypoxia and heat shock. *Biochem. J. 298 (1994), 561-569.*

Missiaen L., Van Acker K., Parys J.B., De Smedt H., Van Baelen K., Weidema A.F., Vanoevelen J., Raeymaekers L., Renders J., Callewaert G., Rizzuto R. y Wuytack F. Baseline cytosolic Ca^{2+} oscillations derived from a non-endoplasmic reticulum Ca^{2+} store. *J. Biol. Chem. 276 (2001), 39161-39170.*

Mizukami Y., Kobayashi S., Uberall F., Hellbert K., Kobayashi N. y Yoshida K. Nuclear mitogen-activated protein kinase activation by protein kinase C ζ during reoxigenation after ischemic hypoxia. *J. Biol. Chem. 275 (2000), 19921-19927.*

Monteith G.R. y Blaustein M.P. Heterogeneity of mitochondrial matrix free Ca^{2+}: resolution of Ca^{2+} dynamics in individual mitochondria in situ. *Am. J. Physiol. 276 (1999), C-1193-C1204.*

Mori K., Ma W., Gething M.J. y Sambrook J. A transmembrane protein with a CDC2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell 74 (1993), 743-756.*

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods 65 (1983), 55-63.*

Murphy R.C., Schneider E. y Kinnally K.W. Overexpression of Bcl-2 suppresses the calcium activation of a mitochondrial megachannel. *FEBS Lett. 497 (2001), 73-76.*

Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., Xu J., Yankner B.A. y Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-β. *Nature 403 (2000), 98–103.*

Newmeyer D.D. y Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell 112 (2003), 481-490.*

Nutt L.K., Chandra J., Pataer A., Fang B., Roth J.A., Swisher S.G., O'Neil R.G. y McConkey D.J. Bax-mediated Ca^{2+} mobilization promotes cytochrome c release during apoptosis. *J. Biol. Chem. 277 (2002), 20301-20308.*

Oakes S.A., Scorrano L., Opferman J.T., Bassik M.C., Nishino M., Pozzan T. y Korsmeyer S.J. Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005), 105-110.*

Obeng E.A. y Boise L.H. Caspase-12 and caspase-4 are not required for caspase-dependent endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J. Biol. Chem. 280 (2005), 29578–29587.*

Oliveira R.G., Coan C. y Verjovski-Almeida S. Utilization of arylazido-ATP by sarcoplasmic reticulum ATPase in the absence of calcium. *J. Biol. Chem. 263 (1988), 1861-1867.*

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

Orrenius S., Zhivotovsky B. y Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4 (2003), 552-565.*

Oyadomari S. y Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ. 11 (2004), 381-389.*

Pacher P., Csordás G. y Hajnóczky G. Mitochondria Ca^{2+} signaling and cardiac apoptosis. *Biol. Signals Recept. 10 (2001), 200-223.*

Pastorino J.G., Shulga N. y Hoek J.B. Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J. Biol. Chem. 277 (2002), 7610-7618.*

Pedersen P.L. y Carafoli E. Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *Trends Biochem. Sci. 4 (1987), 146-150.*

Perez-Terzic C., Stehno-Bittel L. y Clapham D.E. Nucleoplasmic and cytoplasmic differences in the fluorescence properties of calcium indicator Fluo-3. *Cell Calcium 21 (1997), 275-282.*

Pick U. The interaction of vanadate ions with the Ca-ATPase from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem. 257 (1982), 6111-6119.*

Pinton P., Ferrari D., Magalhães P., Schulze-Osthoff K., Di Virgilio F., Pozzan T. y Rizzuto R. Reduced loading of intracellular Ca^{2+} stores and downregulation of capacitative Ca^{2+} influx in Bcl-2-overexpressing cells. *J. Cell Biol. 148 (2000), 857-862.*

Pinton P., Pozzan T. y Rizzuto R. The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *EMBO J. 17 (1998), 5298-5308.*

Qi X.-M., He H., Zhong H. y Distelhorst C.W. Baculovirus p35 and z-VAD-fmk inhibit thapsigargin-induced apoptosis of breast cancer cells. *Oncogene 15 (1997), 1207-1212.*

Rao R.V. y Bredesen D.E. Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration. *Curr. Opin. Cell Biol. 16 (2004), 653-662.*

Reed J.C. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell Biol. 124 (1994), 1-6.*

Reed J.C. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semin. Hematol. 34 (1997), 9-19.*

Regula K.M., Ens K. y Kirshenbaum L.A. Mitochondria-assisted cell suicide: a license to kill. *J. Mol. Cell. Cardiol. 35 (2003), 559-567.*

Rizzuto R., Bastianutto C., Brini M., Murgia M. y Pozzan T. Mitochondrial Ca^{2+} homeostasis in intact cells. *J. Cell Biol. 126 (1994), 1183-1194.*

Robb-Gaspers L.D. y Thomas A.P. Coordination of Ca^{2+} signalling by intercellular propagation of Ca^{2+} waves in the intact liver. *J. Biol. Chem. 270 (1995), 8102-8107.*

Rossi B., de Assis Leone F., Gache C. y Lazdunski M. Pseudosubstrates of the sarcoplasmic Ca^{2+}-ATPase as tools to study the coupling between substrate hydrolysis and Ca^{2+} transport. *J. Biol. Chem. 254 (1979), 2302-2307.*

Rossner M., y Yamada K.M. What's in a picture? The temptation of image manipulation. *J. Cell Biol. 166 (2004), 11-15.*

Rudolf R., Morguillo M., Rizzuto R. y Pozzan T. Looking forward to seeing calcium. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4 (2003), 579-586.*

Rutkowski D.T., Arnold S.M., Miller C.N., Wu J., Li J., Gunnison K.M., Mori K., Sadighi Akha A.A., Raden D. y Kaufman R.J. Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol. 4 (2006), e374.*

Rutkowski D.T. y Kaufman R.J. A trip to the ER: Coping with stress. *Trends Cell Biol. 14 (2004), 20–28.*

Sagara Y. e Inesi G. Inhibition of the sacoplasmic reticulum Ca^{2+} transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentrations. J. *Biol. Chem. 266 (1991), 13503-13506.*

Scaduto R.C. y Grotyohann L.W. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys. J. 76 (1999), 469-477.*

Schendel S.L., Montal M. y Reed J.C. Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death Differ. 5 (1998), 372-380.*

Schröder M. y Kaufman R.J. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat. Res. 569 (2005), 29-63.*

Schröder M. y Kaufman R.J. The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem. 74 (2005), 739-789.*

Schwartzenbach G., Senn H. y Anderegg G. Komplexone XXIX. Ein grosser chelateffekt besonderer. *Helv. Chim. Acta 40 (1957), 1886-1900.*

Scorrano L., Ashiya M., Buttle K., Weiler S., Oakes S.A., Mannella C.A. y Korsmeyer S.J. A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev. Cell 2 (2002), 55-67.*

Scorrano L., Oakes S.A., Opferman J.T., Cheng E.H., Sorcinelli M.D., Pozzan T. y Korsmeyer S.J. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+}: A control point for apoptosis. *Science 300 (2003), 135–139.*

Sharov V.G., Sabbah H.N., Shimoyama H., Goussev A.V., Lesch M. y Goldstein S. Evidence of cardiocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure. *Am. J. Pathol. 148 (1996), 141-149.*

Shimizu S., Ide T., Yanagida T. y Tsujimoto Y. Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *J. Biol. Chem. 275 (2000), 12321-12325.*

Shiozaki E.N. y Shi Y. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends Biochem. Sci. 29 (2004), 486-494.*

Sinev M.A., Sineva E.V., Ittah V. y Haas E. Domain closure in adenylate kinase. *Biochemistry 35 (1996), 6425-6437.*

Slee E.A., Harte M.T., Kluck R.M., Wolf B.B., Casiano C.A., Newmeyer D.D., Wang H.-G., Reed J.C., Nicholson D.W., Alnemri E.S., Green D.R. y Martin S.J. Ordering cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell Biol. 144 (1999), 281-292.*

Slee E.A., Keogh S.A. y Martin S.J. Cleavage of BID during cytotoxic drug and UV radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of Bcl-2 action and is catalysed by caspase-3: A potential feedback loop for amplification of apoptosis-associated mitochondrial cytochrome c release. *Cell Death Differ. 7 (2000), 556–565.*

Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J. y Klenk D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem. 150 (1985), 76-85.*

Soboloff J. y Berger S.A. Sustained ER Ca^{2+} depletion suppresses protein synthesis and induces activation-enhanced cell death in mast cells. *J. Biol. Chem. 277 (2002), 13812-13820.*

Soler F., Fortea M.I., Lax A. y Fernández-Belda F. Dissecting the hydrolytic activities of sarcoplasmic reticulum ATPase in the presence of acetyl phosphate. *J. Biol. Chem. 277 (2002), 38127-38132.*

Soler F., Lax A. y Fernandez-Belda F. Cellular death linked to irreversible stress in the sarcoplasmic reticulum: The effect of inhibiting Ca^{2+}-ATPase or protein glycosylation in the myocardiac cell model H9c2. *Arch. Biochem. Biophys. 466 (2007), 194-202.*

Sparagna G.C., Gunter K.K., Sheu S.S. y Gunter T.E. Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode. *J. Biol. Chem. 270 (1995), 27510-27515.*

Spitzer N.C. y Ribera A.B. Development of electrical excitability in embryonic neurons: mechanisms and roles. *J. Neurobiol. 37 (1998), 190-197.*

Sugita Y., Miyashita N., Ikeguchi M., Kidera A. y Toyoshima C. Protonation of the acidic residues in the transmembrane cation-binding sites of the Ca^{2+} pump. *J. Am. Chem. Soc. 127 (2005), 6150-6151.*

Szalai G., Csordás G., Hantash B.M., Thomas A.P. y Hajnóczky G. Calcium signal transmission between ryanodine receptors and mitochondria. *J. Biol. Chem. 275 (2000), 15305-15313.*

Szegezdi E., Logue S.E., Gorman A.M. y Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep. 7 (2006), 880–885.*

Tamm I., Wang Y., Sausville E., Soudiero D.A., Vigna N., Ottersdort T. y Reed J.C. IAP-family protein survivin inhibits caspases activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases and anticancer drugs. *Cancer Res. 58 (1998), 5315-5320.*

Tang D., Lahti J.M. y Kidd V.J. Caspase-8 activation and Bid cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase-3-dependent manner during staurosporine-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem. 275 (2000), 9303–9307.*

Tanno M., Bassi R., Gorog D.A., Saurin A.T., Jiang J., Heads R.J., Martin J.L., Davis R.J., Flavell R.A., y Marber M.S. Diverse mechanisms of myocardial p38 mitogen-activated protein kinase activation: evidence for MKK-independent activation by a TAB1-associated mechanism contributing to injury during myocardial ischemia. *Circ. Res. 93 (2003), 254-261.*

Teiger E., Dam T.V., Richard L., Wisnewsky C., Tea B.S., Gaboury L., Tremblay J., Schwartz K. y Hamet P. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J. Clin. Invest. 97 (1996), 2891-2897.*

Tewari M., Quan L.T., O´Rourke K., Desnoyers S., Zeng Z., Beidler D.R., Poirier G.G., Salvesen G.S. y Dixit V.M. Yama/CPP32β mammalian homolog of CED-3 is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly-(ADP-ribose) polymerase. *Cell 81 (1995), 801-809.*

Thastrup O., Foder B. y Scharff O. The calcium mobilizing and tumor promoting agent, thapsigargin elevates the platelet cytoplasmic free calcium concentration to a higher steady state level. A possible mechanism of action for the tumor promotion. *Biochem. Biophys. Res. Commun. 142 (1987), 654-660.*

Thomas A.P., Alexander J. y Williamson J.R. Relationship between inositol polyphosphate production and the increase of cytosolic free Ca^{2+} induced by vasopressin in isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem. 259 (1984), 5574-5584.*

Thomas D., Lipp P., Tovey S.C., Berridge M.J., Li W., Tsien R.Y. y Bootman M.D. Microscopic properties of elementary Ca^{2+} release sites in non-excitable cells. *Curr. Biol. 10 (2000), 8-15.*

Thornberry N.A. y Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science 281 (1998), 1312-1316.*

Tikhomirov O. y Carpenter G. Bax activation and translocation to mitochondria mediate EGF-induced programmed cell death. *J. Cell Sci. 118 (2005), 5681–5690.*

Tinel A. y Tschopp J. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science 304 (2004), 843-846.*

Toyoshima C. Structural aspects of ion pumping by Ca^{2+}-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys. 476 (2008), 3-11.*

Toyoshima C., Nakasako M., Nomura H. y Ogawa H. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature 405 (2000), 647-655.*

Toyoshima C. y Nomura H. Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature 418 (2002), 605-611.*

Travers K.J., Patil C.K., Wodicka L., Lockhart D.J., Weissman J.S. y Walter P. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell 101 (2000), 249-258.*

Tsien R.Y., Rink T.J. y Poenie M. Measurement of cytosolic free Ca^{2+} in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell Calcium 6 (1985), 145-157.*

Turner N.A., Xia F., Azhar G., Zhang X., Liu L. y Wei J.Y. Oxidative stress induces DNA fragmentation and caspase activation via the c-Jun NH_2-terminal kinase pathway in H9c2 cardiac muscle cells. *J. Mol. Cell. Cardiol. 30 (1998), 1789–1801.*

Urano F., Wang X., Bertolotti A., Zhang Y., Chung P., Harding H.P. y Ron D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science 287 (2000), 664-666.*

Vaux D.L., Haecker G. y Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell 76 (1994), 777-779.*

Vercesi A.E., Moreno S.N.J., Bernardes C.F., Meinicke A.R., Fernandes E.C. y Docampo R. Thapsigargin causes Ca^{2+} release and collapse of the membrane potential of *Trypanosoma brucei* mitochondria in situ and of isolated rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem. 268 (1993), 8564-8568.*

Von Haefen C., Wieder T., Essmann F., Schulze-Osthoff K., Dörken B. y Daniel P.T. Paclitaxel-induced apoptosis in BJAB cells proceeds via a death receptor-independent, caspases-3/-8-driven mitochondrial amplification loop. *Oncogene 22 (2003), 2236-2247.*

Wang H.G., Pathan N., Ethell I.M., Krajewski S., Yamaguchi Y., Shibasaki F., McKeon F., Bobo T., Franke T.F. y Reed J.C. Ca^{2+}-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science 284 (1999), 339-343.*

Wang, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev. 15 (2001), 2922–2933.*

Watanabe T. e Inesi G. The use of 2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate for studies of nucleotide interaction with sarcoplasmic reticulum vesicles. *J. Biol. Chem. 257 (1982), 11510-11516.*

Wei M.C., Zong W.-X., Cheng E.H.-Y., Lindsten T., Panoutsakopoulou V., Ross A.J., Roth K.A., MacGregor G.R., Thompson C.B. y Korsmeyer S.J. Proapoptotic BAX and BAK: A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science 292 (2001), 727–730.*

Wilkins B.J., Dai Y.-S., Bueno O.F., Parsons S.A., Xu J., Plank D.M., Jones F., Kimball T.R. y Molkentin J.D. Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ. Res. 94 (2004), 110-118.*

Woods N.M., Cuthbertson K.S.R. y Cobbold P.H. Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-treated hepatocytes. *Nature 319 (1986), 600-602.*

Xu C., Ma H., Inesi G., Al-Shawi M.K. y Toyoshima C. Specific structural requirements for the inhibitory effect of thapsigargin on the Ca^{2+}-ATPase SERCA. *J. Biol. Chem. 279 (2004), 17973-17979.*

Yamamoto K., Ichijo H. y Korsmeyer S.J. Bcl-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol. Cell. Biol. 19 (1999), 8469-8478.*

Yao Y., Choi J. y Parker I. Quantal puffs of intracellular Ca^{2+} evoked by inositol trisphosphate in *Xenopus oocytes. J. Physiol. 482 (1995), 533-553.*

Youn H.D., Sun L., Prywes R. y Liu J.O. Apoptosis of T cells mediated by Ca^{2+}-induced release of the transcription factor MEF2. *Science 286 (1999), 790-793.*

Yu X. e Inesi G. Variable stoichiometric efficiency of Ca^{2+} and Sr^{2+} transport by the sarcoplasmic reticulum ATPase. *J. Biol. Chem. 270 (1995), 4361-4367.*

Yue D.T., Marban E. y Wier W.G. Relationship between force and intracellular [Ca^{2+}] in tetanized mammalian heart muscle. *J. Gen. Physiol. 87 (1986), 223-242.*

Yue T.L., Wang C., Romanic A.N., Kikly K., Keller P., DeWolf Jr. W.E., Hart T.K., Thomas H.C., Storer B., Gu J.L., Wang X. y Feuerstein G.Z. Staurosporine-induced apoptosis in cardiomyocytes: A potential role of caspase-3. *J. Mol. Cell. Cardiol. 30 (1998), 495–507.*

Zamzami N. y Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora`s box opens. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2 (2001), 67-71.*

Zamzami N. y Kroemer G. Methods to measure membrane potential and permeability transition in the mitochondria during apoptosis. *Methods Mol. Biol. 282 (2004), 103-115.*

Zhivotovsky B. Caspases: the enzymes of death. *Essays Biochem. 39 (2003), 25-40.*

Zhu L., Ling S., Yu X.D., Venkatesh L.K., Subramanian T., Chinnadurai G. y Kuo T.H. Modulation of mitochondrial Ca^{2+} homeostasis by Bcl-2. *J. Biol. Chem. 274 (1999), 33267-33273.*

Zong W.X., Lindsten T., Ross A.J., MacGregor G.R., y Thompson C.B. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev. 15 (2001), 1481-1486.*

Zou H., Li Y., Liu X. y Wang X. An APAF-1·cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem. 274 (1999), 11549-11556.*