

DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

FENÓMENOS MITOCONDRIALES Y NUCLEARES
RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA A LA
APOPTOSIS. IMPORTANCIA DEL ESTRÉS OXIDATIVO.

NANCY JUDITH MORA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2009

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 24 de juliol de 2009 davant un tribunal format per:

- Dr. José Viña Ribes
- Dra. Marcela del Río Nechaevsky
- Dr. Luis F. Carbonell Meseguer
- Dr. Guillermo Sáez Tormo

Va ser dirigida per:

Dr. Federico Vicente Pallardó Calatayud

Dra. Jelena Markovic

Dra. Ana Lloret Alcañiz

©Copyright: Servei de Publicacions
Nancy Judith Mora

Dipòsit legal: V-4148-2010

I.S.B.N.: 978-84-370-7635-5

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Fisiología



Tesis doctoral:

**“FENÓMENOS MITOCONDRIALES Y
NUCLEARES RELACIONADOS CON LA
RESISTENCIA A LA APOPTOSIS.
IMPORTANCIA DEL ESTRÉS OXIDATIVO”**

Nancy J. Mora

Directores:

Federico V. Pallardó Calatayud

Jelena Markovic

Ana Lloret

Valencia, 2009.-



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Fisiología

Prof. D. Federico V. Pallardó Calatayud, Catedrático del Departamento de Fisiología, de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Dña. Jelena Markovic, Doctora por la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Dña. Ana Lloret Alcañiz, Prof. Contratado Doctor del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que Dña. Nancy J. Mora, Licenciada en Ciencias Biológicas, por la Universidad Nacional de la Patagonia S.J.B., Argentina, ha realizado bajo su dirección la presente tesis tutelada:

“FENÓMENOS MITOCONDRIALES Y NUCLEARES RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA A LA APOPTOSIS. IMPORTANCIA DEL ESTRÉS OXIDATIVO”.

Para la obtención del título de Doctora.

Y para que cosnte en acta a los efectos oportunos, firman la presente certificación,

Valencia, 17 de junio de 2009.-

Prof. D. Federico V.
Pallardó Calatayud

Dra. Jelena Markovic

Dra. Ana Lloret
Alcañiz

Agradecimientos

En primer lugar quiero comenzar agradeciendo al Dr. José Viña por brindarme la oportunidad de ser parte de su grupo de investigación, por compartir su experiencia científica conmigo y por su entrega a la educación.

Quisiera agradecer a mis directores de tesis: Al Dr. Federico Pallardó, por acogerme bajo su tutela y por ofrecerme la oportunidad de llevar a cabo esta tesis. A la Dra. Jelena Markovic, por las horas dedicadas a mi instrucción, por ser a la vez una compañera y una maestra y por guiarme en mi camino como doctoranda. A la Dra. Ana Lloret, por haber participado en este proceso de enseñanza y por su afable ayuda.

Me gustaría expresar mi especial agradecimiento al Dr. Antonio Alberola, por abrirme las puertas del Departamento de Fisiología, por su inestimable ayuda y por su calidad personal.

También quisiera agradecer a todos los profesores y compañeros del Departamento de Fisiología por su amabilidad y por los buenos momentos compartidos. En especial quiero agradecer al Dr. Luís Such por sus valiosos consejos y sus magistrales clases teóricas. Al Dr. Juan Sastre, por su calidez humana. A las secretarías, por su valiosísima ayuda y por su incansable trabajo: Eva, Mari, Teresa y Elena.

No puedo de dejar de mencionar a mis compañeros de grupo con quienes he compartido el día a día del laboratorio: M^aCarmen Gómez, Chelo, Juan, Raúl, Marco, Javi, Alessandro, Javi y Pain, Soraya, Vladi, Anita Brasil, Lele y Fabián. A los raritos: José Luís, Gema, Ana y Carmen. En especial me gustaría agradecer a Paco e Isabel, por ayudarme con las PCR y a Amparo, por ayudarme con los westerns. A los técnicos, que hacen posible que todo funcione: Consuelo, Mar, Rubén y Carmiña.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a Ángel Ortega por su gran trabajo en el confocal, por ser un excelente compañero y por estar siempre dispuesto a brindarme su ayuda. También quisiera agradecer a Sonia, por ayudarme a completar mis experimentos en el confocal, por su candidez y amabilidad.

A los amigos:

A Jelena, mi teacher y co-equiper, gracias por ser mi compañera de aventuras en el viejo mundo y por demostrarme que siempre estas conmigo cuando te necesito. A Noelia, por ser una excelente persona y por que sin tu ayuda no podría haber terminado esta tesis. A Anita Bro., por traer un toque de aire fresco al laboratorio y por compartir esta fascinación por la ciencia. A M^aCarmen B., por que descubrí en vos a una buena amiga y a una gran compañera. A Ana Llo., por ser mi maestra de docencia.

Por último quisiera agradece muy especialmente a mi amigo Mariano Koen Alonso, por haber sido un gran tutor y por haberme inculcado el entusiasmo por mi trabajo y sobre todo por introducirme en el mundo de la investigación.

No quiero dejar de mencionar a mi familia, a los Gorditos, a mi melli y a Karin, a sus medias naranjas y a los piojitos (Martín, María, Osvaldito y Abril), por que me acompañan en la distancia, por ser mi apoyo y mi cable a tierra, porque están conmigo incondicionalmente. A Daniel, por ser un gran compañero de aventuras.

A todos: Gracias totales!!

INTRODUCCIÓN	3
1. Apoptosis	5
1.1. Tipos de muerte celular	5
1.2. Características generales de la apoptosis	7
1.3. Factores que participan en la apoptosis	10
1.3.1. Proteínas de la familia bcl2	10
1.4. Iniciación de la apoptosis: vía extrínseca y vía intrínseca	15
1.4.1. Conexión entre las vías intrínseca y extrínseca	17
1.4.2. Papel de la mitocondria en la apoptosis	17
1.4.2.1. Permeabilidad mitocondrial	18
1.4.2.2. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	20
1.4.2.3. Factores liberados por la mitocondria: citocromo-c	23
1.4.2.4. Otros factores liberados al citoplasma	26
1.5. El calcio y la apoptosis	27
1.6. Apoptosis y el ciclo celular	28
1.6.1. Fases del ciclo celular	30
1.6.2. Control del ciclo celular	32
2. Radicales libres, estrés oxidativo y antioxidantes	35
2.1. Concepto de radical libre y especies activadas	35
2.1.1. Génesis de especies oxidantes en las células	37
2.2.1. La mitocondria como productor de agentes oxidantes	38
2.2. Estrés oxidativo	39
2.3. Antioxidantes fisiológicos	40
2.3.1. Sistemas antioxidantes enzimáticos	41
2.3.2. Sistemas antioxidantes no enzimáticos	42
2.4. El glutatión	43

2.4.1. Papel del glutatión como nexo de unión entre el estrés oxidativo y la proliferación celular	46
2.5. Papel del estrés oxidativo en la apoptosis	51
3. Relación entre el núcleo y la mitocondria	54
3.1 Dinámica mitocondrial	57
OBJETIVOS	60
MATERIAL Y MÉTODOS	65
1. Aparatos e instrumental	67
2. Productos y Reactivos	70
3. Diseño experimental	82
3.1 Tratamientos	82
3.2 Inducción de apoptosis	82
3.2.1. Protocolo de inducción de apoptosis	82
3.2.2 Tiempos de incubación de las muestras	82
4. Modelo celular	83
5. Cultivos celulares	84
5.1 Protocolo de expansión de células	84
5.2. Protocolo de establecimiento de stock de células	85
6. Determinaciones analíticas	86
7. Citometría de flujo	87
7.1 Cuantificación de ADN por citometria de flujo: Ciclo celular	88
7.1.1 Preparación de las muestras para determinación de fases del ciclo celular	89
7.2. Determinación del potencial de membrana mitocondrial	91
7.2.1. Preparación de las muestras para determinación del potencial de membrana mitocondrial por citometría de flujo	91

7.3. Determinación del nivel de ROS intracelular por citometria de flujo	90
7.3.1. Preparación de las muestras para determinación del nivel de peróxido de hidrógeno por citometria de flujo con dihidrorodamina	92
8. Microscopia confocal	94
8.1. Determinación de apoptosis por microscopia confocal	95
8.1.1. Preparación de las muestras para la determinación de apoptosis por confocal	96
8.2. Análisis de la distribución de las mitocondrial por microscopia confocal	96
8.2.1. Preparación de las muestras para el análisis de la distribución de las mitocondrias	97
8.3. Estudio de la compartimentación de glutatión por microscopia confocal	97
8.3.1. Preparación de las muestras para el estudio de compartimentación de glutatión por microscopia	98
8.4. Compartimentación de calcio por microscopia confocal	99
8.4.1. Preparación de las muestras para el estudio de la compartimentación de calcio por microscopía confocal	99
9. Técnica de inmunocitoquímica	100
9.1. Preparación de las muestras para la colocalización de citocromo-c y mitocondrias por inmunocitoquímica	101
10. Determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry	102

10.1. Preparación de las muestras para la determinación de proteínas	102
10.2. Cálculos para determinar la concentración de proteínas	103
11. Determinación de la concentración de GSH celular por medio de la reacción de la glutatión transferasa	103
11.1. Preparación de la muestra para determinación de GSH celular por transferasa	104
11.2. Determinación enzimática de GSH	105
11.3. Cálculos para la determinación enzimática de GSH	106
12. Determinación de la expresión de proteínas por Western Blotting	107
12.1. Obtención de las muestras para western blotting	107
12.2 Procedimiento para determinación de expresión de proteínas por electroforesis SDS/ PAGE	108
13. RT- PCR	110
13.1. Obtención de las muestras para western blotting	110
13.2. Obtención del RNA total	111
13.3. Cuantificación y comprobación de pureza del RNA	111
13.4. Protocolo de RT-PCR	112
14. Análisis estadístico	114
RESULTADOS	115
1. Tratamiento con cisplatino [10 μ M]	117
1.1. Determinación de la citotoxicidad mediante contaje directo de células	117
1.2. Cuantificación del contenido de ADN, fase G0/G1 del ciclo celular	118

1.3. Cuantificación del contenido de ADN, fase S+M/G2 del ciclo celular	120
1.4. Cuantificación del contenido de ADN, células muertas	121
1.5. Determinación del nivel de GSH en extractos celulares	123
1.6. Determinación de los niveles de ROS celular	124
1.7. Determinación del potencial de membrana mitocondrial en MCF7+/- y MCF7+/+	125
1.8. Compartimentación celular del GSH y co-localización de células apoptóticas en MCF7+/- y MCF7+/+ tratadas con cisplatino [10µM]	127
1.9. Análisis de la distribución mitocondrial y marcaje de células apoptóticas en MCF7+/- y MCF7+/+	130
1.10. Análisis de la distribución mitocondrial y necrosis en MCF7+/- y MCF7+/+ tratadas con cisplatino [10µM]	134
1.11. Co-localización de citocromo-c y mitocondrias en MCF7+/- y MCF7+/+ tratadas con cisplatino [10µM]	1356
1.12. Análisis de la distribución celular de calcio y marcaje de células apoptóticas en MCF7+/- y MCF7+/+ tratadas con cisplatino [10µM]	140
1.13. Niveles de expresión de proteínas de fisión y fusión mitocondrial por western blotting	142
1.14. Análisis de la expresión de RNAm por RT-PCR	143
2. Tratamiento con cisplatino [50µM]	145
2.1. Determinación de citotoxicidad mediante contaje directo de células MCF7+/- y MCF7+/+ tratadas con cisplatino [50µM]	145
2.2. Cuantificación del contenido de ADN, fase G0/G1 del ciclo celular en MCF7+/- y MCF7+/-	146

2.3. Cuantificación del contenido de ADN, fase S+M/G2 del ciclo celular en MCF7+/- y MCF7+/+ tratadas con cisplatino [50µM]	147
2.4. Cuantificación del contenido de ADN, células muertas en MCF7+/- y MCF7+/+	148
2.5. Determinación del nivel de GSH en extractos celulares de MCF7+/- y MCF7+/+	149
2.6. Determinación de los niveles de ROS celular en MCF7+/- y MCF7+/+ tratadas con cisplatino [50µM]	150
2.7. Determinación del potencial de membrana mitocondrial	151
2.8. Compartimentación celular del GSH y co-localización de células apoptóticas en MCF7+/- y MCF7+/+ tratadas	152
2.9. Análisis de la distribución mitocondrial y apoptosis	155
2.10. Análisis de la distribución mitocondrial y necrosis	159
2.11. Co-localización de citocromo-c y mitocondrias en células tratadas con cisplatino [50µM]	161
2.12. Análisis de la distribución celular de calcio y células apoptóticas en células MCF7+/- y MCF7+/+ tratadas con cisplatino [50µM]	165
1.13. Niveles de expresión de proteínas de fisión y fusión mitocondrial por western blotting	167
1.14. Análisis de la expresión de RNAm por RT-PCR	168
DISCUSIÓN	171
1. Síntesis y análisis comparativo de los resultados obtenidos.	175
1.1. Efectos del tratamiento de cisplatino [10µM] en los parámetros mitocondriales y nucleares considerados	175

1.2. Efectos del tratamiento de cisplatino [50 μ M] en los parámetros mitocondriales y nucleares considerados	177
2. Mecanismos subyacentes en la relación de los fenómenos nucleares y mitocondriales, papel del estrés oxidativo y del GSH celular	180
2.1. El cisplatino induce la detención de las células en la fase de proliferación y consecuentemente la muerte celular, principalmente por apoptosis	180
2.2. El tratamiento induce un incremento progresivo en los niveles de ROS	181
2.3. Aumenta el nivel de calcio celular, en las células apoptóticas se observa un incremento marcado del calcio, en algunos casos parece disponerse formando agregados	183
2.4. El cisplatino produce la despolarización del potencial de membrana mitocondrial	184
2.5. Se producen alteraciones en las mitocondrias, siendo eventos tempranos que no necesariamente provocan la muerte celular	186
2.7. Las células resistentes al tratamiento presentan altos niveles de GSH, que parece concentrarse principalmente en el núcleo	197
3. El modelo que sobre-expresa bcl-2 resiste mejor al tratamiento con cisplatino. Implicación bcl-2 en la compartimentación del GSH y su relación con los fenómenos mitocondriales y nucleares durante la resistencia a la apoptosis	206

4. A partir de los resultados obtenidos se puede establecer una secuencia de eventos que relacione los parámetros mitocondriales y nucleares estudiados durante la resistencia a la muerte por apoptosis inducida por el cisplatino	209
5. La aparición temprana de las variaciones mitocondriales y nucleares podrían deberse a una estrategia de resistencia celular al tratamiento	212
CONCLUSIONES	195
Futuros estudios	221
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	225

INTRODUCCIÓN

Tesis doctoral:

**“FENÓMENOS MITOCONDRIALES Y NUCLEARES
RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA A LA
APOPTOSIS. IMPORTANCIA DEL ESTRÉS
OXIDATIVO”**

INTRODUCCIÓN

Es ampliamente aceptado que la comunicación entre las organelas es necesaria para el correcto funcionamiento de la célula, así como para la ejecución de los programas de muerte celular. La comunicación entre la mitocondria y el núcleo puede darse a diferentes niveles en respuesta a estímulos diversos. En respuesta a las posibles variaciones extracelulares (temperatura del medio, ejercicio, cambios hormonales, etc.) se activan factores de transcripción que regulan conjuntamente genes nucleares y mitocondriales. De esta forma se consigue la activación de las mitocondrias, como posible respuesta a los cambios ambientales. Por otro lado, las propias variaciones en el funcionamiento de la mitocondria pueden activar una respuesta conjunta entre dicha organela y el núcleo. Por ejemplo, la pérdida de mitocondrias funcionales, puede requerir la formación de nuevas mitocondrias para lo cual se necesita de la acción coordinada del núcleo y las mitocondrias (Ryan *et al.*, 2007).

Introducción

Son numerosos los factores y proteínas involucrados en los procesos de señalización entre organelas. Por ejemplo se ha descrito que posibles defectos en las funciones respiratorias de las mitocondrias podrían activar genes nucleares y mitocondriales a través de una vía de señalización dependiente de H_2O_2 (Suzuki *et al.*, 1998). Así mismo, cambios en la funcionalidad mitocondrial debidos a alteraciones del estado redox celular o la homeostasis del calcio inducen una respuesta conjunta por parte del núcleo y la mitocondria. Estos resultados concuerdan con la idea de que las especies reactivas del oxígeno juegan un importante papel en la señalización entre ambas organelas (Lee and Wei, 2005).

Es probable que la morfología mitocondrial, en especial los fenómenos de fusión y fisión, constituyan un elemento clave en la comunicación entre el núcleo y la mitocondria. Estudios recientes realizados sobre dinámica mitocondrial demuestran que el citoesqueleto tiene un rol fundamental en el movimiento de las mitocondrias a lo largo del citosol así como en el transporte de proteínas entre diferentes organelas (Boldogh and Pon, 2007; Boldogh and Pon, 2006; Tang *et al.*, 2006). Dichos movimientos mitocondriales no sólo estarían relacionados con la funcionalidad de las mitocondrias, también podrían relacionarse con la comunicación entre las organelas. Por ejemplo, proteínas tales como bcl-2, que se encuentra en las membranas del núcleo, las mitocondrias o el retículo endoplasmático, podrían ser transportadas de un compartimento subcelular a otro a través de estas vías de comunicación.

Desde hace unos años nuestro grupo estudia los mecanismos de resistencia a la apoptosis en el marco del estrés oxidativo. A través de estos trabajos se ha demostrado que el principio de la

proliferación activa requiere un ambiente reducido en el núcleo y que el nivel de la compartimentación de glutatión reducido (GSH) regula el ritmo del ciclo celular (Markovic *et al.*, 2007; Markovic *et al.*, en prensa). Es ampliamente aceptado que la sobre-expresión del oncogen humano bcl-2 induce un aumento de la concentración de GSH en el núcleo, lo cual parece contribuir a la resistencia a la apoptosis (Voehringer *et al.*, 1998). Sin embargo, se desconocen los mecanismos subyacentes del tal fenómeno, también se desconoce si este proceso es previo a los fenómenos de estrés oxidativo citosólico o si la implicación de las mitocondrias en el fenómeno apoptótico es previa o posterior (Marin *et al.*, 1996; Borrás *et al.*, 2004).

Teniendo en cuenta que algunos estudios demuestran que bcl-2 cumple una función importante en el transporte de GSH a través de la membrana mitocondrial, es posible que cumpla la misma función en la membrana nuclear. También es factible que el movimiento de las mitocondrias en el proceso de apoptosis se relacione con los fenómenos antes mencionados.

1. Apoptosis

1.1. Tipos de muerte celular: necrosis y apoptosis.

La muerte celular constituye un aspecto esencial del funcionamiento normal de los organismos multicelulares. El mantenimiento de la homeostasis de estos organismos depende de un intrincado balance entre la renovación y la muerte celular. En este sentido la apoptosis o muerte celular programada y la necrosis constituyen los dos mecanismos básicos de muerte celular y pueden ser considerados como los extremos de un amplio abanico de procesos que dirigen a

las células no funcionales hacia su eliminación (Proskuryakov *et al.*, 2003; Penaloza *et al.*, 2006) (Figura 1).

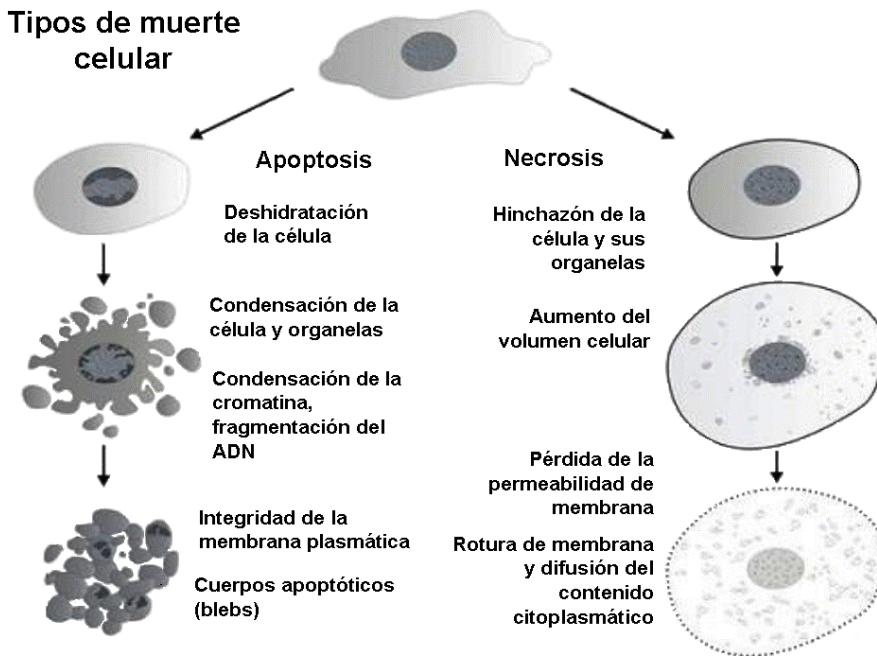


Figura 1. Tipos de muerte celular: muerte celular programa o apoptosis y necrosis.

En 1972 Kerr y colaboradores definen la necrosis como una forma violenta de muerte celular iniciada por estímulos ambientales que rápidamente alteran la homeostasis celular. Alternativamente proponen el término de *apoptosis* al describir las características morfológicas de ciertas células que morían espontáneamente durante el desarrollo. Este término deriva del griego y se refiere a la caída de pétalos u hojas que se observa de forma natural en las plantas. La apoptosis complementa los procesos de mitosis y crecimiento celular, constituye un programa de muerte celular intrínseco en las células y que es activado en determinadas circunstancias. De esta forma las células mueren de manera

controlada y son eliminadas sin dañar a otras células o generar respuesta inflamatoria alguna (Kerr *et al.*, 1972).

La necrosis es un proceso patológico que tiene lugar cuando las células son dañadas por severas lesiones procedentes del entorno (Wyllie *et al.*, 1980; Walker *et al.*, 1988). Este tipo de muerte se produce en respuesta a una amplia variedad de estímulos (hipertermia, isquemia, venenos metabólicos) o por lesión celular directa (Trump and Bulger, 1967; Buckley, 1977; Borgers *et al.*, 1987; Penaloza *et al.*, 2006).

Una célula que sufre necrosis manifiesta características morfológicas y bioquímicas diferenciadas: los primeros cambios incluyen hinchazón del citoplasma y de los orgánulos, especialmente de las mitocondrias y solamente cambios leves en el núcleo. Estos cambios desembocan en la destrucción de los orgánulos subcelulares y en la ruptura de la membrana plasmática, lo que permite la salida del contenido celular al espacio extracelular (Trump *et al.*, 1984). Por tanto, la muerte celular por necrosis afecta a grupos de células adyacentes y desencadena una reacción inflamatoria en el tejido viable cercano, como respuesta a la liberación del contenido celular (Proskuryakov *et al.*, 2003; Lockshin and Zakeri, 2004). Los cambios morfológicos que tienen lugar en la muerte celular por necrosis son debidos a la pérdida del control de la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática (Trump *et al.*, 1984; Zong and Thompson, 2006).

1.2. Características generales de la apoptosis.

La apoptosis o muerte celular programada es un tipo de muerte celular fisiológica que se ha conservado evolutivamente, de hecho se halla presente tanto en animales como en plantas. Este tipo de

Introducción

muerte celular programada tiene una gran importancia para el desarrollo tisular y su homeostasis, ya que regula el número de células presente en un tejido, por ejemplo es de gran importancia durante el desarrollo embrionario (Denecker *et al.*, 2001; Penaloza *et al.*, 2006; Zimmermann *et al.*, 2007).

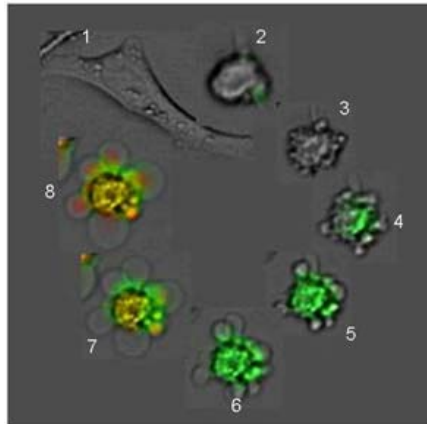


Figura 2. Se puede ver la progresión del proceso de apoptosis, partiendo de una célula normal (1) se muestra la variación de la morfología celular luego de un estímulo apoptótico (2-8). Se mantiene la integridad de la membrana plasmática y se distinguen los cuerpos apoptóticos resultantes.

Una de las marcas características de este tipo de proceso fisiológico es que la membrana se mantiene íntegra y no hay liberación del contenido citoplasmático, con lo que no se produce reacción inflamatoria por el tejido circundante, a diferencia de lo que ocurre en la necrosis. La célula posteriormente se divide en pequeños cuerpos apoptóticos que en última instancia serán fagocitados por las células circundantes (Degterev and Yuan, 2008) (Figura 2).

El estudio de los mecanismos que regulan la apoptosis ha sido objeto de numerosos e intensivos trabajos (Duane *et al.*, 2003). Esto es debido a que constituye un mecanismo homeostático fundamental,

dado que regula el número de células en un tejido y lo protege contra células potencialmente cancerosas (Cerutti, 1985). Sin embargo, tanto su defecto como su exceso pueden ser perjudiciales, estando implicada en múltiples patologías tales como el cáncer, síndromes de inmunodeficiencia adquirida, enfermedades autoinmunes, esclerosis lateral amiotrófica, proceso de desarrollo fetal o perinatal, enfermedades neurodegenerativas, etc. (Thomson, 1995; Zimmermann *et al.*, 2001; Galluzzi *et al.*, 2007).

El programa para la ejecución de la muerte celular por apoptosis parece estar presente de forma constitutiva en virtualmente todas las células de los mamíferos y puede ser activado por estímulos tanto intracelulares como extracelulares (Ashkenazi and Dixit, 1998; Green and Reed, 1998). Una vez activada la vía o las vías que desencadenan el proceso apoptótico se ponen en marcha diferentes mecanismos bioquímicos, por ejemplo, generación de especies oxidantes, activación de caspasas, liberación de moléculas pro-apoptóticas por parte de la mitocondria, cambios en la expresión de ciertos genes, aumento de la concentración intracelular de calcio, etc. Estos mecanismos conducen a la aparición de una serie de alteraciones morfológicas típicas de la apoptosis y consecuentemente a la muerte celular (Debatin, 2004).

Los cambios morfológicos más tempranos incluyen la condensación del citoplasma, que se asocia a la pérdida de líquido intracelular e iones (Lockshin and Beaulaton, 1981) y la condensación del núcleo; posteriormente se observa la disgregación del núcleo en varios fragmentos (Wyllie *et al.*, 1980; Walker *et al.*, 1988). A continuación la célula se fragmenta en varios cuerpos rodeados por la membrana plasmática, los denominados cuerpos apoptóticos, que contienen orgánulos intactos y algunos fragmentos nucleares. Gracias a la

formación de estos cuerpos apoptóticos, no se produce liberación del contenido intracelular al medio extracelular, evitándose una posible reacción inflamatoria (Sheridan *et al.*, 1981).

Finalmente estos cuerpos son fagocitados por células vecinas capaces de detectar los cambios que tienen lugar en la membrana de las células apoptóticas (Savill *et al.*, 1990; Savill *et al.*, 1991; Fadok *et al.*, 1992). Por ejemplo la exposición de los fosfolípidos constituyentes de la membrana plasmática, como la fosfatidilserina que normalmente se encuentra ubicada hacia la cara interna de la membrana y que es expuesta al exterior durante la apoptosis (Fadok *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 2009). Las células capaces de detectar estos cambios y llevar a cabo los procesos de fagocitosis pueden ser macrófagos, células epiteliales normales, células endoteliales o células tumorales (Wyllie *et al.*, 1980).

1.3. Factores que participan en la apoptosis.

En la respuesta apoptótica intervienen una amplia variedad de biomoléculas, que en la mayoría de las situaciones participan en más de una de las vías apoptóticas. Esta ubicuidad permite al programa de muerte celular disponer de mecanismos de regulación y amplificación de señal.

1.3.1. Proteínas de la familia bcl-2.

Los miembros de la familia del protooncogen bcl-2 son proteínas intracelulares que actúan como mediadores esenciales tanto en los procesos de muerte celular por apoptosis como en los procesos de supervivencia celular. Es decir que, ciertos miembros de la familia de proteínas tipo bcl-2 exhiben propiedades pro-apoptóticas mientras

que otros miembros exhiben propiedades anti-apoptóticas (Borner, 2003; van Delft and Huang, 2006).

Además de su papel en los fenómenos relacionados con la apoptosis, se cree que algunos de los miembros de la familia de bcl-2 pueden desempeñar otras funciones. En este sentido, tanto bcl-2 como bcl-x_L participan en la regulación del ciclo celular retardando la entrada en la fase S (Borner, 2003). Además, bcl-2 puede actuar como antioxidante ya que reacciona directamente con los radicales libres previniendo, especialmente, los procesos de peroxidación lipídica (Hockenberry *et al.*, 1993; Saitoh *et al.*, 2003; Zimmermann *et al.*, 2007).

Se han identificado un número creciente de miembros pertenecientes a la llamada familia de bcl-2 en células de mamíferos. Todos ellos presentan de uno a cuatro dominios homólogos del bcl-2 (dominios BH): BH1, BH2, BH3, BH4 (Ashe and Berry, 2003). Estos dominios no muestran ninguna actividad enzimática pero median la interacción de las proteínas de la familia del bcl-2 entre ellas o con otras biomoléculas. Según las interacciones que se produzcan resulta el destino final de la célula (Borner, 2003).

Atendiendo a características estructurales y funcionales, los miembros de la familia de bcl-2 pueden ser divididos en tres grupos. Un primer grupo contiene a aquéllos miembros con características anti-apoptóticas; estructuralmente, los miembros de este grupo contienen, al menos, los dominios BH1 y BH2. Cabe destacar que tanto bcl-2 como bcl-x_L contienen los cuatro dominios BH (BH1, BH2, BH3, BH4). Un segundo grupo está formado por los miembros pro-apoptóticos, como bax, bak y bok (Mtd), que contienen los dominios BH1, BH2 y BH3 pero no el dominio BH4. Finalmente, existe un tercer grupo que aglutina a aquéllos miembros pro-apoptóticos, como

bid, bim, bad, bik, Hork (DP5), bnip3, bim_L, Noxa y PUMA, que poseen únicamente el dominio BH3 (Zimmermann *et al.*, 2001; Borner, 2003; Wong and Puthalakath, 2008) (Figura 3).

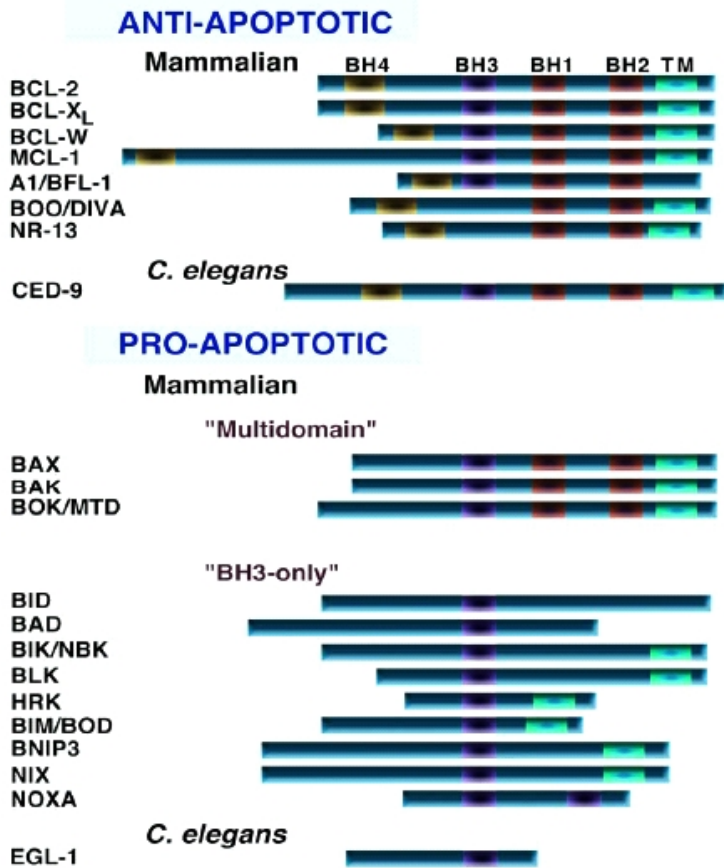


Figura 3. Resumen de los miembros pro y anti-apoptóticos de la familia bcl-2.

Los miembros anti-apoptóticos de la familia del bcl-2 son proteínas integrales de membrana que habitualmente residen en la mitocondria, el retículo endoplásmico y la membrana nuclear. La mayor parte de los miembros pro-apoptóticos, por el contrario, antes de iniciarse el programa de muerte celular, se localizan en el citosol y el citoesqueleto y sólo una fracción muy pequeña de estas proteínas

se encuentra en las membranas intracelulares y unidos a proteínas anti-apoptóticas tipo bcl-2 (Gross, 2001). Sin embargo, algunos estudios muestran que generalmente bak, en su estado inactivo, se localiza en la membrana mitocondrial externa, unido a las proteínas anti-apoptóticas tipo bcl-2, mientras que bax, cuando está inactivo, se encuentra preferentemente en forma monomérica en el citosol y sólo una fracción muy pequeña del mismo se asocia a las membranas (Antonsson, 2001).

El modo de actuación de las proteínas relacionadas con el protooncogen bcl-2 no se conoce con total exactitud. Diversas evidencias experimentales apoyan la hipótesis que los miembros anti-apoptóticos, como bcl-2 o bcl-x_L, se encuentran ligados a las membranas intracelulares donde interactúan con las proteínas relacionadas con bcl-2 de carácter pro-apoptótico, especialmente las proteínas tipo bax y bak, inhibiéndolas. Bajo un estímulo de carácter apoptótico, los factores pro-apoptóticos tipo bax y bak consiguen liberarse de su interacción con las proteínas anti-apoptóticas tipo bcl-2 y alteran la permeabilidad de los orgánulos, especialmente de la mitocondria, de dos modos distintos. Por una parte pueden formar canales, a través de los cuales se liberan al citosol moléculas pro-apoptóticas de pequeño tamaño, como es el caso del citocromo-c, o pueden interactuar con canales preexistentes incrementando la permeabilidad de los mismos. De esta forma moléculas de mayor tamaño, como Smac/DIABLO o Htr2A/Omi, pueden ser liberadas al citosol (Reed, 1997; García-Saéz *et al.*, 2004; Petros *et al.*, 2004). Además, bajo ciertas condiciones, las proteínas anti-apoptóticas de tipo bcl-2 pueden perder su dominio BH4 y adquirir propiedades pro-apoptóticas similares a las de las proteínas de tipo bax y bak (Antonsson, 2001; Ashe and Berry, 2003).

Los miembros pro-apoptóticos de la familia de bcl-2 que sólo contienen el dominio BH3 muestran un comportamiento distinto. Una vez transcritos se mantienen inactivos hasta que reciben una señal que los active (Puthalakath and Strasser, 2002). Se han descrito diversos mecanismos mediante los que este tipo de proteínas pro-apoptóticas pueden activarse, ya sea por inducción de la transcripción (Zha *et al.*, 1996), por fosforilación post-traducciona (Desagher *et al.*, 2001), reacciones de proteólisis (Li *et al.*, 1998) o interacciones con estructuras del citoesqueleto (Puthalakath and Strasser, 2002).

Una vez activados, estos factores presentan una mayor afinidad tanto por las proteínas anti-apoptóticas tipo bcl-2 como por las pro-apoptóticas tipo bax (Wei *et al.*, 2000). Las moléculas pro-apoptóticas que contienen sólo el dominio BH3 pueden aumentar la permeabilidad de las membranas intracelulares, especialmente la de la mitocondrial, al liberar a las proteínas pro-apoptóticas tipo bax de su unión con las proteínas tipo bcl-2. También pueden estimular la oligomerización e inserción en las membranas tanto de bax y bak como de sus proteínas relacionadas. Además, pueden formar poros en las membranas por ellas mismas o afectar la funcionalidad de los sistemas de transporte existentes (Schendel *et al.*, 1999). Si bien, éste último no parece que sea uno de los mecanismos de acción *in vivo* (Ashe and Berry, 2003). Sin embargo, sí parece importante la actividad lípido transferasa que exhiben algunos miembros de este subgrupo, como bid, ya que pueden promover cambios en la composición lipídica en la membrana mitocondrial afectando de éste modo la permeabilidad de la misma (Esposti *et al.*, 2001).

1.4. Iniciación de la apoptosis: vía extrínseca y vía intrínseca.

El proceso de muerte celular por apoptosis se lleva a cabo a través de multitud de vías interconectadas y altamente reguladas. De una manera general, puede hablarse de vías extrínsecas de iniciación de la apoptosis y de vías intrínsecas, atendiendo a los estímulos y mecanismos mediante los que se induce el proceso de muerte celular (Yan and Shi, 2005) (Figura 4).

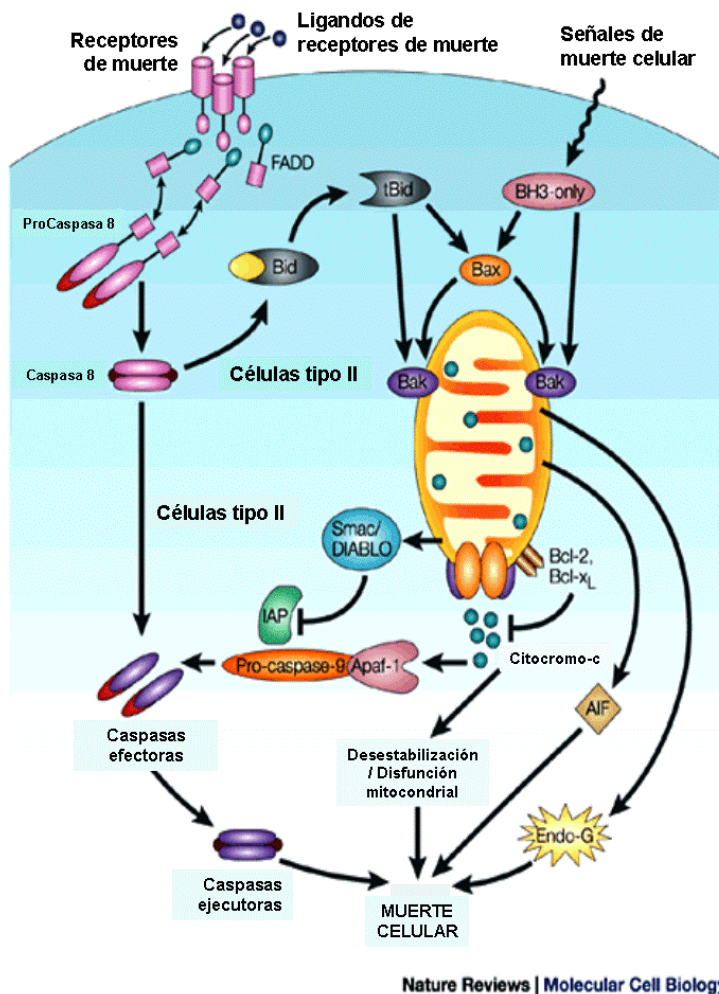


Figura 4. Esquema simplificado de las vías de señalización de muerte celular.

En la vía extrínseca la maquinaria apoptótica entra en funcionamiento como consecuencia de la acción de estímulos extracelulares. Los estímulos extracelulares inductores de apoptosis que activan la vía extrínseca pueden actuar de una manera inespecífica, como es el caso de las perforinas o la granzima B, o específica, uniéndose en la membrana celular a determinados receptores capaces de inducir la respuesta apoptótica. Estos receptores reciben el nombre de receptores de muerte celular (DRs). De esta forma la señal externa puede reaccionar con receptores de membrana como CD95/FAS, el receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) o TRAIL (Tumor necrosis factor Related Apoptosis-Inducing Ligand) (Ashkenazi and Dixit, 1998; Chen and Goeddel, 2002; Wajant, 2002). Una vez unido el ligando a su correspondiente receptor, se inician las cascadas de reacciones necesarias para que se complete el programa de muerte celular, que se denomina apoptosis mediada por receptor (Eberstadt *et al.*, 1998).

Por su parte en la vía intrínseca la apoptosis se inicia como consecuencia de una alteración en la homeostasis intracelular. Puede ser activada por estrés o agentes genotóxicos que dan lugar a la activación de la maquinaria apoptótica mitocondrial (Newmeyer and Ferguson-Miller, 2003). Debido al papel central de la mitocondria en estos procesos es que se denomina a esta como la vía mitocondrial de la apoptosis (Zimmermann *et al.*, 2001; Schwarz *et al.*, 2007). En esta vía participan las proteínas de la familia del Bcl-2 y las moléculas pro-apoptóticas liberadas por la mitocondria al citosol. Es distinta a las vías mediadas por receptores, si bien ambas pueden converger en un punto común, generalmente la activación de las caspasas, o servirse la una de la otra con el fin de potenciar y amplificar la señal apoptótica (Adams and Cory, 2007).

1.4.1. Conexión entre las vías intrínseca y extrínseca.

A pesar de que el modo y los mecanismos mediante los cuales puede iniciarse la muerte celular por apoptosis son muy diferentes, ambas vías convergen para producir, en última instancia, las alteraciones morfológicas y bioquímicas características de la apoptosis. Además, debe tenerse en cuenta que los mecanismos que inducen muerte celular en un determinado tipo celular pueden no desempeñar la misma función o tener la misma importancia en otro tipo celular del mismo organismo (Ashe and Berry, 2003).

Algunos tipos celulares requieren de la conexión de ambas vías como amplificación de la señal de apoptosis. Esta conexión permite clasificar las células en dos tipos. Por ejemplo, en la apoptosis mediada por Fas/FasL en las células de tipo I (timocitos y los linfocitos T periféricos) existe disfunción mitocondrial y liberación de citocromo-c al citosol, sin embargo el fenómeno apoptótico en estas células muestra ser independiente de los miembros de la familia de la proteína Bcl-2 (Scaffidi *et al.*, 1998).

En las células de tipo II la proteína Bid se transforma en su forma activada, tBID (proteína Bid truncada) y ejerce su acción sobre la mitocondria promoviendo la liberación de factores apoptogénicos, como el citocromo c o Smac/DIABLO al citosol (Algeciras-Schimnich *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2002). Por tanto, en las células de tipo II la respuesta apoptótica se inicia mediante una vía extrínseca pero la señal es amplificada mediante la vía mitocondrial o intrínseca de la apoptosis (Schmitz *et al.*, 2000) (Figura 4).

1.4.2. Papel de la mitocondria en la apoptosis.

De los orgánulos intracelulares la mitocondria cumple un papel importante en el proceso de apoptosis y lo desempeña en un doble

sentido (Green and Reed, 1998): por una parte libera al citosol proteínas que desencadenan o potencian la respuesta apoptótica y por otra parte destaca la propia disfunción mitocondrial que se produce durante la apoptosis y que tiene como consecuencia el compromiso del metabolismo celular (Boyd *et al.*, 1995).

La mitocondria puede sufrir alteraciones durante el proceso apoptótico, especialmente en los primeros estadios (Ferri and Kroemer, 2001). Un número creciente de trabajos indican que esta organela juega un papel central en el equilibrio entre los procesos que controlan la vida y la muerte celular, desempeñando no sólo un papel activo en la inducción y ejecución de la muerte celular sino que también parecen determinar el tipo de muerte celular en función de su capacidad para continuar con la síntesis de ATP (Kroemer, 1997; Leist *et al.*, 1997; Kroemer *et al.*, 1998).

1.4.2.1. Permeabilidad mitocondrial.

La mitocondria es un orgánulo caracterizado por la existencia de una doble membrana. Esta organela presenta una membrana mitocondrial externa y una membrana mitocondrial interna, que dividen dos compartimentos submitocondriales: el espacio intermembrana, que es el espacio encerrado por ambas membranas y la matriz mitocondrial, que es el espacio que encierra la membrana interna.

En algunos puntos del espacio intermembrana entran en contacto ambas membranas mitocondriales, la interna y la externa, formándose unas estructuras denominadas poros de permeabilidad transitoria. Los poros de permeabilidad se hallan formados por el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC, voltage dependent anion channel), que se encuentra en la membrana externa y por el

translocador de nucleótidos de adenina (ANT, adenine nucleotide translocator), localizado en la membrana interna (Van Gurp *et al.*, 2003).

Muchas vías y estímulos apoptóticos convergen en la mitocondria e inducen la permeabilización de la membrana mitocondrial, que desemboca en la liberación de moléculas que, una vez en el citosol, adquieren propiedades pro-apoptóticas (Ferri and Kroemer, 2001). Es por ello que el control de la permeabilidad de la membrana mitocondrial resulta crucial para la supervivencia y destino celular.

Como se ha comentado anteriormente, las proteínas de la familia bcl-2 regulan la permeabilidad mitocondrial, de modo que los miembros pro-apoptóticos tienden a alterar las propiedades de dicha membrana y favorecer tanto la disipación del potencial transmembrana como la salida al citosol de proteínas pro-apoptóticas. Por el contrario, los miembros anti-apoptóticos tratan de que la permeabilidad de la membrana mitocondrial no se altere.

Se han propuesto diferentes modelos con el fin de explicar cómo son liberados los factores apoptogénicos, desde la mitocondria hacia el citosol, a través de la interacción de las membranas mitocondriales con las proteínas de la familia bcl2. Uno de los modelos propuestos para explicar la liberación de proteínas pro-apoptóticas postula que las proteínas tipo bcl-2 actuarían modificando la permeabilidad de los poros existentes en la membrana mitocondrial, como por ejemplo, los poros de permeabilidad transitoria (Martinou and Green, 2001; Henry-Mowatt *et al.*, 2004).

Sin embargo, puesto que en algunas ocasiones se produce la liberación de factores apoptogénicos mitocondriales sin que se detecte una disminución en el potencial de membrana mitocondrial (Fesik, 2000), se ha propuesto otro modelo en el que se defiende que

las proteínas pro-apoptóticas del tipo bax y bak pueden formar poros en la membrana mitocondrial externa (Eskes *et al.*, 2000) a través de los cuales se produce la salida de los factores mitocondriales. En este sentido, se ha demostrado que tras un estímulo apoptótico, la proteína bax se oligomeriza, transloca y se inserta en la membrana mitocondrial externa. Además las proteínas pro-apoptóticas de tipo bid, inducen la oligomerización de bax (Eskes *et al.*, 2000). A pesar de que tbid (forma activada del factor Bid) puede formar poros *per se* al actuar directamente sobre la membrana mitocondrial, su función principal parece ser la activación de los factores de tipo bax (Kuwana *et al.*, 2002).

1.4.2.2. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).

En la mayoría de las células procariotas y eucariotas existen diferencias de potencial eléctrico a través de sus membranas y también entre el citosol y el interior de las organelas, como es el caso de la mitocondria. Estas diferencias de potencial se deben por un lado, a la existencia de gradientes de concentración de iones como Na^+ , K^+ , Cl^- y H^+ a través de la membrana celular y por otra parte a la presencia de bombas electrógenas (Shapiro, 2000).

Las mitocondrias mantienen un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna. A la par que se mantiene un flujo de electrones a través de la membrana interna mitocondrial, se bombean protones desde la matriz hacia el espacio intermembrana. De esta forma se crea un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna, la cual es totalmente impermeable a los protones. Este gradiente electroquímico constituye una fuerza protón-motriz de dos componentes. Por un lado consta de un componente eléctrico o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y

por otro lado consta de un componente químico o la diferencia de pH a través de la membrana interna mitocondrial. El componente eléctrico representa la mayor porción del potencial proto-motriz de la mitocondria. Es a través de este gradiente electroquímico que la mitocondria es capaz de sintetizar ATP (Hüttemann *et al.*, 2008) (Figura 5).

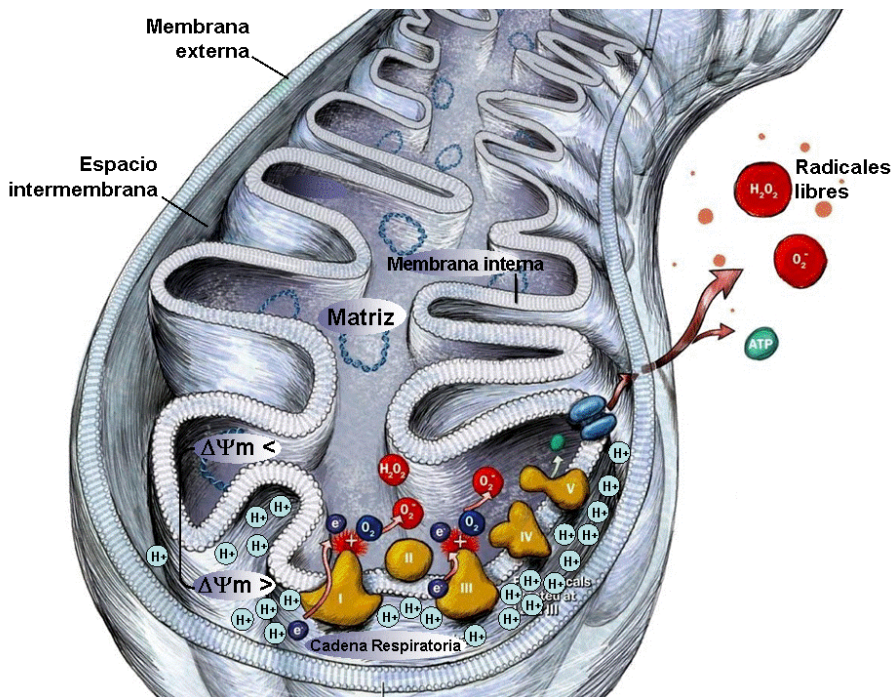


Figura 5. Esquema de la estructura interna de la mitocondria, se puede ver una representación simplificada de la cadena respiratoria.

Es decir que, el potencial de membrana mitocondrial surge como consecuencia de los protones bombeados fuera de la matriz mitocondrial, lo que crea un potencial negativo entre la matriz y el espacio intermembrana. Una disminución en la magnitud del potencial de membrana mitocondrial se conoce como despolarización

y el incremento del mismo se conoce como hiperpolarización. El potencial puede reducirse a cero si la membrana mitocondrial es rota o desaparecer si el metabolismo energético desaparece (Shapiro, 2000).

El potencial de membrana mitocondrial esta directamente relacionado con la producción de radicales libres: un alto potencial de membrana mitocondrial implica un incremento exponencial de la producción de radicales libres (Korshunov *et al.*, 1997), mientras que las mitocondrias de células quiescente con bajo potencial de membrana mitocondrial no producen cantidades significativas de radicales libres. De esta forma, el mantenimiento de un potencial de membrana mitocondrial bajo, pero fisiológicamente óptimo, evitaría la generación de especies reactivas pero debería ser capaz de proveer eficientemente de ATP a la célula (Kaim and Dimroth, 1999). Esto se condice con algunas observaciones que indican que después de la inducción de apoptosis el potencial de membrana mitocondrial puede verse incrementado, llevando a una hiperfosforilación y a un incremento en la producción de radicales libres, lo que sería una señal clave para el consecuente avance del programa de muerte por apoptosis.

La alteración de la permeabilidad mitocondrial es un acontecimiento temprano de la apoptosis que causa tanto la disipación del potencial de membrana mitocondrial como la aparición de proteínas mitocondriales apoptogénicas en el citosol (Zamzami and Kroemer, 2001). Numerosos estímulo pueden producir la disipación del potencial de membrana mitocondrial, incluso a veces puede estar precedido por una fase transitoria de hiperpolarización (Loeffler and Kroemer, 2000).

La disipación del potencial de membrana se relaciona con una pérdida de la función mitocondrial normal y con un mayor estado de oxidación mitocondrial (Kroemer, 2003). Además puede ser considerado como un mecanismo de amplificación de señal dentro de la respuesta apoptótica (Kroemer and Reed, 2000).

1.4.2.3. Factores liberados por la mitocondria: citocromo-c.

Como se mencionara anteriormente, en determinadas condiciones, ciertos estímulos que actúan sobre la mitocondria pueden desembocar en una respuesta de tipo apoptótico caracterizada por la liberación de moléculas mitocondriales que, cuando se encuentran en el citosol, adquieren comportamiento pro-apoptótico (Kroemer and Reed, 2000). Cuando se altera la permeabilidad mitocondrial, el citocromo-c es liberado al citosol. De las proteínas mitocondriales que se liberan durante la muerte celular, el citocromo-c es una de las que mejor se conocen.

La mitocondria contiene una serie de proteínas que, debido a que sufren modificaciones transcripcionales dentro de dicha organela, no se encuentran en ningún otro lugar de la célula. Este es el caso del citocromo-c, una hemoproteína que es ensamblada en el espacio intermembrana de la mitocondria. Es sintetizado en el citoplasma, en forma de apocitocromo-c, a partir de RNAm codificado por el núcleo. El apocitocromo-c es importado a la mitocondria y una vez ubicado en el espacio intermembrana una enzima se encarga de adjuntarle un grupo prostético hemo, quedando secuestrado en dicho espacio, ya que la membrana mitocondrial externa es impermeable al mismo. De esta manera se obtiene la forma activa, denominada holocitocromo-c, que participa en la fosforilación oxidativa como

transportador de electrones entre los complejos III y IV (Ravagnan *et al.*, 2002).

Durante la apoptosis se produce la permeabilización de la mitocondrial. La membrana mitocondrial externa se vuelve permeable, consecuentemente el citocromo-c es liberado al citosol. De esta forma se interrumpe el flujo de electrones entre los complejos III y IV de la cadena respiratoria, lo que produce un incremento en la generación de especies reactivas del oxígeno (Loeffler and Kroemer, 2000).

Estudios de cinética *in vivo* y *ex vivo* han demostrado que la salida del citocromo-c de la mitocondria es rápida y completa. Son necesarios niveles discretos de citocromo-c en el citosol para desencadenar la respuesta apoptótica. En algunas células, especialmente en las células tumorales con elevados niveles de IAPs (Inhibition of Apoptosis Proteins), la cantidad de proteínas pro-apoptóticas que salen de la mitocondria es un paso crítico que permite sobrepasar el efecto protector de la inhibición de las caspasas.

Existen estudios que postulan que la salida del citocromo-c desde la mitocondria al citosol se produce en dos fases, ambas inducibles por las proteínas pro-apoptóticas de la familia bcl-2. En la primera fase, el citocromo-c del espacio intermembrana es liberado al citosol a través de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa. Durante la segunda fase, se produce una redistribución del citocromo-c secuestrado en otros compartimentos de la mitocondria (por ejemplo, en las crestas mitocondriales de la membrana interna). Esto conlleva una remodelación estructural de la membrana interna mitocondrial y a cambios en la unión de citocromo-c a lípidos de membrana, como a la cardiolipina. Esta remodelación mitocondrial,

que podría ser causada por *tbid* y parece ser independiente de *bax* y *bak*, provocaría la movilización del citocromo-c desde el interior de las crestas mitocondriales, de forma que el citocromo-c podría ser liberado totalmente (Scorrano and Korsmeyer, 2003).

Una vez en el citosol, el citocromo-c participa en la formación de una estructura citosólica denominada apoptosoma. Para ello se une con una gran afinidad al Apaf-1 (Apoptosis Protease-Activating Factor-1) (Zou *et al.*, 1999), que normalmente se encuentra en el citosol en un estado inactivo (Saleh *et al.*, 1999). Al mismo tiempo se reclutan unidades de procaspasa-9, que quedan unidas a Apaf-1 (Hu *et al.*, 1999; Jiang and Wang, 2000; Adrain and Martin, 2001). Este complejo, formado por citocromo-c/APAF-1/caspasa-9, es un potente activador de las caspasas (cisteín-proteasas específicas del aspartato), de modo que puede considerarse que opera como un enlace entre las señales iniciadoras de apoptosis que actúan sobre la mitocondria y la cascada de las caspasas (Bratton *et al.*, 2001; Cain *et al.*, 2002; Gerl and Vaux, 2005).

Tanto la actividad como la formación del apoptosoma pueden ser reguladas por distintas proteínas celulares. Por una parte, puede considerarse que las proteínas anti-apoptóticas tipo *bcl-2* inhiben su formación al prevenir la salida del citocromo-c desde la mitocondria (Adrain and Martin, 2001). En este sentido *bcl-2* regularía la formación del apoptosoma de un modo indirecto. Por otra parte hay dos familias de proteínas, las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) (Roy *et al.*, 1997; Deveraux and Reed, 1999) y las proteínas de choque térmico (HSPs), capaces de inhibir la acción del apoptosoma (Beere *et al.*, 2000; Bruey *et al.*, 2000; Pandey *et al.*, 2000; Saleh *et al.*, 2000).

1.4.2.4. Otros factores liberados al citoplasma.

Como se indicara anteriormente, durante la apoptosis se produce la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y con ello la liberación de proteínas confinadas en el espacio intermembrana. Además del citocromo c, la mitocondria libera al citosol una pléyade de sustancias, cuyos mecanismo de actuación no se conocen con total exactitud (Patterson *et al.*, 2000; Ravagnan *et al.*, 2002), pero, en última instancia, estas proteínas se hayan implicadas en la continuación del programa de ejecución de la apoptosis.

Smac/DIABLO (Second Mitochondrial Activator of Caspases/ Direct IAP-Binding protein with Low pI): Esta es una proteína que se encuentran en el espacio intermembrana mitocondrial y que se liberan al citosol durante la respuesta apoptótica (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000). Inhibe la unión de las IAPs con las caspasas, por lo que Smac/DIABLO puede considerarse como activadora de las caspasas (Cain *et al.*, 2002).

HtrA2/Omi: Esta proteína induce la apoptosis por dos mecanismos distintos. Por una parte, es un inhibidor de las proteínas IAP, por lo que puede considerarse como un activador de caspasas (Cain *et al.*, 2002). Además, es capaz de inducir apoptosis por mostrar actividad serinproteasa, promoviendo, de este modo, una respuesta apoptótica que es independiente de la vía de las caspasas (Ravagnan *et al.*, 2002).

AIF (Apoptosis Inducing Factor): Es el factor inductor de apoptosis que tras llegar al citosol se transloca hasta el núcleo donde induce la condensación de la cromatina periférica y escisión del DNA en fragmentos de alto peso molecular. Además de su actividad pro-apoptótica, AIF es una flavoproteína que muestra actividad NADP(H)

oxidasa y actividad monodihidroascorbato reductasa. Las proteínas de choque térmico, especialmente HSP 70, interacciona directamente con AIF inhibiendo su actividad (Ravagnan *et al.*, 2002).

EndoG: La endonucleasa G (EndoG) una vez liberada al citosol también se transloca al núcleo donde promueve la fragmentación oligonucleosomal del DNA, incluso en presencia de inhibidores de actividad caspasa (Li *et al.*, 2001).

Caspasas: Aunque la mayoría de las caspasas se localizan en el citosol, algunas pro-caspasas se localizan en el espacio intermembrana (Mancini *et al.*, 1998). La cantidad disponible en este espacio dependerá del tipo celular y se cree que su confinamiento al espacio intermembrana puede constituir un mecanismo de protección contra su posible activación accidental (Ravagnan *et al.*, 2002).

1.5. El calcio y la apoptosis.

El calcio se encuentra en el medio interno de los organismos como ión calcio (Ca^{2+}) o formando parte de otras moléculas. Los iones de calcio actúan de cofactor en muchas reacciones enzimáticas, inclusive a nivel celular la señalización de calcio es crucial en el control de numerosos procesos fisiológicos.

La mitocondrial juega un papel fundamental en la concentración y la regulación del calcio citosólico. De hecho, esta organela cuenta con múltiples mecanismos de transporte de calcio, por medio de los cuales es capaz de retener o liberar el ión. El poro de permeabilidad transitoria constituye la principal vía de eflujo mitocondrial (Pozzan and Hirsuto, 2000; Jacobson and Duchon, 2004).

Cuando se produce un incremento desmedido de la concentración de calcio intracelular, la mitocondria comienza a ingresar calcio. Esta capacidad de la mitocondria de aumentar la concentración de calcio

en respuesta al incremento de calcio intracelular, le permite remover de forma localizada el calcio del citosol. De esta forma puede modular el rango de calcio celular, así como la propagación del ión, por lo que también intervendrá la modulación de la señalización del calcio (Duchen, 2000). Esto puede ocasionar la apertura del poro de permeabilidad transitoria y la disrupción del potencial de membrana, lo que eventualmente desencadenará la liberación de citocromo-c al citosol y posteriormente la muerte celular (Kass and Orrenius, 1999; Smaili et al., 2000).

El estrés oxidativo causa el influjo de calcio dentro del citoplasma, el cual puede provenir ya sea del ambiente extracelular o inclusive del retículo endoplasmático. Este incremento en la concentración de calcio citoplasmático puede causar el influjo dentro de la mitocondria o el núcleo. Dentro del núcleo este ión puede modular la transcripción de genes o nucleasas las cuales modulan el control de la muerte celular por apoptosis. Tanto en el núcleo como en el citoplasma el calcio libre puede regular la fosforilación y defosforilación de proteínas y también puede modular vías de transducción de señales (Ermak and Davies, 2001).

1.6. Apoptosis y ciclo celular.

A lo largo de la vida de una célula los diferentes estímulos medioambientales y la reacción celular determinarán cuándo la célula debe entrar en el proceso de autodestrucción o dividirse. De esta forma se produce un balance entre la apoptosis o muerte celular y la mitosis o división celular, regulando así la población de células de cada tejido. La importancia de estos procesos se hace evidente a lo largo de toda la vida de un organismo, desde el desarrollo embrionario hasta la vida adulta (Blomena and Boonstra, 2007).

En la formación y desarrollo de los organismos superiores, la muerte celular o apoptosis es tan importante como la división celular. En los vertebrados, por medio de la apoptosis se regula el número de neuronas durante el desarrollo del sistema nervioso, se eliminan linfocitos que no realizan correctamente su función y se moldean las formas de los órganos, eliminando así células específicas. El correcto balance de la mitosis y apoptosis determinará las estructuras, forma y viabilidad del organismo.

El mantenimiento de la estructura de los organismos pluricelulares requiere del aumento en el número de células somáticas así como del proceso de muerte celular. Todos los órganos poseen una capacidad de regeneración y reparación, aún aquellos tradicionalmente considerados post-mitótico, como el páncreas o el cerebro. La pérdida de células requiere del reemplazo constante por células nuevas, de esta manera la tasa de pérdida celular es equilibrada por medio de la tasa de renovación celular. Si en un órgano comprometido la muerte de las células supera el nivel de proliferación o reemplazo de las mismas, la función del órgano inevitablemente decaerá, consecuentemente, esto podría ocasionar una enfermedad degenerativa crónica. Si este desequilibrio fuese generalizado en todo el organismo, entonces se podrían ver acelerados los procesos de envejecimiento y muerte.

Dado que la apoptosis actúa como oponente a la mitosis, es muy importante su relación con el ciclo celular. Las células eucariotas en proliferación pasan a través de una secuencia regular de crecimiento y división, a esta serie ordenada de eventos que culminan en la división de las células es lo que se conoce como *ciclo celular* (Tessema *et al.*, 2004).

En las células eucariotas, durante el ciclo celular se duplican enormes cantidades de DNA que, posteriormente, ha de ser distribuido en partes iguales entre las células hijas. Por su parte el ciclo celular esta separado en fases o periodos, que aseguran la correcta formación de dos células hijas funcionales (Tyson and Novak, 2008). Esta inevitable separación de fase requiere del desarrollo de puntos de control que aseguren inequívocamente que se produzca el inicio de una fase sólo cuando la anterior ha sido completada (Grafi, 1998; Molinari, 2000).

1.6.1. Fases del ciclo celular.

La división celular requiere, no sólo de la duplicación del material genético, también deben replicarse las estructuras celulares que serán repartidas entre las células hijas. Las células en división se pueden encontrar básicamente en dos etapas: la interfase o la mitosis (Figura 5).

Interfase: Este es un período comprendido entre divisiones celulares y sobretodo constituye una fase preparatoria. Antes de que una célula eucariota pueda comenzar a dividirse, debe duplicar su DNA, sintetizar proteínas, producir una reserva adecuada de organelas para las dos células hijas y ensamblar las estructuras necesarias para que se lleven a cabo la mitosis y la citocinesis. Estos procesos ocurren durante la interfase, en la cual, a su vez, se distinguen tres etapas:

Fases G1 (Gap 1), es un período de crecimiento general y duplicación de las organelas citoplasmáticas.

Fase S (síntesis), es la fase de síntesis del material genético, es decir, que es aquí cuando se duplican las cromátidas de los cromosomas.

Fase G2 (Gap 2), durante esta fase comienza la condensación de los cromosomas y el ensamblado de las estructuras requeridas para la mitosis y la citocinesis.

Mitosis y Citocinesis (fase M): Esta es la fase de división celular, los cromosomas son duplicados y distribuidos entre los dos nuevos núcleos. La mitosis, a su vez, se divide en las 4 etapas: Profase; Metafase; Anafase y Telofase. Esta fase culmina con la citocinesis, momento en el cual el citoplasma se divide entre las células hijas.

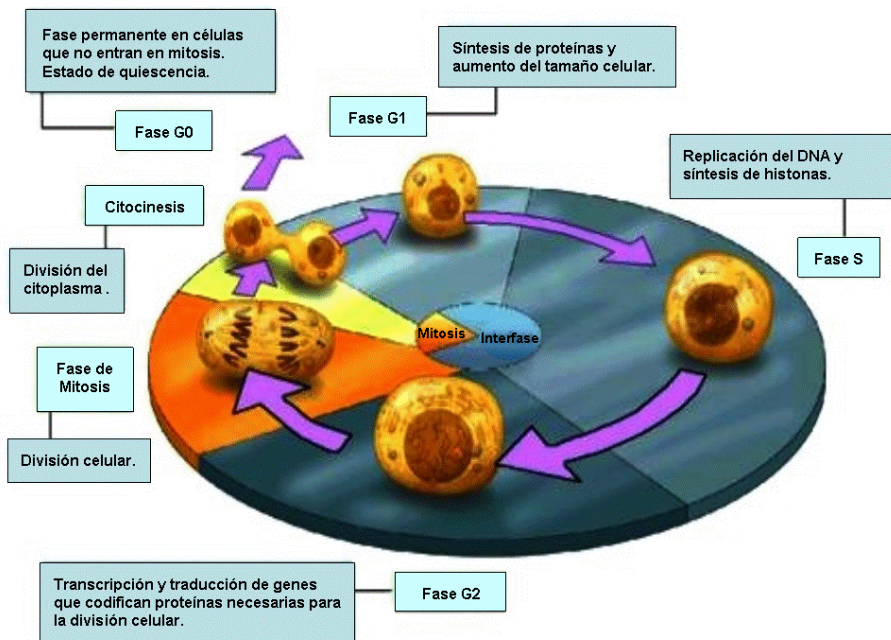


Figura 6. Esquema representativo de las fases del ciclo celular: G1, S y G2, que componen la interfase (en azul) y la fase de mitosis (en naranja). Las células que no se hallan en estado de proliferación se encuentran en la fase G0 (quiescentes).

Teniendo en cuenta cada una de las fases que componen la interfase y la división propiamente dicha, se puede considerar que el ciclo celular consta de 4 estadios: la fase G1, la fase S, la fase G2 y la fase M o mitosis (Baserga, 1999) (Figura 6).

En un tejido normal no todas las células se encuentran en fase de división, es decir que no todas las células necesariamente están en alguna de las etapas del ciclo celular (Mendelson, 1962). En condiciones normales algunas células mueren, otras se encuentran temporalmente inactivadas o fuera del ciclo celular, en la llamada *fase G0* (growth arrest), mientras que otras, bajo los estímulos adecuados, pueden retornar a la fase de proliferación o incluso diferenciarse.

En cada una de las etapas del ciclo celular participa una sofisticada maquinaria bioquímica que asegura la progresión del mismo (Lieberman *et al.*, 1963). A su vez existen puntos de control, llamados punto de restricción, en momentos críticos del ciclo celular que determinarán que una célula aborte la división o comience la proliferación (Pardee, 1974; Blagosklonny and Pardee, 2002; Coller, 2007).

1.6.2. Control del ciclo celular.

Se han identificado varios mecanismos de control que se activan en momentos específicos a lo largo del ciclo celular, el objetivo de estos es asegurar el correcto desarrollo del proceso de división celular. Cada etapa del ciclo celular esta condicionada por el correcto desarrollo de la etapa precedente, incluso no debería iniciarse una nueva etapa a menos que la anterior se complete con éxito.

El correcto progreso de los eventos del ciclo celular se lleva a cabo a través de dos mecanismos alternativos: primero, el producto de un evento temprano sirve de sustrato para un evento ulterior (relación sustrato-producto) y segundo, los mecanismos de regulación podrían demorar o incluso impedir el desarrollo de nuevos eventos si los pasos precedentes no han sido completados (Hartwell and Weinert, 1989). Esta dependencia es consecuencia de los puntos de restricción o checkpoint (Figura 7).

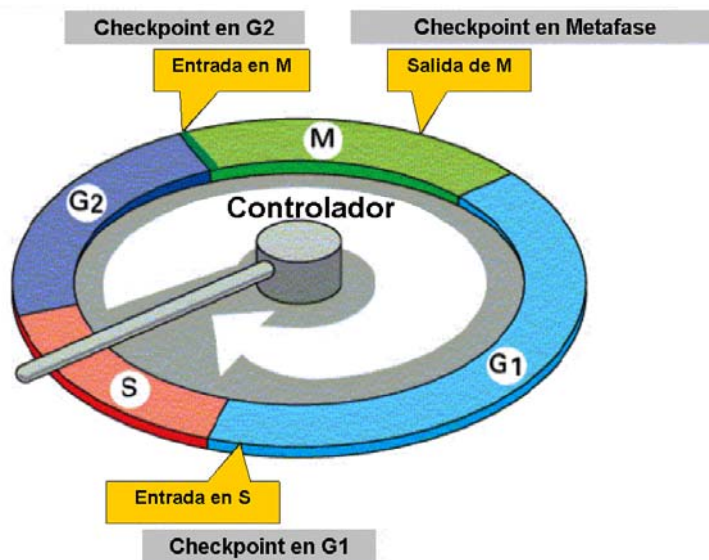


Figura 7. Puntos de restricción del ciclo celular (checkpoints).

El punto de restricción en G1/S previene una posible entrada prematura a la fase S (Machida *et al.*, 2005; Machida and Dutta, 2005). De esta forma se evita la replicación de posibles mutaciones del material genético. En este punto la célula puede detenerse, bloqueando su crecimiento pero manteniéndose metabólicamente activa. Si no pudiesen salvarse los defectos la célula podría inducir el programa de muerte celular. La fase de mitosis no puede ser iniciada

hasta que no se haya completado correctamente la replicación del DNA, lo cual es confirmado en el punto de restricción G2/M. En este punto existen elementos de detección de inmadurez celular que inducen a la muerte por apoptosis cuando la célula no está capacitada para iniciar la mitosis. Hacia el final de la fase M existe otro punto de control. El DNA ha de ser replicado sólo una vez por cada ciclo celular y existen mecanismos que previenen una nueva replicación hasta que la célula haya completado la mitosis. Sin embargo, en el caso de que ocurriera una nueva replicación, las proteínas de restricción (checkpoint proteins) podrían causar que la célula se detenga entre las fases G2/M (Figura 7).

La transición del ciclo celular y el paso de una fase a la siguiente se encuentran estrictamente controlados por las activaciones sucesivas de diferentes complejos proteicos, compuestos por ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDKs, cyclin-dependent kinase). A su vez, la inhibición de estas proteínas provoca que la célula se detenga en los puntos de restricción del ciclo. Proceso que involucra a las proteínas inhibidoras de las ciclinas dependientes de quinasas (CKIs) (MacLachlan *et al.*, 1995).

La concentración de las CDKs es relativamente estable, mientras que la concentración de las diferentes ciclinas oscila a lo largo del ciclo celular. Una vez activadas las CDKs fosforilan otras proteínas, de esta forma cumplen su función en determinado momento del ciclo celular. La concentración de los complejos proteicos varía de acuerdo al momento de la fase en que se encuentre la célula, estos niveles determinarán el paso o la progresión de las diferentes fases del ciclo.

En la fase temprana de G1 están presentes en mayor concentración las ciclinas D y E. La concentración de la ciclina A se incrementará

gradualmente a medida que avance la fase G1. La unión de esta ciclina con CDK2 determinará la entrada a la fase S. El complejo ciclina A-CDK2 ayudará a mantener la replicación del material genético a través de la activación de los puntos de replicación del DNA (Stillman, 1996). Por otro lado hacia el final de la fase S aumentará la concentración del complejo ciclina A-CDK1, lo que servirá de señal para iniciar la fase G2. La fase M es iniciada y controlada por el complejo ciclina B-CDK1 (Alberts et al., 1994; Morgan, 1995).

2. Radicales Libres, Estrés Oxidativo y Antioxidantes

En 1985 Cerrutti postuló que la aparición de un estrés oxidativo en las células podía tener efectos estimuladores en la proliferación de células tumorales (Cerutti, 1985). En la actualidad se sabe que concentraciones bajas de agentes oxidantes estimulan la proliferación celular (Fierani *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1996), mientras que concentraciones progresivamente más altas inducen apoptosis (Slater *et al.*, 1995) o necrosis (Dyrburt *et al.*, 1994).

2.1. Concepto de radical libre y especies activadas.

Un radical libre es una especie atómica o molecular que posee, al menos, un electrón desapareado, que se representa por un punto (•). La presencia de electrones desapareados hace que estas especies sean muy reactivos, por lo que su vida media es extremadamente corta (Simic and Taylor, 1988). Un radical se puede generar por ganancia o pérdida de un electrón o por rotura homolítica de un enlace covalente. La ganancia de un electrón es un proceso mucho

Introducción

más común en un sistema biológico que la rotura homolítica, que requiere energía una elevada procedente de altas temperaturas, luz UV o radiación ionizante (Cheeseman and Slater, 1993).

Se puede encontrar un gran número de especies derivadas del oxígeno que pueden ser muy reactivas o bien pueden ser capaces de dar lugar a estas especies reactivas. Teniendo en cuenta que algunas especies son auténticos radicales libres (como el radical hidroxilo, HO•), mientras que otras no lo son (como el peróxido de hidrógeno, H₂O₂), es posible que el término más adecuado para denominarlas sea el de especies activadas de oxígeno (Halliwell, 1994). Sin embargo, el término más extendido es el de especies reactivas de oxígeno (Reactive oxygen species, ROS) (Halliwell and Gutteridge, 1989; Go and Jones, 2008) (Tabla 1).

Especie	Símbolo
Radical superóxido	O ₂ •
Radical hidroperóxido	HO ₂ •
Peróxido de hidrógeno	H ₂ O ₂
Radical hidroxilo	HO•
Radical alcóxido	RO•
Radical peróxido	ROO•

Tabla 1. Principales especies activadas de oxígeno.

Dentro de las especies activadas del oxígeno el radical ión superóxido (O₂-•), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el radical hidroxilo (HO•), son las especies de mayor importancia en los sistemas biológicos. Además de las especies activadas de oxígeno también existen especies activadas de nitrógeno, de azufre, radicales libres centrado en el carbono, etc.

2.1.1. Génesis de especies oxidantes en las células.

Las especies activadas pueden tener un origen endógeno o exógeno (Freeman and Crapo, 1982; Frei, 1994). Algunas de ellas surgen a partir de reacciones secundarias no deseadas entre las biomoléculas o en la detoxificación de xenobióticos, pero otras especies activadas se generan *in vivo* con un fin determinado (Halliwell, 1991). El origen exógeno de las especies oxidantes se halla relacionado con la acción de radiaciones ionizantes, con las situaciones de hiperoxia o con distintos xenobióticos como es el caso de muchos agentes antineoplásicos y anestésicos, el humo del tabaco o los pesticidas, por ejemplo.

En el organismo se originan multitud de procesos en los que se generan especies oxidantes. En ocasiones, estas reacciones tienen como fin la generación de dichas especies, como es el caso del papel que desempeñan los fagocitos activados en la respuesta inmune, que producen O_2 y H_2O_2 (Babior, 1978). Sin embargo, existen multitud de reacciones en las que la génesis de estas especies reactivas responde a productos colaterales de las mismas. Así ocurre en la oxidación directa de moléculas por el oxígeno (Fridovich, 1986; Fridovich, 1989), en la acción de diversas enzimas, o en situaciones de hipoxia/re-oxigenación, etc. (Granger *et al.*, 1981; Saugstad, 1990). También son productores de especies oxidantes los sistemas de transporte electrónico del retículo endoplásmico (Dolphin, 1988; Foster and Estabrook, 1993) y los microsomas o peroxisomas (Boveris *et al.*, 1972; Philpot, 1991). En circunstancias normales, la principal fuente de radicales libres y especies oxidantes en las células es la fuga de electrones hacia el oxígeno molecular de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Cadenas *et al.*, 1977).

2.1.2. La mitocondria como productor de agentes oxidantes.

La mitocondria es el mayor centro productor de especies oxidantes del organismo (Rickwood et al., 1987; Orrenius et al., 2007; Kakkar and Singh, 2007; Navarro and Boveris, 2007). Esta producción mitocondrial de especies oxidantes (Figura 8) es, principalmente responsabilidad de la cadena de transporte electrónico (Frei, 1994). En la mitocondria se pueden producir tanto especies reactivas del nitrógeno ($\text{NO}\bullet$ por la acción de la NOS mitocondrial) (Ghafourifar and Richter, 1997), como especies reactivas del oxígeno (H_2O_2 y $\text{O}_2\bullet$) (Lenaz, 2001). Además, en la membrana mitocondrial externa se produce H_2O_2 por la acción de monoamino oxidasas que catalizan la desaminación oxidativa de distintas aminas biógenas (Cadenas and Davies, 2000).

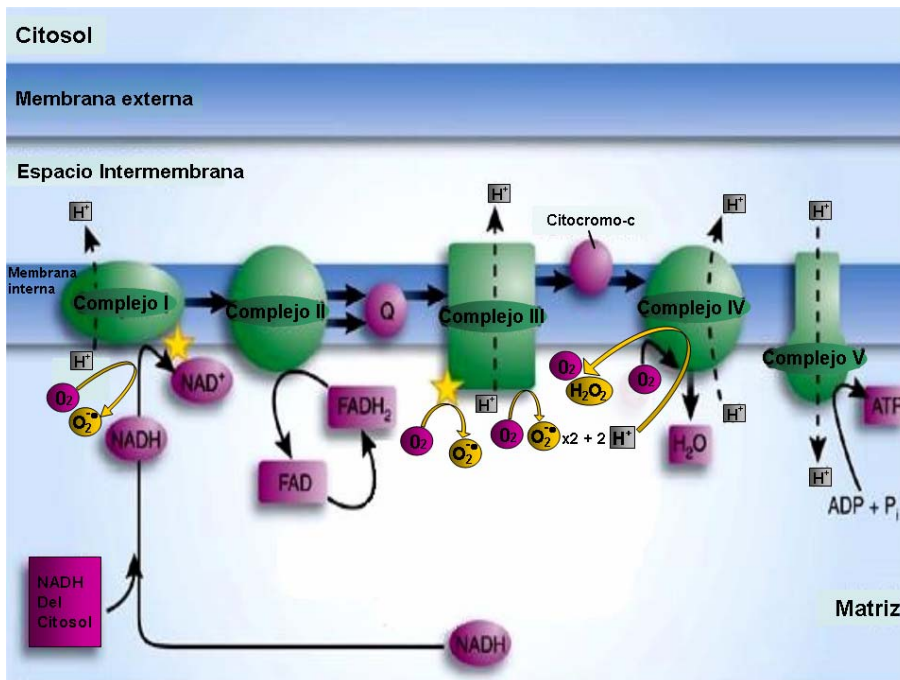


Figura 8. Esquema de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y los puntos de formación de especies reactivas del oxígeno.

En la cadena respiratoria mitocondrial (Figura 8), hay fugas de electrones que no llegan al complejo IV (citocromo-c oxidasa) y que producen reducciones parciales del oxígeno (Cadenas *et al.*, 1977; Frei, 1994). Por ejemplo, aunque los complejos I y III son considerados como los mayores productores de superóxido en la mitocondria, existen pruebas que señalan al complejo II como otro centro productor de superóxido (Cadenas and Davies, 2000). Por el contrario, el citocromo a_3 del complejo IV retiene fuertemente todos los intermediarios del oxígeno parcialmente reducido unidos a su centro activo, hasta que el O_2 es reducido completamente a H_2O (Benzi and Moretti, 1995). Por tanto, la citocromo c oxidasa no produce este radical y, además, exhibe cierta actividad superóxido dismutasa (Markossian *et al.*, 1978; Papa *et al.*, 1997).

La producción mitocondrial de especies activadas de oxígeno aumenta cuando el aporte de sustratos a la cadena respiratoria excede la demanda energética, es decir, cuando el cociente ATP/ADP es alto. En estas condiciones, aumentan la presión parcial de O_2 y el grado de reducción de los transportadores redox de los complejos I, II y III, con el incremento consiguiente en la producción de especies activadas de oxígeno (Brand and Murphy, 1987; Skulachev, 1996).

2.2. Estrés oxidativo.

El estrés oxidativo se puede definir como una alteración del equilibrio entre agentes pro-oxidantes y agentes antioxidantes, en favor de los primeros (Sies, 1986). El estrés oxidativo puede deberse a un exceso de agentes pro-oxidantes, a una deficiencia de agentes antioxidantes o a ambos factores a la vez.

Los agentes pro-oxidantes producen daño oxidativo a las distintas biomoléculas, esto es, a los lípidos, a las proteínas, a los ácidos nucleicos y a los glúcidos. El daño oxidativo a los lípidos de membrana constituye un factor importante en la disminución de la fluidez de las membranas (Shigenaga *et al.*, 1994). Por su parte el daño oxidativo en las proteínas puede dar lugar a un cambio conformacional y, por tanto, a una pérdida o modificación de la función biológica (Stadman, 1992; Davies, 1987). El daño al DNA por radicales libres puede ocurrir por reacción con los residuos desoxirribosa o con las bases del DNA. En el primer caso el daño no es crítico para la célula siempre y cuando se rompa sólo una de las hebras del DNA. Esto permitirá actuar a las enzimas reparadoras (Breen and Murphy, 1995). Por su parte, la reacción con las bases del DNA es más habitual que la ruptura de las cadenas. Como resultado se forman radicales de las bases, las cuales sufren diversas reacciones que originan productos finales muy variados. La oxidación de la desoxiguanosina a 8-oxoguanosina es una de las lesiones más frecuentes y reviste gran importancia por su alto efecto mutagénico (Fraga *et al.*, 1990; Shibutani *et al.*, 1992; Tchou and Grollman, 1993).

2.3. Antioxidantes fisiológicos.

Los seres vivos han desarrollado sistemas de defensa frente a la agresión por especies oxidantes. Cuando los agentes oxidantes superan la capacidad de las defensas antioxidantes se produce un daño oxidativo (Sies, 1986). Los sistemas antioxidantes pueden dividirse en dos grandes grupos: los antioxidantes enzimáticos y los no enzimáticos.

2.3.1. Sistemas antioxidantes enzimáticos.

El grupo de los antioxidantes enzimáticos comprende aquellas enzimas que tienen como función la protección antioxidante.

Superóxido dismutasas. Su función fisiológica es la eliminación de los radicales superóxido producidos en las reacciones del metabolismo aerobio (McCord and Fridovich, 1969; McCord *et al.*, 1974), por lo que esta presente en todas las células aerobias pero ausentes en las células anaerobias obligatorias. Hay descritas cuatro isoformas (Tabla 2) que difieren en el lugar de la célula en el que se encuentran (Fridovich, 1974).

Isoforma	Ubicación
Cu-Zn SOD	Citosol; espacio intermembra mitocondrial
Mn SOD (2 tipos)	1) Matriz mitocondrial
	2) Bacterias (Vance <i>et al.</i> , 1972)
Fe SOD	<i>Escherichia coli</i> (Yost and Fridovich, 1973)

Tabla 2. Principales especies activadas de oxígeno.

La actividad superóxido dismutasa cumple un papel fundamental en la defensa antioxidante ya que aproximadamente el 2% del oxígeno que consumimos se transforma, en la cadena de transporte electrónico mitocondrial, en radical superóxido (Boveris and Chance, 1973; Chance *et al.*, 1979). A pesar de que el radical superóxido es inestable en medio acuoso y espontáneamente se dismuta, la velocidad de dismutación no enzimática es relativamente baja en comparación con la reacción catalizada por la superóxido dismutasa, que incrementa esta velocidad unas 10.000 veces (Fridovich, 1974).

Catalasas. Son un conjunto de hemoproteínas tetraméricas que catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular (Aebi, 1984). Intracelularmente se encuentran especialmente en los peroxisomas, probablemente para eliminar el H_2O_2 generado por las oxidasas localizadas en estos orgánulos (Halliwell, 1996).

Glutación peroxidasa. Son las principales enzimas eliminadoras de peróxidos alquílicos y de peróxido de hidrógeno (Halliwell, 1996). Hay dos tipos de glutatión peroxidasa y ambas requieren glutatión reducido como dador de equivalentes reductores:

- **Glutación peroxidasa selenio dependiente:** Proteína tetramérica, con cuatro átomos de selenio, que cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos. Su centro activo contiene una cisteína en la que el azufre ha sido sustituido por selenio (Forstrom *et al.*, 1978). Su actividad se ve muy afectada por el contenido en selenio de la dieta (Ketterer, 1986).
- **Glutación peroxidasa no selenio dependiente:** sólo tiene actividad frente a peróxidos orgánicos. La mayor parte de la actividad glutatión peroxidasa se encuentra en el citosol, aunque también está presente en la matriz mitocondrial (Ketterer, 1986).

2.3.2. Sistemas antioxidantes no enzimáticos.

Los antioxidantes no enzimáticos son aquellas moléculas que pueden reaccionar directamente con las especies activadas de oxígeno o del nitrógeno o bien con los productos de reacción de estas, sin que sea necesaria ninguna intervención enzimática. Entre

los más importantes a nivel fisiológico destacan: el glutatión, la vitamina C, la vitamina E, los β -carotenos o el ácido úrico.

La compartimentalización celular de los antioxidantes, especialmente del glutatión, es importante porque muchas de las especies oxidantes son muy reactivas y reaccionan preferentemente con aquellos componentes celulares cercanos a los lugares de generación de las mismas (Sastre *et al.*, 1996).

2.4. El glutatión

El glutatión (Figura 9) es el tiol no proteico más abundante en las células de mamíferos (Hopkins, 1929; Sies, 1999). Este tripéptido (γ -glutamil-cisteinil-glicina) desempeña diversas funciones metabólicas de gran importancia, sobre todo relacionadas con la protección antioxidante de las células (Viña, 1990).

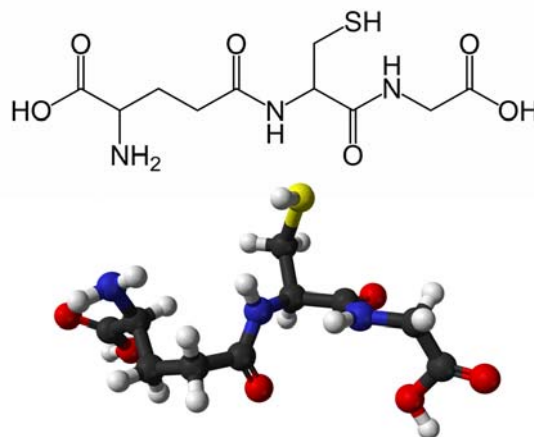


Figura 9. Estructura química y representación en 3D del glutatión (γ -glutamil cisteinil glicina).

Introducción

Muchas de sus funciones fisiológicas se deben a la presencia del grupo tiol (-SH) de la cisteína, que es el grupo activo que participa en las reacciones redox del glutatión y a la existencia del enlace γ -peptídico, que lo hace insensible a las peptidasas habituales de la célula. Este enlace sólo es hidrolizable por la enzima γ -glutamil transpeptidasa situada en la membrana celular (Viña *et al.*, 1990). Por todo esto el glutatión puede ejercer su papel protector cuando se presenta en su forma reducida (GSH). A su vez, dos moléculas de GSH pueden oxidarse cediendo un electrón cada una y combinándose entre sí dando lugar la forma disulfuro (GSSG).

El glutatión puede desempeñar su papel antioxidante mediante dos mecanismos distintos. En el primero puede reaccionar directamente, sin intervención enzimática, con radicales libres y detoxificarlos (Kosower and Kosower, 1978). De esta forma el glutatión participa en reacciones redox monoelectrónicas que dan lugar a una molécula de glutatión oxidado (GSSG), compuesto por dos moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro entre las dos cisteínas. En el segundo mecanismo la acción antioxidante del glutatión tiene lugar cuando GSH reacciona frente a un agente pro-oxidante mediante la intervención de las enzimas glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa (Sies *et al.*, 1978; Akerboom *et al.*, 1982). La acción coordinada y conjunta del glutatión con estas enzimas se conoce como el ciclo redox del glutatión (Halliwell, 1996) y constituye uno de los mecanismos más efectivos de protección contra el estrés oxidativo (Figura 10).

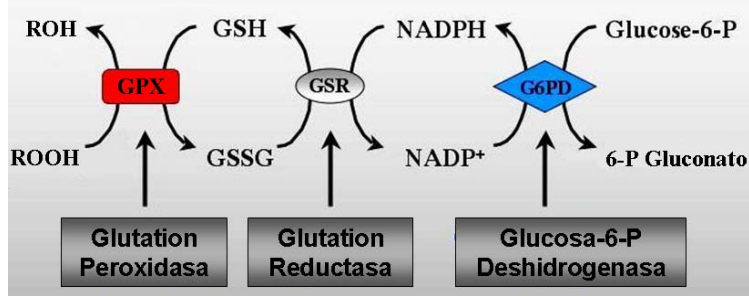


Figura 10. Ciclo redox del glutatión. Enzimas del ciclo: (1) glutatión peroxidasa; (2) glutatión reductasa; (3) glucosa 6-P deshidrogenasa.

El conjunto de las reacciones que participan en la síntesis y degradación del glutatión constituyen el llamado ciclo del γ -glutamilo (Meister and Anderson, 1983). La biosíntesis de glutatión se caracteriza por estar regulada por retroalimentación (Richman and Meister, 1975).

El glutatión es sintetizado a partir de los aminoácidos L-cisteína, L-glutamato y glicina. La síntesis se realiza en dos pasos dependientes de ATP. En primer lugar, se sintetiza gamma-glutamilcisteína a partir de L-glutamato y cisteína, mediante la enzima gamma-glutamilcisteína sintetasa (glutamato cisteína ligasa, GCL). Esta reacción es el paso limitante en la síntesis del glutatión. En segundo lugar, la glicina se añade al terminal C de la gamma-glutamilcisteína mediante la enzima glutatión sintetasa.

La glutamato cisteína ligasa (GCL) compuesta por una subunidad catalizadora (GCLC) y otra moduladora (GCLM). La GCLC lleva a cabo toda la actividad enzimática, mientras que la GCLM aumenta la eficiencia catalítica de la GCLC. Los ratones que carecen de GCLC (es decir, de la síntesis de novo de glutatión) mueren antes de nacer. Los ratones que carecen de GCLM no muestran ningún fenotipo

exterior, sino una marcada disminución de GSH y una mayor sensibilidad a los tóxicos.

Entre las funciones del glutatión reducido (GSH), además de la protección celular frente al estrés oxidativo (Sies, 1986), se encuentra el mantenimiento del estatus tiólico de la membrana celular (Kosower and Kosower, 1983). Esta función resulta especialmente importante en las mitocondrias, ya que al carecer de catalasa dependen exclusivamente del GSH y de la glutatión peroxidasa para la detoxificación de peróxidos (Reed, 1990). El GSH mitocondrial procede del citosol, al no poseer las mitocondrias las enzimas necesarias para su síntesis (Griffith and Meister, 1985).

Este tripéptido constituye en si mismo un reservorio de cisteína para la célula (Tateishi *et al.*, 1974) y tiene la propiedad de mantener el estado redox, tioles/disulfidos, de la célula (Viña *et al.*, 1983). Además, también participa en la detoxificación de xenobióticos (Orrenius and Moldeus, 1984), en la síntesis de DNA (Holmgren, 1979), en los procesos de captación de aminoácidos en algunos tejidos (Viña *et al.*, 1989), en la regulación de la síntesis y degradación de proteínas (Van Caneghem, 1972; Ochoa, 1983), en la modulación de actividades enzimáticas (Ernst *et al.*, 1978; Ziegler, 1985; Pajares *et al.*, 1992), en la homeostasis del calcio (Bellomo *et al.*, 1982), controla el ensamblaje del citoesqueleto (Burchill *et al.*, 1978) y en la regulación de la proliferación celular (Terrádez *et al.*, 1993).

2.4.1. Papel del glutatión como nexo de unión entre el estrés oxidativo y la proliferación celular.

Desde hace unos años se plantea un papel más amplio del estrés oxidativo en las funciones vitales de la vida de la célula, por ejemplo,

en la proliferación celular así como en la determinación de la apoptosis (Halliwell, 2007). En la actualidad se ha dado más cabida a la idea de que las especies reactivas del oxígeno no sólo causan el consabido daño celular si no que cumplen un papel importante mediando la señalización de las vías de promoción del crecimiento celular.

Algunos trabajos demuestran que a través de un estímulo oxidativo, por ejemplo, con O_2^{\bullet} o H_2O_2 , es posible activar las vías de señalización que desencadenan la proliferación celular (Oberly *et al.*, 1981). Las células son capaces de exhibir una amplia respuesta al estrés oxidativo, esta respuesta dependerá en última instancia de la intensidad de dicho estrés. Por ejemplo, niveles bajos H_2O_2 inducen una respuesta mitogénica y estimulan la proliferación celular (Davies, 1999). Por otra parte, el incremento gradual de la concentración de oxidantes causa una detención del ciclo celular, efecto que se vuelve permanente si se mantiene el incremento progresivo de los oxidantes. Cuando se utilizan altas concentraciones de H_2O_2 , la célula entra en apoptosis e incluso, las concentraciones excesivamente altas, pueden inducir la muerte por necrosis.

Se ha demostrado que existe una relación causal entre los cambios redox y el control del crecimiento celular (Pani *et al.*, 2000). En las células proliferativas los niveles bajos de ROS en el medio, no sólo estimulan la proliferación además son necesarios para que se produzca la correcta señalización mitogénica. Más aún, los eventos tempranos de oxidación en la fase G1 podrían constituir un evento regulador crítico en la entrada a la fase S, por parte de la célula proliferativa (Menon *et al.*, 2003).

Desde hace unos años se ha desarrollado un modelo de ciclo redox dentro del ciclo celular, el cual explica la intervención de los ROS en

Introducción

la señalización del ciclo celular (Figura 11; Menon and Goswami, 2007). De acuerdo con este modelo, los cambios transitorios en los niveles de ROS podrían modificar el estado redox las proteínas reguladoras del ciclo celular, en sus residuos críticos de cisteína y así determinar el progreso o detención de la proliferación. Por su parte los mecanismos antioxidantes se encargarían de eliminar los ROS y revertir dicho proceso.

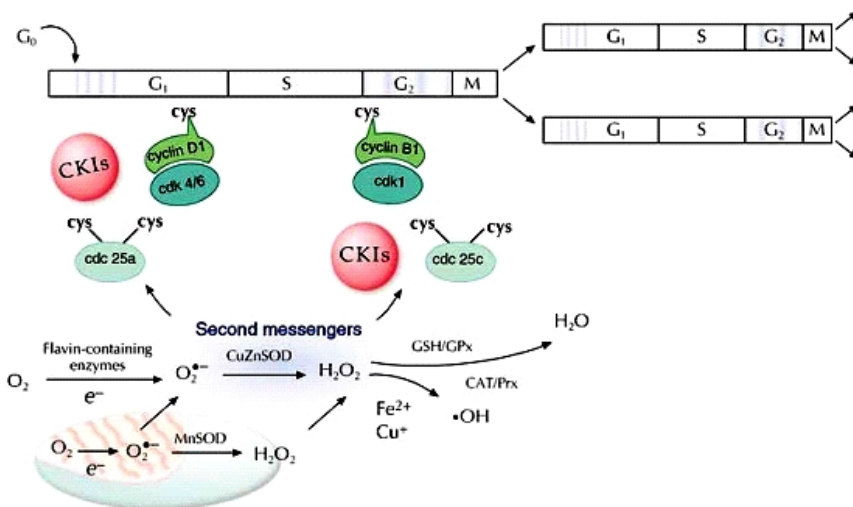


Figura 11. Modelo de ciclo redox dentro del ciclo celular, intervención de los ROS en la señalización del ciclo celular (Menon and Goswami, 2007).

Dentro del mencionado modelo, las células cancerígenas producirían mayor cantidad de radicales libres, de esta manera se induciría una respuesta de la defensa antioxidante de dichas células, lo que llevaría a un estado pro-oxidante en las mismas. Sin embargo, el estrés oxidativo generado en estas células, con alta capacidad proliferativa, no excedería el nivel en el cual el daño oxidativo se convierte en severo, causando así perjuicio a la célula. Dado que el

estrés oxidativo se perfila como un modulador del crecimiento celular, se plantea desde hace unos años la posibilidad de involucrarlo en futuras terapias de tratamiento del cáncer (Halliwell, 2007).

El glutatión celular (GSH) es considerado como esencial para la supervivencia tanto de las células de mamíferos (Viña, 1990) como de levaduras (Viña *et al.*, 1978). Muestra una extensa localización dentro de la célula y una considerablemente alta concentración tanto en células como en tejidos (Tateishi *et al.*, 1974).

Desde hace varios años se ha suscitado un creciente interés en la implicancia de los ROS y el glutatión en las vías de señalización celular, así como en la importancia del estatus oxidativo y el ambiente redox celular en los procesos fisiológicos. De hecho se ha llegado a plantear una posible vinculación entre el estrés oxidativo y la proliferación celular, donde los ROS cumplirían una función de señalización y regulación (Cotgrave and Verdes, 1998). Es por ello que algunos autores han propuesto redefinir al estrés oxidativo en términos de la disrupción del control y de la señalización redox (Jones, 2006).

Numerosos estudios han asociado cambios en los niveles de bajo peso molecular con la regulación del crecimiento celular (Harris and Patt, 1969; Post *et al.*, 1983; Wolf *et al.*, 1987). En esta línea de trabajo, se ha demostrado que la disminución de la biosíntesis de GSH *in vivo* inhibe la tasa de crecimiento en células tumorales (Kosower and Kosower, 1978). Incluso, se ha llegado a sugerir que el GSH podría alcanzar niveles críticos antes de la iniciación de la proliferación y que la variación en los niveles del estatus redox de las proteínas sulfidrilos, podría estar directamente relacionada con la regulación del crecimiento celular (Atzori *et al.*, 1990).

Introducción

A través de las determinaciones del estatus redox celular por medio de la proporción de glutatión (GSH)/glutatión disulfuro (GSSG), se ha demostrado que cada fase del ciclo celular puede caracterizarse por un estado redox determinado (Jones, 2006). Por ejemplo, las células en proliferación se encuentran en un estado más reducido (Scanner and Buettner, 2001), cuando detiene el crecimiento en favor de la diferenciación (Nkabyo et al., 2002) o a causa de la inhibición por contacto (Schafer and Buettner, 2001), la célula se encuentra más oxidada. Mientras que en los procesos de apoptosis las células presentan un estado más oxidado (Sun and Oberley, 1996).

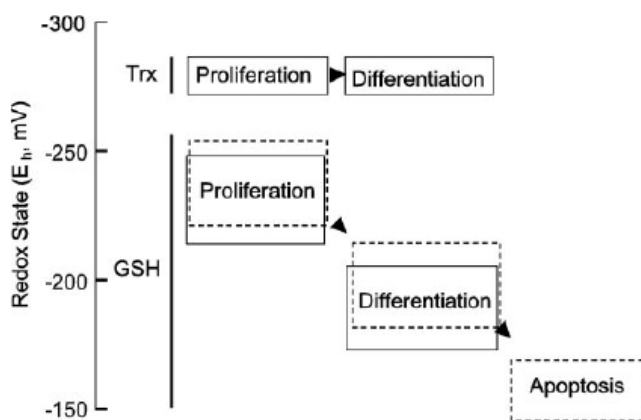


Figura 12. Cambios en el estado redox celular asociados con el estado de crecimiento (Nkabyo et al., 2002).

A medida que la células atraviesa diferentes estados, que van desde la proliferación, la inhibición por contacto, la diferenciación y finalmente la apoptosis, se produce una transición desde un estado redox celular más reducido a un estado más oxidado (Figura 12). Dada la universalidad de dicho modelo, el cual ha sido aplicado en diferentes tipos celulares de diferentes organismos, se ha planteado

una hipótesis que sostiene la implicación y función de los tioles y disulfuros como nano-interruptores celulares (nano-switches) (Schafer and Buettner, 2001). Es decir que la proporción de GSSG/2GSH cumpliría una función de operador, encargado de movilizar la célula desde un estado proliferativo, a través de la diferenciación y hacia la muerte celular programada, en caso de no poder mantenerse el estatus redox celular, o incluso hacia la necrosis si se produjera un daño severo.

Por otra parte, en las dos últimas décadas se ha incrementado la evidencia que sugiere que numerosos factores de transcripción sufren modificaciones oxidativas que son necesarias para su activación. Por ejemplo AP1, NFkB, p53 y SP1 dependerían del estatus redox de las cisteínas de sus tioles estructurales (Sun and Oberly, 1996). La glutationilación es una modificación que se produce en las proteínas y que consiste en la unión covalente del tripéptido GSH al grupo SH del residuo de cisterna. En este marco conceptual, adquiere especial relevancia la idea de que la glutationilación de proteínas cumpliría un importante papel como mecanismos de regulación de la proliferación celular (Pineda-Molina *et al.*, 2001; Giustarini *et al.*, 2004; Reynaert *et al.*, 2006; Dalle-Donne *et al.*, 2007).

2.5. Papel del estrés oxidativo en la apoptosis.

Un gran número de las especies oxidantes, especialmente aquéllas producidas en la mitocondria, participan activamente en los procesos de muerte celular. Las especies oxidantes son susceptibles de modificar ciertas biomoléculas afectando y/o regulando su actividad biológica, pero también pueden intervenir en los procesos de transducción de señal que regulan la respuesta apoptótica, así como

en las fases efectoras o de inducción de la muerte celular (Fleury *et al.*, 2002).

La generación de altos niveles de especies oxidantes es considerada como un acontecimiento apoptótico conservado evolutivamente (Zamzami *et al.*, 1995). Incluso en modelos donde la muerte celular no es inducida a través de especies oxidantes, se observa un aumento en el daño oxidativo tanto en proteínas como en lípidos (Buttke and Sandstrom, 1994).

A nivel celular tiene especial importancia la producción mitocondrial de especies oxidantes. En este sentido, parece generalizada la opinión de que cuando éstas se producen en gran cantidad la célula es dirigida hacia una muerte de tipo necrótica, tanto por la inhibición de la síntesis de ATP como por la inhibición de la actividad de las caspasas. Mientras que, cuando la cantidad de especies oxidantes producidas por la mitocondria no es tan elevada, el tipo de muerte celular suele ser de tipo apoptótica.

De un modo general, puede establecerse un modelo de apoptosis inducida por agentes oxidantes en el que, al actuar éstos sobre la mitocondria, se afectan los componentes de la cadena de transporte electrónico, se promueve así una disminución en el potencial de membrana mitocondrial y una pérdida de control de la permeabilidad de esta organela, que llevará a la muerte celular (Fleury *et al.*, 2002).

Por otra parte, la producción mitocondrial de especies oxidantes, es un elemento clave en los procesos de muerte celular. Cuando las especies oxidantes producen una disfunción mitocondrial, al inhibir la respiración celular, ocasionan una disminución de la síntesis de ATP y un aumento en la producción de especies oxidantes en la cadena de transporte electrónico. De esta forma, el metabolismo mitocondrial entra en un círculo vicioso que finaliza con es la pérdida del control

sobre la permeabilidad mitocondrial y la destrucción dicha organela y finalmente de la célula (Hentze *et al.*, 2003). Como se ha comentado anteriormente, dependiendo de la severidad de la disfunción mitocondrial, el tipo de muerte celular se producirá según un patrón de tipo apoptótico o de tipo necrótico.

Además, las sustancias oxidantes estimulan la síntesis y actividad del sistema Fas/FasL (Dumont *et al.*, 1999; Miñana *et al.*, 2002) y modulan la actividad de factores de transcripción, que una vez activados pueden inducir la expresión de genes pro-apoptóticos o inhibir la expresión de genes relacionados con proteínas inhibitoras de la respuesta apoptótica (Pinkus *et al.*, 1996).

Uno de los procesos biológicos íntimamente relacionados con el estrés oxidativo durante la apoptosis es la depleción de las defensas antioxidantes, especialmente del glutatión. Según el modelo experimental de inducción de apoptosis y el tipo celular, la depleción del glutatión es considerada como un fenómeno primario o secundario en relación con el aumento de producción de especies oxidantes (Buttke and Sandstrom, 1994).

Por otro lado, la compartimentación de GSH constituye un fenómeno de relevancia, por ejemplo cumple un rol de vital importancia en la detoxificación celular. Los tumores con mayor nivel de glutatión son los más resistentes a la quimioterapia. Siendo especialmente importantes en estos casos, la compartimentación del GSH en el núcleo y la mitocondria (Voehringer *et al.*, 1998; Benlloch *et al.*, 2005).

El GSH es sintetizado principalmente en el citosol (Griffith and Meister, 1985; McKernan et al., 1991) y luego se transporta al núcleo, la mitocondria o el retículo endoplasmático, donde realiza principalmente funciones antioxidantes. La concentración de GSH

citosólico dependerá, no solo de la tasa de síntesis y degradación, también del flujo a través de la membrana plasmática (Hinchman and Ballatori, 1990; Linsdell and Narran, 1998; Laberge et al., 2007).

La depleción del pool mitocondrial de GSH resulta un acontecimiento clave en la respuesta apoptótica, ya que implica a la fisiología mitocondrial y compromete la obtención de energía por parte de la célula, lo que desencadena el destino fatal de toda la economía celular. Considerándose que la depleción del pool mitocondrial de GSH es un acontecimiento efector pero no desencadenante de la apoptosis (Fleury *et al.*, 2002). Dado que la mitocondria es la principal fuente de ROS celular, es prioritario el mantenimiento de niveles altos de GSH dentro de la mitocondria.

Durante la respuesta apoptótica se observa una depleción en los niveles de GSH, depleción que parece ser debida a una redistribución del mismo, siendo el pool de GSH nuclear el más resistente (Kagan *et al.*, 2002).

3. Relación entre el núcleo y la mitocondria

La comunicación entre la mitocondria y el núcleo es importante a diferentes niveles. Por un lado, esta comunicación es necesaria para el correcto funcionamiento de la mitocondria. Ciertos mecanismos celulares involucran un grupo de factores de transcripción o co-activadores, que regulan la expresión de genes nucleares y mitocondriales en respuesta a estímulos externos tales como consumo calórico o ejercicio, o cambios en los niveles de ciertas hormonas. En estos mecanismos se produce un cambio en el programa de activación de genes que se traducirá en la activación de

la mitocondria a fin de lograr la síntesis y reclutamiento de proteínas mitocondriales y no-mitocondriales, de esta forma la célula será capaz de adaptarse a las variaciones del medio.

A pesar de que la mitocondria cuenta con su propio genoma, la mayoría de las enzimas y proteínas que residen en la membrana mitocondrial son productos de genes nucleares (Cummins, 1998). En las células eucarióticas la estrecha colaboración entre el producto derivado del genoma nuclear y mitocondrial permite el ensamblaje y funcionalidad de los diferentes componentes mitocondriales (Poyton and McEwen, 1996).

Dado que la mitocondria ocupa un papel central en la señalización de la apoptosis, parte de su función consiste en integrar señales provenientes de otras organelas. Este cruce de información es fundamental en la determinación del destino celular (Kroemer *et al.*, 2007).

Otro grupo de mecanismos involucra la respuesta celular a los cambios propios del funcionamiento mitocondrial. Por ejemplo, cambios debidos a la caída del potencial electroquímico (desacoplamiento) que podrían causar una disfunción mitocondrial, desencadenan una serie de procesos que le permiten a la mitocondria responder ante estas situaciones de estrés mitocondrial. La mitocondria es una organela rodeada por una doble membrana, de las cuales la membrana interna es impermeable, con un flujo constante de proteínas y metabolitos a través de canales y transportadores específicos. El sistema de transporte mitocondrial es altamente regulado, de esta manera cualquier perturbación producida en la mitocondria puede desencadenar una amplificación de la señalización al núcleo. Estas señalizaciones podrían mediar cambios de metabolitos o flujo de iones o cambios estructurales de la propia

organela (por ejemplo los cambios de homeostasis en la fusión y fisión) (Ryan *et al.*, 2007).

Deficiencias en la respiración mitocondrial, debidas al envejecimiento o situación de estrés, inducen a la mitocondria a producir energía para afrontar las necesidades celulares. Este requerimiento energético es dirigido a reparar y eliminar el daño celular. Algunas señales, como el H₂O₂, son transmitidas al núcleo con el objeto de detener la proliferación celular e inducir la proliferación mitocondrial y amplificación del DNA mitocondrial, para obtener así mayor cantidad de mitocondrias funcionales (Suzuki *et al.*, 1998). Una vez el daño haya sido debidamente reparado o eliminado, la células podría reiniciar las fases del ciclo celular y continuar así con el crecimiento normal. Sin embargo, cuando el daño es persistente o no es posible repararlo, la mitocondria podría interpretar e integrar las señales de estrés extracelulares o extramitocondriales e iniciar la cascada de señalización que llevaría irremediablemente al proceso de muerte celular. En este marco, los ROS juegan un importante papel en la señalización entre la mitocondria y el núcleo (Lee and Wei, 2005).

Los cambios en la función mitocondrial inducidos por alteraciones del estado redox o de la homeostasis del calcio, pueden incrementar la comunicación entre la mitocondria y el núcleo. La intensidad y el tiempo de exposición a situaciones de estrés oxidativo producen distintos tipos de respuesta celular. Un estrés oxidativo moderado podría incrementar la abundancia de las mitocondrias así como el contenido de DNA mitocondrial. Sin embargo, la exposición prolongada en condiciones de estrés oxidativo podría provocar un daño severo o incluso agravar los daños provocados por el estrés asociado al envejecimiento o a enfermedades o incluso podría perturbar la respuesta celular a dicho daño (Lee and Wei, 2005).

Es probable que la morfología mitocondrial sea un elemento clave en la comunicación entre el núcleo y la mitocondria (Ryan *et al.*, 2007). Cada célula de mamífero contiene varios cientos o incluso miles de mitocondrias. El tamaño, la forma y abundancia de estas organelas varía dramáticamente según los diferentes tipos celulares e incluso puede variar en función de los cambios en las demandas energéticas o según las condiciones fisiológicas o ambientales. La cantidad de mitocondrias en las células depende de la biogénesis y división de las organelas. Así mismo esta abundancia es rigurosamente controlada por la acción conjunta del núcleo y la mitocondria (Lee and Wei, 2005).

3.1 Dinámica mitocondrial.

La mitocondria es una organela esencial para las células eucariotas, en los diferentes tipos de tejidos presenta diferencias substanciales en cuanto al número, estructura y función, lo que es un reflejo de la variabilidad de la demanda energética dentro de un organismo (Garesse and Vallejo, 2001). Estas organelas se organizan formando redes mitocondriales y se encuentran en movimiento constante que les permite interactuar con otras mitocondrias (Berreiter-Hahn, 1990; Krendel *et al.*, 1998) o inclusive con otros orgánulos, como el núcleo o el retículo endoplasmático (Hirsuto *et al.*, 1998).

Numerosos estudios demuestran que la morfología y disposición dentro de la célula son aspectos determinantes en la funcionalidad de las mitocondrias. Por ejemplo, la morfología mitocondrial es regulada por procesos dinámicos de fusión y fisión (Chan 2006). El balance entre estos procesos además de determinar la forma y la cantidad de organelas, permite el intercambio de lípidos de membrana y el contenido intramitocondrial. Estos procesos

Introducción

constituyen eventos fisiológicos cruciales para el mantenimiento de una población de mitocondrias sanas por lo que pueden tener consecuencias en el desarrollo, en diferentes tipos de enfermedades y en los procesos de muerte celular.

Múltiples proteínas están involucradas en la remodelación de las membranas mitocondriales (McBride *et al.*, 2006). La fusión mitocondrial es un proceso mediado a través de la acción de al menos tres GTPasas. Las mitofusinas 1 y 2 constituyen parte de la membrana mitocondrial externa y cuentan con dominios expuestos al citosol. Estas proteínas pueden unirse formando homodímeros o heterodímeros, los cuales se pueden formar entre organelas adyacentes. De hecho, se ha sugerido que el extremo carboxilo de estas proteínas sería responsable del amarre de dos organelas lo que provocaría la fusión de las mismas (Ishihara *et al.*, 2004; Griffin and Chan, 2006) (Figura 13).

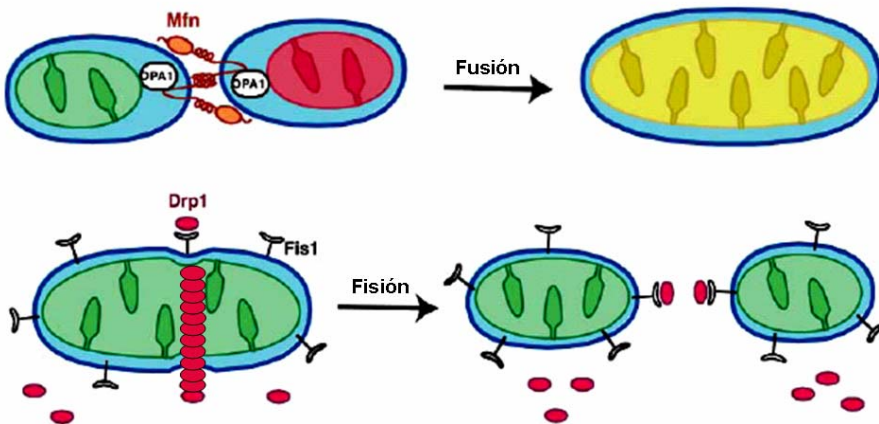


Figura 13. Proteínas involucradas en los procesos de fusión (esquema superior) y fisión (esquema inferior) mitocondrial (Chen and Chan, 2005).

Otra proteína de fusión con actividad GTPasa es OPA1. Esta proteína reside en el espacio intermembrana, donde se asocia a la membrana interna. Se conocen al menos 8 isoformas de OPA1, algunas de las cuales presentan diferente localización. La función de OPA1, dentro de los procesos de fusión mitocondrial, ha sido genéticamente vinculada a la mitofusina 1 (Cipolat *et al.*, 2004).

En relación a la fisión mitocondrial al menos son necesarias dos proteínas en las células de mamíferos, estas son FIS1 y DRP1 (Figura 13). La proteína DRP1 se ubica en la membrana mitocondrial donde oligomeriza, formando una estructura circular alrededor del sitio de fusión. Lugar por donde la organela finalmente se constriñe. Existe un pool citosólico de DRP1, pero una pequeña fracción se ubica en lugares puntuales de la membrana mitocondrial. Por su parte, FIS1 es una proteína transmembrana que se encuentra anclada a la membrana mitocondrial externa por una región C-terminal (Chen and Chan, 2005).

Numerosos estudios señalan que los movimientos de las mitocondrias a lo largo del citosol podrían estar relacionados con el transporte de proteínas entre diferentes subcompartimentos celulares. Proteínas como las de la familia bcl-2 podrían ser transportadas de un compartimento subcelular a otro a través de estas vías de comunicación (Zimmermann *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta que algunos trabajos demuestran que bcl-2 cumple una función importante en el transporte de GSH a través de la membrana mitocondrial y que esta proteína se encuentra tanto en la membrana nuclear como mitocondrial e incluso en el retículo endoplasmático, es posible que cumpla la misma función en el núcleo. Más aún, es factible que el movimiento de las mitocondrias en el proceso de apoptosis se relacione con los fenómenos antes mencionados.

Introducción

La disfunción mitocondrial es crucial en diferentes tipos de enfermedades como las enfermedades neurodegenerativas, la obesidad, etc. (Zorzano *et al.*, 2004). En el marco del presente trabajo sería de relevancia verificar mecanismos de comunicación entre la mitocondria y el núcleo así como la relación entre ambas organelas durante la apoptosis.

OBJETIVOS

Objetivos

OBJETIVOS

Son los objetivos del presente trabajo los siguientes:

El propósito del presente trabajo será dilucidar los mecanismos relacionados con fenómenos nucleares y mitocondriales y el papel del GSH celular en dichos procesos así como la relación con parámetros de estrés oxidativo, en el marco de la resistencia a la apoptosis inducida por el tratamiento con cisplatino (cis-diaminodicloroplatino).

Los objetivos específicos son los siguientes:

1. Estudiar el papel del estrés oxidativo y el glutatión en la secuencia de eventos en el mecanismo de la resistencia a la apoptosis inducida por el cisplatino:
 - Estudiar diferentes parámetros mitocondriales y nucleares, así como parámetros de estrés oxidativo en el modelo propuesto.
 - Analizar variaciones del nivel y la compartimentación del GSH celular en el marco de la resistencia a la apoptosis inducida por el cisplatino.
 - Establecer una secuencia de eventos a partir de los parámetros estudiados en el modelo utilizado.
2. Develar la relación subyacente entre los mecanismos nucleares y mitocondriales en función la compartimentación del GSH en el marco de la resistencia a la apoptosis inducida por el tratamiento con cisplatino.

Objetivos

3. Estudiar la implicancia de la proteína bcl-2 en la compartimentación del GSH y su relación con los fenómenos mitocondriales y nucleares durante la resistencia a la apoptosis.

Para llevar a cabo el presente estudio se utilizó como modelo experimental la cepa celular de cáncer de mama MCF7+/- (wild type) y su análogo MCF7+/, capaz de sobre-expresar la proteína bcl-2. Como modelo de inducción de apoptosis se utilizó el citostático cisplatino en dos concentraciones ([10 μ M] y [50 μ M]).

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Aparatos e instrumental

- Cultivo celulares:
 - 1) Cabinas de flujo laminar (Telstar- AV30/70 y Culair- BC100);
 - 2) Incubadores de CO₂ (Napco, Model 5415 IR CO2 SYSTEM);
 - 3) Instalación de criogenia:
 - Tanques de N₂ líquido;
 - Congeladores -150°C;
 - 4) Congeladores:
 - Congelador -80°C (Thermo Heraus- Electrón Corporation);
 - Congelador -20°C (Liebherr Premium);
 - 5) Equipo de esterilización:
 - Autoclave Selecta;
 - Estufa de secado (Heraus Instruments- D6450 Hanau);
 - 6) Centrifugas:
 - Centrifuga termorregulable para tubos de 15 y 50 mL (Termo- Heraus Mutlifuge 35RT Centrifugen);
 - Centrifuga termoregulable para eppendorf (Hettinch Zentrifugen- Rotina 35R);
 - 7) pH-metro (Crison- pH Meter GLP21);
 - 8) Bomba de vacío;
 - 9) Pipetas y micropipetas:
 - Pipetas automáticas;

Material y métodos

- Pipetas estériles descartables (TPP): 25mL, 10mL, 5mL y 2mL;
- Micropipetas automáticas: 1000 μ l, 20-200 μ l, 2-20 μ l y 0,5-2 μ l;

10) Material plástico estéril:

- Frascos de cultivo (TPP): 150cm², 75cm² y 25cm²;
- Placas petri (TPP): 100mm, 30mm;
- Chamber slides, placas diseñadas especialmente para microscopía confocal (Nalgene Nunk Internacional);
- Cubetas de congelación (Nalgene);

11) Material de cultivo:

- Cells Scrapers estériles 25cm (Corning);
- Criotubos estériles 1,8mL (Nunc);
- Filtros de Nylon estériles 0,22 μ m (Nalgene);

12) Medios de cultivo y aditivos:

- Modificación de Iscove del medio DMEM (IMDM + GlutaMAX, Gibco-Invitrogen);
- Tripsina- EDTA (Gibco-Invitrogen);
- Suero Bovino Fetal (SBF, Gibco - Invitrogen);
- Solución salina equilibrada tampón fosfato (PBS, Gibco-Invitrogen);
- Solución salina equilibrada de Hanks (HBSS, Gibco-Invitrogen);
- Solución tamponadora HEPES pH= 7.2 a 7.8 (Gibco-Invitrogen);
- Combinación de antibióticos, estreptomina/ penicilina (Sigma-Aldrich);
- Dimetil sulfoxido (DMSO, SIGMA).

13) Instrumentos ópticos:

- Microscopio binocular (Nikon SE);
- Microscopio binocular invertido (Nikon Elipse TS100);
- Baños termostatzados:
 - Baño húmedo con agitador (Selecta Heater- Unitronic 320 OR);
 - Baño seco (Grant- QBA2);
- Vortex (Vortex Mixer Stuart SA8);
- Agitador magnético (Sturat- hotplate stirrer SB162-3);
- Equipo de purificación de agua (Millipore Milli-Q Integral-15);
- Balanzas de precisión (SALTER, HA-120M y SARTORIUS, PT 1200);
- Espectrofotómetros:
 - Molecular Devices- SpectraMax GeminiXS, software SoftMax Pro 4.3LS;
 - Espectrofotómetro GeneQuantPro (Amersham Bioscience).
- Citómetro de flujo. Citómetro Epics Elite, Counter Electronics, Miami, USA. Equipado con láser de argón. El análisis de las muestras se realizó con el software E 11/94 versión 4.0 EPICS, provisto en el citómetro.
- Servicio de Microscopia confocal. Microscopio confocal Leica TCS-SP2, unidad equipada con láser de argón y láser de helio-neón y microscopio invertido Leica DM1RB.
- Western Blotting
- Membrana de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0,2µm (Schelider & Schuel, USA);
- Sistema Mini-protean II (BioRad, USA);
- Equipo de revelado: Cámara CCD.
 - RT-PCR

- ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystem).

2. Productos y Reactivos

Cisplatino: Es el compuesto inorgánico cis-diaminodicloroplatino (cisplatino, Sigma) en el que el platino se encuentra en estado de oxidación +2. Este es un compuesto integrado por un átomo central de platino unido a dos iones cloruro, de fácil liberación y a dos iones amonio, por uniones covalentes. La estructura en posición cis le confiere actividad antineoplásica. Entra en la célula por difusión. En presencia de agua, los dos cloruros se desplazan formando un compuesto hidratado con carga positiva, que se une a puntos nucleofílicos de proteínas y ácidos nucleicos estableciendo entonces uniones covalentes intra e intercadenas. Como consecuencia de este proceso se altera la estructura y la síntesis del DNA. Actúa preferentemente sobre las bases del DNA, en particular con el nitrógeno en posición 7 de la guanina debido a su gran nucleofilia. Además, se comporta como un agente bifuncional produciendo enlaces cruzados entre las dos hebras del DNA. La tiourea y otros tioles presentan avidez por el platino y lo desplazan de su unión al DNA, por lo que se comportan como agentes de rescate. La fase más afectada es la G1 y en menor proporción el resto del ciclo. El cisplatino es un agente mutagénico y carcinogénico. A una concentración de $[12,5\mu\text{M}]$ se une a los grupos sulfhidrilos libres de la tubulina produciendo una despolimerización parcial de los microtúbulos. De esta forma modifica la tubulina, lo que cambia el ensamblaje de los microtúbulos así como el patrón del citoesqueleto

de las células tumorales. A una concentración de [5mM] forma un complejo con los lípidos de fosfatidilserina de la membrana induciendo citotoxicidad (Sigma product information).

Fluorocromos: Las moléculas fluorescentes absorben la luz de una determinada longitud de onda y emiten luz de otra longitud de onda más larga. Las sustancias que tienen la propiedad de emitir un fotón de una longitud de onda determinada cuando captan (son excitados) por un fotón incidente de una longitud de onda característica se conocen como fluorocromos. Si un componente de este tipo es iluminado a su longitud de onda absorbente y visualizado a través de un filtro que sólo permita pasar la luz de longitud de onda igual a la de la luz emitida, el componente aparece brillante sobre un fondo oscuro. La intensidad y el color de la luz es una propiedad característica del fluorocromo utilizado. Los colorantes fluorescentes usados para la tinción celular son detectados con ayuda del microscopio de fluorescencia. En estos microscopios la luz incidente procedente de una fuente atraviesa un filtro que selecciona la longitud de onda capaz de excitar al fluorocromo antes de incidir sobre la muestra. La luz emitida por la muestra (reflejada y fluorescente) atraviesa un segundo filtro que selecciona la longitud de onda de emisión del fluorocromo. La utilización de diferentes combinaciones de fluorocromos hace posible analizar las diferentes estructuras subcelulares o incluso diferentes fases del ciclo de vida celular (Mullins 1994; Mullins 1999).

- **Hoechst:** (Molecular Probes) Fluorocromo fácilmente asimilado por las células dada su capacidad de atravesar las membranas (Telford *et al.*, 1992). Es capaz de entrar tanto en

las células vivas como en las muertas y se queda en el núcleo tiñendo el DNA. Tiene elevada especificidad ya que se une a las bases adenina-timina. Su excitación se produce en el ultravioleta-azul. La señal fluorescente es proporcional a la unión del fluorocromo al ácido nucleico. Lo que permite ver el nivel de condensación de la cromatina que es un indicador de la fase del ciclo celular así como de la apoptosis (Molecular Probes product information).

Hoechst	
γ excitación (nm)	γ emisión (nm)
340	510

Tabla 3: Características de excitación y emisión del Hoechst.

- **Yoduro de propidio:** (Sigma) El yoduro de propidio (IP) solo tiñe las células muertas o en una apoptosis muy tardía, por su incapacidad de atravesar la membrana plasmática (Telford *et al.*, 1992). Las fases tardías de apoptosis están acompañadas por un incremento en la permeabilidad de la membrana o la pérdida de integridad de la misma, que permite al IP entrar en las células. Es por ello que la combinación de este compuesto con el Hoechst ha sido extensamente usada para el análisis de las fases de la apoptosis tanto por microscopía de fluorescencia como por citometría de flujo (Sigma product information; Belloc *et al.*, 1994; Gong *et al.*, 1994).

IP	
γ excitación (nm)	γ emisión (nm)
493	630

Tabla 4: Características de excitación y emisión del Ioduro de Propidio (IP).

- **Anexina-V:** (Molecular Probes) Es una proteína que se une específicamente al fosfolípido de membrana fosfatidilserina, el cual se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática y es expuesto en la cara externa de dicha membrana cuando comienza el proceso de apoptosis. De esta forma la anexina se une a la fosfatidilserina expuesta en la superficie de las membranas de las células apoptóticas. La conjugación de esta proteína con diferentes fluoróforos, como son Alexa fluo- 488 (verde) o R-ficoeritrina (rojo), permite la detección de las células apoptóticas por citometría de flujo o microscopia confocal. Para la unión de la proteína con el fosfolípido es requerida la presencia de calcio, por lo que se utiliza un binding buffer donde se mantiene la suspensión celular para la tinción (Molecular Probes product information; Andree *et al.*, 1990; Koopman *et al.*, 1994).

Fluorocromo	γ excitación (nm)	γ emisión (nm)
Anexina V AlexaFluor488	493	630
Anexina V R-phycoerythrin	495	519

Tabla 5: Características de excitación y emisión de la anexina V.

- **Mitotracker:** (Molecular Probes) Esta sonda fluorescente específica para las mitocondrias. Difunde fácilmente a través de la membrana plasmática, se concentra en el interior de la

mitocondria, donde es retenido durante la fijación, a diferencia de lo que ocurre con otros marcadores mitocondriales (Molecular Probes product information).

Fluorocromo	γ excitación (nm)	γ emisión (nm)
Mitotracker red	581	644
Mitotracker green	490	516

Tabla 6: Características de excitación y emisión del Mitotracker.

- **CellTracker green 5-clorometilfluoresceína diacetato:** (Molecular Probes) Este marcador, también conocido como CMFDA, es un fluorocromo que mediante la actividad de la glutatión S-transferasa se une al GSH con una especificidad del 95%, siendo posible que una pequeña cantidad de fluorocromo se una a proteínas con el grupo -SH. Si el GSH esta en su forma oxidada GSSG, la reacción no tiene lugar y no se observa tinción (Molecular Probes product information; Poot *et al.*, 1991; Barhoumi *et al.*, 1993).

CMFDA	
γ excitación (nm)	γ emisión (nm)
492	517

Tabla 7: Características de excitación y emisión del CMFDA.

- **Fluo-3 AM:** (Molecular Probes) Este es un marcador de calcio intracelular. Permite cuantificar la cantidad de Ca^{2+} intracelular a través del microscopio confocal o por citometría de flujo. La característica más importante del Flou3 es que presenta un amplio espectro de absorción compatible con la

excitación a 488nm del láser de argón. La unión con el Ca^{2+} incrementa la intensidad de fluorescencia. La forma acetoximetil éster (acetoxymethyl ester AM) del fluorocromo es muy útil ya que permite un marcaje intracelular no invasivo. La forma permeable a la células una vez dentro de la misma se une al calcio libre, es hidrolizado por esterazas no específicas quedando atrapado en el citosol (Molecular Probes product information).

Fluo-3AM	
γ excitación (nm)	γ emisión (nm)
506	526

Tabla 8: Características de excitación y emisión del Fluo-3.

- **5,5',6,6'tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazol-carbocyanine iodide:** (Molecular Probes) Este marcador, también conocido como JC1, es un catión lipofílico que detecta variaciones en el potencial de membrana mitocondrial sin afectar la viabilidad celular ni la respiración mitocondrial. Este fluorocromo se acumulan selectivamente en el interior de las mitocondrias activas, atraídas solamente por el potencial de membrana mitocondrial. Los monómeros de JC1 (fluorescencia verde) una vez acumulados selectivamente dentro de la mitocondria serán agregados (fluorescencia naranja o roja) como consecuencia del potencial de membrana mitocondrial. Es decir que el fluorocromo puede virar del color verde (monómeros) al naranja (agregados) cuanto más polarizado se encuentre el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) ya que el gradiente

electroquímico de la mitocondria es responsable de la formación de los agregados de JC1. En condiciones normales la mitocondria posee un potencial de membrana elevado. Cuando el potencial de membrana es bajo (despolarización) el fluorocromo se encuentra formando monómeros (fluorescencia verde) que se distribuyen mayoritariamente en el citoplasma. La despolarización de la membrana mitocondrial se evidencia como una disminución en el cociente de intensidad de fluorescencia naranja/ intensidad de fluorescencia verde. Esta variación de la proporción entre fluorescencias sólo depende del potencial de membrana mitocondrial y es independiente de otros factores tales como el tamaño de la mitocondria, la forma o la densidad, factores que afectan el marcaje de otros fluorocromos. El uso de esta proporción de fluorescencias permite hacer comparaciones del potencial mitocondrial de diferentes muestras e incluso comparar poblaciones. Ambos colores pueden ser detectados tanto por citometría confocal como por fluorimetría o por citometría de flujo (Molecular Probes product information; Cossarizza, Szilágyi *et al.*, 2006).

JC1		
	γ excitación (nm)	γ emisión (nm)
Monómeros	485	530
Agregados	535	490

Tabla 9: Características de excitación y emisión del JC1.

- **Dihidrorodamina 123:** La dihidrorodamina es un fluorocromo utilizado para medir H₂O₂ intracelular. Esta molécula difunde

de forma pasiva a través de las membranas, una vez dentro de la célula esta molécula es directamente oxidada a rodamina-123, la cual es excitable a 488nm y emite a 515nm. Una vez oxidada a rodamina-123 se localiza en las mitocondrias. La conversión de las moléculas no fluorescentes a moléculas fluorescentes depende completamente de los productos de oxidación y no requiere catálisis enzimática (Molecular Probes product information; Wardman 2007).

Dihidrorodamina 123	
γ excitación (nm)	γ emisión (nm)
488nm	515nm

Tabla 10: Características de excitación y emisión de la DhRh 123.

Anticuerpos: Los anticuerpos son moléculas de peso molecular aproximado de 150 kDa, pertenecientes al grupo de las inmunoglobulinas (Ig). Son capaces de reconocer otras moléculas, los antígenos. La capacidad de reconocimiento de un anticuerpo radica en las secuencias variables de sus cadenas proteicas, generadas por recombinación de una serie de genes en el proceso de producción de los linfocitos B durante el desarrollo embrionario. La combinatoria de estas secuencias puede producir más de un billón de secuencias diferentes. Esta información es almacenada en el pool de linfocitos B presentes en nuestro tejido linfático.

Anticuerpos primarios: Se utilizaron los siguientes anticuerpos;

- **Citocromo-c:** (Rabbit polyclonal antibody; Santa Cruz Biotechnology, Inc) Permite detectar citocromo-c procedente

de ratón, rata, humano y caballo. Es útil tanto para western blotting como para inmunofluorescencia. Peso molecular del citocromo-c: 11kDa.

- **FIS:** (anticuerpo monoclonal, mouse). Este anticuerpo permite detectar FIS Una de las proteína responsables de los procesos de fisión mitocondrial. Se utilizó una dilución 1:1000 y su peso molecular es de 18KDa. Fue gentilmente cedido por Dr. Antonio Zorzano.
- **DRP1:** (anticuerpo policlonal, rabbit) Este anticuerpo permite detectar DRP1, una proteína que interviene en los procesos de fisión mitocondrial. Se utilizó una dilución 1:1000 y su peso molecular es de 80KDa. Este anticuerpo fue gentilmente concedido por el Dr. Antonio Zorzano.
- **Mitofisina-1:** (anticuerpo policlonal, rabbit) Reconoce esta proteína de fusión mitocondrial. Se utilizó una dilución 1:500 y su peso molecular es de 89-90KDa. Este anticuerpo fue gentilmente cedido por el DR. Antonio Zorzano.
- **Mitofusina-2:** (anticuerpo policlonal, rabbit) Este anticuerpo reconoce la proteína MTF2 que interviene en los procesos de fusión mitocondrial. Se utilizó una dilución 1:500 y su peso molecular es de 89-90KDa. Este anticuerpo fue gentilmente cedido por el DR. Antonio Zorzano.
- **OPA:** (anticuerpo policlonal, rabbit) Este anticuerpo reconoce la proteína OPA1 relacionada que interviene en procesos de fusión mitocondrial. Posee 8 isoformas diferentes en humanos. Se utilizó una dilución 1:1000 y su peso molecular es de 80-100 KDa. Este anticuerpo fue gentilmente cedido por el DR. Antonio Zorzano.

- **αporina:** (anticuerpo policlonal, mouse) Se utilizó como control de carga en una dilución 1:5000

Anticuerpos secundarios:

- **Anti-Rabbit IgG FITC Conjugate** (Sigma). Anticuerpo que reconoce específicamente la secuencia anti-rabbit IgG. Se encuentra conjugado con FITC, lo que permite la localización a 488nm de excitación y 530nm de emisión.
- **Anti-Mouse IgG Conjugate to horseradish peroxidase** (Calbiochem). Anticuerpo que reconoce específicamente la secuencia anti-mouse IgG.

Determinación de proteínas:

Se utilizó el Protein Assay Kit, basado en una modificación de Peterson del método de Lowry (Total Protein Kit Micro Lowry - Peterson's Modification, Sigma). El reactivo de Lowry contiene dodecilsulfato sódico, que facilita la disolución de las proteínas parcialmente insolubles y tartrato cúprico alcalino, que se une a las proteínas. Por su parte el reactivo de Folin contiene fenol, que al interaccionar con el tartrato da lugar a un compuesto de color azul (Lowry *et al.*, 1951; Sigma product information).

Enzimas:

- **Glutación S-transferasa:** La glutación S-transferasa (GST, Sigma) representa una familia multifuncional de enzimas que están involucradas básicamente en los procesos de defensa contra el estrés tóxico y oxidativo en los tejidos, incluyendo un grupo de proteínas que participa en los eventos de detoxificación de una amplia variedad de compuestos de

origen biológico y químico. El glutation (γ -L-glutamyl-L-cisteinil-glicina, GSH), uno de los substratos naturales de la GST, participa como co-factor en múltiples reacciones del metabolismo animal, vegetal y en el transporte de aminoácidos hacia el interior de la célula. La reacción principal catalizada por la GST, es la conjugación al GSH de una amplia variedad de compuestos electrofílicos exógenos o endógenos. De esta forma, la enzima neutraliza los sitios activos del electrófilo y genera productos más hidrosolubles y por tanto, más fácilmente excretables (Sigma product information).

- **Ribonuclease A:** La ribonucleasa A (RNAsa-A, Sigma) consiste en una cadena polipeptídica simple que contiene 4 puentes disulfuro. Esta es una endoribonucleasa que actúa sobre los grupos fosfato 3' de los nucleótidos de pirimidina (Sigma product information).

Otros reactivos

- IGEPAL (Sigma);
- Ácido perclórico (PCA, Merck/Scharlau);
- Fosfato potásico (Merck);
- Cloro dinitrobenceno (CDNB, Sigma);
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Sigma);
- N-(2-hidroxiethyl)piperacina-N'-(2-ácido etanosulfónico) (HEPES, Sigma);
- Cloruro sódico (NaCl, Panreac);
- Cloruro de calcio (CaCl₂, Panreac);
- Sosa (NaOH, Panreac);
- Ácido clorhídrico (HCl 38%, Baker);

- Sodio (Na, Sigma);
- Potasio (K₂, Sigma);
- 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (TRIS, Roche);
- Etanol absoluto (Baker);
- Metanol (Baker);
- Citrato sódico (NaH₂(C₃H₅O(COO)₃, Sigma);
- Acetato sódico (NaAc, Panreac);
- Triton X-100 (Sigma);
- Yoduro de propidio (Sigma);
- OrtoVanadato de sodio (OHNa vanadato, Sigma);
- Dodecilsulfato sódico (SDS, C₁₂H₂₅NaO₄S, Sigma/Aldrich);
- Glicerol (C₃H₈O₃, Sigma);
- Inhibidor de proteasas (SIGMA);
- Glicina;
- Poliacridamina;
- Tween 20;
- Reactivo quimioluminiscente LumiGLOI® (Cell Signaling Technologies);
- Amersham RPN2106 ECL Western Blotting Detection Reagent.

3. Diseño experimental

3.1. Tratamientos

El propósito del presente trabajo será dilucidar los mecanismos subyacentes en la relación de los fenómenos nucleares y mitocondriales en el marco de la resistencia a la apoptosis. Para ello se estudiará el papel del GSH en dicho proceso así como parámetros mitocondriales, como son: el potencial de membrana mitocondrial, liberación de citocromo-c y dinámica mitocondrial. También se estudiará el papel del calcio en dicho proceso. Todo esto se analizará en el marco de la resistencia celular a la muerte por apoptosis.

Se utilizará como modelo experimental la cepa celular de cáncer de mama MCF7+/- y su análogo MCF7+/, un modelo ampliamente estudiado por nuestro grupo de trabajo. Como modelo de inducción de apoptosis se utilizará el citostático cisplatino.

3.2. Inducción de apoptosis

Para estudiar el fenómeno de apoptosis se utilizó el citostático cisplatino (cis-DiammineplatinumII dichloride) en dos concentraciones una baja de [10 μ M] y otra alta de [50 μ M]. De esta forma se establecieron 3 grupos (Tabla 11).

Tratamientos de inducción de apoptosis		
Control (Ct)	Cisplatino 10 μ M (cis10)	Cisplatino 50 μ M (cis50)

Tabla 11: Tratamientos utilizados.

3.2.1. Protocolo de inducción de apoptosis

Dado que el cisplatino es un citostático, es necesario aplicarlo cuando los cultivos celulares se encuentran en fase de síntesis, de

manera de asegurar la eficacia del mismo. Para el presente protocolo de inducción de apoptosis las células se dejaron crecer durante un período de 48hs, en el cual llegaban a una fase de crecimiento exponencial. En este punto se les añadía cisplatino (dilución extemporánea en PBS), a una concentración final de [10 μ M] y [50 μ M].

3.2.2. Tiempos de incubación de las muestras

De acuerdo con el protocolo puesto a punto previamente en nuestro grupo las células se sembraron y se dejaron en estufa durante 48hs. Transcurrido este lapso las células, que se encontraban en fase de crecimiento, fueron tratadas con el citostático cisplatino. Las muestras se incubaron por 24hs y luego se cambió el medio. Por último se dejaron reposar durante 24hs.

En el presente estudio se evaluaron los mecanismos y se intentó determinar la secuencia de eventos relacionados con la resistencia a la apoptosis inducida por el tratamiento. Para ello se tomaron muestras en diferentes tiempos de incubación con cisplatino, de manera de completar una serie de tiempo. De esta forma se recogieron muestras de 16hs, 24hs, 40hs y 48hs de tratamiento. Luego de las 24hs de tratamiento se realizó el cambio el medio de las muestras. De esta manera se establecieron 4 grupos según el tiempo de incubación de las muestras (Figura 14).

Material y métodos

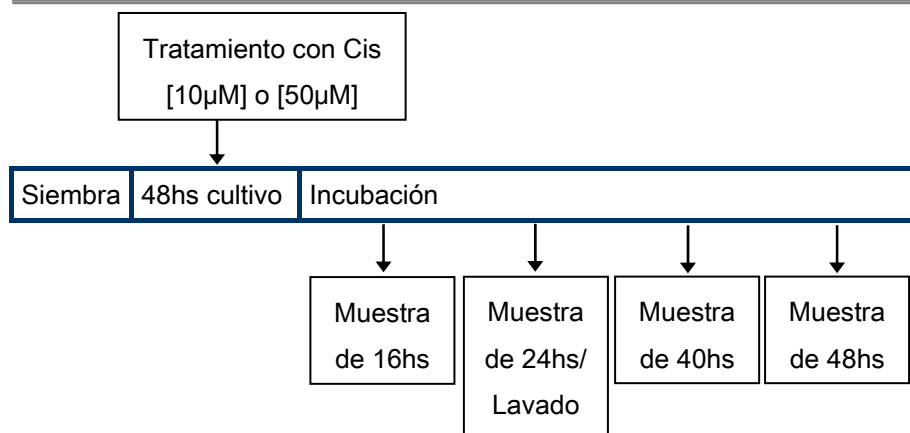


Figura 14: Diseño experimental.

4. Modelo celular

La cepa MCF7 se adquirió en el banco celular ATCC-LGC Promochem Cell Biology collection (ATCC®; Number: HTB-22). Esta es una línea celular establecida de cáncer de mama humano de tipo adherente y con morfología de tipo epitelial.

Para llevar a cabo los experimentos se utilizó la cepa celular de cáncer de mama MCF7 +/- (wild type) y su análogo MCF7 +/+, la cual ha sido transfectada con el oncogen bcl-2 y tiene la capacidad de sobre-expresar dicha proteína.

5. Cultivos celulares

5.1 Protocolo de expansión de células: La manipulación de las células se llevó a cabo en condiciones estrictas de esterilidad, bajo cabinas de flujo laminar. La expansión de los cultivos subconfluentes se hizo en una relación 1:5. Para el cultivo y mantenimiento de la cepa se utilizó un medio compuesto por:

- 89% IMDM;

- 10% SBF;
- 1% Estreptomycin/ penicilina.
- Se retiró el medio de cultivo, a fin de descartar las células muertas y luego se realizaron un par de lavados con PBS para eliminar restos de medio.
- Se agregó un pequeño volumen de tripsina-EDTA de forma de cubrir el fondo de la placa de cultivo que posteriormente se colocó en la estufa un par de minutos para aumentar la eficacia y rapidez de la tripsina.
- Una vez despegadas las células los frascos se lavaron con un volumen adecuado de medio de cultivo fresco y se recogieron en un tubo.
- Luego de centrifugar a 1500rpm, durante 4-6 minutos a 24°C, se eliminó el sobrenadante resuspendiendo el pelet en 1mL de medio fresco.
- Por último se contaron las células en cámaras de Neubauer, haciendo las diluciones adecuadas en los casos en que fue necesario.
- Por último la siembra se realizó con una densidad de 10000 células/ cm² y se cultivaron en incubadores con 95% de aire y 5% CO₂, medio humificado a 37°C.

5.2 Protocolo de establecimiento de stock de células: Para la congelación de las células utilizó el siguiente medio:

- 90% SBF;
- 10% DMSO.
- Se eliminó el medio de cultivo y luego las placas se lavaron un par de veces con PBS estéril y frío.
- Para levantar las células se utilizó tripsina-EDTA.

- Una vez levantadas las células se recogieron en un tubo con medio fresco.
- Las muestras se centrifugaron 5 minutos, a 1500 rpm a temperatura ambiente.
- Se eliminó el sobrenadante y el pelet restante fue resuspendido en 1 mL de medio de congelación.
- Posteriormente se realizó el conteo y se colocaron 2.5×10^6 células/mL de medio de congelación por cada criotubo.
- Una vez rotulados se congelaron en sendos recipientes (Nalgene). Estos recipientes, rellenos con 250mL de propanol, se colocaron a -80°C entre 12hs-24hs permitiendo un proceso de congelación progresivo.
- Finalmente los criotubos se almacenaron en tanques de nitrógeno líquido (Servicio de cultivos celulares de la Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia).

6. Determinaciones analíticas

Para estudiar los mecanismos de resistencia al tratamiento con cisplatino y la secuencia de eventos subyacentes se realizaron diferentes determinaciones en los tiempos de incubación previamente descritos (control, 16hs, 24hs, 40hs y 48hs de tratamiento), para ambas concentraciones de cisplatino ($[10\mu\text{M}]$ y $[50\mu\text{M}]$) y en ambas cepas (MCF7+/- y MCF7+/+).

Se realizó el conteo directo de las muestras y los controles, para evaluar el efecto del tratamiento en la proliferación celular. Se realizaron determinaciones de apoptosis y contenido de DNA para ciclo celular por citometría de flujo. Se determinó el nivel de peróxidos a través de la tinción con dihidrorodamina 123. También se

evaluó el potencial de membrana mitocondrial a través de la tinción con JC1. Todas estas determinaciones se hicieron por citometría de flujo.

Se detectaron células apoptóticas por microscopia confocal. También se usaron sondas fluorescentes para estudiar la distribución de las mitocondrias y la compartimentación del GSH celular y el calcio por microscopia confocal. Se aplicaron técnicas de inmunocitoquímica para verificar la distribución celular del citocromo-c, que se co-localizó con las mitocondrias.

Se determinó el nivel de GSH celular por métodos bioquímicos (por medio de la reacción de la glutatión S-transferasa). Se llevaron a cabo PCR cuantitativas para evaluar la expresión de los siguientes genes: PARP1; Catalasa, SOD-Mn; SOD-Cu/Zn; hOGG1; GCLC; GCLM; glutatión peroxidasa; RAD51 y el oncogen bcl-2. A través de la metodología de Western Blotting se analizó la expresión de proteínas de proliferación, como son PCNA e ID2, también se evaluó el estado de las proteínas oxidadas y glutatióniladas y la expresión de la proteína anti-apoptótica bcl2.

7. Citometría de flujo

El citómetro de flujo permite analizar células en suspensión que interfieren de forma individual con una fuente de luz. La intersección de cada célula con la luz láser provoca la emisión de una serie de señales luminosas que permite diferenciar poblaciones celulares dentro de la muestra analizada, por su tamaño relativo, por la complejidad de sus membranas o bien por su reactividad con diversos fluorocromos. Este es un método de lectura rápido, que permite analizar un elevado número de muestras y proporciona datos

cuantitativos y la posibilidad de análisis multiparamétricos en poblaciones celulares con un registro computarizado de los resultados (Darzynkiewicz *et al.*, 1999; Rieseberg *et al.*, 2001).

En este trabajo se utilizó la metodología de citometría de flujo para estudiar el contenido de DNA y las fases del ciclo celular de las muestras tratadas, para determinar el potencial de membrana mitocondrial, los niveles de peróxido de hidrógeno, siguiendo los protocolos indicados más adelante. El análisis de las muestras se realizó en un citómetro de flujo Epics Elite cell sorter (Coulter Electronics, Miami) y el software disponible en el mismo.

7.1. Cuantificación de DNA por citometría de flujo: Ciclo celular

Entre otros usos, el citómetro permite separar físicamente poblaciones de células o partículas previamente reconocidas por la fluorescencia de sus marcadores, su tamaño o granulosidad. Así mismo, permite la cuantificación del DNA y la determinación de la actividad proliferativa de la población celular. La medida del contenido de DNA se basa en la capacidad de marcadores fluorescentes, como el ioduro de propidio (IP), para unirse específicamente al material genético de las células (Vermes *et al.*, 2000; Reich and Pisetsky, 2009). Las células teñidas con este marcador emiten una fluorescencia proporcional al contenido de DNA celular, de esta forma se pueden distinguir las fases del ciclo celular (Figura 15) así como células en apoptosis y restos de células muertas o debree (Figura 16).

- La fase G1 es el período entre el nacimiento de una célula (tras una mitosis) y el comienzo de la replicación de su DNA. En este tiempo el metabolismo produce crecimiento de la masa celular. La mayoría de las células del cuerpo se encuentran en G1, es decir en reposo, pero preparadas para dividirse.
- La fase S es cuando se duplica el genoma de una célula (síntesis de DNA), esta pasa de una dotación 1N a 2N.
- La fase G2 es de preparación para la mitosis (duplicación de centriolos, condensación de los cromosomas y ruptura de la membrana nuclear).
- La fase M (mitosis) consiste en la división del citosol y el núcleo celular. Al conjunto de las fases G1+S+G2 se le denomina interfase (período entre mitosis).
- La fase G0 es el estado en cual las células no se dividen. Equivale a una fase G1 muy prolongada, células muy diferenciadas.

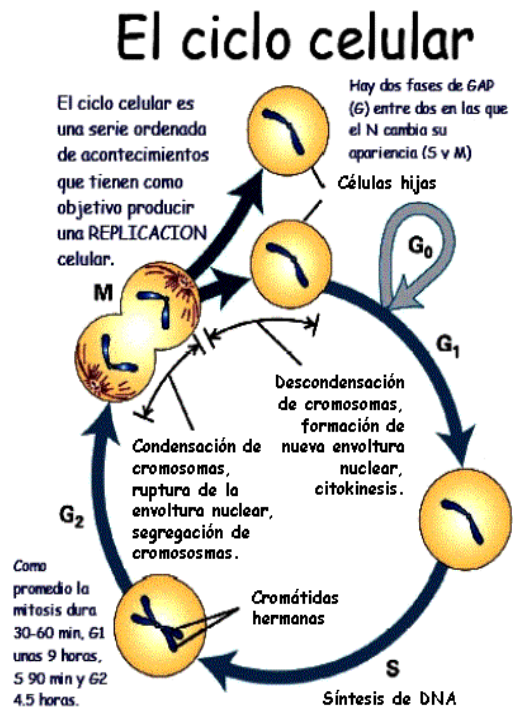


Figura 15: Esquema de las diferentes fases del ciclo celular G0/G1; S; G2 y M.

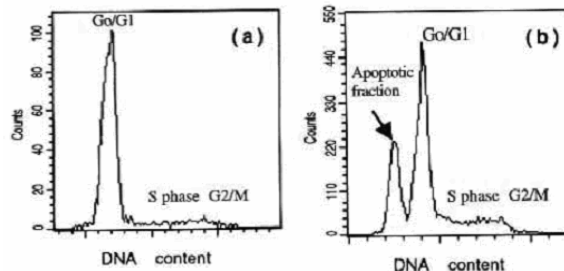


Figura 16: Histogramas de las diferentes fases del ciclo celular en una población control (a) y en una población con una alta fracción de apoptosis (b).

7.1.1. Preparación de las muestras para determinación de fases del ciclo celular

Para la determinación del contenido de DNA se utilizó una modificación del protocolo de Esteve *et al.* (1999).

Material y métodos

- Para recolectar las muestras las placas se lavaron con PBS frío y se trataron con tripsina, recogiendo todo el medio. Una vez despegadas las células se recogieron con PBS.
- Las muestras se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C.
- Luego se resuspendieron en PBS y se contaron con cámara de Neubauer.
- Se realizó una segunda centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C.
- Se eliminó el sobrenadante y luego las células se fijaron en etanol frío al 95% (1×10^6 células/2mL etanol) y se dejaron al menos 24hs a -20°C.
- Para retirar el etanol se centrifugaron a 1500 rpm, durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se hizo un lavado con PBS frío y se centrifugaron nuevamente a 1500 rpm durante 5 minutos.
- Seguidamente las células se resuspendieron en una solución con PBS, RNAsa a una concentración [0,05mg/mL], IGEPAL al 10% y IP a una concentración final [0,05mg/mL], en una proporción de 1 mL por millón de células. Las células se tiñeron en la solución durante 1hr a temperatura ambiente y en oscuridad.
- Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo según parámetros pre-establecidos. Los fluorocromos fueron excitados a 488nm con el láser de argón del citómetro de flujo. Para cada muestra se adquirieron 15000 células.

7.2. Determinación del potencial de membrana mitocondrial

La estimación de potencial de membrana mitocondrial por citometría de flujo se realiza desde hace 30 años. El primer reporte data de 1979 donde se emplearon cianinas y oxonoles, fluorocromos utilizados originalmente para mediciones volumétricas con espectrofluorometría (Shapiro *et al.*, 1979). Recientemente el desarrollo de nuevas metodologías ha permitido determinaciones más precisas en términos de medias poblacionales, heterogeneidad poblacional y detección de cambios en el tiempo. La estimación indirecta del potencial de membrana mitocondrial se puede obtener monitoreando la distribución de sondas fluorescentes y analizándolas por citometría de flujo (Szilágyi *et al.*, 2006).

7.2.1. Preparación de las muestras para determinación del potencial de membrana mitocondrial por citometría de flujo

Para la determinación del potencial de membrana mitocondrial por citometría de flujo se utilizó el marcador JC1 siguiendo las indicaciones de la casa comercial (Molecular Probes products information, Cossarizza) con algunas modificaciones.

- Para disolver el JC1 se colocó una alícuota del mismo en un tubo y luego se agregó gota a gota medio de cultivo, mientras se mantenía el tubo constantemente sobre el vortex a máxima velocidad. Sólo de esta forma se pudo disolver correctamente el fluorocromo, a una concentración de [20µg/mL] (Cossarizza).
- Para recolectar las muestras las placas se lavaron con PBS frío y se trataron con tripsina, recogiendo el medio. Una vez despegadas las células se recogieron con PBS.

- Las muestras se centrifugaron 5 minutos, a 1500 rpm y a temperatura ambiente.
- El pelet se resuspendió en PBS y las células se contaron en una cámara Newbauer.
- Para la tinción se utilizó una alícuota de 100000 células en 125 μ L, luego se agregaron 125 μ L de la solución de JC1 en medio, siendo la concentración final de [10 μ g/mL].
- Las muestras se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a 37°C.
- Luego se lavaron con PBS para eliminar restos del fluorocromo y se analizaron por citometría de flujo con los parámetros previamente establecidos. La adquisición de las muestras se detuvo luego de pasar 11000 eventos.

7.3. Determinación del nivel de ROS intracelular por citometría de flujo

El estudio de las funciones biológicas de las especies reactivas del oxígeno (ROS) así como de sus efectos deletéreos requiere de metodologías específicas y sensibles, especialmente si se intentan dilucidar los mecanismos relacionados con estos procesos (Tarpey *et al.*, 2004). Algunas características de los ROS podrían dificultar estas determinaciones. Por ejemplo, algunas especies son altamente reactivas y su vida media es muy corta. Otra dificultad es la presencia de los antioxidantes que existen in vivo y que podrían capturarlos. Los marcadores fluorescentes son excelentes sensores de ROS debido a su alta sensibilidad y por ser un sistema de colección de datos relativamente sencillo (Gomes *et al.*, 2005).

La combinación de las técnicas de fluorescencia, a través del uso de marcadores específicos, con la citometría de flujo constituye una

excelente aproximación para la determinación de niveles celulares de ROS. En este sentido uno de los marcadores más utilizados en la bibliografía para el estudio de los niveles de ROS celular es la dihidrorodamina, sobre todo aplicada al análisis por citometría de flujo.

7.3.1. Preparación de las muestras para determinación del nivel de peróxido de hidrógeno por citometría de flujo con dihidrorodamina

Para la determinación del potencial de los niveles de peróxido de hidrógeno por citometría de flujo se utilizó un marcaje con dihidrorodamina-123.

- Para recolectar las muestras las placas se lavaron con PBS frío y se trataron con tripsina, recogiendo el medio en un tubo. Una vez despegadas las células se recogieron con PBS.
- Las muestras se centrifugaron 5 minutos, a 1500 rpm y a temperatura ambiente.
- Se eliminó todo el sobrenadante, resuspendiendo cada muestra en PBS atemperado a una densidad de 400000 células/1mL.
- Se añadió el fluorocromo a una concentración final de [1µg/mL].
- Posteriormente se incubaron durante 30 minutos a 37°C y protegidas de la luz.
- Las muestras se analizaron por citometría de flujo con los parámetros previamente establecidos. La adquisición de las muestras se detuvo luego de pasar 11000 eventos.

8. Microscopia confocal

Los colorantes fluorescentes usados para la tinción celular pueden ser detectados con ayuda del microscopio de fluorescencia. En estos microscopios la luz incidente procedente de una fuente atraviesa un filtro que selecciona la longitud de onda capaz de excitar al fluorocromo antes de incidir sobre la muestra. La luz emitida por la muestra (reflejada y fluorescente) atraviesa un segundo filtro que selecciona la longitud de onda de emisión del fluorocromo. La microscopía de fluorescencia confocal posee un sistema óptico que no ilumina toda la preparación a la vez, sino que en cada momento sólo ilumina un pequeño punto a una cierta profundidad de la muestra. Este sistema cuenta con fuentes de iluminación de gran intensidad, generalmente haces láser, cuya luz pasa a través de un juego de diafragmas y de un sistema de captación de imagen electrónico, que permite la obtención de imágenes de finas secciones ópticas. La luz fluorescente emitida por el punto seleccionado es detectada mientras que la que procede de otras regiones de la muestra queda fuera de foco en el diafragma y no se detecta. La imagen digital en un microscopio confocal se forma al almacenar en una matriz numérica las intensidades luminosas medidas en cada uno de los puntos del barrido. A partir de series de secciones ópticas de este tipo obtenidas a diferentes profundidades resulta posible reconstruir una imagen tridimensional de la muestra. Este sistema constituye una herramienta de gran utilidad para examinar las estructuras celulares y sus funciones. Permite obtener un aumento notable en la resolución, especialmente en muestras con fluorescencia, reduce el blanqueado de la fluorescencia, permite hacer reconstrucciones tridimensionales más precisas de mejor

calidad y en menor tiempo que por otros métodos (Dailey *et al.*, 1999; Földes-Papp *et al.*, 2003; Ronneberger *et al.*, 2008).

En el presente trabajo se utilizó la metodología de microscopía confocal para analizar la distribución de las mitocondrias (marcaje con mitotracker), así la compartimentación del GSH celular (tinción con CMFDA) y la compartimentación del calcio celular (marcaje con Fluo-3). Se utilizó la metodología de inmunocitoquímica para evaluar la distribución celular del citocromo-c así como su co-localización con las mitocondrias. El análisis de las muestras se realizó con el software provisto por el microscopio.

8.1. Determinación de apoptosis por microscopia confocal

El uso de marcadores fluorescentes es una herramienta útil para identificar células apoptóticas. Para la determinación de apoptosis, ya sea por citometría de flujo o por microscopia confocal, el marcador más utilizado es la anexina V. Para la unión de la anexina V con la fosfatidilserina es requerida la presencia de calcio, por lo que se utiliza un binding buffer donde se mantiene la suspensión celular para la tinción (Andree *et al.*, 1990; van Engeland *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2009).

En el presente trabajo se utilizó anexina-V para detectar células apoptóticas por microscopía confocal. Este marcador se utilizó conjuntamente con otras sondas fluorescente, descritas más adelante, lo que ha permitido llevar a cabo estudios de co-localización con mitocondrias, así como estudiar distribución de calcio celular y la compartimentación de GSH en células apoptóticas.

8.1.1. Preparación de las muestras para la determinación de apoptosis por confocal

- Las células fueron sembradas en chamber slides, placas diseñadas especialmente para microscopía confocal con pocillos de superficie 2cm².
- Para la evaluación de la presencia de apoptosis se eliminó el medio de cultivo y se reemplazó por el tampón de anexina-V (preparado según las indicaciones del fluorocromo, Molecular Probes product information).
- Luego las muestras fueron incubadas con 5μL anexina-V en 100μl de tampón de anexina durante 5 minutos a 37°C y protegidas de la luz.
- Luego se agregó el IP a una concentración final de [2μg/mL] y Hoechst 33342 a igual concentración y se incubaron durante 10 minutos más.
- El análisis de las muestras se realizó por microscopia confocal.

8.2. Análisis de la distribución de las mitocondrial por microscopia confocal

La disfunción mitocondrial es crucial en diferentes tipos de enfermedades como las enfermedades neurodegenerativas, la obesidad, etc. (Chen and Chan, 2005; Zorzano *et al.*, 2004). Existen aspectos de la biología de las mitocondrias que pueden ser cruciales en la comprensión de su función. Las mitocondrias se organizan en filamentos y en redes mitocondriales que resultan de la actividad de procesos de fusión y fisión. Estas organelas se encuentran en movimiento constante e interaccionan con otros orgánulos, como el núcleo, retículo endoplasmático (Rizzuto *et al.*, 1998) o con otras

mitocondrias. Durante su movimiento a través de los elementos del citoesqueleto (tales como la actina), se fusionan con otras formando filamentos, o éstas se disgregan produciendo mitocondrias aisladas, las cuales, a su vez, se dirigen en distintas direcciones para volverse a fusionar con otras mitocondrias (Bereiter-Hahn *et al.*, 1990; Krendel *et al.*, 1998). Es factible que el movimiento de las mitocondrias en el proceso de apoptosis se relacione con los fenómenos antes mencionados.

8.2.1. Preparación de las muestras para el análisis de la distribución de las mitocondrias

- El Mitotracker se reconstituyó en DMSO filtrado a una concentración final de [1mM], siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (Molecular Probes product information).
- Las células sembradas en chamber slides, placas diseñadas especialmente para microscopía confocal con pocillos de superficie 2cm², una vez tratadas fueron teñidas con Mitotracker a una concentración final de [250nM] y se incubaron a 37°C durante 30 minutos.
- Luego se agregó Hoechst 33342 a una concentración final de [2µg/mL] y se incubó por 10 minutos más a 37°C y en condiciones de oscuridad.
- La disposición de las mitocondrias fue analizada por microscopia confocal.

8.3. Estudio de la compartimentación de glutatión por microscopia confocal

El glutatión reducido (GSH) es uno de los antioxidantes endógenos más importantes en las células de mamíferos. Por su propiedad de

mantener el estado redox (tioles/disulfidos) de la célula, ocupa un lugar central en el control de gran diversidad de procesos vitales (Nicotera *et al.*, 1989). La microscopia confocal hace posible analizar la distribución de GSH en diferentes fases de la vida o de la muerte de la célula. Esta información es muy importante en los estudios de la resistencia a la apoptosis que muestran las células MCF7, teniendo en cuenta que la distribución intercelular de glutatión parece ser más importante que el nivel total de glutatión en la célula (Voehringer *et al.*, 1998; Markovic *et al.*, 2007.).

8.3.1. Preparación de las muestras para el estudio de compartimentación de glutatión por microscopia confocal

- El CMFDA se reconstituyó en DMSO filtrado a una concentración de [10 mM], siguiendo las especificaciones del producto (Molecular Probes product information)
- Las células sembradas en chamber slides de 2cm² luego de ser expuestas a los diferentes tratamientos se tiñeron con CMFDA a una concentración final de [5µM] y se incubaron durante 20 minutos a 37°C protegidas de la luz.
- Luego se agregó IP a una concentración final de [2µg/mL] y Hoechst 33342 a igual concentración, incubando las muestras a 37°C durante 10 minutos más.
- Posteriormente se reemplazó el medio por uno previamente atemperado y se dejaron reposar durante 30 minutos a 37°C.
- Luego se analizó la distribución del GSH celular con el microscopio de fluorescencia confocal.

8.4. Compartimentación de calcio por microscopia confocal

Numerosos fenómenos fisiológicos y patológicos que ocurren en la células van acompañados de cambios iónicos. El calcio (Ca^{2+}) cumple diversidad de funciones celulares, interviene en la contracción muscular, es un activador de la exocitosis y de diversas enzimas catabólicas, etc. Este ión no se distribuye por toda la célula, de hecho su distribución intracelular es heterogénea. En condiciones de reposo o normales las células tienen un nivel de calcio citosólico bajo. El calcio intracelular se encuentra acumulado en orgánulos subcelulares como el retículo endoplásmico, en las mitocondrias o incluso en el núcleo y también puede encontrarse asociado a proteínas (como la calmodulina). Una buena aproximación para estudiar la distribución intracelular del calcio es la microscopia confocal combinada con el uso de marcadores fluorescentes. Uno de los marcadores fluorescentes más utilizados para el estudio del calcio intracelular es la sonda fluo-3. De esta forma se puede realizar un análisis preciso de la distribución espacial del calcio dentro de la células o un estudio de su compartimentación en las organelas subcelulares (Lee *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 1999).

8.4.1. Preparación de las muestras para el estudio de la compartimentación de calcio por microscopía confocal

- El Fura-3 se reconstituyó en DMSO filtrado a una concentración de [2mM].
- Las células sembradas en chamber slides de 2cm² luego de ser expuestas a los diferentes tratamientos se tiñeron con la sonda fluorescente a una concentración final de [10μM] y se incubaron durante 50 minutos a 37°C protegidas de la luz.

- Luego se agregó Hoechst 33342 a una concentración final de [2µg/mL] y se incubó a 37°C durante 10 minutos más.
- El análisis de la distribución del GSH celular se llevó a cabo con el microscopio de fluorescencia confocal.

9. Técnica de inmunocitoquímica

La inmunocitoquímica es un conjunto de técnicas en donde se emplean anticuerpos para detectar y localizar antígenos específicos en células y tejidos. La parte del antígeno reconocida por el anticuerpo se denomina epitope. Los epitopes pueden estar expuestos al medio extracelular (por ejemplo la porción extracelular de una proteína de transmembrana como las integrinas, el receptor de la insulina, etc.) o pueden ser intracelulares (como la actina). Para acceder a los epitopes intracelulares, los anticuerpos deben cruzar barreras como la membrana plasmática, es por ello que se deben permeabilizar las células, de forma tal de generar poros que permitan el pasaje de los anticuerpos. Antes de permeabilizar, las células usualmente se fijan con el objetivo de preservar la localización y estructura de los antígenos lo más fielmente posible a la situación que existe in vivo. Al conjugar fluorocromos a los anticuerpos se puede analizar las muestras por microscopia de fluorescencia o por citometría de flujo.

En el presente estudio se utilizó la técnica de inmunocitoquímica para analizar la distribución de citocromo-c durante el proceso de apoptosis inducida por efecto del citostático cisplatino. Las muestras también fueron teñidas con mitotracker red para comparar la localización de las mitocondrias y del citocromo-c (Haga *et al.*, 2003; Cardoso *et al.*, 2004; Ferreiro *et al.*, 2006).

9.1. Preparación de las muestras para la co-localización de citocromo-c y mitocondrias por inmunocitoquímica

- Las células fueron sembradas en chamber slides, placas diseñadas especialmente para microscopía confocal con pocillos de superficie 2cm².
- Luego de que ser expuestas a los diferentes tratamientos se tiñeron con Mitotracker Red580 durante 1hr a una concentración final de [750nM] a 37°C y protegidas de la luz, siguiendo las especificaciones de la casa comercial (Molecular Probes product information).
- Luego de la tinción las placas se lavaron suavemente con medio de cultivo completo atemperado a 37°C.
- Las células se fijaron con formaldehído al 3.7% (en medio de cultivo completo), a 37°C durante 15 minutos.
- Luego de lavar las placas se agregó glicina a una concentración final de [20mM] para detener la fijación de formaldehído. Las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- El medio se removió y se realizó un lavado con PBS atemperado. Después las células se permeabilizaron con saponina 0,1% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Después de lavar las placas se agregó la solución de bloqueo (10% SBF en PBS) durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- Una vez eliminada esta solución las muestras se incubaron con el anticuerpo primario para citocromo-c en una dilución 1:50 (en PBS con 1.5% SBF) y se colocaron en cámara húmeda durante una noche a 2-4°C.

- Luego de lavar la solución se incubó con el anticuerpo secundario (Anti-Rabbit IgG FITC Conjugate) durante 1hr a temperatura ambiente a una dilución 1:80 en PBS.
- Antes de analizar las muestras por microscopia confocal se tiñeron con Hoechst a una concentración final de [2 μ g/mL] durante 10 minutos para marcar los núcleos.

10. Determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry

Se utilizó el Total Protein Kit Micro Lowry -Peterson's Modification. Este kit contiene el reactivo de Lowry y el reactivo de Folin (Lowry *et al.*, 1951; Sigma product information).

10.1. Preparación de las muestras para la determinación de proteínas

Previamente a la determinación de proteínas se procedió a disolver el reactivo de Lowry en 40mL de H₂O_{bidestilada}.

- Se recogió el pelet de las muestras previamente centrifugadas, el cual contiene las proteínas y se le agregó sosa [1N] (NaOH) en igual volumen al de la muestra ácida extraída.
- Estas muestras se conservaron a -20°C hasta su posterior utilización.
- Se añadió la muestra (de 10 a 25 μ L) a un tubo de ensayo y se completó con agua bidestilada hasta un volumen de 1mL.
- Luego se preparó una recta patrón con seroalbúmina bovina (BSA) en cantidades comprendidas entre las concentraciones

0,01 y 0,1 mg/mL de igual forma que las muestras (10 a 25 μ L y se completó con agua bidestilada hasta un volumen de 1mL).

- Se preparó un blanco con 1ml de agua bidestilada.
- Se añadió 1mL del reactivo de Lowry a cada tubo, se agitó en el vórtex y se incubó 20 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.
- Se añadieron 500 μ L del reactivo de Folin, se agitó en el vórtex y se incubó durante 30 minutos en oscuridad.
- Se realizó una lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 660 nm.

10.2. Cálculos para determinar la concentración de proteínas

Se resta a cada muestra la absorbancia del blanco y se valoran frente a la recta patrón construida con seroalbúmina bovina (BSA) en cantidades comprendidas entre las concentraciones 0,01- 0,1 mg/mL.

11. Determinación de la concentración de GSH celular por medio de la reacción de la glutatión transferasa

Se utilizó el método descrito por Brigelius *et al.* (1983) reacción que se muestra en la Figura 17.

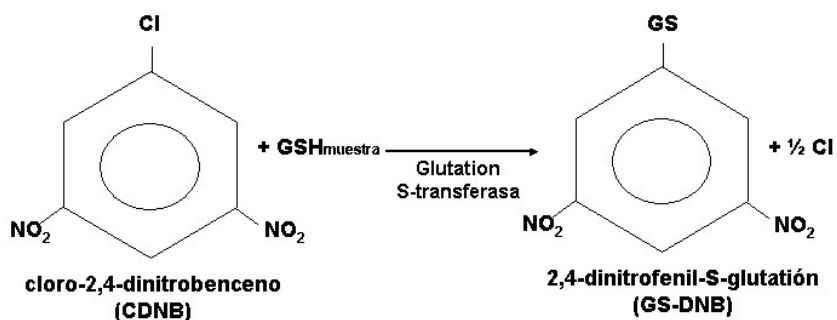


Figura 17: Conjugación del GSH con el CDNB catalizado por la glutacion S-transferasa.

11.1. Preparación de la muestra para determinación de GSH celular por transferasa

La preparación de las muestras se realizó sobre hielo:

- Se eliminó el medio de cultivo.
- Las placas se lavaron un par de veces con PBS frío.
- Para lisar las células se agregó PCA 6% con EDTA [0.2mM] en función de la densidad celular (Tabla 12).

Tratamiento	Volumen μL de tampón de lisis	
Control		200
Cis10 μM	18hs	160
	24hs	120
	40hs	120
	48hs	100
Cis 50 μM	18hs	120
	24hs	100
	40hs	100
	48hs	80

Tabla 12: Volúmenes de tampón de lisis utilizado para la extracción de muestras para determinación de GSH por transferasa.

- Luego se raspó la placa y se recogió la muestra.
- La muestra se centrifugó a 15000rpm, durante 15 minutos a 4°C.
- Se extrajo y se midió el volumen de muestra ácida (sobrenadante) y se usó para la reacción enzimática.
- Al pelet se le agregó sosa [1N] (NaOH) en igual volumen al de la muestra ácida extraída (para la posterior determinación de proteínas).

11.2. Determinación enzimática de GSH

- Se prepara el CDNB a 2mg/mL en etanol absoluto.
- En una microcubeta se añadieron los siguientes reactivos:
 - 770 μ L de fosfato potásico [0,1M], EDTA [1mM], pH:7 (KPI atemperado).
 - 80 μ L de muestra (muestra ácida conteniendo GSH disuelto en PCA 6% EDTA [0.2mM]).
 - 10 μ L de la solución de 1-cloro-2,4-dinitrobenzono [10mM] (CDNB) en etanol al 100%.
- Se realizó una primera medición, E1, en espectrofotómetro a 340nm.
- La reacción comienza al añadir 10 μ L de una solución de glutatión S-transferasa 500 U/mL en la microcubeta preparada con la muestra (Esta solución se dializó previamente durante 6hs en tampón fosfato cambiando el tampón de diálisis cada 2hs).
- Por ultimo se registró la variación de la absorbancia a 340nm hasta el final de la reacción, E2.
- La diferencia E2-E1 es proporcional a la cantidad de GSH existente.

11.3. Cálculos para la determinación enzimática de GSH

Para calcular la concentración de GSH se utilizó el coeficiente de absorción molar del 2,4-dinitrofenil-S-glutación a 340nm:

$$\varepsilon = 9,6mM^{-1} * cm^{-1}$$

Para referenciar los niveles de GSH celular según el número de células se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{\left(\frac{A_{GSH\ Mtra} - A_{GSH\ Bco}}{\varepsilon} * \frac{VC}{VMAC} * VMA \right)}{N^{\circ} \text{ Células } (1 \times 10^6)} = \left[\frac{\mu mol \text{ GSH}}{1 \times 10^6 \text{ células}} \right]$$

Donde:

$A_{GSH\ Mtra}$ = Medida de absorbancia del GSH de la muestra (E2),

$A_{GSH\ Bco}$ = Medida de absorbancia del GSH blanco (E1),

ε = Coeficiente de absorción molar del CDNB a 340nm,

VC = Volumen final en la cubeta,

VMAC = Volumen de muestra ácida añadido a la cubeta,

VMA = Volumen de muestra ácida obtenido,

Para referenciar los niveles de GSH celular según la concentración de proteínas en [mg/mL] se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{\left(\frac{A_{GSH\ Mtra} - A_{GSH\ Bco}}{\varepsilon} * \frac{VC}{VMAC} * VMA \right)}{[mg \text{ proteína}]} = \left[\frac{\mu mol \text{ GSH}}{mg \text{ proteína}} \right]$$

Donde:

[mg proteína] = Concentración de proteína de la muestra en mg.

12. Determinación de la expresión de proteínas por Western Blotting

A través de la metodología de Western Blotting se analizó la expresión de diferentes proteínas:

- proteínas de proliferación (PCNA, ID2);
- proteínas oxidadas y glutationiladas;
- expresión de la proteína anti-apoptótica bcl-2;
- Proteínas de fusión mitocondrial (DRP/OPA) y fisión mitocondrial (Mitofusina).

12.1. Obtención de las muestras para western blotting

- Para realizar la extracción de las muestras se trabajó sobre hielo. El lavado de las placas se hizo con una solución de PBS y ortovanadato y luego se retiraron completamente todos restos de medio.
- Para la extracción total de proteínas celulares se utilizó un tampón de lisis TRIS/SDS/Glicerol
 - 83mL de TRIS (0,927gr: 100mL H₂O_{bidestilada} a pH= 6,8);
 - 2gr SDS;
 - 10mL de glicerol;
 - Ortovanadato-Na a una concentración final de [200nM];
 - Cocktail inhibidor de proteasas

Se utilizó una proporción de tampón en función de la densidad celular de la muestra (Tabla 13).

- Luego se dejaron reposar durante 10 minutos sobre el hielo.
- Transcurrido el tiempo de incubación se rasparon con un cell scraper y se recogió cada muestra en sendos eppendorf.
- Las muestras recogidas se calientan a 90°C por 10 minutos.

Material y métodos

- Por último las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta el momento de su utilización.

Tratamiento		Volumen μL de tampón de lisis
Control		200
Cis $10\mu\text{M}$	18hs	120
	24hs	100
	40hs	100
	48hs	80
Cis $50\mu\text{M}$	18hs	100
	24hs	80
	40hs	100
	48hs	80

Tabla 13: Volúmenes de tampón de lisis usado para la extracción de muestras de proteínas totales.

12.2. Procedimiento para determinación de expresión de proteínas por electroforesis SDS/ PAGE

El análisis de la expresión de proteínas se realizó mediante al técnica de inmunoblot. Para ello se utilizó la misma cantidad de proteínas en todas las muestras (10-15 μg). Previamente se prepararon los siguientes tampones y soluciones:

- TRIS pH=6,8;
- TRIS pH= 8,8;
- TRIS-glicina a pH= 8,3: TRIS [25mM], glicina [200mM], 0,1% SDS);
- Tampón de transferencia a pH=8,3: TRIS [25mM]; glicina [192mM], metanol 20% v/v;
- TBST: Tris/HCl [25 mM] a pH 7.5; NaCl [0,15M]; 0.05% (v/v) de Tween 20;

- Solución de bloqueo: leche descremada comercial 5% (w/v) en TBST
- Las muestras se calentaron durante 5 minutos en simple buffer y luego se separaron mediante electroforesis SDS/PAGE.
- Se utilizó un stacking gel de poliacridamina al 4% en una solución buffer de TRIS pH=6,8. Para la separación de las proteínas se utilizaron geles de 10-12% de poliacridamina con 0,1% de SDS, de acuerdo al protocolo estándar establecido en nuestro grupo, en tampón de TRIS pH= 8,8.
- Los geles fueron sumergidos en un tampón de TRIS-glicina pH= 8,3 y se les aplicó una corriente eléctrica de voltaje constante (100V) por al menos 2hr.
- Luego de la electroforesis las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (poro de 0.2 μ m) durante 2hr a 4°C en un tampón de transferencia de pH=8,3, para lo que se utilizó un sistema Mini-protean II (BioRad).

Para visualizar las proteínas se utilizó el siguiente protocolo:

- Bloqueo: Las membranas fueron incubadas en la solución de bloqueo durante 1hr a temperatura ambiente y sobre un agitador orbital;
- Immunostaining: Las membranas se lavaron 3 veces por 5 minutos en TBST, luego fueron incubadas con los anticuerpos primarios diluidos en TBST: 5% de BSA a 4°C durante una noche. Cumplido el tiempo de incubación las membranas se lavaron con TBST y se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario (conjugated to horseradish peroxidase, Santa Cruz) durante 1hr a temperatura ambiente.

- Detección: Finalmente se lavaron las membranas con TBST y para la detección de proteínas se utilizó un reactivo quimioluminiscente y siguiendo las especificaciones de la casa comercial (Cell Signaling Technologies). El revelado se realizó con una cámara CCD. También se utilizó un sistema alternativo de revelado consistente en colocar la membrana sobre un film fotográfico y exponerlo a la luz. Se obtiene así un revelado del bandeo correspondiente a la expresión de proteínas de la membrana. En ambos casos las imágenes obtenidas se almacenaron en formato digital tipo Tif.

13. RT- PCR

En el presente trabajo se utilizó la técnica de RT-PCR para evaluar la expresión génica de los siguientes genes:

PARP1; Catalasa, SOD-Mn; SOD-Cu/Zn; hOGG1; GCLC; GCLM; glutation peroxidasa; RAD51 y el encogen bcl-2.

13.1. Obtención de las muestras para western blotting

- Se elimina el medio de cultivo y se lava la placa un par de veces con PBS.
- Se agregar tripsina para levantar las células y se deja a 37°C por un par de minutos.
- Una vez las células se han despegado, las muestras se lavan con PBS y se recoge en sendos tubos.
- Se procede a una centrifugación a 4°C, a 1500 rpm durante 6 minutos.
- Luego se eliminar el sobrenadante y se resuspende cuidadosamente el pelet en 1mL de PBS frío.

- Se realiza una nueva centrifugación.
- Por último se elimina el sobrenadante y el pellet resultante se almacena a -80°C hasta el momento de su utilización.

13.2. Obtención del RNA total

Para la obtención del RNA total de cada muestra se empleó el kit PARISTM (Ambion). Se emplearon los tampones provistos por el kit y se siguieron las indicaciones de la casa comercial.

- Se agregaron $250\mu\text{L}$ de Cell Disruption Buffer a cada muestra. De este volumen se separaron $83\mu\text{L}$ para determinaciones de proteínas y los $167\mu\text{L}$ restantes se utilizaron para la extracción de RNA.
- A estas alícuotas se les agregó $167\mu\text{L}$ de Lysis Binding Solution con 2β -mercaptoetanol y mezcló en vortex. Luego se les agregó $167\mu\text{L}$ de etanol 100% y se homogeneizó la solución nuevamente.
- Se colocó el volumen del preparado en columnas que se centrifugaron 1 minuto a 10000rpm. Se realizaron 3 lavados de estas columnas con las soluciones provistas por el kit y un último lavado con las columnas vacías para eliminar posibles restos de solución de lavado.
- Por último se realizó una elución con Elution Buffer precalentado a 95°C y se dejó decantar entre 2-10 minutos a temperatura ambiente. En los volúmenes de elución se recuperó el RNA de las muestras.

13.3. Cuantificación y comprobación de pureza del RNA

La cuantificación y determinación de la pureza del RNA extraído se realizó mediante espectrofotometría, para lo cual se utilizó el

espectrofotómetro GeneQuantPro (Amersham Bioscience) disponible en la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina. La comprobación de la pureza del RNA se hizo mediante la relación de las medidas $\lambda=260\text{nm}$ y $\lambda=280\text{nm}$.

Para la determinación se utilizaron unos $3\mu\text{L}$ de muestra, recogidos con un capilar. Primero se realizó la medición del blanco y seguidamente se midió la absorbancia de cada una de las muestras extraídas, a $\lambda=260\text{nm}$ y a $\lambda=280\text{nm}$. De esta forma el software calcula automáticamente los valores correspondientes a la concentración del RNA extraído y el cociente entre las mediciones de absorbancia:

$$\frac{\lambda(260\text{nm})}{\lambda(280\text{nm})} \geq 2,0$$

Los valores iguales o superiores a 2.0 indican que el RNA obtenido es de buena calidad, puro y limpio de proteínas.

13.4. Protocolo de RT-PCR

La reacción de RT-PCR se llevó a cabo en dos pasos. Primero se realizó la transcripción inversa, mediante la cual se obtuvo el cDNA. En el segundo paso el cDNA sintetizado se amplificó mediante PCR, de esta forma se evaluó la expresión relativa de los genes estudiados para en la presente tesis. Para ello se utilizó la RT-PCR disponible en la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina (ABI 7900HT, Applied Biosystems).

Para la transcripción inversa se utilizó el High Capacity cDNA-Reverse Transcription Kit (AB Applied Biosystems). Se siguieron las especificaciones de la casa comercial:

- Se preparó el master mix 2X.

- Se agregó master mix a cada muestra de RNA obtenido: se colocaron 10µL de master mix 2X por pocillo en una placa de 96 pocillos y se agregaron 250ngr RNA total en 10µL de H₂O libre de RNAsas, correspondiente a cada muestra extraída. Se centrifugó brevemente la placa.
- Se colocó la placa en el termociclador, siguiendo las indicaciones del producto (Tabla 14).

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Temperature (°C)	25	37	85	4
Time	10 min	120 min	5 sec	∞

Tabla 14: Condiciones estipuladas para el termociclado.

La amplificación del cDNA sintetizado se llevó a cabo con el kit TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), lo que permite cuantificar el producto de la reacción de la PCR mediante el incremento de fluorescencia. Los cebadores seleccionados (Taqman Gene Expresión Assays, Aplied Biosystems) fueron los siguientes:

- Glutamato-cisteína ligasa subunidad catalítica (GCLC): HS 00155249-m1;
- Glutamato-cisteína ligasa subunidad moduladora (GCLM): HS 00157694-m1;
- Glutation peroxidasa (GPx): HS 00829989-gH;
- GAPDH: HS 99999905-m1.

La PCR se realizó en placas de 96 pocillos, donde se colocaron 2µL de cDNA. Se tomó como control interno el RNA de la proteína ribosomal 18S rRNA, dado que este RNA se expresa a un nivel

constante en muchos tejidos y líneas celulares cultivadas en diferentes condiciones fisiológicas. Las condiciones de amplificación fueron:

2 minutos a 85°C para conseguir un efecto hot-start, 94°C durante 2 minutos y a continuación: 94°C durante 45 segundos, 30 segundos a la temperatura de anillado y 68°C durante 1 minuto. Esto último se repite por 40 ciclos. Por último, existe un periodo de extensión final de 5 minutos a 72°C.

Para la cuantificación de las curvas de amplificación se utilizó el programa Sequence Detection System 9700 (Applied Biosystem). De esta manera se obtuvo la expresión de los genes estudiados.

14. Análisis estadístico

Para las comparaciones múltiples se utilizó un ANOVA de dos vías y los correspondientes contrastes se realizaron con el estadístico de Tukey. En los casos en los que no fue posible utilizar dicho estadístico, se realizaron las comparaciones de las medias con test no-paramétricos. Para las comparaciones de pares de muestras se utilizó el estadístico de Mann-Whitney y para las comparaciones múltiples el de Kruscall-Wallis. Cuando fue necesario establecer diferencias entre tratamientos se utilizaron los contrastes Z. En todos los casos se trabajó con un nivel de significancia del 95% ($\alpha=0.05$).

RESULTADOS

RESULTADOS

En la presente tesis doctoral se ha estudiado la relación entre el núcleo y las mitocondrias durante el proceso de apoptosis inducido con cisplatino. Se han utilizado dos tipos concentraciones de cisplatino, [10 μ M] y [50 μ M] y se ha comparado las células MCF7 wild type (MCF7+/-) y una variedad que sobre-expresa el oncogen bcl-2 (MCF7 +/+). En general los resultado muestran que las MCF7+/+ son más resistentes al tratamiento y que están más protegidas que las MCF7+/- . A continuación se analizarán, en primera instancia los resultados obtenidos con el tratamiento de cisplatino [10 μ M] y posteriormente los resultados del tratamiento de ambas cepas con cisplatino [50 μ M].

1. Tratamiento con cisplatino [10 μ M].

1.1. Determinación de la citotoxicidad mediante contaje directo de células.

En las células MCF7+/- se puede ver una disminución del número de células desde las 16hs de tratamiento respecto del control ($p=0.010$). Esta tendencia se mantiene a las 24hs, 40hs y 48hs ($p=0.008$; $p=0.005$ y $p=0.002$, respectivamente), aunque de forma atenuada (Figura 18).

En las células MCF7+/+ a las 16hs de tratamiento prácticamente el número de células no se ve afectado ($p=0.090$), comparando con el control. Sin embargo, a las 24hs de tratamiento si se observa una disminución estadísticamente significativa del número de células,

Resultados

respecto del control ($p=0.007$). A las 40hs de incubación se mantiene bajo el número de células ($p=0.002$), pero la tendencia se atenúa y baja otra vez a las 48hs ($p=0.001$).

No existen diferencias significativas en el número de células en MCF7+/- y MCF7+/+ en la condición control ($p=0.657$). Sin embargo, a las 16hs de tratamiento las diferencias en la respuesta al tratamiento son estadísticamente significativas ($p=0.017$). La diferencia del número de células entre ambas cepas es también significativa a las 24hs, 40hs y 48hs de tratamiento ($p=0.038$, $p=0.050$ y $p=0.020$, respectivamente).

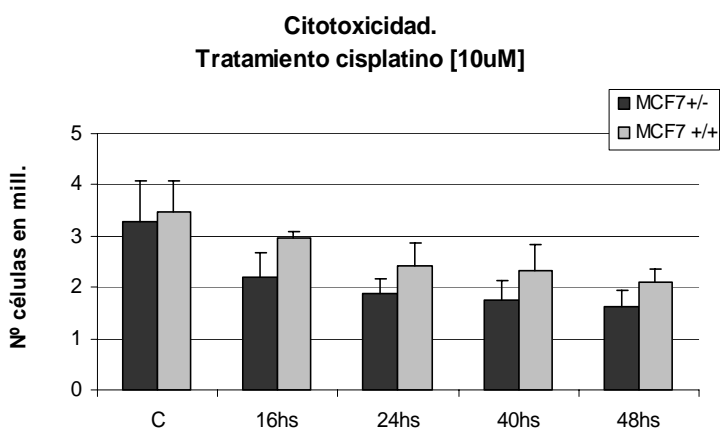


Figura 18. Evaluación de la citotoxicidad inducida por el tratamiento con cisplatino [10 μ M] a través del conteo directo en MCF7+/- y MCF7+/+, condición control y tratadas a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs.

1.2. Cuantificación del contenido de ADN. Fase G0/G1 del ciclo celular.

En la cepa MCF7+/- la cantidad de células en la fase G0/G1 disminuye a lo largo del tratamiento (Figura 19). A las 16hs de

incubación con cisplatino se observa una leve disminución respecto del control pero esta diferencia no es significativa ($p=0.229$). Esta tendencia es un poco más marcada a las 24hs de tratamiento, donde las diferencias respecto del control son estadísticamente significativas ($p=0.050$). A las 40hs de incubación con cisplatino [$10\mu\text{M}$] la disminución en la fase G0/G1 es aún mas pronunciada y se mantiene hasta las 48hs de tratamiento ($p=0.008$ y $p=0.010$, respectivamente).

En las células MCF7+/+ tanto a las 16hs de incubación como a las 24hs las diferencias de las cantidad de células en la fase G0/G1 no son significativas respecto del control ($p=0.631$ y $p=0.936$, respectivamente). Sin embargo, a las 40hs y 48hs de tratamiento la cantidad de células en esta fase disminuye levemente lo que hace la diferencia respecto de la condición control sea estadísticamente significativa ($p=0.004$ y $p=0.016$, respectivamente).

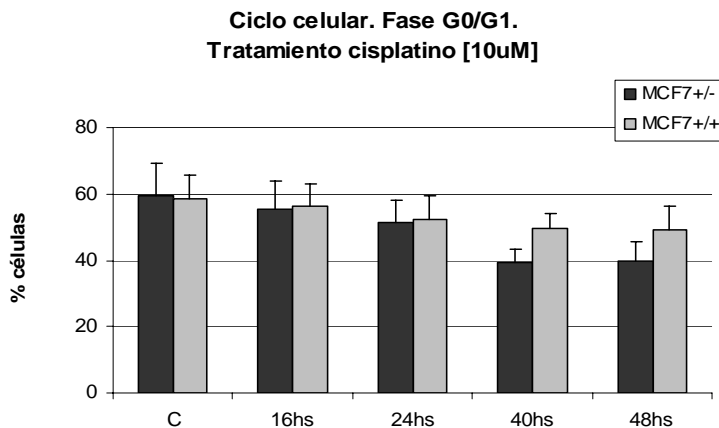


Figura 19. Fase G0/G1 del ciclo celular en MCF7+/- y MCF7+/+, condición control y tratadas con cisplatino [$10\mu\text{M}$] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs.

Resultados

En relación a las condiciones control, no están diferencias significativas en el nivel de células en la fase G0/G1 entre ambas cepas ($p=0.631$). Si bien en ambas cepas el tratamiento disminuye levemente la cantidad de células en esta fase, tanto a las 16hs como a las 24hs de incubación las diferencias no son significativas entre ambas cepas. Por su parte, a las 40hs y 48hs de tratamiento estas diferencias en la cantidad de células en la fase G0/G1 entre las MCF7+/- y MCF7+/+ son estadísticamente significativas ($p=0.004$ y $p=0.016$, respectivamente). Las MCF7+/- presentan menos células en la fase G0/G1 que las MCF7+/+.

1.3. Cuantificación del contenido de DNA. Fase S+M/G2 del ciclo celular.

En las células MCF7+/- se puede observar un incremento en la cantidad de células en la fase S+M/G2 a medida que transcurre el tiempo de incubación con el cisplatino [$10\mu\text{M}$] (Figura 20). A partir de las 16hs de incubación con el cisplatino se produce un leve aumento en la cantidad de células en la fase de proliferación, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p=0.150$). A partir de las 24hs de tratamiento este aumento en la fase S es significativo respecto del control ($p=0.020$). A las 40hs de tratamiento el incremento en la fase S muestra su nivel más alto y a las 48hs baja ligeramente. En ambos casos las diferencias son significativas respecto del control ($p=0.025$ y 0.025 , respectivamente).

En las MCF7+/+ puede observarse un incremento en la cantidad de células en la fase de proliferación como resultado del tratamiento con cisplatino. Tanto a las 16hs como a las 24hs de tratamiento esta diferencia no es significativa ($p=0.749$ y $p=0.200$). A las 40hs y 48hs

de incubación el aumento en la cantidad de células en proliferación es significativo comparado con la condición control ($p=0.038$ y $p=0.039$, respectivamente).

Al comparar ambas cepas en cada tiempo de incubación, se obtiene que las diferencias no son significativas entre los controles ($p=0.200$). Tampoco lo son a las 16hs o 24hs de incubación con el cisplatino ($p=0.974$ y $p=0.789$, respectivamente). Sin embargo estas diferencias son estadísticamente significativas a las 40hs y 48hs de tratamiento ($p=0.037$ y $p=0.044$, respectivamente).

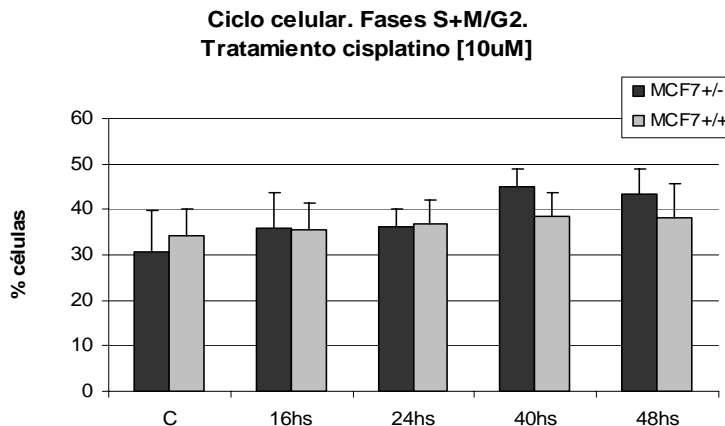


Figura 20. Fase S+/MG2 del ciclo celular en MCF7+/- y MCF7+/+, muestras control y tratadas con cisplatino [10 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs.

1.4. Cuantificación del contenido de DNA. Células muertas.

En las MCF7+/- el incremento de la cantidad de células muertas producido por el tratamiento con cisplatino no es significativo a las 16hs ni a las 24hs de incubación ($p=0.872$ y $p=0.199$, respectivamente) (Figura 21). Es a las 40hs y 48hs de tratamiento cuando el incremento en la cantidad de células muertas es

Resultados

significativo respecto de la condición control ($p=0.004$ y $p=0.004$, respectivamente). En estos tratamientos se observa un incremento notorio en la cantidad de células muertas, en ambos casos se duplica el nivel obtenido para la condición control.

En las MCF7+/+ el tratamiento con cisplatino [$10\mu\text{M}$] no produce un aumento notorio en la cantidad de células muertas a las 16hs de incubación ($p=0.872$). Si bien a las 24hs y 40hs de tratamiento se mantiene se obtiene un leve aumento de las células muertas, estas diferencias no son significativas respecto del control ($p=0.128$ y $p=0.078$). Sólo a las 48hs de tratamiento se obtienen diferencia estadísticamente significativas en la cantidad de células muertas ($p=0.016$).

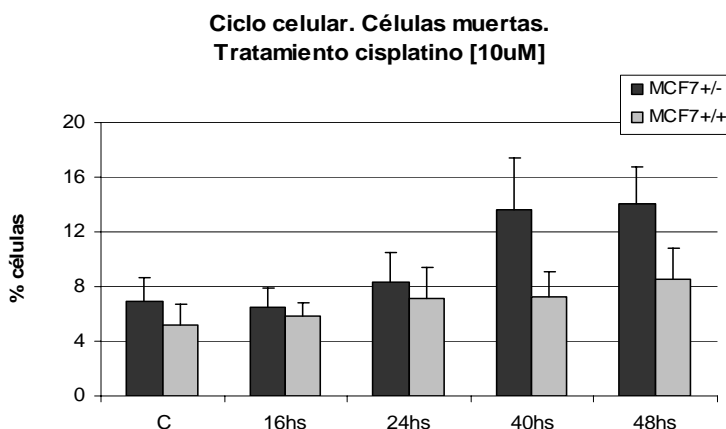


Figura 21. Porcentaje de células muertas en MCF7+/- y MCF7+/+, muestras control y tratadas con cisplatino [$10\mu\text{M}$] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs.

La condición control para las MCF7+/- tienen mayor cantidad de células muertas que las MCF7+/+, pero esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p=0.109$). Esta tendencia se mantiene a las 16hs y a las 24hs de incubación con cisplatino [$10\mu\text{M}$], pero en

ninguno de estos tratamientos las diferencias entre ambas son estadísticamente significativas ($p=0.172$ y $p=0.378$, respectivamente). A las 40hs y 48hs de tratamiento estas diferencias son entre ambas cepas son significativas ($p=0.010$ y $p=0.010$, respectivamente). En ambos casos el nivel de células muertas en la cepa MCF7+/- es superior al obtenido para las MCF7+/+.

1.5. Determinación del nivel de GSH en extractos celulares.

En las células MCF7+/- el cisplatino produce un aumento en el nivel de GSH celular a partir de las 16hs de incubación, esta diferencia es significativa respecto del control ($p=0.034$). A las 24hs de incubación se mantiene la misma tendencia ($p=0.049$), mientras que a las 40hs de tratamiento este nivel se incrementa de forma notoria ($p=0.034$) y se mantiene en el tratamiento de 48hs ($p=0.034$) (Figura 22).

Las células MCF7+/+ exhiben una disminución del nivel de GSH celular a las 16hs de incubación con el cisplatino ($p=0.034$). A las 24hs de incubación también se observa una disminución, aunque no tan marcada, siendo la misma no significativa al compararla con el control ($p=0.174$). El tratamiento de 40hs causa un aumento significativo del nivel de GSH celular ($p=0.050$), mientras que el incremento más elevado se observa en el tratamiento de 48hs ($p=0.050$).

Los controles de ambas cepas muestran diferencias significativas ($p=0.021$), siendo más bajo el nivel de GSH celular en las MCF7+/- . En los tratamientos de 16hs y 24hs de incubación los niveles de GSH son superiores en las MCF7+/-, pero estas diferencias no son significativas. A las 40has de tratamiento las MCF7+/- mantienen un mayor nivel de GSH que las MCF7+/+ ($p=0.050$). A las 48hs de

Resultados

tratamiento se puede ver que las MCF7+/+ presentan un nivel más elevado de GSH celular ($p=0.050$).

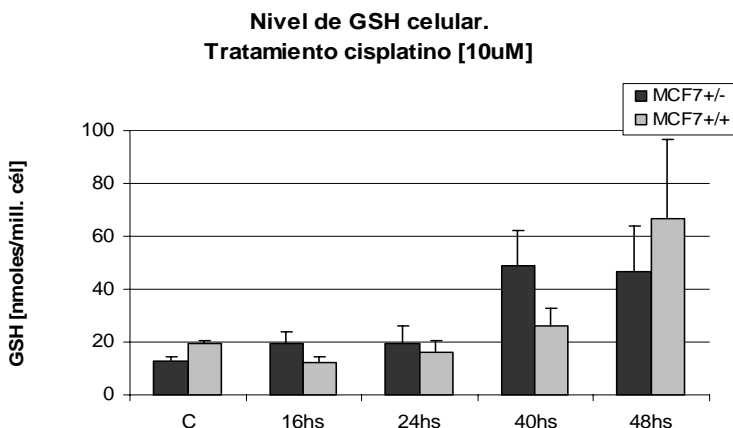


Figura 22. Determinación del nivel de GSH [nmol/millón de células] en extractos celulares en MCF7+/- y MCF7+/+, muestras control y tratadas con cisplatino [10 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs.

1.6. Determinación de los niveles de ROS celular.

A las 16hs de incubación con cisplatino [10 μ M] se produce un leve incremento de los niveles celulares de ROS ($p=0.620$) y se vuelve más pronunciado hacia las 24hs de tratamiento, siendo significativo respecto del control ($p=0.041$). Esta tendencia se mantiene a las 40hs de tratamiento y a las 48hs es cuando se registra el mayor aumento de ROS celular ($p=0.050$) (Figura 23).

En las MCF7+/+ los tratamiento de 16hs, 24hs y 40hs con cisplatino no produce un incremento significativo en los niveles celulares de ROS respecto del control ($p=0.564$, $p=0.248$ y $p=0.108$, respectivamente). A las 48hs de incubación es cuando se registra un

incremento significativo del nivel de ROS celular respecto de la condición control ($p=0.021$).

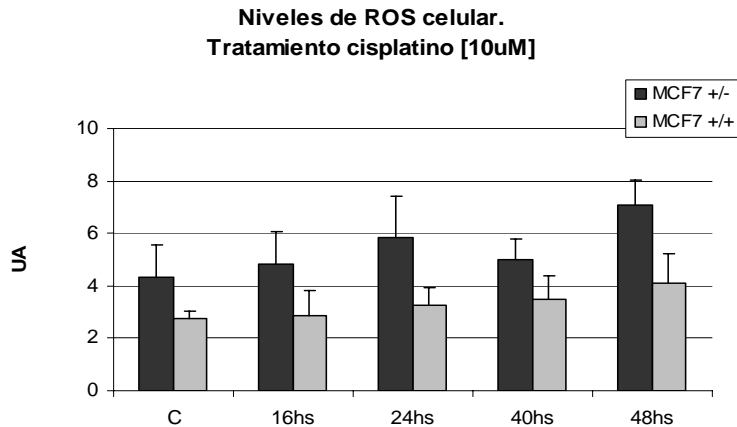


Figura 23. Cuantificación del nivel de ROS celular en MCF7 \pm y MCF7 \pm , muestras control y tratadas con cisplatino [10 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs.

Las MCF7 \pm presentan niveles de ROS más elevados para la condición control que las MCF7 \pm ($p=0.034$). Esta tendencia también se observa a las 16hs y a las 24hs de tratamiento ($p=0.050$ y $p=0.033$, respectivamente). A las 40hs de incubación los niveles de ROS celular siguen siendo más elevados en las MCF7 \pm , pero esta diferencia no es significativa ($p=0.086$). Sin embargo, a las 48hs de tratamiento los niveles de ROS de las MCF7 \pm es significativamente inferior al de las MCF7 \pm ($p=0.034$).

1.7. Determinación del potencial de membrana mitocondrial en MCF7 \pm y MCF7 \pm .

En las MCF7 \pm se produce una bajada del potencial de membrana mitocondrial como consecuencia del tratamiento con cisplatino

Resultados

[10 μ M]. Esta bajada es leve a las 16hs, 24hs y 48hs de incubación ($p > 0.050$). Cuando las células son incubadas por un lapso de 48hs el potencial de membrana mitocondrial se ve más afectado, se produce una despolarización que es significativa respecto de la condición control ($p = 0.006$) (Figura 24).

Por su parte en las células MCF7+/+ también se produce una leve despolarización del potencial de membrana mitocondrial a las 16hs, 24hs y 40hs de tratamiento con cisplatino, pero no son significativamente diferentes del valor control ($p = 0.100$; $p = 0.115$ y $p = 0.119$, respectivamente). A las 48hs de incubación se puede observar que el potencial de membrana mitocondrial se recupera alcanzando valores similares al control ($p = 0.276$).

El cisplatino a una concentración de [10 μ M] produce una despolarización en el potencial de membrana mitocondrial de las MCF7+/- pero prácticamente no parece afectar a las MCF7+/+. La condición control de las MCF7+/- es ligeramente menor que las MCF7+/+, pero estas diferencias no son significativas ($p = 0.943$). Al comparar ambos tipos celulares a lo largo del tratamiento se observa esta misma tendencia, tanto a las 16hs, 24hs y 40hs de incubación esta condición se mantiene ($p = 0.971$; $p = 0.720$ y $p = 0.984$, respectivamente). Sin embargo la incubación con cisplatino por 48hs produce una despolarización marcada en las MCF7+/-, mientras que prácticamente no afecta a las MCF7+/+. Esta condición presenta diferencias significativas al comparar ambas cepas ($p = 0.003$).

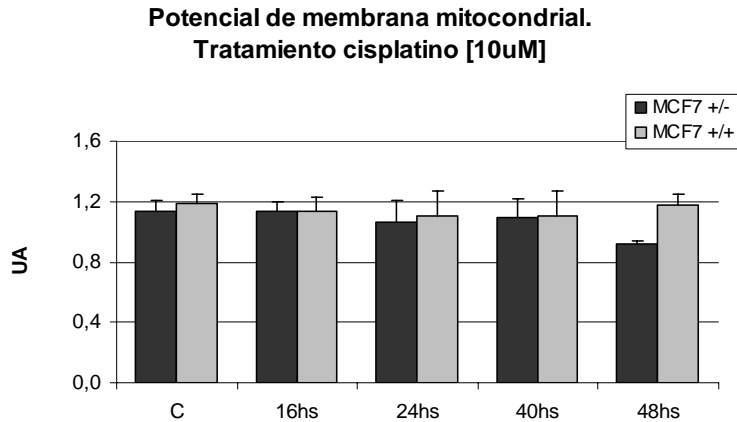


Figura 24. Determinación del potencial de membrana mitocondrial en MCF7 \pm y MCF7 \pm , muestras control y tratamientos con cisplatino [10 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs.

1.8. Compartimentación celular del GSH y co-localización de células apoptóticas en MCF7 \pm y MCF7 \pm tratadas con cisplatino [10 μ M].

En la figura 25 se pueden ver en verde la distribución del GSH de las células MCF7 \pm , en rojo se marcaron las células apoptóticas y en azul los núcleos. En la condición control (imágenes del extremo superior) se puede apreciar una mayor concentración de GSH en el núcleo, el cual se presenta un verde más intenso, que en el citosol. No se observan células apoptóticas en esta condición, las mismas deberían verse en marcadas en rojo. El tratamiento con cisplatino parece intensificar esta compartimentación del GSH en el núcleo, aunque en algunos casos también se observa una concentración mitocondrial. Luego de 16hs de incubación con cisplatino la concentración nuclear del GSH es ligeramente superior al observado en la condición control, pero no se observa un incremento de células

Resultados

apoptóticas. Estas tendencia se mantiene al prolongar el tiempo de incubación por un lapso de 24hs. A las 40hs de tratamiento con el citostático se pueden algunas células sin marca de anexina (no apoptóticas) con un incremento de GSH, mientras que las células apoptóticas (marca roja positiva) muestran niveles bajos de GSH tanto en el citosol como en núcleo (señaladas con una flecha blanca). En estas células se puede ver como el material genético (azul) se dispone en forma anular. Por su parte en el tratamiento de 48hs se observan que en las células apoptóticas (marcadas en rojo) el GSH es homogéneo dentro de la célula, mientras que otras células (sin marca de anexina) presentan un elevado nivel de GSH que parece concentrarse sobre todo en el núcleo.

En las MCF7+/+ (Figura 26) las células de la condición control muestran una clara compartimentación del GSH (en verde) en el núcleo y en algunos casos también en las mitocondrias. A lo largo del tratamiento con el cisplatino [10 μ M] se observa un incremento en el nivel del GSH. A las 16hs de incubación los núcleos parecen brillar aún más que en el control, es decir que el GSH se concentra en organela. A las 24hs de incubación el fenómeno de compartimentación nuclear del GSH se hace más evidente. A las 40hs y 48hs de tratamiento aumenta notoriamente el nivel celular de GSH, sobre todo parece concentrarse en el núcleo. Sobre todo hacia el final del tratamiento se incrementa el nivel de apoptosis.

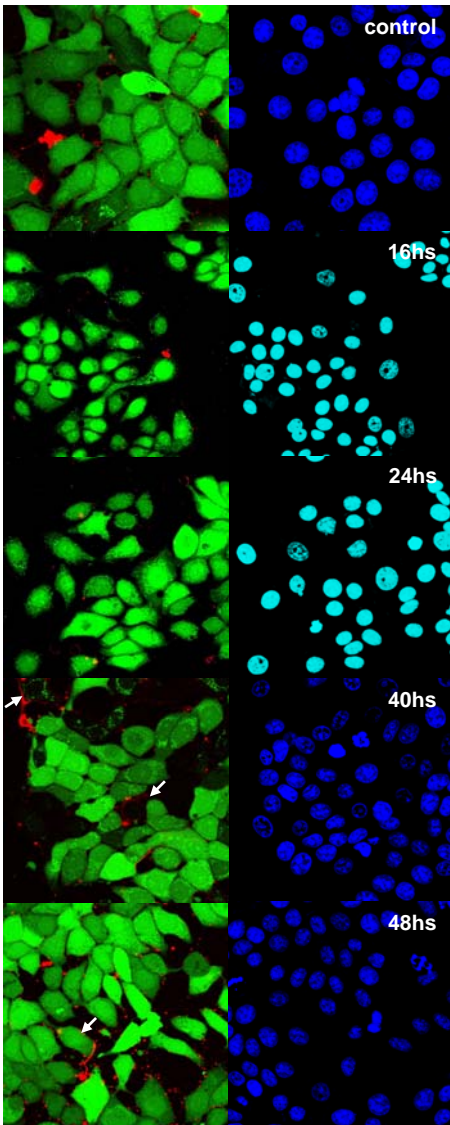


Figura 25. Compartimentación del GSH celular en MCF7+/-, control y tratadas con cisplatino [10 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs. Se puede ver en la columna de la derecha el GSH marcado en verde y con rojo las células apoptóticas. En la columna de la izquierda se muestran los núcleos en azul.

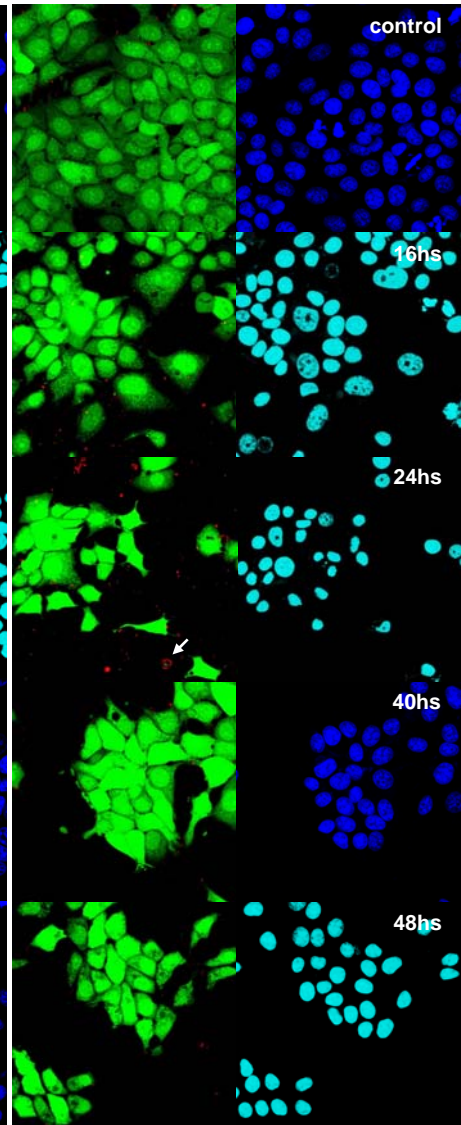


Figura 26. Compartimentación del GSH celular en MCF7+/+, control y tratadas con cisplatino [10 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs de incubación. Se puede ver en la columna derecha el GSH marcado en verde y con rojo las células apoptóticas y en la columna izquierda los núcleos en azul.

1.9. Análisis de la distribución mitocondrial y marcaje de células apoptóticas en MCF7+/- y MC7+/+.

En las figuras 11 y 12 se muestra un análisis conjunto de la distribución mitocondrial y el nivel de apoptosis. En estas imágenes las mitocondrias se han marcado con verde, las células apoptóticas en rojo y los núcleos en azul. Las mitocondrias de la condición control en las MCF7+/- (Figura 27) tienen una forma tubular alargada y se distribuyen de manera homogénea a lo largo de todo el citoplasma, formando una especie de entretejido.

Luego de 16hs de incubación con cisplatino [10 μ M], la morfología mitocondrial parece mantenerse semejante a las del control. Sin embargo, en algunas células la distribución se ve ligeramente alterada, ya no es homogénea, las mitocondrias tienden a compactarse ubicándose muy cercanas unas de otras (señalado con una flecha blanca). A las 24hs de incubación esta distribución agregada es aún más evidente. En algunas células la distribución mitocondrial es similar a las de las células control, pero en otras las mitocondrias se colocan más compactadas en el área perinuclear.

A las 40hs de tratamiento aún se pueden ver células que conservan la morfología y distribución mitocondrial de la condición control, pero también se pueden ver células con las mitocondrias ubicadas alrededor del núcleo. En algunos casos las organelas parecen perder su forma tubular alargada por una forma más puntiforme. En el tratamiento de 48hs las mitocondrias puntiformes son evidentes en algunas células y se pueden ver células apoptóticas (marcadas en rojo).

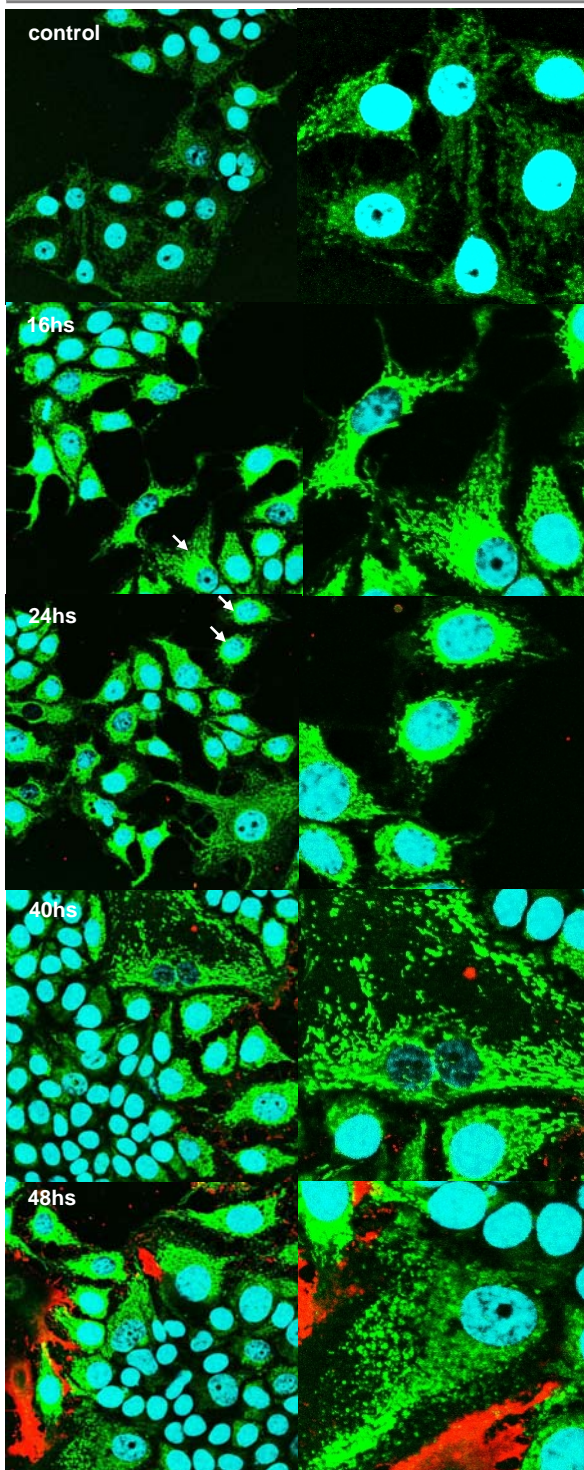


Figura 27. Análisis de la distribución mitocondrial y co-localización de células apoptóticas en MCF7+/- control y tratadas con cisplatino [10 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs. Las mitocondrias están marcadas en verde, con rojo las células apoptóticas y los núcleos en azul. La segunda columna corresponde a una sección de la imagen ampliada.

Resultados

En la condición control de las células MCF7+/+ (Figura 28) se puede ver que las mitocondrias son tubulares y alargadas y que se ubican por todo el citosol. En estas células el tratamiento con cisplatino [10 μ M] afecta sobre todo la distribución y no tanto la forma de las mitocondrias. En las células incubadas por 16hs con el citostático los patrones mitocondriales son semejantes a los observados en la condición control. Se conserva la forma tubular alargada y la distribución homogénea.

Al incubar las muestras por 24hs con el citostático, las células conservan la distribución homogénea de las mitocondrias a lo largo del citosol. Estas características se mantienen en la tratamiento de 40hs con cisplatino. En la mayoría de las células se conserva la distribución mitocondrial homogénea. El tratamiento de 48hs parece afectar la distribución mitocondrial, en algunas células las mitocondrias parecen concentrarse sobretodo alrededor del núcleo y no tanto a lo largo del citoplasma (señalado con una flecha blanca).

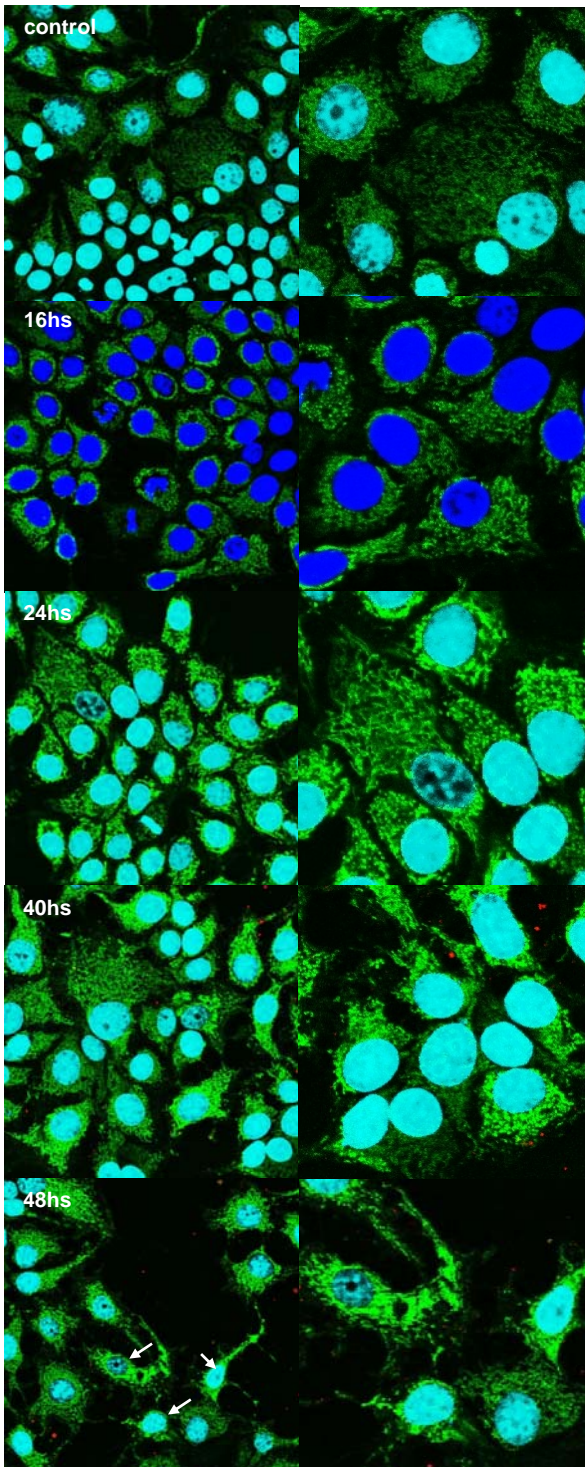
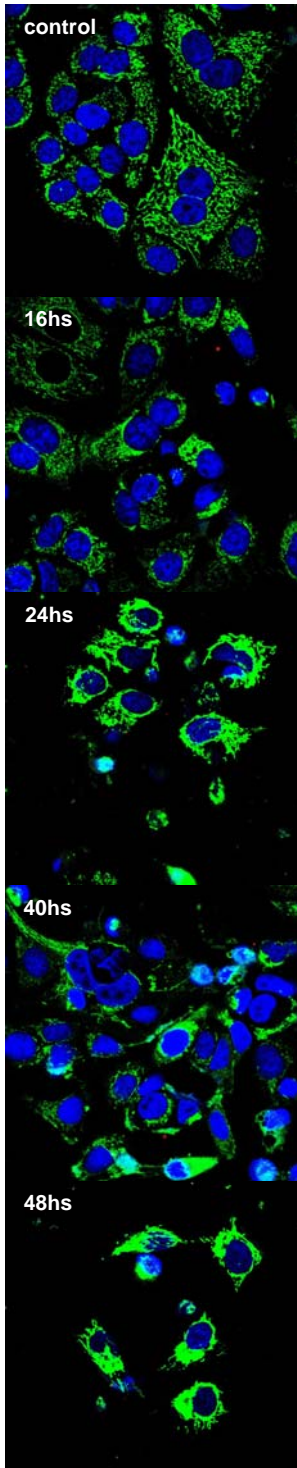


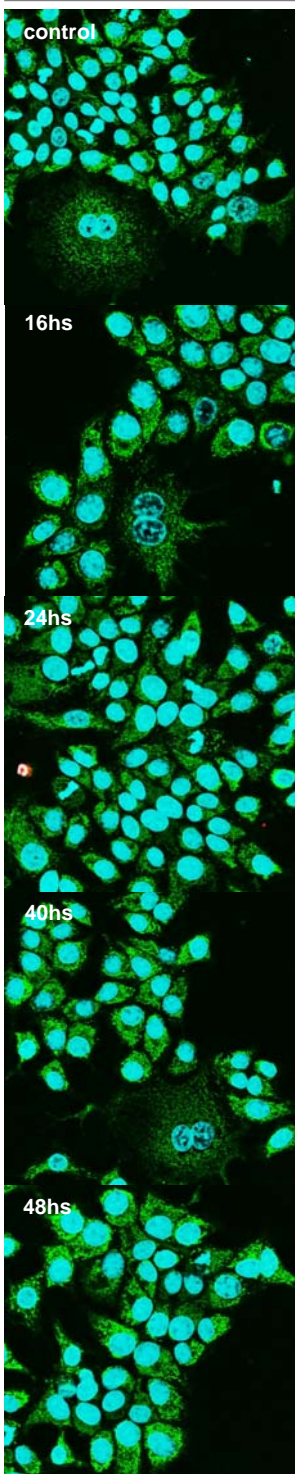
Figura 28. Análisis de la distribución mitocondrial y células apoptóticas en MCF7+/+ control y tratadas con cisplatino [10 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs. Las mitocondrias están marcadas en verde, con rojo las células apoptóticas y los núcleos en azul. La segunda columna corresponde a una sección de la imagen ampliada.



1.10. Análisis de la distribución mitocondrial y necrosis en MCF7+/- y MCF7+/+ tratadas con cisplatino [10 μ M].

Como se describiera anteriormente, al tratar a las MCF7+/- con cisplatino [10 μ M] se obtiene un patrón de distribución mitocondrial perinuclear a diferencia del patrón homogéneo obtenido para la condición control (Figura 29). Sobre todo se ve afectada la disposición espacial de las mitocondrias a las 16hs y 24hs de incubación con el citostático. Mientras que a las 40hs y 48hs de tratamiento además de la distribución se afecta la forma de estas organelas, que pasan de una forma tubular y alargada a una puntiforme. Pero este tratamiento no parece incrementar la muerte celular por necrosis (células marcadas en rojo).

Figura 29. Análisis de la distribución mitocondrial y células necróticas en MCF7+/- control y tratadas con cisplatino [10 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs. Las mitocondrias están marcadas en verde, con rojo las células necróticas y en azul los núcleos.



En las MCF7+/+ el tratamiento con cisplatino [10 μ M] parece afectar sobre todo a la disposición de las mitocondrias y no tanto a la forma de la organela (Figura 30). Las mitocondrias parecen mantener su forma tubular a lo largo del tratamiento, pero hacia el final se disponen más agregadas unas de otras. Estos efectos son más evidentes a partir de las 40hs de tratamiento. En cuanto la necrosis, no se registran un incremento evidente con este tratamiento.

Figura 30. Análisis de la distribución mitocondrial y células necróticas en MCF7+/+ control y tratadas con cisplatino [10 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs. Las mitocondrias están marcadas en verde, con rojo las células necróticas y en azul los núcleos.

1.11. Co-localización del citocromo-c y las mitocondrias en MCF7+/- y MCF7+/+ tratadas con cisplatino [10 μ M].

En las figuras 31 y 32 se pueden distinguir las mitocondrias marcadas con rojo en la primer columna, el citocromo-c marcado en verde en la segunda columna, en la tercer columna se muestra una imagen superpuesta de las mitocondrias y el citocromo-c que se ve en amarillo cuando co-localizan ambos marcajes, también se muestra una sección enmarcada en blanco que corresponde a la sección ampliada que se muestra en la última columna. Además, en las dos últimas columnas se pueden ver los núcleos marcados en azul.

En la condición control de las MCF7+/- (Figura 31) se puede ver como las mitocondrias se ubican por todo el citoplasma, distribución que coincide con la disposición del citocromo-c. Una superposición de ambos marcajes muestra una co-localización del citocromo-c y las mitocondrias, que se ve en amarillo (tercer columna). Lo que indicaría que en las células control el citocromo-c se encuentra dentro de las mitocondrias y estas estarían diseminadas homogéneamente por toda la célula. Al tratar las células con cisplatino [10 μ M] se observan variaciones del patrón de la condición control. A las 16hs de incubación se puede ver como se afecta la distribución de las mitocondrias, aunque aún co-localizan con el citocromo-c. En el tratamiento de 24hs de incubación la co-localización persiste, las mitocondrias se agregan alrededor del núcleo y los mismo ocurre con el citocromo-c. A las 40hs y 48hs de tratamiento se aprecian células en las cuales se pierde esta co-localización. En estas células las mitocondrias se agregan alrededor del núcleo (en rojo) mientras que el citocromo-c se ubica por todo el citoplasma.

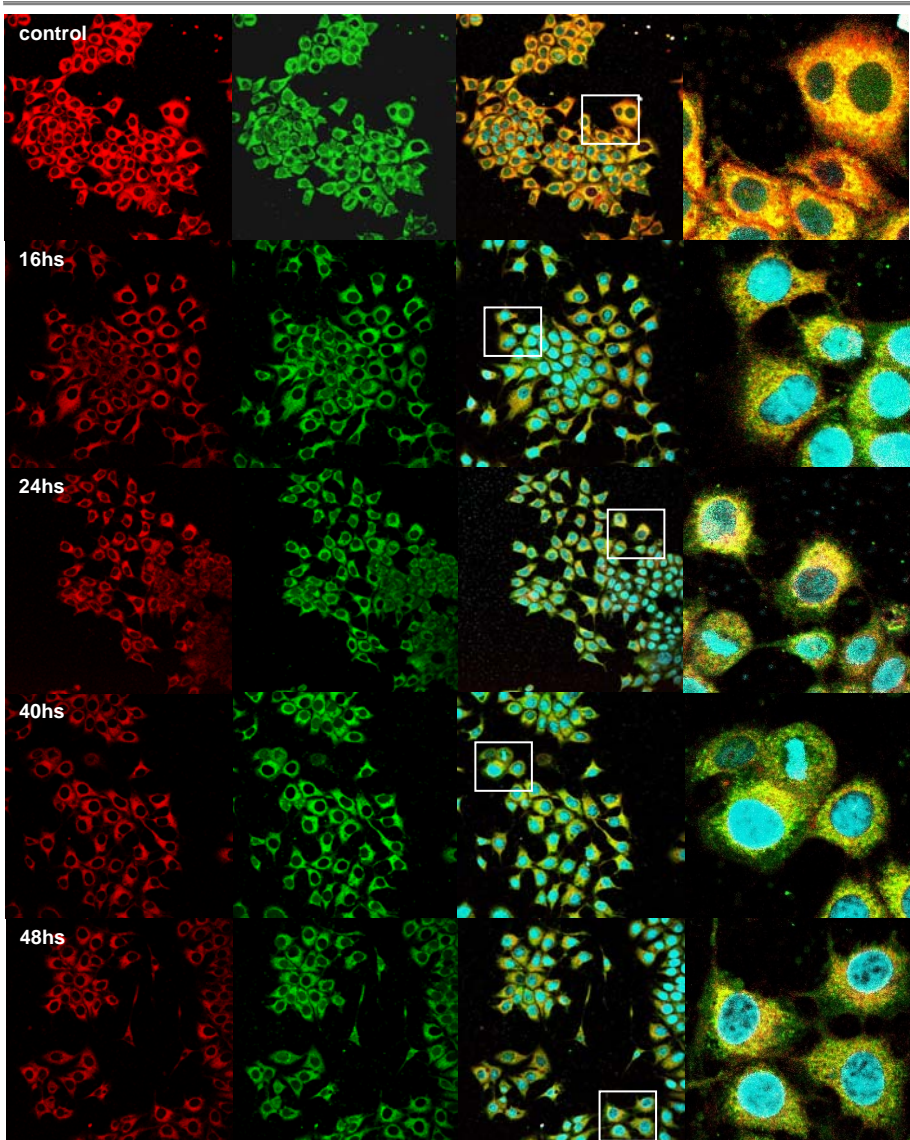


Figura 31. Co-localización de mitocondrias (primer columna, marcaje rojo) y citocromo-c (segunda columna, marcaje verde) en células MCF7+/- control y tratadas con cisplatino [$10\mu\text{M}$] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs. En la tercer columna se muestra la superposición de ambos marcajes y, enmarcada en blanco, se indica la sección ampliada que se muestra en la última columna. Los núcleos presentan una tinción azul.

Resultados

En las MCF7+/+ (Figura 32) la condición control presenta una distribución homogénea de las mitocondrias que coincide con la distribución del citocromo-c. Al superponer ambos marcajes se obtiene un marcaje amarillo a lo largo de todo el citoplasma, lo que indica la co-localización de la mitocondria y el citocromo-c.

A las 16hs de incubación con cisplatino [10 μ M] prácticamente no se observan diferencias respecto de la condición control, las mitocondrias conservan su distribución homogénea en toda la célula y co-localizan con el citocromo-c.

En el tratamiento de 24hs de incubación con el citostático aparecen algunas células donde se comienza a evidenciar una agrupación de mitocondrias, sobre todo se ubican cercanas al núcleo. Sin embargo, co-localizan con el citocromo-c, como se puede ver en la última columna.

A las 40hs de tratamiento la agregación de las mitocondrias parece más evidente, pero todavía coincide la distribución de las organelas con la del citocromo-c. A las 48hs de tratamiento, la mayoría de las células presentan una agregación de mitocondrias que no se aprecia en la condición control. La disposición de las organelas coincidente con la distribución del citocromo-c, pero en algunos casos el citocromo-c se ubica por todo el citoplasma a diferencia de lo que ocurre con las mitocondrias. En este último tratamiento se pierde la co-localización del citocromo-c y las mitocondrias.

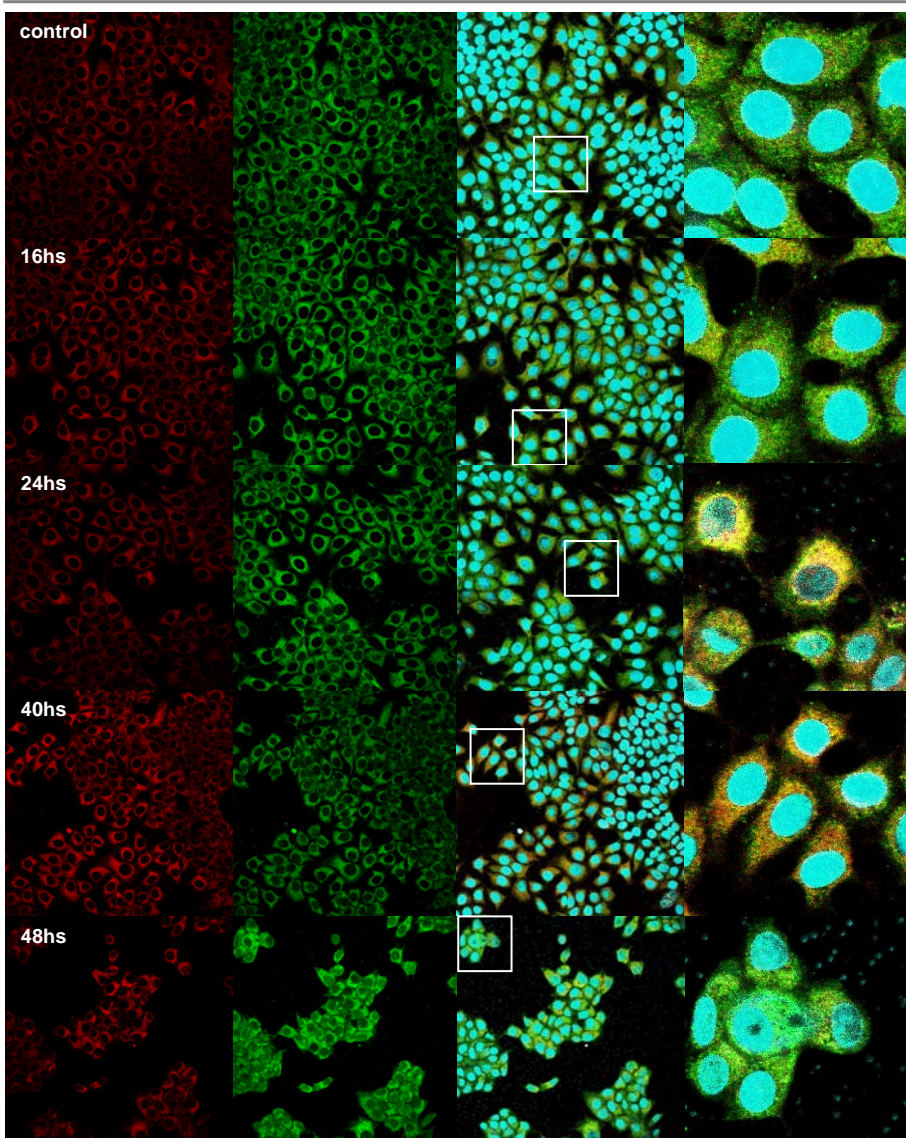
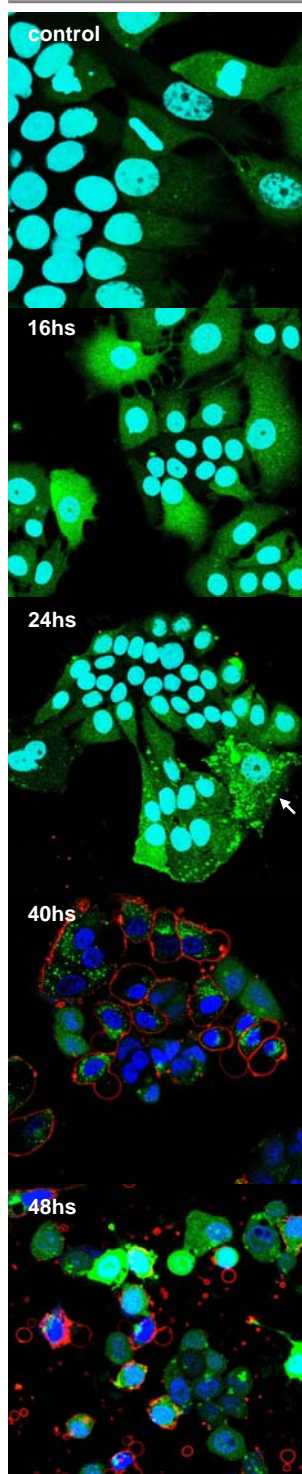


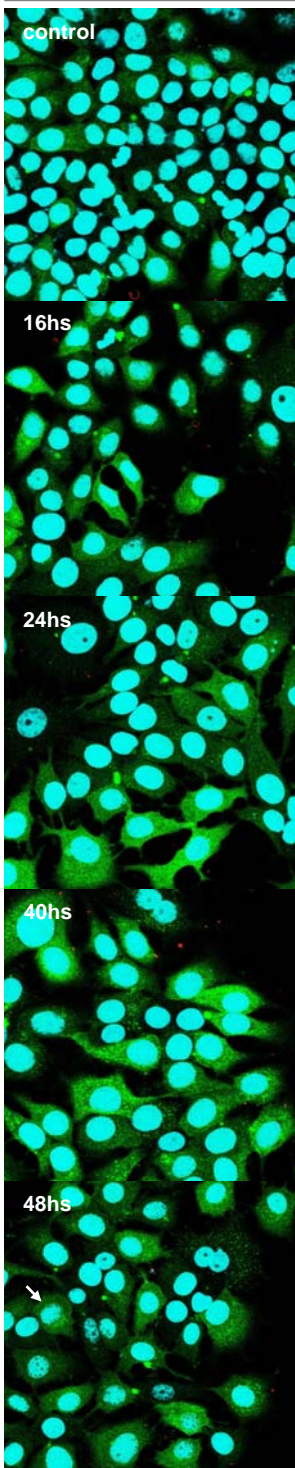
Figura 32. Co-localización de mitocondrias (primer columna, marcaje rojo) y citocromo-c (segunda columna, marcaje verde) en células MCF7+/+ control y tratadas con cisplatino [$10\mu\text{M}$] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs. En la tercer columna se muestra la superposición de ambos marcajes y, enmarcada en blanco, se indica la sección ampliada que se muestra en la última columna. Los núcleos presentan una tinción azul.



1.12. Análisis de la distribución celular de calcio y marcaje de células apoptóticas en MCF7+/- y MCF7+/+ tratadas con cisplatino [10 μ M].

En la condición control de las MCF7+/- se puede ver una distribución homogénea del calcio (marcaje en verde) por todo el citosol (Figura 33). Los resultados del tratamiento con cisplatino a las 16hs de incubación muestran un incremento en el nivel de calcio celular, que se traduce en un aumento de marcaje. A las 24hs de incubación con el citostático aparecen algunas células con un patrón agregado del calcio (señaladas con una flecha blanca). A las 40hs y 48hs de tratamiento se puede ver como las células apoptóticas (marcadas en rojo) presentan agregaciones de calcio, en algunos casos estos cluster se ubican en área perinucleares en otros casos se puede ver un incremento del calcio por toda la célula.

Figura 33. Análisis de la distribución celular de calcio y apoptosis en MCF7+/- control y tratadas con cisplatino [10 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs. El calcio está marcadas en verde, con rojo las células apoptóticas y en azul los núcleos.



Por su parte, las células no-apoptóticas presentan una distribución más homogénea del calcio en toda la célula una alta concentración en algunos casos.

En las MCF7+/+ (Figura 34) las células control presentan una distribución del calcio celular. El tratamiento de 16hs de incubación con cisplatino parece causar un ligero incremento del nivel celular de calcio y afectar en menor medida la distribución del mismo. A las 24hs de incubación se observan prácticamente los mismos resultados, aumento del nivel calcio y poca variación en la distribución del ión. En los tratamientos de 40hs y 48hs la agregación del calcio se hace más evidente (señalado con una flecha blanca).

Figura 34. Análisis de la distribución celular de calcio y apoptosis en MCF7+/+ control y tratadas con cisplatino [10 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs. El calcio está marcado en verde, con rojo las células apoptóticas y en azul los núcleos.

1.13. Niveles de expresión de proteínas de fisión y fusión mitocondrial por western blotting.

Para el presente análisis se consideraron las proteínas DRP1 y FIS, proteínas que intervienen en fenómenos de fisión mitocondrial y las proteínas MTF y OPA, ambas proteínas de fusión mitocondrial.

En las MCF7^{+/-} las proteínas de fisión mitocondrial, tanto DRP1 como FIS, parecen aumentar su expresión a medida que transcurre el tratamiento, esta diferencia se hace más notoria a las 40hs y 48hs de tratamiento (Figura 35). En las cuanto a las proteínas de fusión, parece haber una disminución en la expresión de MTF2, sobre todo a 48hs. En OPA esta tendencia no es tan clara, si bien el bandeo presenta variaciones a lo largo del tratamiento se podría decir que hay un leve aumento en la expresión de la proteína.

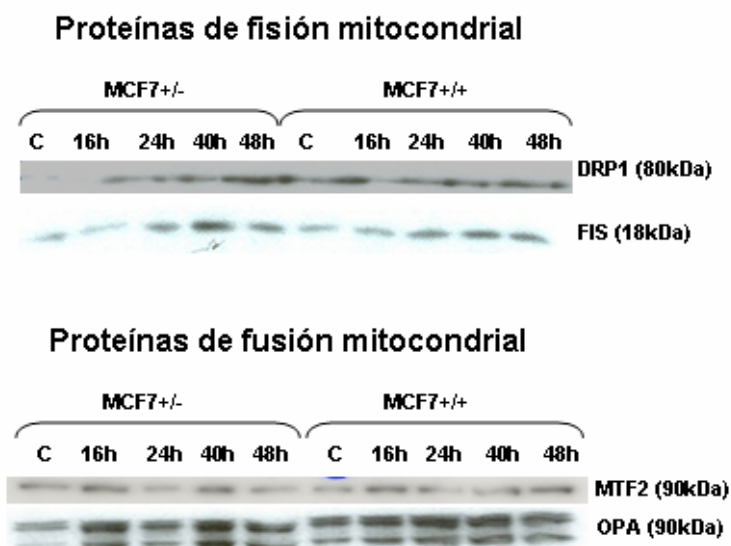


Figura 35. Expresión de proteínas de fisión (DRP1 y FIS1) y fusión (MTF2 y OPA) mitocondrial en MCF7^{+/-} y MCF7^{+/+}, muestras control y tratadas con cisplatino [10 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs.

En las MCF7+/+ (Figura 35), la expresión de DRP1 parece variar poco con el tratamiento mientras que FIS muestra un incremento respecto de la condición control. En las proteínas de fusión mitocondrial, MTF2 muestra un leve incremento a las 48hs de tratamiento, mientras que OPA se parece aumentar levemente entre las 16hs y 40hs de tratamiento y disminuir hacia las 48hs, donde el bandeo se presenta similar a la condición control.

1.14. Análisis de la expresión de RNAm por RT-PCR.

Se analizó la expresión de las enzimas glutamato-cisteína ligasa subunidad catalítica (GCLC) y subunidad moduladora (GCLM) y de la glutatión peroxidasa (GPx). En las MCF7+/- (Figura 37-A) se puede ver una tendencia a la disminución de la enzima GPx desde las 16hs de tratamiento, tendencia que se mantiene sobre todo a las 40hs y 48hs de tratamiento. La GCLC no parece variar significativamente su expresión, los valores obtenidos son semejantes al control a lo largo del tratamiento. La subunidad GCLM se mantiene prácticamente invariable a las 16hs y 24hs de incubación con cisplatino pero disminuye ligeramente la expresión hacia el final del tratamiento, sobre todo a las 48hs de tratamiento.

Para las MCF7+/+ (Figura 36-B) la expresión de RNAm se presenta prácticamente invariable a lo largo del tratamiento. Tanto las enzimas GCLC como GCLM parecen aumentar levemente la expresión a las 16hs de tratamiento, aunque este valor no llega a duplicar el obtenido para la condición control, para luego vuelve a valores semejantes al control. En cuanto a la GPx se puede apreciar una bajada significativa a las 16hs de tratamiento, pero posteriormente se

Resultados

recupera alcanzando valores semejantes al obtenido para la condición control.

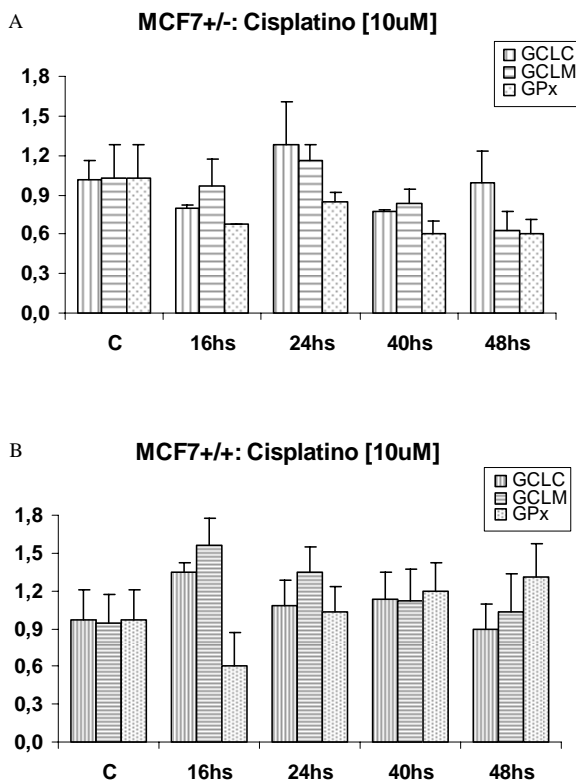


Figura 36. Niveles de RNAm (datos relativos al control) de la glutamato-cisteína-ligasa subunidad catalítica (GCLC) y la subunidad moduladora (GCLM) y la glutatión peroxidasa, en MCF7+/- (A) y MCF7+/+ (B) tratadas con cisplatino [10 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs.

2. Tratamiento con cisplatino [50 μ M]

2.1. Determinación de citotoxicidad mediante contaje directo de células MCF7+/- y MCF7+/+ tratadas con cisplatino [50 μ M]

El tratamiento con cisplatino induce una disminución constante del número de células (Figura 37). En ambas cepas el tratamiento también produce una reducción del número de células desde las 16hs de incubación y esta tendencia se mantiene hasta el último tiempo de incubación considerado ($p < 0.050$). La condición control no presenta diferencias significativas entre ambas cepas ($p = 0.657$). A medida avanza el tratamiento con el cisplatino las MCF7+/- se ven más afectadas que las MCF7+/+. Esta diferencia entre ambas cepas no es significativa a las 16hs de incubación ($p = 0.100$), pero si es significativa a las 24hs, 40hs y 48hs de tratamiento ($p = 0.006$, $p = 0.010$ y $p = 0.004$, respectivamente).

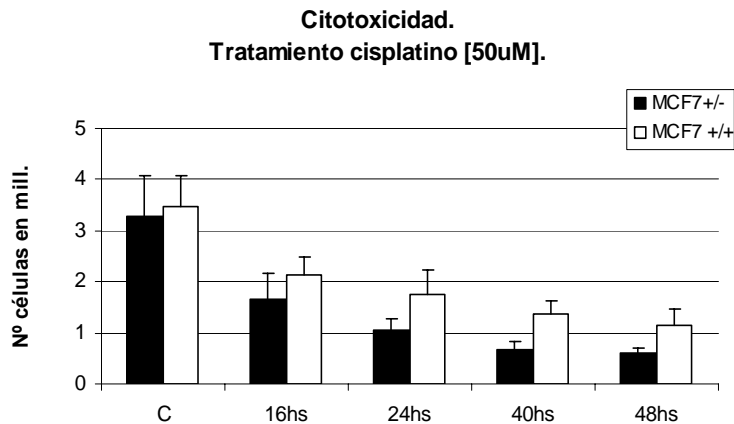


Figura 37. Evaluación de la citotoxicidad inducida por el tratamiento con cisplatino [50 μ M] a través del contaje directo, en MCF7+/- y MCF7+/+, condición control y diferentes tiempos de incubación (16hs, 24hs, 40hs y 48hs).

2.2. Cuantificación del contenido de ADN, fase G0/G1 del ciclo celular en MCF7+/- y MCF7+/-

Como resultado del tratamiento se obtiene una disminución progresiva de la cantidad de células en la fase G0/G1 para las MCF7+/- (Figura 38). A las 16hs de incubación esta disminución en la fase G0/G1 es significativa respecto de la condición control ($p=0.016$). Esta tendencia se mantiene progresivamente hasta el final del tratamiento ($p<0,05$).

En las MCF7+/+ el cisplatino también causa una disminución en la cantidad de células en fase G0/G1. Esta diferencia es significativa a partir de 24hs de tratamiento ($p=0.037$) y se mantiene a las 40hs y 48hs de tratamiento ($p=0.042$ y $p=0.005$).

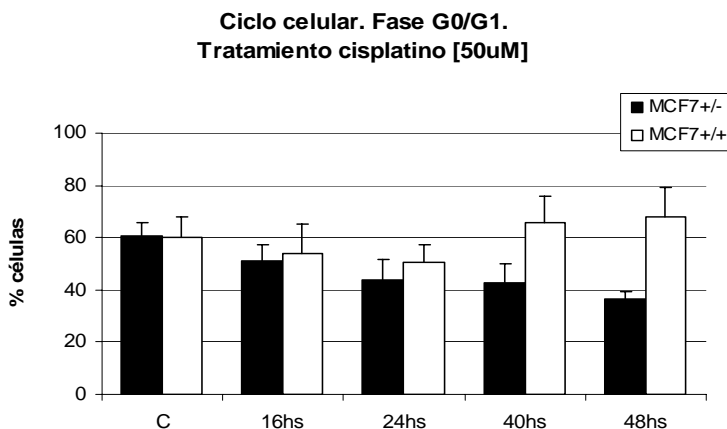


Figura 38. Fase G0/G1 en MCF7+/- y MCF7+/+, condición control y tratadas con cisplatino [50 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs.

En la condición control ambas cepas presentan niveles similares en la fase G0/G1 ($p=0.873$). A 16hs y 24hs de incubación con cisplatino las MCF7+/- tienen menor cantidad de células en esta fase que las MCF7+/+, pero estas diferencias no son significativas ($p=0.336$ y

$p=0.109$, respectivamente). A las 40hs y 48hs de tratamiento, en las MCF7+/- continúa disminuyendo la cantidad de células en esta fase, pero en las MCF7+/+ aumentan las células detenidas en esta fase. En ambos tratamientos las diferencias entre las cepas son significativas ($p=0.004$ y $p=0.004$, respectivamente).

2.3. Cuantificación del contenido de ADN, fase S+M/G2 del ciclo celular en MCF7+/- y MCF7+/+ tratadas con cisplatino [50 μ M]

En las MCF7+/- el cisplatino induce la detención de las células en la fase de proliferación (Figura 39). A partir de las 16hs de incubación se observa un incremento de células en esta fase, pero esta diferencia no es significativa ($p=0.150$). A las 24hs de incubación el aumento de células acumuladas en esta fase es significativo ($p=0.025$), lo mismo ocurre en los tratamientos de 40hs y 48hs ($p=0.010$ y $p=0.050$, respectivamente). En las MCF7+/+ a las 16hs y 24hs de incubación con cisplatino aumenta la cantidad de células en fase de proliferación, pero las diferencias son significativas ($p=0.631$ y $p=0.078$, respectivamente). A las 40hs y 48hs de tratamiento disminuye la cantidad de células en esta fase, en ambos casos las diferencias son significativas ($p=0.050$ y $p=0.025$, respectivamente). A lo largo del tratamiento con cisplatino el nivel de células en la fase de proliferación es mayor en las MCF7+/- que en las MCF7+/+. Estas diferencias no son significativas a las 16hs y 24hs de incubación con cisplatino ($p=0.810$ y $p=0.423$, respectivamente), pero a las 40hs y 48hs de tratamiento las diferencias entre ambas cepas son significativas ($p=0.025$ y $p=0.006$, respectivamente).

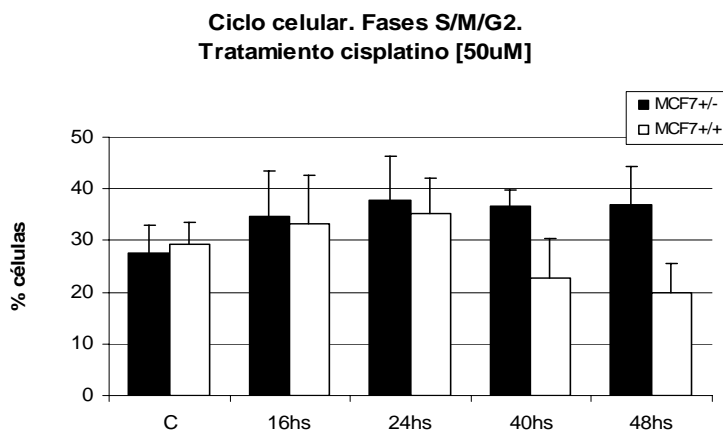


Figura 39. Fase S+/MG2 en MCF7+/- y MCF7+/+, condición control y tratadas con cisplatino [50 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs.

2.4. Cuantificación del contenido de ADN, células muertas en MCF7+/- y MCF7+/+

Las MCF7+/- muestran un incremento en el número de células muertas a partir del tratamiento de 16hs de incubación con cisplatino tendencia que se mantiene hasta el final del tratamiento, siendo en cada caso significativo respecto del control ($p < 0,05$). En las MCF7+/+ el cisplatino también produce un aumento en la muerte celular. Este incremento es significativo a lo largo de todo el tratamiento ($p < 0.05$) (Figura 40).

El aumento en el número de células muertas es mayor en las MCF7+/- que en las MCF7+/+. Sin embargo, estas diferencias sólo son significativas en los tratamientos de 40hs y 48hs ($p = 0.010$ y $p = 0.010$, respectivamente).

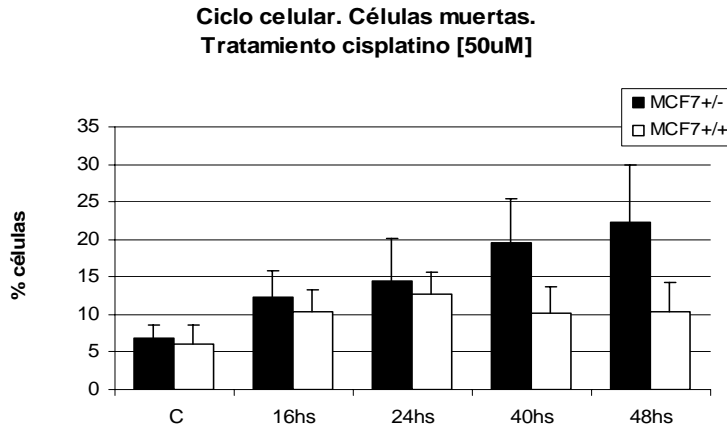


Figura 40. Niveles de muerte celular en MCF7+/- y MCF7+/+, condición control y tratadas con cisplatino [50 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs.

2.5. Determinación del nivel de GSH en extractos celulares de MCF7+/- y MCF7+/+

Este tratamiento produce un rápido descenso del GSH celular en las MCF7+/-, siendo significativa la disminución a las 16hs y 24hs de incubación ($p=0.000$ en ambos casos) (Figura 41). En los tratamientos de 40hs y 48hs con cisplatino se produce una recuperación de los niveles de GSH celular, en ambos casos los incrementos son significativos respecto del control ($p=0.000$ y $p=0.034$, respectivamente). En las MCF7+/+ se observa la misma tendencia. El nivel de GSH celular baja a las 16hs y 24hs de incubación con cisplatino ($p=0.034$ y $p=0.0034$, respectivamente) y se recupera en los tratamientos de 40hs y 48hs.

En ambos tipos celulares se obtiene la misma respuesta al tratamiento con el citostático, primero la disminución del nivel de GSH y luego una recuperación. En los tratamientos de 40hs y 48hs las diferencias entre ambas cepas son significativas, las MCF7+/-

Resultados

tienen un nivel de GSH inferior al de las MCF7+/+ ($p=0.007$ y $p=0.007$, respectivamente).

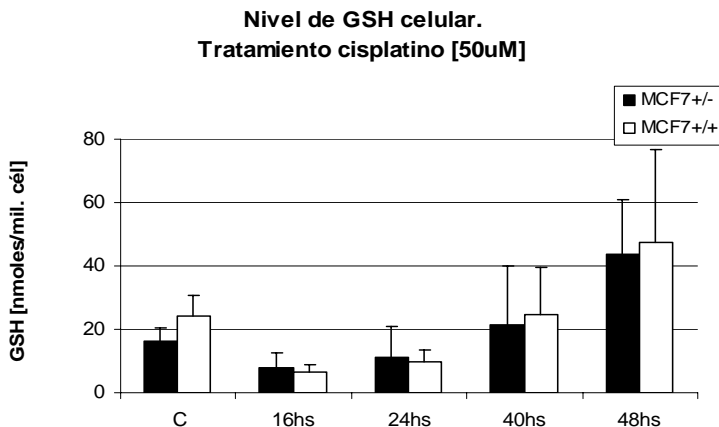


Figura 41. Determinación del nivel de GSH [nmoles/millón células] en extractos celulares de MCF7+/- y MCF7+/+, condición control y tratadas con cisplatino [50 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs.

2.6. Determinación de los niveles de ROS celular en MCF7+/- y MCF7+/+ tratadas con cisplatino [50 μ M]

En las MCF7+/- el tratamiento produce un incremento de los niveles celulares de ROS (Figura 42), el cual es significativo a partir de las 16hs de incubación y hasta el final del tratamiento ($p<0.05$). En las MCF7+/+ también se produce un aumento en los niveles de ROS, siendo significativo a partir de las 24hs de incubación y hasta el final del tratamiento ($p<0.05$). Los niveles celulares de ROS en la condición control son mayores en las MCF7+/- que en las MCF7+/+ ($p=0.034$). A su vez, el aumento en los niveles de ROS inducido por el tratamiento es mayor en las MCF7+/- que en las MCF7+/+. Estas

diferencias entre ambos tipos celulares son significativas a lo largo del todo el tratamiento ($p < 0.05$).

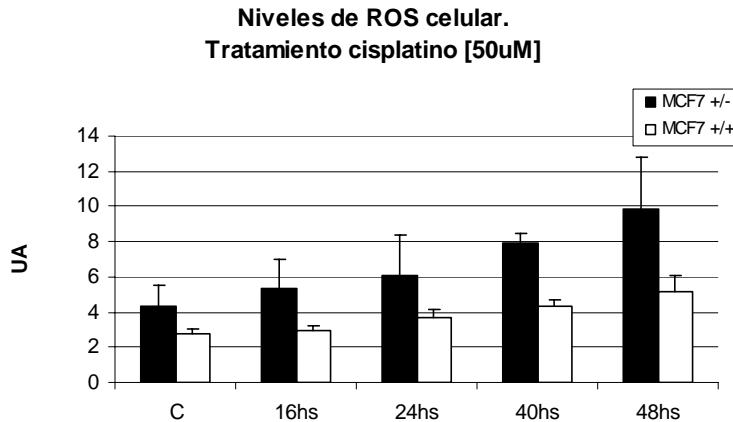


Figura 42. Cuantificación del nivel de ROS celular en MCF7+/- y MCF7+/, condición control y tratadas con cisplatino [50 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs.

2.7. Determinación del potencial de membrana mitocondrial

El cisplatino causa una despolarización del potencial de membrana mitocondrial en las MCF7+/- (Figura 43). A las 16hs y 24hs de incubación esta disminución no es significativa ($p=0.724$ y $p=0.289$, respectivamente), pero en los tratamientos de 40hs y 48hs este efecto es significativo respecto de la condición control ($p=0.034$ y $p=0.034$, respectivamente). En las MCF7+/+ también se produce una disminución del potencial de membrana mitocondrial como resultado del tratamiento con cisplatino. Estas diferencias son significativas a las 24hs de incubación y en los tratamientos de 40hs y 48hs ($p=0.034$, $p=0.034$ y $p=0.020$, respectivamente).

En ambas cepas se produce una disminución del potencial de membrana mitocondrial por el tratamiento con cisplatino. En el

Resultados

control y a las 16hs de incubación las diferencias en la respuesta entre ambas cepas no son significativas ($p=0.386$ y $p=0.593$, respectivamente). A las 24hs de incubación y en los tratamientos de 40hs y 48hs el potencial de membrana mitocondrial de las MCF7+/- es menor que el de las MCF7+/, en todos los casos las diferencias son significativas ($p=0.009$, $p=0.034$ y $p=0.032$, respectivamente).

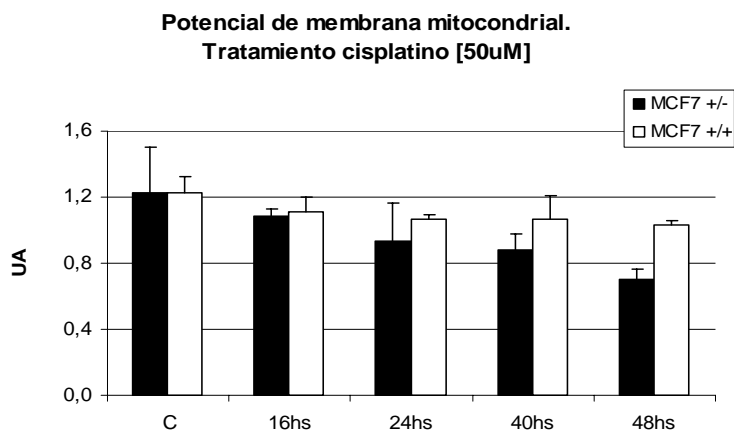


Figura 43. Determinación del potencial de membrana mitocondrial en MCF7+/- y MCF7+/, condición control y tratadas con cisplatino [50 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs.

2.8. Compartimentación celular del GSH y co-localización de células apoptóticas en MCF7+/- y MCF7+/+ tratadas con cisplatino [50 μ M]

En las figuras 44 y 45 se muestra la distribución celular del GSH, marcado en verde y las células apoptóticas en rojo, en la primer columna y en la segunda columna los núcleos en azul. En las MCF7+/- (Figura 44) en la condición control se puede ver que el GSH se encuentra en mayor medida ubicado en el núcleo, también se

distingue la disposición en las mitocondrias, siendo ambos marcajes superiores al del citoplasma. Luego de 16hs de incubación con cisplatino este fenómeno parece incrementarse. Aparecen células apoptóticas (señalado con una flecha blanca) y en algunos casos se observa núcleos (en azul) con disposición anular del ADN (marcado con una flecha blanca). A las 24hs de incubación con cisplatino, se pueden ver células con un alto nivel de GSH y en algunos casos se puede distinguir una marcada concentración nuclear. En los tratamientos 40hs y 48hs aumenta el número de células apoptóticas (marcadas en rojo y señaladas con una flecha blanca). En estas células los niveles tienen bajos niveles de GSH y la disposición del mismo es uniforme. En las células que parecen sobrevivir al tratamiento con el citostático el nivel de GSH celular es muy alto, lo que no permite diferenciar patrones de compartimentación.

Las células MCF7+/+ muestran una compartimentación del GSH en los núcleos para la condición control, también se aprecia una compartimentación en las mitocondrias, en ambos casos el marcaje es superior al citoplasmático (Figura 45). Luego de 16hs de incubación con cisplatino [50 μ M] se observa un incremento en la compartimentación nuclear del GSH. A las 24hs de incubación se incrementa el nivel de GSH y la disposición nuclear del mismo no se observa un incremento de células apoptóticas (marcadas en rojo). A las 40hs y 48hs de tratamiento el nivel celular de GSH se incrementa y también se incrementa la disposición nuclear del GSH mayor que en el citoplasma (señalado con una flecha blanca), lo que denota una compartimentación nuclear del GSH muy elevada. Estas células con mayor nivel de GSH no presentan marca de apoptosis (en rojo).

Resultados

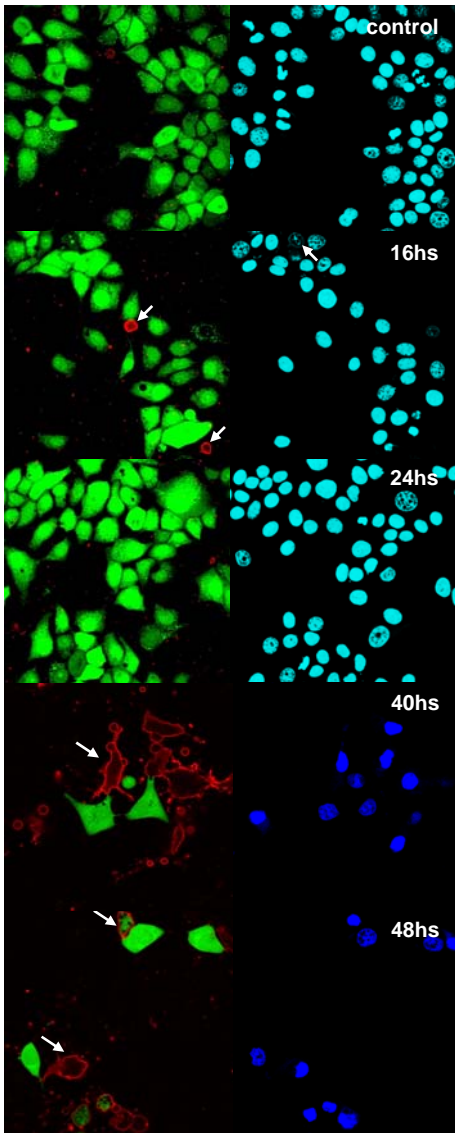


Figura 44. Compartimentación del GSH celular en MCF7+/- control y tratadas con cisplatino [50 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs. En la columna derecha se muestra el GSH marcado en verde y con rojo las células apoptóticas y en la columna izquierda los núcleos en azul.

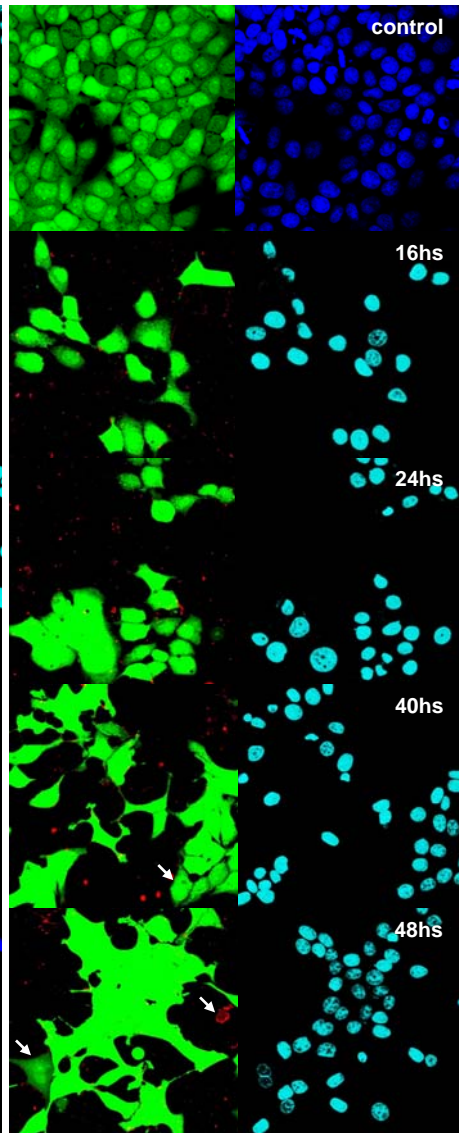


Figura 45. Compartimentación del GSH celular en MCF7+/+ control y tratadas con cisplatino [50 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs. En la columna derecha se muestra el GSH marcado en verde y con rojo las células apoptóticas y en la columna izquierda los núcleos en azul.

2.9. Análisis de la distribución mitocondrial y apoptosis

En las Figuras 46 y 47 se muestran las mitocondrias marcadas en verde, las células apoptóticas en rojo y los núcleos marcados en azul.

En la condición control en las MCF7+/- se puede ver que las mitocondrias son tubulares y alargadas y que se disponen por toda la célula de forma homogénea (Figura 46). El tratamiento con cisplatino afecta la disposición y forma de las mitocondrias de esta cepa. A las 16hs de incubación se ve alterada la distribución de las organelas. Las mitocondrias tienden a disponerse agregadas y a ubicarse hacia el área perinuclear y en algunos casos presentan una forma más acortada que en la condición control (señalado con una flecha). Resultados similares se obtienen en el tratamiento de 24hs de incubación. Las mitocondrias se disponen agregadas y se ubican en la periferia del núcleo. En algunos casos es posible distinguir un menor tamaño en las organelas y en otros se ven células con mitocondrias puntiformes.

A las 40hs de tratamiento se pueden ver células apoptóticas, los cambios en la morfología y disposición de las mitocondrias son más evidentes. En algunas células apoptóticas las mitocondrias se disponen alrededor del núcleo en otras la distribución es menos evidente. También es posible distinguir en algunos casos mitocondrias puntiformes. En el tratamiento de 48hs se pueden ver células apoptóticas (marcadas en rojo) con mitocondrias puntiformes y con una distribución heterogéneas, en algunos casos dispuestas en zonas perinucleares. Por su parte, las células no-apoptóticas conservan mitocondrias tubulares y alargadas aunque la disposición esta alterada respecto del control (señalado con una flecha).

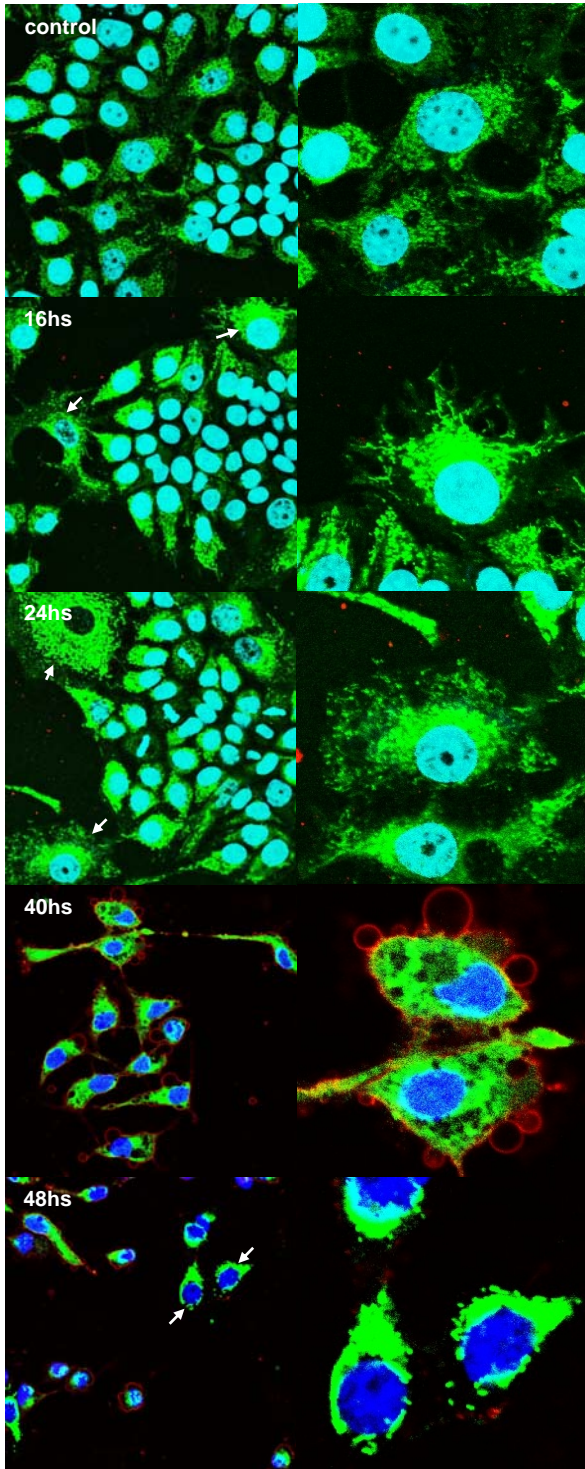


Figura 46. Análisis de la distribución mitocondrial y co-localización de células apoptóticas en MCF7+/- tratadas con cisplatino [50 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs. Las mitocondrias están marcadas en verde, con rojo las células apoptóticas y los núcleos en azul. La segunda columna corresponde a una sección de la imagen ampliada.

En las células MCF7+/+ (Figura 47) en la condición control se puede ver tubulares distribuidas homogéneamente en la célula. Luego de 16hs de incubación con cisplatino no se distingue una variación en la forma de las mitocondrias, pero la distribución en algunas células parece más agregada (señalado con una flecha blanca).

Al alargar el tratamiento hasta 24hs de incubación las mitocondrias conservan la forma tubular pero son más acortadas que en el control. En algunas células las organelas se disponen alrededor del núcleo.

El tratamiento de 40hs provoca cambios en la forma de las mitocondrias, en algunas células las mitocondrias son puntiformes (señalado con una flecha) mientras que en otras se mantiene la forma tubular. También se distingue la ubicación de las organelas en zonas perinucleares.

En el tratamiento de 48hs se pueden diferenciar algunas células muy afectadas por el tratamiento, probablemente estén necróticas (ya que no muestran marca de anexina). Las células supervivientes tienen mitocondrias en algunos casos tubulares y en otros casos puntiformes (señalado con una flecha blanca). En todas predomina una distribución más perinuclear de estas organelas.

Resultados

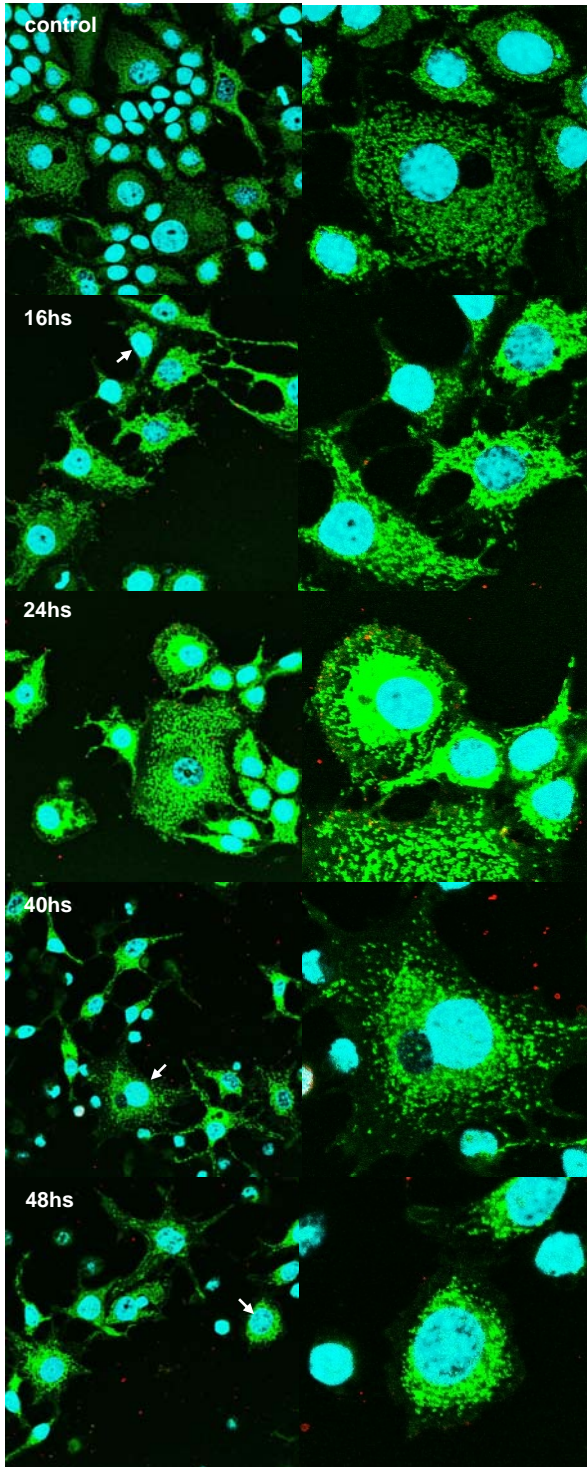


Figura 47. Análisis de la distribución mitocondrial y co-localización de células apoptóticas en MCF7+/+ tratadas con cisplatino [50 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs. Las mitocondrias están marcadas en verde, con rojo las células apoptóticas y los núcleos en azul. La segunda columna corresponde a una sección de la imagen ampliada.

2.10. Análisis de la distribución mitocondrial y necrosis

En las figuras 48 y 49 se pueden ver las mitocondrias en verde, las células necróticas en rojo y marcados en azul los núcleos. Como se mencionara anteriormente el cisplatino a una [50 μ M] tiene efectos tanto en la forma de las mitocondrias (verde) como en su patrón de distribución en las células MCF7+/- (Figura 48). Estos efectos se registran a partir de las 16hs de incubación con el citostático y se hacen más evidentes a lo largo del tratamiento. Se produce así un cambio de una forma tubular alargada a una puntiforme y se pasa de una distribución homogénea a una distribución perinuclear. La cantidad de células necróticas (marcadas con rojo) parece aumentar ligeramente sobre todo en el tratamiento de 48hs.

En las MCF7+/- (Figura 48, columna de la izquierda) las células necróticas se observan al final del tratamiento, los cambios de forma y disposición de las mitocondrias son anteriores. En las células necróticas es difícil distinguir un patrón de distribución o la forma de las organelas.

En las células MCF7+/+ (Figura 49, columna de la derecha) aparecen algunas células necróticas al final del tratamiento. No es posible distinguir la forma o la distribución de las mitocondrias en las células necróticas.

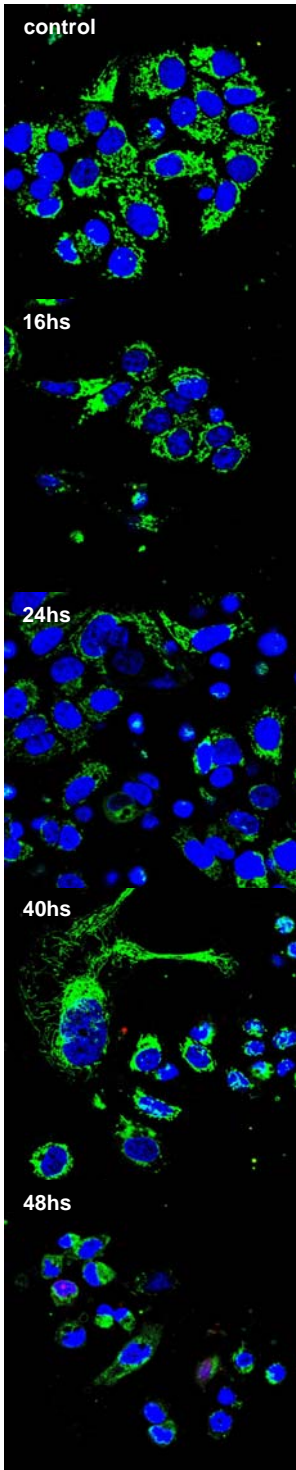


Figura 48. Análisis de la distribución mitocondrial y células necróticas en MCF7+/- tratadas con cisplatino [50 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs. Las mitocondrias están marcadas en verde, con rojo las células necróticas y en azul los núcleos.

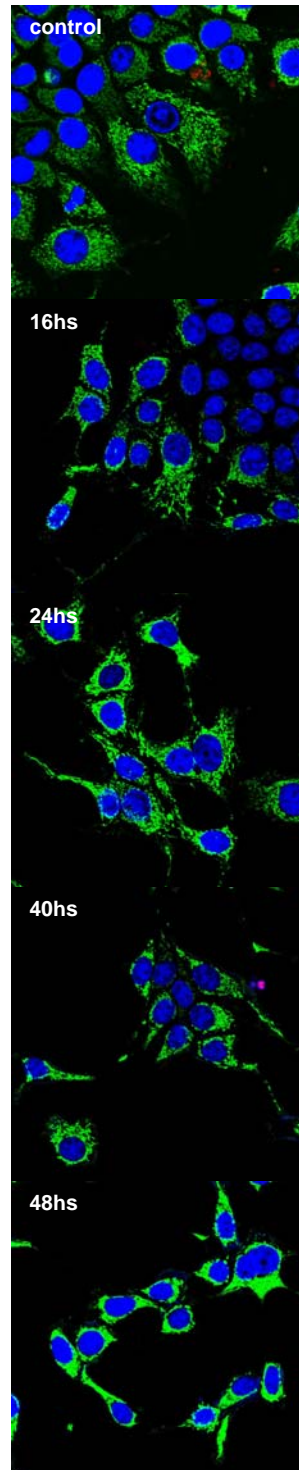


Figura 49. Análisis de la distribución mitocondrial y células necróticas en MCF7+/+ tratadas con cisplatino [50 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs. Las mitocondrias están marcadas en verde, con rojo las células necróticas y en azul los núcleos.

2.11. Co-localización de citocromo-c y mitocondrias en células tratadas con cisplatino [50 μ M]

La figura 50 corresponde a las MCF7+/-, se puede ver en la primer columna las mitocondrias marcadas en rojo, en la segunda columna el citocromo-c marcado en verde, en la tercer columna se muestra una superposición de ambos marcajes (cuando co-localizan el marcaje es predominantemente amarillo) y se señala un área que corresponde a la zona ampliada en la última columna. Los núcleos están marcados con azul.

En la condición control se puede ver una co-localización de las mitocondrias y el citocromo-c en la última columna (marcaje amarillo). Ambos se disponen de forma homogénea por toda la célula. A las 16hs de incubación con el cisplatino se mantiene la co-localización de las mitocondrias y el citocromo-c, en algunas células las mitocondrias se agregan, pero el citocromo-c muestra el mismo patrón. Luego de 24hs de incubación con el citostático la agregación mitocondrial es más marcada, en algunos la disposición del citocromo-c coincide con la mitocondrial y en otros este se dispone por toda la célula. A las 40hs y 48hs, en general, las mitocondrias aparecen agregadas, mientras que el citocromo-c se dispone por toda la célula, lo que indica una pérdida de co-localización que se evidencia en una disminución de áreas amarillas.

Resultados

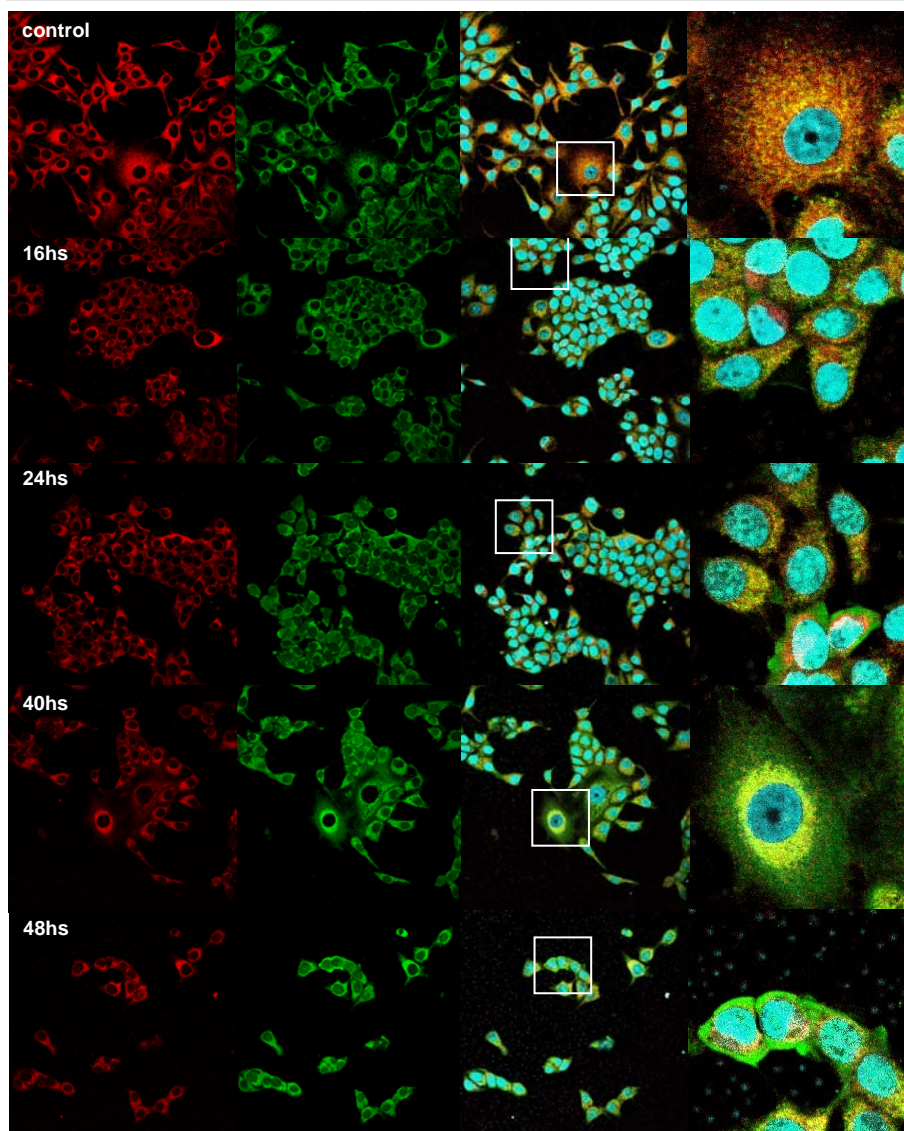


Figura 50. Co-localización de mitocondrias y citocromo-c en MCF7+/-, condición control y tratadas con cisplatino [50 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs. En la primer columna se pueden ver las mitocondrias marcadas en rojo, la segunda columna corresponde al citocromo-c marcado en verde, en la tercer columna se muestra la superposición de ambos marcajes y la sección señalada en blanco corresponde a la sección ampliada que se muestra en la última columna. Los núcleos están marcados con azul.

La figura 51 corresponde a las MCF7+/+, en la primer columna se pueden ver las mitocondrias marcadas en rojo, en la segunda columna el citocromo-c marcado en verde, en la tercer columna se muestra una superposición de ambos marcajes (cuando co-localizan el marcaje es predominantemente amarillo) y se señala un área que corresponde a la zona ampliada en la última columna. Los núcleos están marcados con azul.

En la condición control la distribución de las mitocondrias y el citocromo coinciden (imagen superpuesta, zonas amarillas), ambos se disponen por toda la célula. A las 16hs de incubación con cisplatino [50 μ M] se mantiene la superposición de ambos marcajes, los efectos sobre la distribución mitocondrial son leves, algunas células muestran cierta agregación coincidente con la disposición del citocromo-c. A las 24hs de incubación las mitocondrias se ven más afectadas, se agregan sobre todo en el área perinuclear. En la mayoría de las células esta distribución coincide con la del citocromo-c, manteniéndose la co-localización de ambos marcajes, en otras el citocromo-c, a diferencia de las mitocondrias, se dispone por toda el citoplasma. En los tratamientos de 40hs y 48hs la agregación mitocondrial es más evidentes y se observan más células donde el citocromo-c se libera al citoplasma.

Resultados

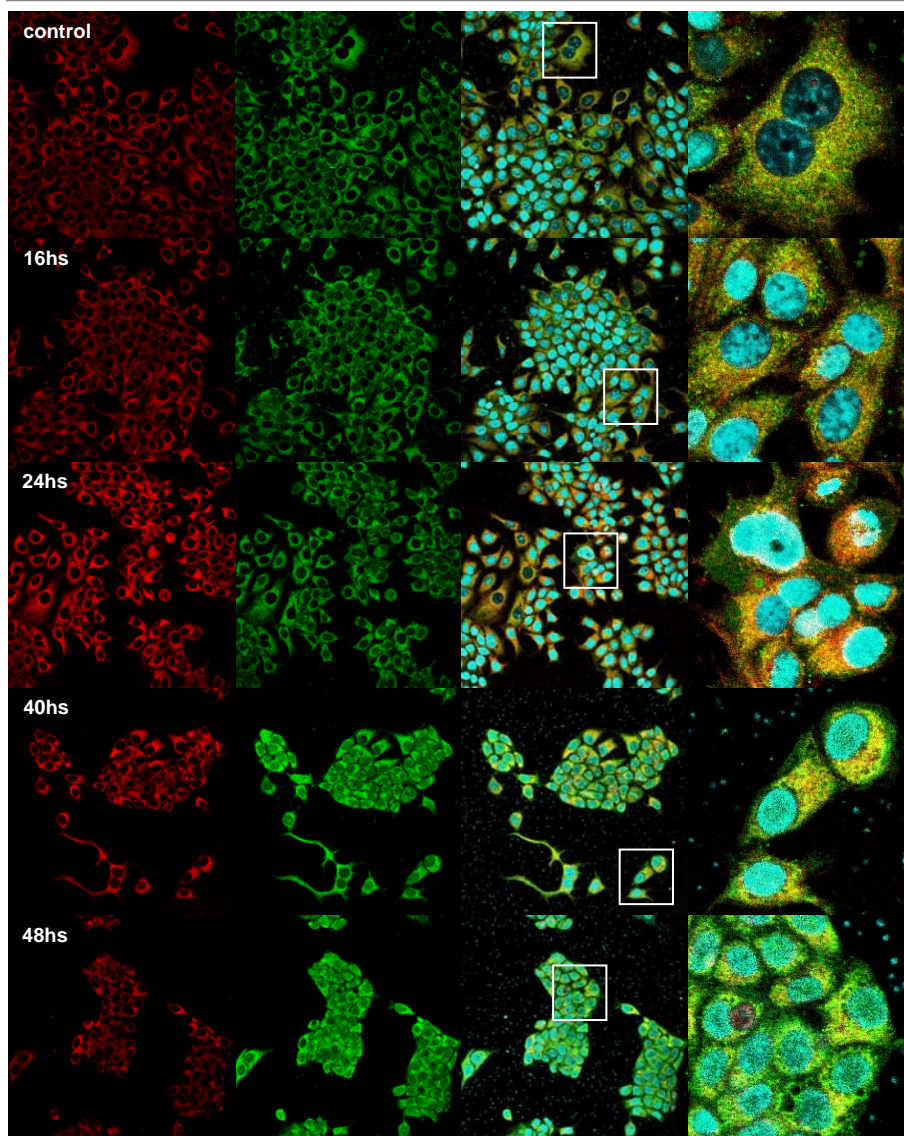
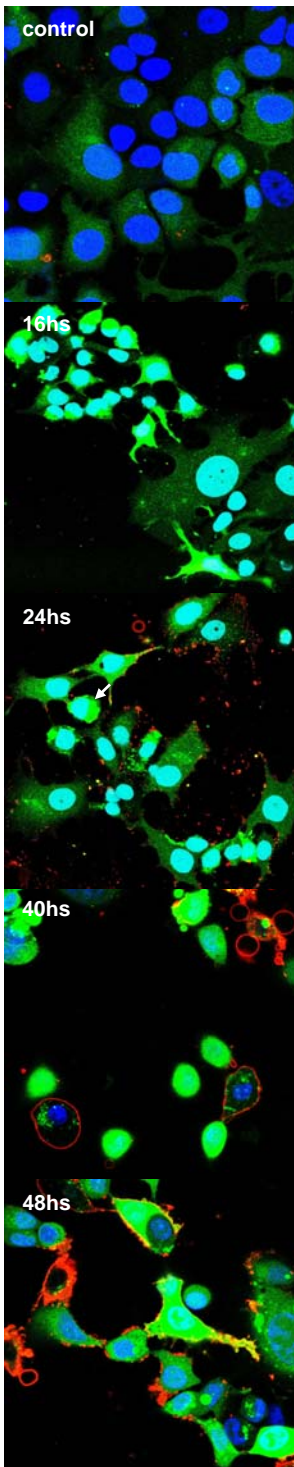


Figura 51. Co-localización de mitocondrias (primer columna, marcaje rojo) y citocromo-c (segunda columna, marcaje verde) en células MCF7+/+ tratadas con cisplatino [50 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs. En la tercer columna se muestra la superposición de ambos marcajes y marcada en blanco se indica la sección ampliada que se muestra en la última columna. Los núcleos están marcados con azul.

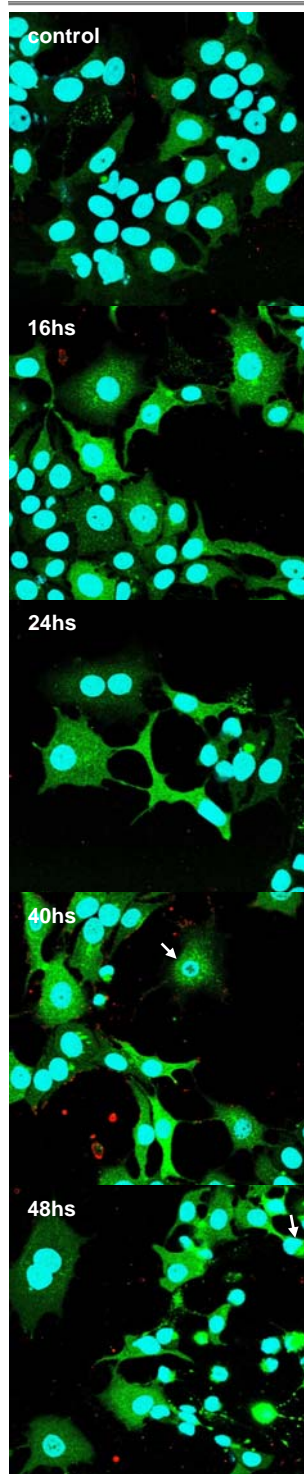


2.12. Análisis de la distribución celular de calcio y células apoptóticas en MCF7+/- y MCF7+/+ tratadas con cisplatino [50 μ M].

En la figura 52 se pueden ver en las MCF7+/- el calcio marcado en verde, las células apoptóticas en rojo y los núcleos en azul. En la condición control el nivel de calcio (verde) se distribuye homogéneamente por toda la célula. A las 16hs de incubación con cisplatino en algunas células se incrementa el nivel de calcio, que en algunos casos se dispone en agregados. A las 24hs de incubación se observan la misma tendencia, un aumento del nivel de calcio y una disposición agregada en algunos casos (señalado con una flecha blanca). A las 40hs y 48hs de tratamiento se incrementa el nivel de apoptosis. En algunas células apoptóticas el nivel de calcio es muy alto y en otras es más bajo y se dispone formando clusters aunque también se sitúa por el citoplasma.

Figura 52. Análisis de la distribución celular de calcio y apoptosis en MCF7+/-, condición control y tratadas con cisplatino [50 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs. El calcio está marcadas en verde, con rojo las células apoptóticas y en azul los núcleos.

Resultados



En la condición control de las MCF7+/+ (Figura 53) el calcio se distribuye homogéneo en toda la célula. A las 16hs de incubación con el cisplatino aumenta ligeramente el nivel de calcio, en algunos casos se dispone en forma agregada. A las 24hs de incubación, se observa la misma tendencia, un ligero aumento del nivel de calcio y en algunos casos una disposición agregada. A las 40hs y 48hs el nivel de calcio es más alto respecto del control, en otras células el ión se dispone formando agregados que se ubican mayoritariamente cercanos al núcleo (marcado con una flecha blanca).

Figura 53. Análisis de la distribución celular de calcio y apoptosis en MCF7+/+, condición control y tratadas con cisplatino [50 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs. El calcio está marcadas en verde, con rojo las células apoptóticas y en azul los núcleos.

1.13. Niveles de expresión de proteínas de fisión y fusión mitocondrial por western blotting.

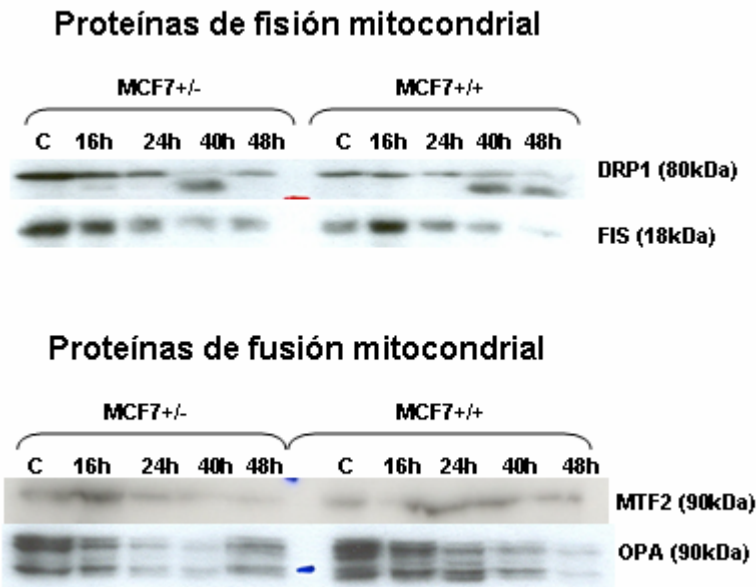


Figura 54. Expresión de proteínas de fisión (DRP1 y FIS1) y fusión (MTF2 y OPA) mitocondrial en MCF7+/- y MCF7+/+, muestras control y tratadas con cisplatino [50 μ M] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs.

En la expresión de la proteína de fisión mitocondrial DRP1 se observa una disminución de la expresión que coincide con la aparición de una nueva banda de peso molecular ligeramente superior (Figura 54). Esto se observa en ambas cepas, pero el efecto parece más marcado en las MCF7+/- . En la expresión de FIS se observa una clara disminución a lo largo del tratamiento.

Las proteínas de fusión también disminuyen su expresión como consecuencia del tratamiento. En las MCF7+/- la MTF disminuye la expresión con el tratamiento, en las MCF7+/+ parece haber un incremento y finalmente una disminución de la expresión. También

Resultados

se obtiene una disminución en la expresión de OPA, efecto que aparece más temprano en las MCF7+/-.

1.14. Análisis de la expresión de RNAm por RT-PCR.

Los resultados corresponden al análisis de expresión de RNA mensajero de la enzima GCL, se muestra la expresión de la subunidad catalítica (GCLC) y la moduladora (GCLM) y también la expresión de GPx (Figura 55).

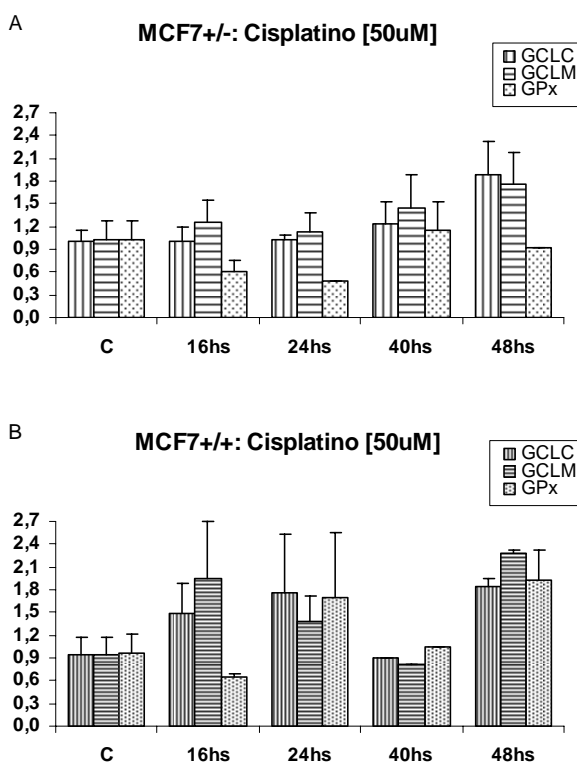


Figura 55. Niveles de RNAm (datos relativos al control) de la glutamato-cisteína-ligasa, subunidad catalítica (GCLC) y subunidad moduladora (GCLM) y la glutatión peroxidasa, en MCF7+/- (A) y MCF7+/+ (B) tratadas con cisplatino [50µM] a 16hs, 24hs, 40hs y 48hs.

En las MCF7+/- (Figura 55-A) el tratamiento con el cisplatino produce un incremento progresivo en la expresión de ambas subunidades de la GCL (GCLC y GCLM), donde el nivel superior se obtiene al final del tratamiento. Por su parte la GPx tiene disminuye al comienzo del tratamiento y luego se recupera hasta lograr un nivel semejante al control.

En las MCF7+/+ (Figura 55-B) también se observa un incremento en la expresión de la GCL, siendo marcado más marcado y se observa desde el comienzo del tratamiento. El cisplatino disminuye la expresión de la GPx a las 16hs de incubación y posteriormente se produce un incremento en la expresión.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se han estudiado los mecanismos subyacentes en la relación entre el núcleo y la mitocondria y la importancia de la compartimentación del GSH en el núcleo durante la resistencia a la apoptosis inducida por el tratamiento con cisplatino. Así mismo se ha evaluado la posible implicancia de la proteína bcl-2 en la compartimentación del GSH en el núcleo como mecanismo de la resistencia a la apoptosis. Para ello se ha utilizado la cepa celular MCF7 wild type y un homólogo que sobre-expresa bcl-2.

Los datos muestran que el tratamiento induce un estrés oxidativo que afecta a la funcionalidad de las mitocondrias, lo que puede evidenciarse a través de la despolarización del potencial de membrana mitocondrial. Eventualmente, esto podría llevar a la muerte celular principalmente por apoptosis.

Como respuesta temprana al tratamiento se producen alteraciones en la disposición mitocondrial, las mitocondrias se agregarían ubicadas en zonas perinucleares. Seguidamente se producirían variaciones morfológicas, que llevarían a la disminución del tamaño mitocondrial. Posiblemente estos eventos podrían guardar relación con estrategias de resistencia al tratamiento. En este sentido, es posible que los procesos de fusión y fisión cumplan una función como mecanismo de control de calidad capaz de gobernar el recambio mitocondrial, siendo un evento decisivo en dicho mecanismo la despolarización del potencial de membrana mitocondrial. Esto permitiría la remoción por autofagia de las mitocondrias despolarizadas o potencialmente disfuncionales.

Así mismo, los niveles de GSH celular y sobre todo la compartimentación del mismo en el núcleo, también parecen tener gran relevancia en la resistencia a la muerte por apoptosis. Los resultados obtenidos en la presente tesis parecen indicar que las células que sobre-expresan bcl-2 resisten mejor al tratamiento de inducción de apoptosis con cisplatino. Estas células muestran un mayor incremento en los niveles de GSH celular y una mayor disposición del tripéptido en el núcleo. Dado que la proteína bcl-2 parece relacionarse con la compartimentación del GSH, la sobre-expresión de la misma podría vincularse con la mayor compartimentación del GSH en el núcleo y de esta forma conferir mayor resistencia al tratamiento. Más aún, es posible que la compartimentación del GSH en el núcleo y la mitocondria cumpla algún papel en la comunicación entre el núcleo y la mitocondria en la resistencia al modelo de inducción de apoptosis utilizado.

1. Síntesis y análisis comparativo de los resultados obtenidos.

La elección del cisplatino (cis-diamminedichloroplatinum) en nuestro modelo se debe a que este agente quimioterapéutico, utilizado en clínica habitualmente, es capaz de inducir muerte celular por apoptosis en diferentes tipos celulares (Chu, 1994; Mese *et al.*, 2000; Del Búfalo *et al.*, 2002; Marklund *et al.*, 2004). Las dos concentraciones de cisplatino elegidas, una baja ([cis10 μ M]) y una alta [cis50 μ M], han permitido realizar un análisis comparativo entre los efectos de un tratamiento moderado y uno más agresivo. En ambos tratamientos se obtuvo el mismo patrón de eventos, siendo los efectos más pronunciados o incluso aparecen de forma más temprana como respuesta a la concentración más alta de cisplatino.

1.1. Efectos del tratamiento de cisplatino [10 μ M] en los parámetros mitocondriales y nucleares considerados.

El tratamiento con el cisplatino [10 μ M] detiene las células en la fase de proliferación, S+M/G2 (Figura 20), esto provoca una disminución en la fase G0/G1 (Figura 19) y el incremento de la muerte celular (Figura 21), por lo que disminuye el número de células (Figura 18). Se produce la salida del citocromo-c desde la mitocondria al citosol (Figuras 31 y 32), lo que provoca la muerte celular principalmente por apoptosis y en menor medida por necrosis (Figuras 29 y 30).

Se produce un estrés oxidativo que se evidencia a través de un incremento progresivo en los niveles de ROS (Figura 23) y el potencial de membrana mitocondrial baja a medida que avanza el tratamiento (Figura 24). En las MCF7+/- el incremento de los niveles de ROS es significativo casi desde el principio del tratamiento y el

efecto de la despolarización del potencial de membrana mitocondrial es mayor que en las MCF7+/+.

El tratamiento también afecta la disposición espacial y la morfología de las mitocondrias, sobre todo en las MCF7+/- (Figuras 27), en las MCF7+/+ los cambios más importantes se producen en la distribución de las organelas (Figura 28). Se observa una distribución perinuclear de las mitocondrias y en algunos casos pasan de una forma tubular alargada a una puntiforme. En las MCF7+/- aumenta la expresión en las proteínas de fisión (FIS y DRP1) mientras que en las proteínas de fusión la disminución es leve (MTF) o incluso aumenta (OPA) (Figura 35). En las MCF7+/+ aumenta la expresión de FIS y DRP1 se mantiene invariable, este efecto parece compensado con el aumento en la proteína de fusión OPA, mientras que la MTF no cambia. Al analizar estos resultados con los de microscopia confocal, donde la morfología mitocondrial de las MCF7+/+ esta menos alterada que en las MCF7+/-, parece haber un claro aumento de fisión en la cepa wild type a diferencia de lo que ocurre en la transflectada. Por su parte, el nivel de calcio aumenta calcio en ambas cepas (Figuras 33 y 34). En las células apoptóticas se observa un incremento marcado del calcio, en algunos casos parece disponerse formando agregados.

Como respuesta al estrés inducido por el cisplatino los niveles celulares de GSH se incrementan a medida que transcurre el tratamiento (Figura 22), lo que evidencia una respuesta antioxidante por parte de la célula. Aparentemente las células resistentes al tratamiento presentan un mayor nivel de GSH. En las estimaciones por métodos bioquímicos (Figura 22) las desviaciones obtenidas no permiten una clara comparación entre los niveles celulares de GSH. Pero el análisis conjunto de estos resultados con los obtenidos por

microscopia confocal indica que el cisplatino induce un aumento del nivel de GSH en las células supervivientes y una clara compartimentación en el núcleo (Figura 25 y 26). También puede verse compartimentación en las mitocondrias. Las células supervivientes tienen altos niveles de GSH celular ubicado principalmente en el núcleo, a diferencia de las células apoptóticas, donde el nivel es bajo y uniforme. En las MCF7+/+ (Figura 25) parece que el nivel y compartimentación del GSH son más marcados que en las MCF7+/- (Figura 25).

El análisis de la expresión de RNAm muestra una leve disminución de la GPx. En las MCF7+/- el efecto se intensifica a lo largo del tratamiento, mientras que la disminución es inmediata en las MCF7+/+ y luego se recupera un nivel similar al obtenido en el control (Figura 36). Esta enzima cumple un papel importante en la defensa antioxidante del glutatión frente a agentes pro-oxidantes y de esta forma interviene en uno de los mecanismos de protección contra el estrés oxidativo. Por su parte, la enzima GCL relacionada con la síntesis de GSH, parece menos afectada. Sólo se observa una disminución de la subunidad GCLM en las MCF7+/- al finalizar el tratamiento (Figura 36-A). En las MCF7+/+ la expresión de las enzimas es prácticamente invariable (Figura 36-B). Sería interesante analizar las actividades de estas enzimas, lo que complementarían la información aquí obtenida.

1.2. Efectos del tratamiento de cisplatino [50 μ M] en los parámetros mitocondriales y nucleares considerados.

El tratamiento con cisplatino [50 μ M] disminuye el número de células en ambas cepas (Figura 37). En las MCF7+/- las células se acumulan en S+M/G2 (Figura 39), lo que disminuye la fase G0/G1

(Figura 38) y esto llevará al incremento de la muerte celular (Figura 40). En las MCF7+/+ las células se detiene en la fase G0/G1, disminuye el nivel de células en proliferación y la muerte celular. Se produce la salida del citocromo-c desde la mitocondria al citosol (Figura 50 y Figura 51) lo que coincide con el hecho de que la muerte celular es principalmente por apoptosis y en menor medida por necrosis (Figura 48 y Figura 49).

Se produce un incremento significativo de los niveles de ROS, desde el primer tiempo de incubación (Figura 42) y el potencial de membrana mitocondrial desciende (se despolariza) con el avance del tratamiento (Figura 43). Por su parte, el nivel de calcio celular aumenta a partir de las primeras etapas del tratamiento y parece disponerse de forma agregada. En las células apoptóticas los niveles son muy elevados, el ión se ubica por todo el citosol, en algunos casos persiste la distribución agregada. En las MCF7+/- (Figura 52) este efecto es mayor que en las MCF7+/+ (Figura 53).

También se afectan la distribución mitocondrial y la morfología. Las mitocondrias pierden su distribución homogénea, se ubican de forma agregada y en muchos casos en zonas cercanas al núcleo. Ambos efectos aparecen antes y son más evidentes en las MCF7+/- (Figura 46) que en MCF7+/+ (Figura 47). En cuanto a la expresión de las proteínas de fusión (MTF y OPA) se registra una disminución (Figura 54), lo mismo ocurre con las proteínas de fisión FIS y DRP. El análisis de la expresión en las fracciones mitocondrial y citosólica podría aclarar la implicancia de estas proteínas en las variaciones morfológicas observadas por microscopia confocal.

Como consecuencia del estrés oxidativo inducido se produce una caída del nivel de GSH celular al comienzo del tratamiento y luego los valores se incrementan significativamente (Figura 41). En las

determinaciones bioquímicas las desviaciones son muy altas lo que no permite evaluar correctamente el efecto del tratamiento. Sin embargo, es más claro el efecto observado por microscopía confocal. Se observa un incremento del nivel de GSH y una compartimentación nuclear del mismo a lo largo del tratamiento, siendo las células supervivientes las que tienen niveles más altos de GSH y una marcada compartimentación nuclear. Por su parte, en las células apoptóticas los niveles de GSH son bajos y la distribución celular homogénea. En las MCF7+/+ (Figura 45) estos efectos son más marcados que en las MCF7+/- (Figura 44) así como el nivel de apoptosis.

Estos altos niveles de GSH celular coinciden con un aumento progresivo de la expresión de RNAm en la GCL (en ambas subunidades) a medida que avanza el tratamiento. El efecto que se obtiene es similar en ambas cepas (Figura 55). La GPx en principio parece bajar la expresión, sobre todo en las MCF7+/- (Figura 55-A) y luego se incrementa la expresión, en la cepa wild type alcanza valores semejantes al control y en las MCF7+/+ (Figura 55-B) es superior. En este caso el análisis de la actividad enzimática permitiría complementar la información obtenida.

2. Mecanismos subyacentes en la relación de los fenómenos nucleares y mitocondriales, papel del estrés oxidativo y del GSH celular.

2.1. El cisplatino induce la detención de las células en la fase de proliferación y consecuentemente la muerte celular, principalmente por apoptosis.

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con cisplatino detiene las células en la fase de proliferación, S+M/G2, esto provoca una disminución en la fase G0/G1 y se incrementa la muerte celular.

Estos datos concuerdan con los efectos descritos para el tratamiento con el citostático. Los efectos citotóxicos del cisplatino principalmente son debidos a la formación de aductos del DNA (Jamieson and Lippard, 1999; Kartalou and Essigmann, 2001), lo que lleva a que se detenga la replicación celular. Como consecuencia de las lesiones inducidas en el DNA por el cisplatino, se activa la regulación del ciclo celular en el punto de control entre las fases G2 y M (cell cycle checkpoint). De esta forma, las células se detienen principalmente en estas fases. Cuando el daño inducido en la fase G2 es irreparable, la apoptosis sirve como una vía de eliminación de estas células, impidiendo que las células dañadas por el cisplatino en la fase G2 pasen a la fase de mitosis (O'Brien and Brown, 2006).

En nuestros resultados se puede ver que el cisplatino produce la muerte celular principalmente por apoptosis en ambos tratamientos. Las células presentan mayor marcaje con anexina, células apoptóticas y en menor medida con yoduro de propidio, marcaje para células necróticas. Por otro lado también pudo evidenciarse que el tratamiento con cisplatino induce la liberación del citocromo-c desde

la mitocondria al citosol a medida que avanza el tratamiento. Con la concentración más alta de cisplatino (cisplatino [50 μ M]) se encontraron resultados similares, pero algunos efectos aparecieron más temprano, como la liberación del citocromo-c al citosol.

2.2. El tratamiento induce un incremento progresivo en los niveles de ROS.

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son productos del metabolismo normal de la célula que pueden ser potencialmente nocivos y afectar a las funciones celulares. Los ROS son generados por todos los organismos aeróbicos y parecen ser indispensables en las vías de transducción de señales que regulan el crecimiento y el estatus redox celular. La sobreproducción de metabolitos reactivos de oxígeno puede iniciar reacciones letales, las cuales desembocan en la oxidación y daño de estructuras cruciales para la integridad celular.

Muchos agentes anti-tumorales, como en el caso del cisplatino, producen la muerte celular por apoptosis a través de la inducción de ROS (Fang *et al.*, 2007). Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales estas especies reactivas median los efectos apoptóticos del cisplatino no se conocen con exactitud.

Al igual que en otros trabajos, en este estudio se registró un incremento de ROS en respuesta al cisplatino (Del Bufalo *et al.*, 2002). Con el tratamiento de baja concentración (cisplatino [10 μ M]) se produjo un aumento progresivo de los niveles de ROS y con la concentración más alta (cisplatino [10 μ M]) el incremento fue más marcado. Siendo en ambos casos menor el efecto en las MCF7+/+ que en las MCF7+/-.

Parece haber una relación entre la proliferación y los niveles celulares de ROS. Se ha propuesto que la proliferación celular se desarrolla dentro de un determinado rango de niveles de ROS, concentraciones inferiores o superiores a este rango provocarían la detención de crecimiento o inclusive la muerte celular. Lo que indicaría que los ROS podrían actuar como un arma de doble filo (Davies, 1999). Más aún, se ha propuesto un modelo en el cual se relaciona la proliferación con el estado redox celular, donde se postula la existencia de un interruptor redox que ayudaría a regular la proliferación en las células normales (Hutter *et al.*, 1997; Hoffman *et al.*, 2008). De acuerdo con el modelo redox de proliferación celular, existiría un valor umbral de potencial redox el cual inicia la fosforilación de diferentes proteínas de regulación asociadas con diferentes fases del ciclo celular y por ende con la proliferación celular. Cuando el potencial redox supera ese valor umbral las células entran en la fase G0/G1. Según este modelo existe un límite en el potencial de reducción, en el cual las células normales no podrían sobrevivir. Estos límites serían más laxos en las células cancerígenas, ya que este punto de control estaría ausente, lo que posibilitaría evadir el punto de restricción, ocasionando así la pérdida de control del ciclo celular.

En el presente modelo de inducción de apoptosis, como se ha explicado en el apartado anterior, el cisplatino provoca la detención de las células en la fase de proliferación. Esto se podría relacionar con el incremento de los niveles celulares de ROS observados. De hecho a medida que avanza el tratamiento aumenta la cantidad de células detenidas en la fase S+M/G2 y también se produce un incremento en los niveles de ROS.

Por otro lado, se ha descrito que el incremento en la producción de ROS podría relacionarse con un incremento en los eventos de fisión de las mitocondrias (Pletjushkina *et al.*, 2006), ya que los procesos de fisión podría intervenir en la eliminación de las especies reactivas del oxígeno producidas en la mitocondria (Skulachev, 1999; Skulachev *et al.*, 2004). Lo que coincide con lo observado en nuestro trabajo, en las MCF7+/- los niveles de ROS se incrementan a medida que avanza el tratamiento, de la misma forma las variaciones en la morfología mitocondrial son más notorias. En las MCF7+/+ los niveles de ROS se incrementan de forma más atenuada y las variaciones morfológicas son menos marcadas.

2.3. Aumenta el nivel de calcio celular, en las células apoptóticas se observa un incremento marcado del calcio, en algunos casos parece disponerse formando agregados.

Los resultados muestran que el tratamiento con cisplatino produce un aumento de los niveles de calcio que en algunos casos se dispone formando agregados, lo que parece ser una respuesta temprana. Las células apoptóticas parecen tener niveles de calcio muy altos. Estos efectos son más marcados con el tratamiento de mayor concentración de cisplatino (cisplatino [50 μ M]).

Esto concuerda con otros trabajos en los que se ha registrado que el cisplatino produce el aumento de calcio celular (Chirino *et al.*, 2009). El calcio participa en la señalización de múltiples funciones celulares, en condiciones normales su concentración intracelular suele ser baja. El transporte de calcio dentro y fuera de la matriz mitocondrial puede modular procesos fisiológico celulares. Como parte de la señalización del calcio dentro de la célula puede variar el transporte del ión a través de la mitocondria lo que llevaría a cambios del potencial de

membrana mitocondrial. La pérdida del potencial de membrana mitocondrial suele preceder la desintegración de la envoltura nuclear y se asocia tanto con el incremento de los niveles de ROS como de calcio (Smaili *et al.*, 2000).

La distribución del calcio en agregados podría ser consecuencia de la disposición mitocondrial del ión y podría cumplir una función de protección. En las células acinares pancreáticas se ha descrito que el incremento de los niveles de calcio intracelular induce la acumulación del ión dentro de la mitocondria y el retículo endoplasmático. De esta forma se reducirían los niveles de calcio libre en el citoplasma y se protegería a la célula de las posibles señalizaciones causadas por el incremento descontrolado del ión. Más aún, las mitocondrias podrían ubicarse en las zonas específicas donde la concentración de calcio es superior o en zonas más sensibles a la señalización. Por ejemplo, se ha descrito la ubicación perinuclear de las mitocondrias cuya función sería proteger al núcleo y aislarlo de las posibles señalizaciones causadas por el incremento desmedido de calcio intracelular (Park *et al.*, 2001).

2.4. El cisplatino produce la despolarización del potencial de membrana mitocondrial.

La disipación del potencial de membrana se relaciona con una pérdida de la función mitocondrial normal y con un mayor estado de oxidación mitocondrial (Kroemer, 2003). La exposición a agentes citotóxicos, como el cisplatino, puede producir la despolarización del potencial de membrana mitocondrial.

Como principal fuente de producción de ROS, la mitocondria es más propensa a sufrir daño por parte de estas especies reactivas. Una respuesta común al daño causado por ROS o niveles de calcio

elevados es la permeabilización de la membrana mitocondrial interna. Los niveles incrementados de ROS pueden inducir la apertura de los poros de permeabilidad transitoria en la membrana interna mitocondrial. De esta forma se produciría el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, así mismo luego del hinchamiento de la mitocondria seguiría la liberación del citocromo-c al citoplasma, lo que promovería la muerte celular (Lemasters *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2003). Por otro lado, la despolarización del potencial de membrana mitocondrial puede ser considerado como un mecanismo de amplificación de señal dentro de la respuesta apoptótica (Kroemer and Reed, 2000).

Los resultados aquí obtenidos indican que el incremento en los niveles de ROS se relaciona de forma inversa con la disminución del potencial de membrana mitocondrial. El potencial de membrana mitocondrial disminuye a medida que avanza el tratamiento, mientras que los niveles de ROS se incrementan. Con el tratamiento de baja concentración (cisplatino [10 μ M]) el potencial de membrana se despolariza de forma atenuada, siendo significativa la disminución al final del tratamiento, cuando los niveles de ROS son mayores y también el nivel de muerte celular. De hecho, hacia el final del tratamiento el citocromo-c es liberado desde la mitocondria al citosol. Por su parte, con el tratamiento de alta concentración (cisplatino [50 μ M]) el incremento de ROS es más pronunciado y el potencial de membrana mitocondrial parece sufrir una mayor despolarización y esta respuesta aparece antes. Lo mismo ocurre con la liberación del citocromo-c al citosol. Todos estos efectos producidos por ambos tratamientos son más atenuados en las MCF7+/>+

2.5. Se producen alteraciones en la disposición y morfología de las mitocondrias, siendo eventos tempranos que no necesariamente provocan la muerte celular.

El tratamiento con cisplatino induce alteraciones de las mitocondrias, algunos de estos fenómenos parecen influir en la resistencia a la muerte por apoptosis. Las variaciones en la distribución y la morfología mitocondrial son eventos tempranos, que preceden la muerte celular. Más aún, no parece desencadenar la apoptosis, por lo que es posible que estos cambios en la distribución y morfología mitocondrial se relacionen con estrategias celulares de resistencia a la muerte por apoptosis.

La distribución de las mitocondrias dentro de la célula se relaciona con el correcto funcionamiento celular.

Las mitocondrias se disponen formando una red dinámica que contribuye en la producción de energía, la homeostasis del calcio y la señalización celular (Chen and Chan, 2005). La apropiada distribución de esta red mitocondrial se relaciona con el correcto funcionamiento de la organela y es esencial para la supervivencia celular (Frederick and Shaw, 2007). El tráfico de las mitocondrias dentro de las células obedece principalmente a las demandas celulares, por ejemplo, los cambios de posición de las mitocondrias dentro de la célula en función de las demandas locales de ATP (McBride *et al.*, 2006).

Células altamente polarizadas, como las neuronas, son particularmente sensibles a los defectos en los movimientos mitocondriales. En estas células las mitocondrias suelen disponerse en las áreas de mayor demanda energética, como las zonas sinápticas (Hollendeck and Saxton, 2005; Detmer and Chan, 2007).

En este sentido, el tráfico mitocondrial cumple un papel importante para el mantenimiento tanto de las neuronas como de las mitocondrias, el cese de estos movimientos podría desencadenar la disfunción mitocondrial y neuronal. Es por ello que el daño en los mecanismos del movimiento mitocondrial y la alteración de la morfología de las organelas se relacionan con las lesiones neuronales. Esto podría desencadenar la degeneración neuronal y consecuentemente la muerte de las neuronas (Chang and Reynolds, 2006).

En el modelo propuesto para este trabajo, las mitocondrias se disponen agregadas en general alrededor del núcleo, siendo esta una respuesta temprana al tratamiento. Luego se registra la alteración de la morfología mitocondrial, las mitocondrias parecen acortarse y en algunos casos pierden la forma tubular alargada por una puntiforme. Ambos eventos son anteriores a la liberación de citocromo-c desde la mitocondria al citosol además no parecen desencadenar necesariamente la muerte por apoptosis. Los datos del análisis de la distribución mitocondrial y el nivel de apoptosis muestran que las células necróticas o apoptóticas no necesariamente presentan una distribución perinuclear de las mitocondrias. El estudio de la co-localización de las mitocondrias y el citocromo-c demuestra que la agregación mitocondrial precede la liberación del citocromo-c al citosol. Pero no todas las células con agregación mitocondrial presentan disipación del citocromo-c. En algunas células las mitocondrias se hallan uniformemente distribuidas, otras presentan una distribución agregada de las organelas que co-localizaban con el citocromo-c (células vivas) y en otras las mitocondrias y el citocromo no co-localizaban.

Discusión

Es posible que los cambios observados en la distribución y la morfología mitocondrial en el presente trabajo se relacionen con estrategias celulares de resistencia a la muerte por apoptosis. Sobre todo teniendo en cuenta que los movimientos de la mitocondria y su morfología son esenciales para el correcto funcionamiento de la mitocondria y que la pérdida del movimiento mitocondrial y la alteración de la dinámica mitocondrial pueden desencadenar la disfunción de la organela y la muerte celular.

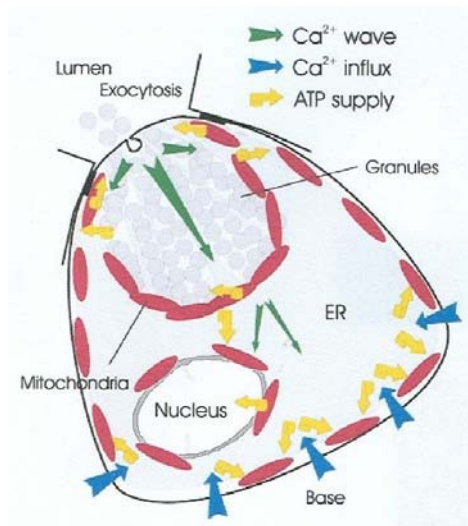


Figura 56: Esquema de la localización de los diferentes grupos de mitocondrias (Park *et al.*, 2001).

Más aún, es posible que los mencionados cambios en la disposición espacial de las mitocondrias cumplan una función de protección. Por ejemplo, en las células acinares pancreáticas cuando se produce un influjo de calcio desde la membrana plasmática se induce un incremento localizado del calcio mitocondrial y algunas de estas mitocondrias se ubican alrededor del núcleo. Esto ha llevado a proponer un modelo en el cual se postula que diferentes poblaciones

de mitocondrias se ubicarían en las zonas de mayor incremento de calcio a efectos de proteger a la célula de una señalización descontrolada del ión (Figura 56). De esta forma, la población perinuclear se encargaría de proteger al núcleo y lo aislaría de los potenciales efectos que podría causar el rápido incremento del calcio intracelular (Park *et al.*, 2001).

En el modelo utilizado en el presente trabajo, la disposición perinuclear de las mitocondrias podría cumplir una función de protección del núcleo. Inclusive, esta disposición podría asegurar la disponibilidad y accesibilidad del GSH entre los dos principales reservorios celulares del tripéptido.

Las variaciones en la distribución obtenidas no necesariamente se deberían a modificaciones o ruptura de los microtúbulos del citoesqueleto.

Las mitocondrias se mueven por los microtúbulos del citoesqueleto, los que utilizan como verdaderos andenes o vías a través de los cuales se desplazan de un lado a otro de la célula (Detmer and Chan, 2007; Frederick and Shaw, 2007; Ryan and Hoogenraad, 2007). Las primeras descripciones de la movilidad y la plasticidad de la mitocondria datan de principios del siglo pasado, varias décadas antes de que se relacione al citoesqueleto con la posición y movimiento de estas organelas. En la actualidad se sabe que las interacciones entre las mitocondrias y el citoesqueleto tienen influencia en la actividad respiratoria, la dinámica mitocondrial (procesos de fisión y fusión), así como con la localización de las mitocondrias en los sitios de alta demanda energética, metabólica o de biogénesis de especies reactivas del oxígeno, homeostasis del calcio y/o diseminación de factores mitocondriales apoptogénicos.

En el presente modelo, la elección de dos concentraciones de cisplatino, una baja (cisplatino [10 μ M]) y una alta (cisplatino [50 μ M]), ha permitido realizar un análisis comparativo de la respuesta de la morfología y distribución de las mitocondrias en función de las alteraciones del citoesqueleto. El cisplatino a una concentración de [12,5 μ M] produce modificaciones de los microtúbulos del citoesqueleto que se traducen en la pérdida del arreglo ordenado y continuidad de los filamentos. Lo que podría ser la causa de la disposición alterada de las mitocondrias dentro de la célula. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que las variaciones de la morfología y sobre todo de la disposición espacial de las mitocondrias son efectos tempranos en ambos tratamientos. Lo que indicaría que estos fenómenos mitocondriales no necesariamente se deberían a la ruptura de los microtúbulos del citoesqueleto. En ambos tratamientos se observaron patrones similares y estas variaciones no necesariamente llevan a la muerte celular.

De todas formas sería interesante realizar un estudio de la disposición y el arreglo de los filamentos del citoesqueleto en nuestro modelo. Por ejemplo, sería interesante evaluar si los cambios en la morfología y distribución mitocondrial condicen con un incremento de alguno de los componentes del citoesqueleto.

La eliminación de mitocondrias disfuncionales se relaciona con los procesos de fusión y fisión y con la despolarización del potencial de membrana mitocondrial.

Las mitocondrias se disponen en la célula formando un entramado reticular, este arreglo es remodelado constantemente a través de los procesos de fusión y fisión y del movimiento mitocondrial (Westermann, 2002; Griffin *et al.*, 2006). Cuantiosos estudios

demuestran que el ciclo de vida mitocondrial consiste en frecuentes eventos de fisión y fusión, estos procesos se suceden a través de ciclos continuos (Shaw and Nunnari, 2002; Karbowski and Youle, 2003; Karbowski *et al.*, 2004) y se caracterizan por ser eventos rápidos. Por ejemplo, estudios realizados en células INS1 y COS7 muestran que los eventos de fusión se producen cada 5 a 20 minutos (Arimura *et al.*, 2004; Twig *et al.*, 2008).

En relación a la dinámica mitocondrial existen varios trabajos que demuestran que estos eventos se hallan íntimamente interconectados y son de gran relevancia para la funcionalidad de estas organelas. En este sentido, se ha propuesto una hipótesis en la cual los procesos de fusión y fisión cumplirían una función como mecanismo de control de calidad capaz de gobernar el recambio mitocondrial, siendo un evento decisivo en dicho mecanismo la despolarización del potencial de membrana mitocondrial. Esto permitiría la remoción por autofagia de las mitocondrias potencialmente disfuncionales.

Los eventos de fusión permiten la rápida difusión de las proteínas de la matriz mitocondrial (Partikian *et al.*, 1998; Jakobs *et al.*, 2003; Jakobs, 2006; Twig *et al.*, 2006), con una lenta migración de los componentes de la membrana interna y externa (Busch *et al.*, 2006). La fisión podría ser un evento metabólico central en el ciclo de vida de la mitocondria, siendo capaz de alterar el estado energético de la misma. Esta idea esta sustentada por el hecho de que a diferencia de la fusión, el desarrollo del proceso de fisión no requiere del potencial de membrana mitocondrial intacto (Legros *et al.*, 2002; Ishihara *et al.*, 2003; De Vos *et al.*, 2005; Pletjushkina *et al.*, 2006). Inclusive, con un potencial de membrana despolarizado es posible que haya fisión mitocondrial, pudiéndose generar una mitocondria

con el potencial intacto y otra con el potencial despolarizado (Twig *et al.*, 2008).

Por otro lado, numerosos trabajos demuestran que tras ser disipado el potencial de membrana mitocondrial a través de agentes desacopladores se accionan mecanismos que previenen la fusión mitocondrial (Mattenberger *et al.*, 2003; Malka *et al.*, 2005; Meeusen and Nunnari, 2005; Meeusen *et al.*, 2006). Estos trabajos indicarían que las mitocondrias despolarizadas no se fusionarían entre sí, pero existe evidencia de que podrían fusionarse con mitocondrias cuyo potencial de membrana este intacto. De esta forma, podría establecerse una población de mitocondrias despolarizadas que no intervienen en procesos de fusión y que se caracterizan por tener diferentes isoformas de OPA que el resto de las mitocondrias (Twig *et al.*, 2008). Aparentemente el procesamiento de OPA en las células de mamíferos podría involucrar una relación directa con los complejos de la cadena respiratoria. Lo que vincularía el procesado de esta proteína de fusión mitocondrial con parámetros bioenergéticos (Baricault *et al.*, 2007; Zanna *et al.*, 2008).

El hecho de que la fusión sea un proceso dependiente del potencial de membrana mitocondrial garantizaría que las organelas potencialmente disfuncionales no intervengan en el mismo, mientras que las mitocondrias intactas se verían beneficiadas del intercambio de metabolitos. Las mitocondrias disfuncionales no sólo serían segregadas, en estas se rompería el balance entre los procesos de fusión y fisión y como resultado se generarían mitocondrias pequeñas y despolarizadas. Siendo las mitocondrias con estas características el objetivo de eliminación a través de los procesos de autofagia en la célula, de esta forma la autofagia se hallaría asociada con la disipación del potencial de membrana mitocondrial (Elmore *et*

al., 2001; Kissova *et al.*, 2004; Priault *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007; Twig *et al.*, 2008). En conjunto los procesos de dinámica mitocondrial y la autofagia actuarían en la segregación de las mitocondrias despolarizadas y potencialmente disfuncionales, como parte de un mecanismo organizador capaz de dirigir la disfunción mitocondrial y el mantenimiento de la eficiencia bioenergética de la célula (Figura 57).

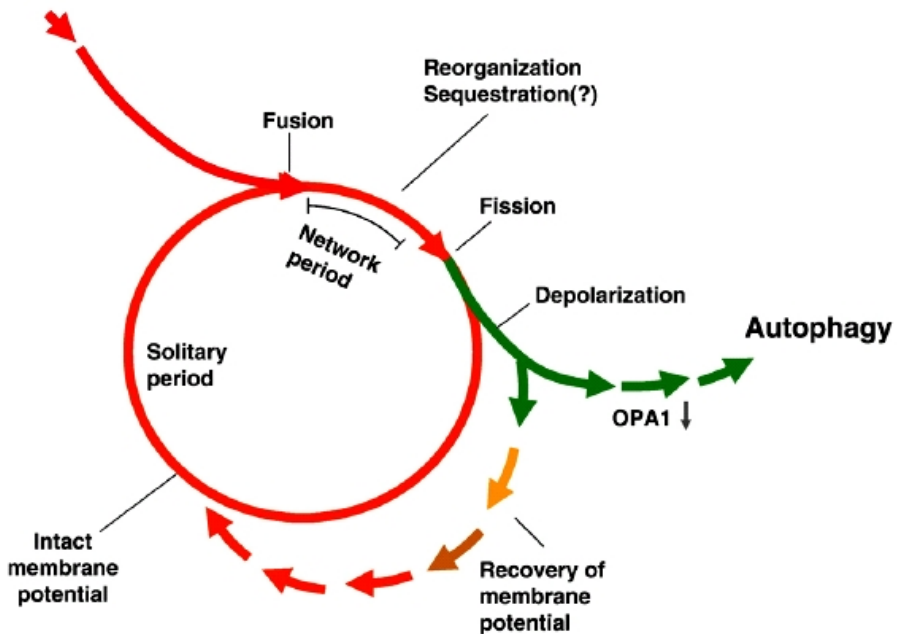


Figura 57: Esquema del ciclo de vida mitocondrial y los roles de la dinámica mitocondrial y la autofagia en la segregación de mitocondrias disfuncionales. El ciclo de vida mitocondrial consiste en frecuentes eventos de fisión y fusión, la fusión es dependiente del $\Delta\Psi_m$ a diferencia de la fisión, que puede originar mitocondrias con el potencial intacto (línea roja); o despolarizado (línea verde). Mientras las mitocondrias permanezcan despolarizadas no intervendrán en posteriores fusiones. Si se recupera el $\Delta\Psi_m$ se reestablecerán los procesos de fusión (línea con flechas que pasa del verde al rojo), pero si la despolarización es persistente, habrá una reducción de OPA1 seguida de la eliminación por autofagia de estas mitocondrias potencialmente disfuncionales (Twig *et al.*, 2008).

Discusión

Este modelo podría explicar los resultados obtenidos en el presente trabajo. Se observan variaciones en la disposición mitocondrial seguidos por variaciones en la morfología, mientras que el potencial de membrana mitocondrial sufre una despolarización progresiva a medida que avanza el tratamiento. En el tratamiento de baja concentración esta despolarización es significativa hacia el final del mismo, pero sólo en las MCF7+/-, donde la morfología mitocondrial se ve más afectada. En el tratamiento de alta concentración estos efectos aparecen antes y son más pronunciados. Los niveles de ROS se incrementan prácticamente desde el comienzo del tratamiento, la despolarización del potencial de membrana mitocondrial aparece más temprano y la morfología mitocondrial puntiforme es más evidente. Sin embargo, no todas las células con variaciones en la distribución y morfología mitocondriales presentaban marca de apoptosis.

Es factible suponer que en el presente trabajo las mitocondrias son afectadas a medida que avanza el tratamiento, lo que puede evidenciarse a través de la despolarización del potencial de membrana mitocondrial. La disfuncionalidad mitocondrial podría ocasionar el incremento de los eventos de fisión y/o la disminución de los eventos de fusión de las organelas, lo que afectaría la morfología de las mitocondrias de una forma más marcada. Así, las mitocondrias pasarían de tener una forma tubular alargada a una puntiforme.

Resultados similares han sido observados en otros trabajos donde las variaciones morfológicas o en la disposición espacial aparecen como una respuesta fisiológica inducida a partir de cambios en la actividad mitocondrial. Esto indicaría que estos eventos podrían ser importantes en condiciones normales y también podrían constituir

estrategias de supervivencia celular ante estímulos apoptóticos (Karbowski and Youle, 2003; De Vos *et al.*, 2005).

Aparentemente aumenta la expresión de las proteínas de fisión con el tratamiento de baja concentración, mientras que disminuye la expresión con el tratamiento de alta concentración de cisplatino.

En cuanto a la expresión de las proteínas relacionadas con la dinámica mitocondrial el tratamiento con cisplatino [10 μ M] en las MCF7+/- parece aumentar la expresión en las proteínas de fisión (FIS y DRP1), mientras que en las proteínas de fusión se observa una leve disminución en la mitofusina y OPA parece aumentar. Este aumento de las proteínas de fisión podría explicar las variaciones morfológicas observadas por microscopia confocal, la disminución del tamaño de las mitocondrias y a su vez se relacionaría con la despolarización significativa del potencial de membrana mitocondrial observada a medida que avanza el tratamiento. Por su parte, en las MCF7+/+ DRP1 no varía pero aumenta la expresión de FIS, lo que podría estar compensado con el leve aumento en la expresión de OPA, mientras que la MTF no cambia.

Con respecto al tratamiento de mayor concentración (cisplatino [50 μ M]) se observa una disminución de la expresión tanto en las proteínas de fusión (MTF y OPA) como en las de fisión (FIS y DRP). Esta disminución de la expresión de las proteínas puede deberse al hecho de que las mitocondrias se hallen más afectadas, lo que puede evidenciarse a través de la despolarización de potencial de membrana mitocondrial y de la morfología mitocondrial.

Este análisis de la expresión de las proteínas de fisión y fusión en extractos totales sirve como una primera aproximación para evaluar los fenómenos de dinámica mitocondrial. Las determinaciones en

extractos de mitocondrias aisladas permitirían complementar la información obtenida.

Los eventos de fisión mitocondrial requieren del reclutamiento de la proteína DRP1 desde el citosol, lo que se relaciona estrechamente con FIS (Smirnova *et al.*, 2001; Shaw and Nunnari, 2002; Ingerman *et al.*, 2005; Bhar *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2007). En cuanto a OPA, existe una estrecha relación entre la disfuncionalidad mitocondrial y el clivaje de la proteína (Ishihara *et al.*, 2006). Aparentemente la funcionalidad de la mitocondria afectarían el procesamiento de OPA, lo que a su vez alteraría la funcionalidad de esta proteína (Duvezin-Caubet *et al.*, 2006; Baricault *et al.*, 2007). Por otro lado, la interacción de la mitofusina con OPA1 es un paso determinante en el proceso de fusión (McBride *et al.*, 2006). El análisis de la expresión de estas proteínas en extractos aislados de mitocondria permitiría un análisis más detallado lo que complementarían la información obtenida en el presente trabajo.

Es posible que los cambios observados en las mitocondrias se deben a la remodelación de la red mitocondrial más que a un incremento de la masa mitocondrial.

Los resultados obtenidos por microscopía no parecen indicar que se haya producido un incremento de la masa mitocondrial como respuesta al tratamiento. Los cambios observados apuntan a una remodelación de la red mitocondrial, es decir de la distribución espacial y la morfología de las organelas. Teniendo en cuenta que la biogénesis mitocondrial aparece como una respuesta a una mayor demanda energética (Cannino *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2007; Psarra and Sekeris, 2008) y que en nuestro modelo se produce un arresto del ciclo celular seguido de la muerte principalmente por apoptosis,

en conjunto los resultados no parecen señalar que haya un aumento de la cantidad de mitocondrias. Sin embargo sería interesante evaluar parámetros de biogénesis mitocondrial que permitan complementar los resultados obtenidos en el presente trabajo.

2.7. Las células resistentes al tratamiento presentan altos niveles de GSH, que parece concentrarse principalmente en el núcleo.

Teniendo en cuenta que el número de células disminuye con el tratamiento y que este induce un incremento del nivel de GSH, es factible suponer que las células resistentes al tratamiento presenten mayores niveles de GSH celular. Las células de la condición control presentan una mayor disposición del GSH en el núcleo respecto del citoplasma, fenómeno que se incrementa luego del tratamiento con el cisplatino.

También puede verse compartimentación en las mitocondrias. Como resultado del tratamiento las células supervivientes tienen altos niveles de GSH celular ubicado principalmente en el núcleo, a diferencia de las células apoptóticas, donde el nivel es bajo y uniforme. Parece posible que el GSH y la compartimentación del mismo puedan ser decisivos en la resistencia al tratamiento de inducción de apoptosis elegido.

Estos resultados guardan relación con las funciones establecidas para el glutatión celular. El glutatión es el tiol no proteico más abundante en las células de mamíferos (Sies, 1999), desempeña diversas funciones sobre todo relacionadas con la protección antioxidante de las células (Viña, 1990). El glutatión reducido (GSH) es uno de los antioxidantes endógenos más importantes en las células, por su propiedad de mantener el estado redox (tioles/disulfidos) de la célula (Viña *et al.*, 1983), ocupa un lugar

central en el control de muchos procesos celulares. Por ejemplo, interviene en la regulación de la muerte celular programada (Esteve *et al.*, 1999) y el ciclo celular (Borras *et al.*, 2004) y también participa en la detoxificación de xenobióticos (Orrenius and Moldeus, 1984). El incremento de la resistencia a la radiación (Biaglow *et al.*, 1983) y los xenobióticos (Morales *et al.*, 1998) tradicionalmente han sido vinculados con el GSH.

En nuestro modelo se ha obtenido evidencia del incremento de los niveles de ROS, por lo que el aumento del nivel de GSH podría ser una clara respuesta antioxidante por parte de la célula ante una situación de estrés oxidativo. Por otro lado, los resultados obtenidos en la expresión de RNAm de la glutatión peroxidasa (GPx) muestran una cierta disminución en las MCF7+/- mientras que en las MCF7+/+ primero baja la expresión y luego recupera valores semejantes al control, en el tratamiento de baja concentración o incluso lo duplica, en el tratamiento de alta concentración. Esta enzima interviene en las defensas antioxidantes.

Ha sido descrito previamente que la citotoxicidad inducida por el cisplatino puede provocar la disminución de enzimas antioxidantes, tales como la GPx (Chirino and Pedraza-Chaverri, 2009). En este caso sería interesante analizar la actividad de esta enzima a efectos de complementar los resultados obtenidos.

Por su parte, la expresión de RNAm de las subunidades de la enzima glutamato cisteína ligasa (GCL), subunidad catalizadora (GCLC) y moduladora (GCLM), indican que con el cisplatino [10 μ M] hay poca variación en ambas cepas. Sin embargo, en la concentración alta se produce un incremento de la expresión hacia el final del tratamiento, momento en el que se obtiene mayores niveles de ROS celular y

mayores niveles de GSH celular en las células resistentes. En este caso también sería interesante evaluar la actividad de esta enzima.

Las condiciones control de ambas cepas muestran la presencia de altas concentraciones de GSH en el núcleo lo que parece ser una característica común y necesaria en las células que se preparan para dividirse.

La gran diversidad de procesos vitales dependientes del glutatión y realizados en diferentes orgánulos de la célula implica la necesidad de su compartimentación y la existencia de mecanismos que controlen su concentración y garanticen el ambiente adecuado en cada compartimiento.

La ubicación del GSH en el núcleo constituye un evento crítico para el correcto funcionamiento y mantenimiento de la célula. Sin embargo, sobre la concentración del glutatión en el núcleo y los mecanismos de regulación se sabe relativamente poco. Esto es debido a dos factores principales. El primero es metodológico: es imposible determinar la concentración del GSH nuclear usando los clásicos métodos de fraccionamiento celular (Söderdahl *et al.*, 2003). El segundo factor es el enfoque: el GSH nuclear se ha estudiado, por lo general, en células confluentes (en la fase G0/G1) lo que se aproxima a una situación *in situ*, es decir, en el tejido las células están diferenciadas, han salido del ciclo celular y están confluentes. Además, el núcleo cambia dramáticamente durante las diferentes fases del ciclo celular, pero son pocos los estudios que tienen en cuenta esta dinámica.

En este sentido, nuestro grupo viene realizando trabajos sobre las variaciones del GSH celular y nuclear en el marco de la proliferación celular. Previamente se ha demostrado una posible regulación de la

actividad de la enzima telomerasa por parte del GSH en células en cultivo (Borrás *et al.*, 2004). Dado que esta enzima cumple su función en el núcleo, se estudió la distribución del GSH en relación a la progresión del ciclo celular en fibroblastos de ratón (Markovic *et al.*, 2007).

En dicho trabajo se demostró que las células necesitan un ambiente reducido, provisto por el GSH, para llevar a delante la proliferación. El GSH se ubicaría en el núcleo previamente a la fase de proliferación celular y luego, cuando las células alcanzan la confluencia, se redistribuiría entre el núcleo y el citoplasma. En este estudio sobre las variaciones del GSH celular y nuclear a lo largo del ciclo celular se demostró que el núcleo sufre cambios dramáticos en su estado oxidativo, siendo de gran relevancia el papel del GSH nuclear en la fisiología del ciclo celular. Estudios posteriores, confirmando estos resultados en cultivos celulares provenientes de diferentes especies y con distintos niveles de proliferación, indicarían que este fenómeno parece universal (Markovic *et al.*, en prensa).

En concordancia con este modelo, nuestros resultados muestran que en la condición control de ambas cepas las células en general presentan una mayor concentración de GSH en el núcleo, respecto del citosol. Esto se debe a que, en el modelo propuesto, las células se trataron cuando se encontraban en fase de crecimiento. Dado que el cisplatino afecta a la estructura y síntesis del DNA, para aumentar la eficacia de este anti-neoplásico, los tratamientos se aplicaron cuando los cultivos celulares se hallaban en fase de proliferación. Con el tratamiento se obtuvo un incremento de los niveles de GSH y se acentuó el fenómeno de compartimentación nuclear. También puede verse compartimentación en las mitocondrias. Como resultado, las células resistentes o supervivientes al cisplatino

presentaron altos niveles de GSH celular ubicado principalmente en el núcleo, a diferencia de las células apoptóticas, donde el nivel fue bajo y uniforme.

La compartimentación nuclear del GSH parece cumplir diversas funciones en la célula.

El papel protector del glutatión sobre el DNA (Biaglow *et al.*, 1983) y su implicación en numerosos procesos que tienen lugar en el núcleo, sobre todo la síntesis de DNA (Thelander and Reichard, 1979) y en el mantenimiento de la organización del matriz nuclear (Dijkwel and Wenink, 1986) han sido claramente demostrados. La presencia de altos niveles de GSH en núcleo parece una característica común en las células en división mientras que las células quiescentes y diferenciadas tienen niveles similares de GSH en el núcleo y el citoplasma.

Se ha propuesto que la reducción del ambiente intracelular en las células que pasa de la fase G1 a la fase G2/M podría servir para proteger al DNA del posible daño oxidativo tras la ruptura de la envoltura nuclear (Conour *et al.*, 2004). En este sentido, se ha reportado la necesidad de que se produzcan eventos oxidativos en la fase G1 temprana que permiten la transición desde esta fase a la fase S (Menon *et al.*, 2003). Más aún, se ha postulado recientemente que la restricción de la síntesis de DNA en la fase reductiva del ciclo celular en levaduras podría ser un importante mecanismo evolutivo capaz de reducir el daño oxidativo del DNA durante la replicación (Klevecz *et al.*, 2004). Esto implicaría un mecanismo común de protección del DNA durante la fase S en todos los eucariotas.

La presencia del glutatión nuclear guarda gran relevancia con el mantenimiento de la integridad funcional del núcleo. Es posible que

el cambio del estado redox del núcleo puede resultar en la desregulación de las interacciones entre el DNA y los factores de transcripción (Hansen *et al.*, 2006). Un número importante de proteínas nucleares, incluyendo factores de transcripción, requieren de un ambiente reducido para poder unirse al DNA. En este sentido, se ha sugerido que el GSH nuclear podría actuar como un regulador de la transcripción controlada por NFkB, AP1 y p53, alterando su estado redox en el núcleo (Jang and Surh, 2003).

Por otro lado, situaciones patofisiológicas develan la importancia del GSH nuclear. Por ejemplo, se ha demostrado la importancia de la cantidad y el estado redox de los tioles celulares, especialmente el GSH, para la proliferación y diferenciación de las células bronquiales epiteliales en humanos (Atzori *et al.*, 1994).

Estudios que relacionan el estrés oxidativo con la genotoxicidad indican que las modificaciones oxidativas del DNA se correlacionan negativamente con el GSH nuclear (Green *et al.*, 2006). Por su parte, la depleción del GSH nuclear previa a la irradiación ocasiona la fragmentación del DNA y la apoptosis, hallazgos que centran la atención sobre el GSH nuclear como determinante de la radiosensibilidad intrínseca de las células. Lo que sugiere un papel protector crítico del GSH en el mantenimiento de la integridad funcional del núcleo (Morales, 1998).

Algunos trabajos demuestran la importancia del GSH nuclear en la resistencia a agentes citotóxicos. Donde la citotoxicidad se incrementa en función de la habilidad de estos agentes para deplecionar el GSH nuclear (Jevtovic-Todorovic and Guenther, 1992).

Resistencia al cisplatino; posibles mecanismos de protección del GSH frente a la citotoxicidad inducida por el citostático.

El cisplatino ha sido utilizado en el tratamiento de distintos tipos del cáncer por más de 30 años. Una vez dentro de la célula, se transforma en una molécula cargada siendo capaz de reaccionar con el DNA, RNA o inclusive con proteínas. Se cree que la citotoxicidad del compuesto reside principalmente en su capacidad de reacción con el DNA, con el que forma aductos, dificultando así la transcripción del RNA y la replicación del DNA. Lo que en última instancia ocasionará la detención del ciclo celular y la muerte celular por apoptosis (Kartalou and Essigmann, 2001; Stordal and Davey, 2007).

Se han propuesto numerosos mecanismos que podrían estar relacionados con la resistencia al cisplatino, como cambios en la acumulación intracelular de la droga, detoxificación, inhibición de la apoptosis o inclusive reparación de los aductos de DNA (Wang and Lippard, 2005; Yang *et al.*, 2006). Una vez formados los aductos de cisplatino y DNA, estos serían removidos del genoma a través de los procesos de escisión de nucleótidos y posteriormente se activarían las proteínas de reparación (Wang *et al.*, 2003).

La resistencia al cisplatino también se ha vinculado con la alteración en la expresión de genes tales como c-fos, c-myc, H-ras, c-jun y c-abl, así como con genes supresores de tumores, como p53 (Ohmichi *et al.*, 2005). Por ejemplo, la expresión de c-fos o c-myc parece ser más alta en las células resistentes al cisplatino. Así mismo también se verían incrementados los niveles de p53, proteína involucrada en el control de ciclo celular, la reparación del DNA y la apoptosis. La alteración de la expresión de proteínas reguladoras involucradas en la transducción de las vías de señalización que controlan la apoptosis

también podrían estar afectadas en la sensibilidad a la droga (Martin *et al.*, 2008).

El incremento de la resistencia a los xenobióticos tradicionalmente ha sido vinculada con el GSH. En el caso particular del cisplatino, la mayoría de los autores propone que el glutatión permitiría la detoxificación del citostático. El GSH reaccionaría directamente con el cisplatino en el citoplasma impidiendo su translocación al núcleo o inclusive podría unirse al platino de los aductos de DNA una vez dentro del núcleo, previniendo así la potencial formación de uniones citotóxicas en el genoma (Eastman, 1987). De esta forma, los complejos formados entre el platino y el GSH serían activamente transportados fuera de la célula, a través de un transporte dependiente de ATP, lo que contribuiría a reducir la acumulación intracelular del cisplatino (Ohmichi *et al.*, 2005; Rabik and Dolan, 2007; Stordal and Davey, 2007).

El GSH también podría participar directa o indirectamente en la reparación del DNA. Ha sido demostrado que la depleción del glutatión por parte de diferentes reactivos, parece inhibir los procesos de reparación del genoma (Lertratanangkoon *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2000; Fuertes *et al.*, 2003). Por otro lado, es posible que el GSH también pueda modular la expresión de factores de transcripción, tales como c-fos y c-jun, vinculados con la resistencia al cisplatino.

Si bien en general se suele conferir importancia al GSH en los mecanismos de resistencia al cisplatino, en muy pocos trabajos se vincula estos eventos con la compartimentación del GSH en el núcleo. De hecho, es factible suponer que la resistencia al tratamiento con cisplatino esté estrechamente relacionada con la disposición del GSH en el núcleo. En conjunto, estos trabajos demuestran la importancia de la disposición nuclear del GSH para

numerosos mecanismos de resistencia a la muerte por apoptosis inducida a través del cisplatino.

La presencia del GSH en el núcleo: transporte activo, síntesis de novo, difusión o algún otro proceso.

La disponibilidad del GSH en los compartimentos celulares esta definida por un equilibrio complejo entre la utilización, el transporte, la síntesis, la glutationilación de las proteínas y la reducción de GSSG. La regulación de estos procesos a nivel nuclear no esta clara. Posibles mecanismos bioquímicos involucrados en el turnover nuclear del GSH pueden ser (Smith *et al.*, 1996):

1. El GSH entra al núcleo desde el citoplasma de manera pasiva o mediante un proceso dependiente de energía.
2. Podría existir una síntesis nuclear de GSH mediante las enzimas γ -glutamil cistein ligasa (glutamato cisteína ligasa) y GSH sintetasa.
3. El GSH podría funcionar como transportador del γ -Glu-Cys-Cys.

En un estudio en núcleos aislados de hígado se concluyó que el GSH entraba al núcleo por difusión pasiva y no mediante un proceso dependiente del ATP. Según esta investigación, alrededor del 4-8% de la actividad de las enzimas de síntesis de GSH se ha encontrado en el núcleo, manteniendo así los niveles nucleares del GSH (Ho and Guenther, 1994). Por otro lado, diferentes autores señalan la importancia del oncogen humano bcl-2 en el posible transporte del GSH a través de la membrana nuclear.

3. El modelo que sobre-expresa bcl-2 resiste mejor al tratamiento con cisplatino. Implicación del bcl-2 en la compartimentación del GSH y su relación con los fenómenos mitocondriales y nucleares durante la resistencia a la apoptosis.

El análisis conjunto de los resultados obtenidos demuestra que en nuestro modelo la sobre-expresión de la proteína bcl-2 se relaciona con la mejor resistencia al tratamiento con cisplatino. Los datos muestran que las células MCF7+/+ parecen resistir con mayor eficacia al cisplatino respecto de las MCF7+/-.

Los ROS sufren un incremento más atenuado a lo largo del tratamiento y en el potencial de membrana mitocondrial la despolarización también es más atenuada. Los niveles celulares de calcio varían menos que en las MCF7+/-.

En cuanto a la distribución mitocondrial, aparece en ambas cepas como un efecto temprano, predominando la disposición perinuclear de las mitocondrias, pero la agregación es menor que en las MCF7+/- . Los cambios en la morfología mitocondrial no son tan marcados como en la cepa wild type, el cisplatino puede inducir la disminución del tamaño mitocondrial pero parece prevalecer la forma tubular alargada frente a la puntiforme. Sobre todo se afecta la morfología cuando el tratamiento es más agresivo.

Un aspecto relevante de los resultados es que las células supervivientes al tratamiento con el citostático presentan niveles superiores de GSH y parecen tener una marcada compartimentación nuclear del tripéptido. Este fenómeno es más evidente en las MCF7+/+, las cuales tienen mayores niveles de GSH y el fenómeno de compartimentación nuclear es más pronunciado que en las MCF7+/- . Coincidentemente la cepa transfectada resiste mejor al

tratamiento, los niveles de muerte celular son más bajos, hay menos apoptosis y el número de células es superior al de la cepa MCF7+/- . Esta mayor resistencia al tratamiento en el modelo que sobre-expresa bcl-2 podría explicarse de diversas formas. Además del conocido papel que cumple bcl-2 en los fenómenos relacionados con la resistencia a la apoptosis se cree que esta proteína puede desempeñar o relacionarse con otras funciones.

Papel de bcl-2 en la defensa antioxidante.

En nuestro modelo, la sobre-expresión de bcl-2 cumpliría un papel anti-apoptótico relacionado con la señalización y regulación de las vías de muerte celular, los resultados indican que en las MCF7+/+ los niveles de muerte celular son menores que en la cepa wild type. Por otro lado, podría desempeñar un papel protector ante el estrés oxidativo inducido por el cisplatino e influir en el incremento del nivel de GSH celular y su compartimentación.

En concordancia con los resultados aquí obtenidos, la respuesta al tratamiento con cisplatino a través del incremento de ROS y el nivel de apoptosis también ha sido registrada en otros trabajos (Del Bufalo *et al.*, 2002). Así mismo, se ha encontrado que células que sobre-expresan bcl-2 resisten mejor al cisplatino, siendo menores los niveles de ROS y de apoptosis.

A través del desarrollo de ratones knockout de Bcl-2, se ha revelado la importancia de esta proteína en la regulación del potencial redox celular en respuesta a situaciones de estrés oxidativo. Por ejemplo, bcl-2 puede actuar como antioxidante al reaccionar directamente con los radicales libres previniendo, especialmente, los procesos de peroxidación lipídica (Hockenberry *et al.*, 1993; Saitoh *et al.*, 2003; Zimmermann *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que el GSH se une a bcl-2 en la mitocondria, lo que explicaría las bases moleculares de la función antioxidante de esta proteína (Zimmermann *et al.*, 2007). De esta forma, bcl-2 se localizaría en la membrana mitocondrial introduciendo GSH en el espacio mitocondrial.

Relación entre bcl-2 y el GSH nuclear.

La relación entre bcl-2 y el GSH celular surgió hace una década, cuando se comprobó que la sobre-expresión de bcl-2 en las células He-La (Voehringer *et al.*, 1998) no sólo incrementaba el nivel total de GSH celular, también inducía la redistribución hacia el núcleo. Esto llevó a proponer la hipótesis de que la compartimentación nuclear del GSH era facilitada por bcl-2 y de esta forma se lograba un ambiente redox nuclear que era crucial para la regulación transcripcional. Otros estudios que siguieron esta línea de trabajo han demostrado la capacidad de bcl-2 como una proteína formadora de poros de membrana. Esto le permitiría actuar de transportador localizado en las membranas de la mitocondria, el retículo endoplasmático o incluso en el núcleo (Reed *et al.*, 1980; Hermann *et al.*, 1996; Voehringer *et al.*, 1998).

Análisis de la estructura de las proteínas tipo bcl-2 corrobora estos hallazgos. La estructura de estas proteínas guarda una estrecha similitud con los proteínas formadoras de poros de bacterias tóxicas. Más aún, las proteínas bcl-xL, bcl-2 y bax son capaces de formar poros en membranas artificiales (Petros *et al.*, 2004). También, se ha demostrado la presencia de bcl-2 en la envoltura nuclear e incluso se ha sugerido su asociación con el complejo del poro nuclear (Krajewski *et al.*, 1993).

Los primeros reportes donde se postula la posible función de bcl2 como transportador de membrana datan de casi 20 años. En estos se menciona la capacidad de bcl-2 de formar poros que permitan el tráfico de calcio e incluso de proteínas a través de la membrana externa mitocondrial, el retículo endoplasmático y la membrana nuclear. Se ha sugerido que las proteínas de esta familia podrían actuar como proteínas adaptadoras, capaces de arrastrar a otras proteínas hacia el citosol y/o actuar como proteínas integrantes de canales ubicadas en las membranas (Reed *et al.*, 1980). También se ha propuesto que bcl-2 podría cumplir un papel de guardián, regulando selectivamente la localización nuclear de factores de transcripción cruciales, tales como p53 y NfκB (Hermann *et al.*, 1996; Pallardó *et al.*, 2009).

4. A partir de los resultados obtenidos se puede establecer una secuencia de eventos que relacione los parámetros mitocondriales y nucleares estudiados durante la resistencia a la muerte por apoptosis inducida por el cisplatino.

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con cisplatino detiene las células en la fase de proliferación, S+M/G2, posiblemente como consecuencia de las lesiones inducidas en el DNA. De esta forma se provocaría la detención de la replicación y la parada del ciclo celular. Disminuyendo así la cantidad de células en la fase G0/G1. Cuando el daño inducido por el cisplatino se torna irreparable, la apoptosis serviría como una vía de eliminación de estas células dañadas.

Al detenerse las células en la fase S+M/G2 se induciría el incremento progresivo en los niveles de ROS a medida que avanza el

tratamiento. La proliferación celular se desarrolla dentro de un determinado rango de niveles de ROS, la detención de las células en la fase de proliferación por parte del cisplatino llevaría al incremento de estos niveles intracelulares de ROS. A su vez, los niveles de calcio también se incrementan de forma temprana a causa del tratamiento, lo que podría tener incidencia en el transporte del ión a través de la mitocondria. El incremento del ión dentro de las mitocondrias cumplirían una función de protección frente al aumento de calcio libre en el citoplasma, determinando así su disposición en agregados. De esta forma, las organelas se dispondrían en las zonas de mayor concentración de calcio o en zonas más sensibles a la señalización. Así, la disposición perinuclear de las mitocondrias permitiría proteger al núcleo, aislándolo de las posibles señalizaciones causadas por el incremento desmedido de calcio intracelular.

Tanto el aumento de los niveles de ROS como de calcio intracelular provocarían cambios del potencial de membrana mitocondrial. Posiblemente, en respuesta al daño causado por el incremento de ROS y calcio se produciría la permeabilización de la membrana mitocondrial interna. Lo que induciría la apertura de los poros de permeabilidad transitoria en la membrana interna mitocondrial y así se produciría la disminución progresiva del potencial de membrana mitocondrial a lo largo del tratamiento. La alteración de la permeabilidad mitocondrial consecuentemente llevaría la liberación del citocromo-c al citoplasma, lo que eventualmente promovería la muerte celular.

En respuesta al tratamiento, se modificaría la distribución espacial de las mitocondrias y posteriormente se inducirían cambios en la morfología mitocondrial, por lo que las mitocondrias perderían su

forma tubular alargada por una puntiforme. Estos eventos constituirían estrategias de resistencia a la muerte por apoptosis inducida por el cisplatino. De esta forma, la disposición perinuclear de las mitocondrias podría cumplir una función de protección del núcleo o inclusive, podría asegurar la disponibilidad y accesibilidad del GSH entre los dos principales reservorios de GSH de la célula, el núcleo y la mitocondria. Estos cambios en la distribución mitocondrial no serían ocasionados por alteraciones en los microtúbulos del citoesqueleto, dado que en los dos tratamientos considerados (cisplatino [10 μ M] y [50 μ M]) las variaciones de la disposición espacial de las mitocondrias fueron eventos tempranos. Por su parte, los cambios morfológicos detectados podrían relacionarse con la segregación de las mitocondrias disfuncionales. Los procesos de fusión y fisión cumplirían una función como mecanismo de control de calidad capaz de gobernar el recambio mitocondrial, siendo un evento decisivo en dicho mecanismo la despolarización del potencial de membrana mitocondrial. Esto permitiría la remoción por autofagia de las mitocondrias potencialmente disfuncionales. De esta manera, las mitocondrias potencialmente afectadas por el tratamiento, donde se produciría la despolarización irreversible del potencial de membrana, no intervendrían en eventos de fusión pero si sufrirían eventos de fisión mitocondrial. A partir de estos procesos se originarían mitocondrias de tamaño pequeño y despolarizadas, las cuales tendrían mayor probabilidad de ser eliminadas por autofagia. A su vez el incremento en los niveles de ROS podría estar relacionado con el incremento de la fisión mitocondrial. De esta forma, a través de los procesos de fisión se podrían eliminar las especies reactivas del oxígeno producidas en la mitocondria.

Por su parte, los niveles celulares de GSH son elevados, lo cual indica una clara respuesta antioxidante de parte de la célula. El GSH celular se ubica principalmente en el núcleo y en algunos casos también es evidente la compartimentación en las mitocondrias. Estos fenómenos aparecen como una respuesta temprana al tratamiento y se incrementan a medida que este avanza. Las células resistentes o supervivientes presentan un mayor nivel de GSH y una clara compartimentación nuclear, mientras que en las células apoptóticas el nivel de GSH es bajo y homogéneo. Teniendo en cuenta estos resultados es factible suponer que el incremento del GSH celular y la disposición del mismo en el núcleo sean decisivos al momento de determinar el destino celular en el modelo estudiado.

Así mismo, el análisis conjunto de los resultados obtenidos demuestra que en nuestro modelo la sobre-expresión de la proteína bcl-2 se relaciona con la mejor resistencia al tratamiento con cisplatino. En el modelo utilizado la sobre-expresión de bcl-2 cumpliría un papel anti-apoptótico relacionado con la señalización y regulación de las vías de muerte celular y también podría desempeñar un papel protector ante el estrés oxidativo inducido por el cisplatino e influir en el incremento del nivel de GSH celular y su compartimentación.

5. La aparición temprana de las variaciones mitocondriales y nucleares podrían deberse a una estrategia de resistencia celular al tratamiento.

Los resultados presentados muestran que la compartimentación de GSH en el núcleo y la mitocondria podrían ser eventos clave en la resistencia celular a la apoptosis. Lo que indicaría que la ubicación

del GSH en estas organelas no sólo cumpliría una función de mero reservorio celular, ya que parece vincularse con la capacidad de resistencia y supervivencia celular frente a estímulos apoptóticos. Así mismo, es posible que la comunicación entre estas organelas guarde algún tipo de relación con estos eventos.

En el presente modelo, en las células supervivientes el pool de GSH nuclear parece resistir al tratamiento y aparentemente ocurre lo mismo con el pool mitocondrial. Por otra parte, la alteración de la disposición espacial de las mitocondrias aparece como un evento temprano y no necesariamente lleva a la muerte celular. Es posible que de esta forma el GSH este disponible y pueda pasar de la mitocondria al núcleo, a través del retículo endoplasmático, dependiendo de las necesidades celulares al momento de resistir a un estímulo apoptótico.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se pueden establecer las siguientes conclusiones.

1. En respuesta a la apoptosis inducida por el tratamiento con cisplatino se producen alteraciones en la distribución y forma de las mitocondrias así como un aumento del nivel y la compartimentación nuclear del GSH que parecen relacionarse con la mayor resistencia a la muerte por apoptosis inducida por el tratamiento con cisplatino.
 - El cisplatino produce un aumento progresivo y continuo de los niveles de ROS, lo que podría relacionarse con la detención del ciclo celular en la fase de proliferación.
 - Aumenta el nivel de calcio celular y su disposición en agregados. La agregación podría deberse al incremento de la compartimentación mitocondrial del ión, de esta forma se protegería a la célula de las posibles señalizaciones causadas por el incremento descontrolado del calcio. Las mitocondrias se ubicarían en zonas donde la concentración de calcio es superior o en zonas más sensibles a la señalización. Por ejemplo, la ubicación perinuclear permitiría proteger al núcleo y aislarlo de posibles señalizaciones causadas por el incremento desmedido de calcio intracelular.

- En respuesta al daño causado por el incremento de ROS y/o niveles de calcio se induciría la permeabilización de la membrana mitocondrial. Eventualmente esto llevaría a la despolarización del potencial de membrana mitocondrial, lo que se relaciona con una pérdida de la función mitocondrial normal y con un mayor estado de oxidación mitocondrial y con la eventual liberación del citocromo c al citosol, lo que promovería la muerte celular.
- Como respuesta temprana al tratamiento, las mitocondrias se agregan y se disponen alrededor del núcleo y lo que podría tener una función de protección o inclusive podría facilitar el intercambio y disponibilidad del GSH entre ambas organelas. A medida que avanza el tratamiento las mitocondrias pueden perder su forma tubular alargada por una puntiforme, posiblemente como consecuencia de la pérdida de la función mitocondrial. Las mitocondrias despolarizadas y potencialmente disfuncionales no intervendrían en procesos de fusión pero si sufrirían procesos de fisión, originando así mitocondrias pequeñas y despolarizadas, serían segregadas y eliminadas posiblemente por autofagia.
- Estas alteraciones de la distribución y morfología mitocondrial no son causantes de la muerte celular, más aún, parecen relacionarse con la resistencia celular a la muerte por apoptosis inducida por el tratamiento.

- El tratamiento induciría el incremento del nivel de GSH y su compartimentación, siendo respuestas tempranas que determinarían la resistencia a la apoptosis inducida por el cisplatino. Esto llevaría a que las células supervivientes tengan niveles muy altos de GSH y una alta compartimentación nuclear, mientras que las apoptóticas presentan un nivel bajo y homogéneo.
2. En el modelo estudiado, la sobre-expresión de la proteína bcl-2 se relaciona con una mayor resistencia al tratamiento con cisplatino, a través del mecanismo que se explica a continuación:
- La sobre-expresión de la proteína bcl-2 confiere mayor resistencia a la apoptosis inducida tras el tratamiento con cisplatino.
 - La proteína podría cumplir una función antioxidante frente al estrés oxidativo inducido por el tratamiento.
 - La sobre-expresión de bcl-2 podría relacionarse con el incremento del nivel total de GSH celular y también podría inducir la redistribución hacia el núcleo.
3. Es posible que la comunicación entre la mitocondria y el núcleo en el marco de la resistencia a la apoptosis en el modelo estudiado guarde relación con el hecho de que ambas organelas representan los reservorios más persistentes de GSH de la célula. De esta forma, la disposición perinuclear de las mitocondrias podría facilitar una mayor disponibilidad e intercambio de glutatión entre el núcleo y las mitocondrias, en función de las necesidades celulares durante la resistencia a la apoptosis.

FUTUROS ESTUDIOS

FUTUROS ESTUDIOS

A partir de los resultados obtenidos surge la posibilidad de desarrollar futuros estudios que permitan completar y ampliar el presente trabajo.

- El análisis por citometría de flujo de las mitocondrias aisladas permitirá realizar un análisis más detallado de estas organelas. A través de esta metodología se puede realizar un análisis detallado de las mitocondrias con un tamaño muestral grande. Por ejemplo, sería interesante evaluar en nuestro modelos posibles variaciones en la morfología y el volumen de las mismas así como en los niveles de GSH.
- Complementar algunas de las determinaciones realizadas en el presente trabajo como por ejemplo: analizar la expresión de las proteínas de fusión y fisión mitocondrial en las fracciones citosólica y mitocondrial por separado; realizar un análisis de los componentes del citoesqueleto permitirá corroborar los efectos en la distribución y organización del mismo; estudiar las actividades de las enzimas glutatión peroxidasa (GPx) y glutamato cisteína ligasa (GCL).
- La depleción del GSH celular permitiría evaluar los efectos directos sobre los parámetros analizados en la presente tesis.
- Así mismo, a través de RNA de interferencia se podría evaluar el papel de la proteína bcl-2 en el modelo propuesto, sobre todo en cuanto al nivel de GSH y su compartimentación y sobre todo evaluar los efectos en los fenómenos considerados en el presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referencias bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams J.M. and S. Cory. 2007. "Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. Review". *Current Opinion in Immunology*, 19: 488–496.
- Adrain C. and S.J. Martin. 2001. "The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas". *Trends Biochem Sci.*; 26(6): 390-7.
- Aebi H. 1984, "Catalase *in vitro*". *Methods Enzymol.*; 105: 121-6.
- Akerboom T.P., M. Bilzer and Sies H. 1982. "The relationship of biliary glutathione disulfide efflux and intracellular glutathione disulfide content in perfused rat liver". *J. Biol. Chem.*, 257 (8): 4248-4252.
- Alberts B.B.D., J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J.D. Watson. 1994. "The Cell -Division Cycle, in *Molecular Biology of the Cell*". Garland Publishing, Taylor & Francis group: New York. 863-906 pp.
- Algeciras-Schimmich A., L. Shen, B.C. Barnhart, A.E. Murmann, J.K. Burkhardt and M.E. Peter. 2002. "Molecular ordering of the initial signaling events of CD95". *Mol Cell Biol.*, 22(1): 207-20.
- Andree H.A.M., C.P.M. Reutelingsperger, R. Hauptmann, H.C. Hemker, W.Th. Hermen and G.M. Willems. 1990. "Binding of Vascular Anticoagulant α (VAC α) to Planar Phospholipid Bilayers". *The Journal Of Biological Chemistry*, Vol. 265. No. 9, pp. 4923-4928.
- Antonsson B. 2001. "Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family killer-proteins and their victim the mitochondrion". *Cell Tissue Res.*; 306(3): 347-61.
- Arimura S., J. Yamamoto, G.P. Aida, M. Nakazono and N. Tsutsumi. 2004. "Frequent fusion and fission of plant mitochondria with unequal nucleoid distribution". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101: 7805–7808.
- Ashe P.C. and M.D. Berry. 2003. "Apoptotic signaling cascades". *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*; 27(2): 199-214.

Referencias bibliográficas

- Ashkenazi A. and V.M. Dixit. 1998. "Death receptors: signaling and modulation". *Science* 267: 1456-1462.
- Atzori L., J.M. Dypbukt, K. Sundqvist, I. Cotgreave, C.C. Edman, P. Moldéus and R.C. Grafström. 1990. "Growth-associated modifications of low-molecular-weight thiols and protein sulfhydryls in human bronchial fibroblasts". *J Cell Physiol*, 143(1): 165-71.
- Babior B.M. 1978. "Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes". *N. Engl. J. Med.*; 298: 659-668.
- Barhoumi R., J.A. Bowen, L.S. Stein, J. Echols and R.C. Burghardt. 1993. "Concurrent analysis of intracellular glutathione content and gap junctional intercellular communication". *Cytometry*; 14(7): 747-56.
- Baricault L., B. Segui, L. Guegand, A. Olichon, A. Valette, F. Larminat and G. Lenaers. 2007. "OPA1 cleavage depends on decreased mitochondrial ATP level and bivalent metals". *Exp. Cell Res.*, 313: 3800–3808.
- Baserga R. 1999. "Introduction to the Cell Cycle, in *The Molecular Basis of Cell Cycle and Growth Control*". B.R. Stein G.S., Giordano A., Denhardt, D.T., Editor., Wiley-Liss Inc.
- Beere H.M., B.B. Wolf, K. Cain, D.D. Mosser, A. Mahboubi, T. Kuwana, P. Taylor, R.I. Morimoto, G.M. Cohen and D.R. Green. 2000. "Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome". *Nat Cell Biol.*; 2(8): 469-75.
- Belloc F., P. Dumain, M.R. Boisseau, C. Jalloustre, J. Reiffers, P. Bernard and F. Lacombe. 1994. "A flow cytometric method using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells". *Cytometry*; 17: 59-65.
- Bellomo C., S.A. Jewel, H. Thor and S. Orrenius. 1982. "Regulation of intracellular calcium compartmentation: Studies with isolated hepatocytes and t-butylhydroperoxide". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 79 (22): 6842-6846.
- Benlloch M., A. Ortega, P. Ferrer, R. Segarra, E. Obrador, M. Asensi, J. Carretero and J.M. Estrela. 2005. "Acceleration of glutathione efflux and inhibition of gamma-glutamyltranspeptidase sensitize metastatic

- B16 melanoma cells to endothelium-induced cytotoxicity". *J Biol Chem*, 280(8): 6950-9.
- Benzi G. and A. Moretti. 1995. "Age and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system". *Free Rad. Biol. Med.*; 19(1): 77-101.
- Bereiter-Hahn J. 1990. "Behaviour of mitochondria in the living cell". *Int. Rev. Cytol.*; 122: 1-63.
- Bhar D., M. A. Karren, M. Babst and J. M. Shaw. 2006. "Dimeric Dnm1-G385D interacts with Mdv1 on mitochondria and can be stimulated to assemble into fission complexes containing Mdv1 and Fis1". *J. Biol. Chem.*; 281: 17312–17320.
- Biaglow J.E., M.E. Varnes, E.P. Clark and E.R. Epp. 1983. "The role of thiols in cellular response to radiation and drugs". *Radiat Res*, 95(3): 437-55.
- Blagosklonny M.V. and A.B. Pardee. 2002. "The restriction point of the cell cycle". *Review. Cell Cycle.*;1(2):103-10.
- Blomen V.A. and J. Boonstra. 2007. "Cell fate determination during G1 phase progression. Review". *Cell. Mol. Life Sci.* 64: 3084 – 3104.
- Boldogh I.R. and L.A. Pon 2007. "Mitochondria on the move". *Trends Cell Biol.*; 17(10): 502-10.
- Boldogh I.R. and L.A. Pon. 2006. "Interactions of mitochondria with the actin cytoskeleton". *Biochim Biophys Acta.*; 1763(5-6): 450-62.
- Borgers M., L.G. Shu, R. Xhonneux, F. Thoné and P. Van Overloop. 1987. "Changes in ultrastructure and Ca²⁺ distribution in the isolated working rabbit heart after ischemia. A time-related study". *Am J Pathol*; 126(1): 92-102.
- Borner C. 2003. "The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions". *Mol Immunol.*; 39(11): 615-47.
- Borrás C., Esteve J.M., Viña J.R., Sastre J., Viña J. and Pallardó F.V. 2004. "Glutathione regulates telomerase activity in 3T3 fibroblasts". *J Biol Chem.*; 279(33): 34332-5.

Referencias bibliográficas

- Boveris A. and B.C. Chance. 1973. "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen". *Biochem J.*; 143: 707-716.
- Boveris A., N. Oshino and B. Chance. 1972. "The cellular production of hydrogen peroxyde". *Biochem. J.*; 128 (3): 617-630.
- Boyd J.M., G. Gallo, B. Elangovan, B. Houghton, S. Malstrom, B.J. Avery, R.G. Ebb, T. Subramanian, C. Chitteden and R.J. Lutz. 1995. "Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins". *Oncogene*; 11(9): 1921-8.
- Boyland E. and L.F. Chasseaud. 1967. "Enzyme-catalysed conjugations of glutathione with unsaturated compounds". *Biochem. J.*; 104, 95-102.
- Brand M.D. and M.P. Murphy. 1987. "Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells". *Biol. Rev.*; 62: 141-193.
- Bratton S.B., G. Walker, S.M. Srinivasula, X.M. Sun, M. Butterworth, E.S. Alnemri and G.M. Cohen. 2001. "Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes". *Embo J.*, 20(5): 998-1009.
- Breen A.P. and J.A. Murphy. 1995. "Reactions of oxyl radicals with DNA". *Free Rad. Biol. Med.*; 18(6): 1033-1077.
- Brigelius R., C. Muckel, T.P. Akerboom and H. Sies. 1983. "Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide". *Biochem. Pharmacol.*, 32(17): 2529-34.
- Bruey J.M., C. Ducasse, P. Bonniaud, L. Ravagnan, S.A. Susin, C. Diaz-Latoud, S. Gurbuxani, A.P. Arrigo, G. Kroemer, E. Solary and C. Garrido. 2000. "Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c". *Nat Cell Biol* 2(9): 645-52.
- Burchill B.R., .M. Oliver, C.B. Pearson, E.D. Leinbach and R.D. Berlin. 1978. "Microtubule dynamics and glutathione metabolism in phagocytizing human polymorphonuclear leukocytes". *J Cell Biol*, 76(2): 439-47.

- Busch K.B., J. Bereiter-Hahn, I. Wittig, H. Schagger and M. Jendrach. 2006. "Mitochondrial dynamics generate equal distribution but patchwork localization of respiratory complex I". *Mol. Membr. Biol.*, 23: 509–520.
- Buttke T.M. and P.A. Sandstrom. 1994. "Oxidative stress as a mediator of apoptosis". *Immunol Today* 15(1): 7-10.
- Cadenas E. and K.J.A. Davies. 2000. "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging". *Free Radic Biol Med*; 29(3/4): 222-230.
- Cadenas E., A. Boveris, C.I. Ragan and A.O. Stoppani. 1977. "Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADPH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria". *Arch. Biochem. Biophys.*; 180 (2): 248-257.
- Cain K., S.B. Bratton and G.M. Cohen. 2002. "The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex". *Biochimie*; 84(2-3): 203-14.
- Cardoso S.M., I. Santana, R.H. Swerdlow and C.R. Oliveira. 2004. "Mitochondria dysfunction of Alzheimer's disease cybrids enhances Ab toxicity". *Journal of Neurochemistry*, 89: 1417–1426.
- Cerutti P.A. 1985. "Prooxidant states and tumor promotion". *Science* 227, 4685: 375- 381.
- Chan D.C. 2006. "Mitochondrial Fusion and Fission in Mammals". *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22: 79–99.
- Chance B., Sies H. and Boveris A. 1979. "Hydroxiperoxide metabolism in mammalian organs". *Physiol Rev.*; 59(3): 527-605.
- Chang D.T.W. and I.J. Reynolds. 2006. "Differences in mitochondrial movement and morphology in young and mature primary cortical neurons in culture". *Neuroscience*, 141: 727–736.
- Cheeseman K.H. and T.F. Slater. 1993. "An introduction to free radical biochemistry". *Br. Med. Bull.*; 49(3): 588-603.
- Chen G. and D.V. Goeddel. 2002. "TNF-R1 signalling: a beautiful pathway". *Science*, 296(5573): 1634-5.
- Chen H. and Chan D.C. 2005. "Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission". *Hum Mol Genet.*; 14 (2): R283-9.

Referencias bibliográficas

- Chirino Y.I. and J. Pedraza-Chaverri. 2009. "Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity". *Exp Toxicol Pathol.*; 61(3): 223-42.
- Chu G. 1994. "Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair". Review. *J Biol Chem.*; 269(2): 787-90.
- Cipolat S., Martins de Brito O., Dal Zilio B. and Scorrano L. 2004. "OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 101: 15927–15932.
- Coller H.A. 2007. "What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation". Review. *Nat Rev Mol Cell Biol.*; 8(8): 667-70.
- Conour J.E., W.V. Graham and H.R. Gaskins. 2004. "A combined *in vitro* bioinformatic investigation of redox regulatory mechanisms governing cell cycle progression". *Physiol. Genomics*; 18: 196–205.
- Cossarizza A. "Measure of Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi$) with the Fluorescent Probe JC-1". *Purdue Cytometry CD-ROM Series*, vol.3.
- Cotgreave I.A. and R.G. Gerdes. 1998. "Recent trends in glutathione biochemistry--glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation?". *Biochem Biophys Res Commun*, 242(1): 1-9.
- Cummins J. 1998. "Mitochondrial DNA in mammalian reproduction". *Rev Reprod.*; 3(3): 172-82.
- Dailey M., G. Marrs, J. Satz and M. Waite. 1999. "Concepts in Imaging and Microscopy. Exploring Biological Structure and Function with Confocal Microscopy". *Biol. Bull.* 197: 115-122.
- Dalle-Donne I., R. Rossi, D. Giustarini, R. Colombo and A. Milzani. 2007. "S-glutathionylation in protein redox regulation". *Free Radic Biol Med*, 43(6): 883-98.
- Darzynkiewicz Z., E. Bedner, X. Li, W. Gorczyca and M.R. Melamed. 1999. "Laser-scanning cytometry: A new instrumentation with many applications". *Exp Cell Res.*, 25; 249(1): 1-12.

- Davies K.J. 1999. "The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress". *IUBMB Life*, 48(1): 41-7.
- Davies K.J.A. 1987. "Protein damage and degradation by oxygen radicals. General aspects". *Journal of Biological Chemistry*; 262: 9895-9901.
- De Vos K.J., V.J. Allan, A.J. Grierson and M.P. Sheetz. 2005. "Mitochondrial function and actin regulate dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission". *Curr. Biol.*, 15: 678–683.
- Debatin K.M. 2004. "Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. Review". *Cancer Immunol Immunother*; 53: 153–159.
- Degterev A. and Yuan J. 2008. "Expansion and evolution of cell death programmes. Review". *Nature*; 9: 378- 390.
- Del Bufalo D, A. Biroccio, D. Triscioglio, T. Bruno, A. Floridi, A. Aquino and G. Zupi. 2002. "Bcl-2 has differing effects on the sensitivity of breast cancer cells depending on the antineoplastic drug used". *Eur. J. Cancer*; 38 (18): 2455-62.
- Denecker G., D. Vercammen, W. Declercq and P. Vandenabeele. 2001. "Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. Review". *Cell. Mol. Life Sci.*; 58: 356–370.
- Desagher S., A. Osen-Sand, S. Montessuit, E. Magnenat, F. Vilbois, A. Hochmann, L. Journot, B. Antonsson and J.C. Martinou. 2001. "Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8". *Mol Cell*; 8(3): 601-11.
- Detmer S.A. and D.C. Chan. 2007. "Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics". *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 870–879.
- Deveraux Q.L. and J.C. Reed. 1999. "IAP family proteins-suppressors of apoptosis". *Genes Dev*; 13: 239-252.
- Dijkwel P.A. and P.W. Wenink. 1986. "Structural integrity of the nuclear matrix: differential effects of thiol agents and metal chelators". *J. Cell Sci.*, 84: 53-67.
- Dolphin D. 1988. "The generation of radicals during the normal and abnormal functioning of cytochromes P450". *Oxygen radicals in biology and*

Referencias bibliográficas

- medicine. M.G. Simic, K.A. Taylor, J.F. Ward and C. Sonntag. New York, Ed. Plenum Press.: 491-500.
- Du C., M. Fang, Y. Li, L. Li and X. Wang. 2000. "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition". *Cell*; 102(1): 33-42.
- Duchen M.R. 2000. "Mitochondria and Ca(2+) in cell physiology and pathophysiology". Review. *Cell Calcium.*; 28(5-6): 339-48.
- Duchen M.R. 2004. "Roles of mitochondria in health and disease". Review. *Diabetes.*; 53 Suppl. 1: S96-102.
- Dumont A., S.P. Hehner, T.G. Hofmann, M. Ueffing, W. Dröge and M.L. Schmitz. 1999. "Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF-kappaB". *Oncogene*; 18(3): 747-57.
- Duvezin-Caubet S., R. Jagasia, J. Wagener, S. Hofmann, A. Trifunovic, A. Hansson, A. Chomyn, M.F. Bauer, G. Attardi, N.G. Larsson, W. Neupert and A.S. Reichert. 2006. "Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology". *J. Biol. Chem.*; 281: 37972–37979.
- Dypbukt J.M., M. Ankarcona, M. Burkitt, A. Sjöholm, K. Ström, S. Orrenius and P. Nicotera. 1994. "Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. The role of intracellular polyamines". *J Biol Chem.*; 269(48): 30553-60.
- Eastman A. 1987. "Crosslinking of glutathione to DNA by cancer chemotherapeutic platinum coordination complexes". *Chem. Biol. Interact.*; 61: 241–248.
- Eberstadt M., B. Huang, Z. Chen, R.P. Meadows, S.C. Ng, L. Zheng, M.J. Lenardo and S.W. Fesik. 1998. "NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain". *Nature*, 392(6679): 941-5.

- Elmore S.P., T. Qian, S.F. Grissom and J.J. Lemasters. 2001. "The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes". *FASEB J.*, 15: 2286–2287.
- Ermak G. and K.J.A. Davies. 2002. "Calcium and oxidative stress: from cell signalling to cell death". Review. *Molecular Immunology*; 38: 713–721.
- Ernst V., D.H. Levin and I.M. London. 1978. "Inhibition of protein synthesis initiation by oxidized glutathione: activation of a protein kinase that phosphorylates the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75(9): 4110-4.
- Eskes R., S. Desagher, B. Antonsson, J.C. Martinou. 2000. "Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane". *Mol Cell Biol*, 20(3): 929-35.
- Esposti M.D., Eler J.T., Hickman J.A. and C. Dive. 2001. "Bid, a widely expressed proapoptotic protein of the Bcl-2 family, displays lipid transfer activity". *Mol Cell Biol*, 21(21): 7268-76.
- Esteve J.M., J. Mompo, J. García de la Asunción, J. Sastre, M. Asensi, J. Boix, J. Viña, J.R. Viña and F.V. Pallardó. 1999. "Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis. Studies *in vivo* and *in-vitro*". *FASEB J.*, 13: 1055- 1064.
- Fadok V.A., D.R. Voelker, P.A. Campbell, J.J. Cohen, D.L. Bratton and P.M. Henson. 1992. "Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages". *J Immunol.*; 148(7): 2207-16.
- Fang J., H. Nakamura and A.K. Iyer. 2007. "Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy". Review. *J Drug Target.*;15(7-8):475-86.
- Ferreiro E., R. Resende, R. Costa, C.R. Oliveira and C.M.F. Pereira. 2006. "An endoplasmic-reticulum-specific apoptotic pathway is involved in prion and amyloid-beta peptides neurotoxicity". *Neurobiology of Disease*, 23: 669–678.
- Ferri K.F. and G. Kroemer. 2001. "Organelle-specific initiation of cell death pathways". *Nat Cell Biol*; 3(11): E255-63.

Referencias bibliográficas

- Fesik S.W. 2000. "Insights into programmed cell death through structural biology". *Cell*; 103(2): 273-82.
- Fiorani M., Cantoni O., Tasinto A., Boscoboinik D. and Azzi A. 1995. "Hydrogen peroxide-and fetal bovine serum-induced DNA synthesis in vascular smooth muscle cells: positive and negative regulation by protein kinase C isoforms". *Biochim. Biophys Acta*, 1269: 98- 104.
- Fleury C., B. Mignotte and J.L. Vayssière. 2002. "Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling". *Biochimie*; 84(2-3): 131-41.
- Földes-Papp Z., U. Demel and G.P. Tilz. 2003. "Laser scanning confocal fluorescence microscopy: an overview". *International Immunopharmacology*, 3: 1715–1729.
- Forster R.E. and R.W. Estabrook. 1993. "Is oxygen an essential nutrient?". *Annu. Rev. Nutr.*, 13: 383-403.
- Forstrom J.W., J.J. Zakowski and A.L. Tappel. 1978. "Identification of the catalytic site of the rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine". *Biochemistry.*, 17 (13): 2639-2644.
- Fraga C.G., M.K. Shigenaga, J.W. Park, P. Degan and B.N. Ames. 1990. "Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87 (12): 4533-4537.
- Frederick R.L. and J.M. Shaw. 2007. "Moving Mitochondria: Establishing Distribution of an Essential Organelle. Review". *Traffic*; 8: 1668–1675.
- Freeman B.A. and J. Crapo 1982. "Biology of disease: Free radicals and tissue injure". *Lab. Invest.*, 47 (5): 412-426.
- Frei B. 1994. "Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action". *Am. J. Med.*, 97(3A): 5S-13S.
- Fridovich I. 1974. "Superoxide Dismutases". *Adv Enzimol*, 41: 35-97.
- Fridovich I. 1986. "Superoxide dismutases". *Methods. Enzymol.*; 58: 61-97.
- Fridovich I. 1989. "Superoxide dismutases: an adaptation to a paramagnetic gas". *J Biol Chem.*; (264): 7761-7764.
- Fuertes M.A., C. Alonso and J.M. Pérez. 2003. "Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action: Enhancement of antitumor activity and

- circumvention of drug resistance". *Chemical Reviews*, 103(3): 645-662.
- Galluzzi L., M.C. Maiuri, I. Vitale, H. Zischka, M. Castedo, L. Zitvogel and G. Kroemer. 2007. "Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. News and Commentaries". *Cell Death and Differentiation*, 14: 1237–1266.
- García-Saéz A.J., I. Mingarro, E. Pérez-Payá and J. Salgado. 2004. "Membrane-Insertion Fragments of Bcl-xL, Bax, and Bid". *Biochemistry*, 43: 10930-10943.
- Garesse R. and C.G. Vallejo. 2001. "Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes". Review. *Gene*; 263: 1-16.
- Gerl R. and D.L. Vaux. 2005. "Apoptosis in the development and treatment of cancer". *Carcinogenesis*; 26(2): 263—270.
- Ghafourifar P. and C. Richter. 1997. "Nitric oxide synthase activity in mitochondria". *FEBS Lett.*, 418(3): 291-296.
- Giustarini D., R. Rossi, A. Milzani, R. Colombo, I. Dalle-Donne. 2004. "S-glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases". Review. *J Cell Mol Med*, 8(2): 201-12.
- Go Y.M. and D.P. Jones. 2008. "Redox compartmentalization in eukaryotic cells. Review". *Biochimica et Biophysica Acta*; 1780: 1273–1290.
- Gomes A., E. Fernandes and J.L.F.C. Lima. 2005. "Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. Review". *J. Biochem. Biophys. Methods*, 65: 45–80.
- Gong J., F. Traganos and Z. Darzynkiewicz. 1994. "A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry". *Anal. Biochem.*, 218: 314-319.
- Grafi G. 1998. "Cell Cycle Regulation of DNA Replication: The Endoreduplication Perspective". Minireview. *Experimental Cell Research*, 244: 372–378.
- Granger D.N., G. Rutili and J.M. McCord. 1981. "Superoxide radicals in feline intestinal ischemia". *Gastroenterology*; 81(1): 22-29.

Referencias bibliográficas

- Green D.R. and J.C. Reed. 1998. "Mitochondria and apoptosis." *Science*, 281: 1309-1312.
- Green R.M., M. Graham, M.R. O'Donovan, J.K. Chipman, N.J. Hodges. 2006. "Subcellular compartmentalization of glutathione: correlations with parameters of oxidative stress related to genotoxicity". *Mutagenesis*, 21(6): 383-90.
- Griffin E.E. and Chan D.C. 2006. "Domain interactions within Fzo1 oligomers are essential for mitochondrial fusion". *J. Biol. Chem.*, 281: 16599–16606.
- Griffin E.E., S.A. Detmer and D.C. Chan. 2006. "Molecular mechanism of mitochondrial membrane fusion". *Biochim. Biophys. Acta*, 1763: 482–489.
- Griffith O.W. and A. Meister. 1985. "Origin and turnover of mitochondrial glutathione". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82 (14): 4668-4672.
- Gross A. 2001. "Bcl-2 proteins: regulators of the mitochondrial apoptotic program". *Life*, 52: 231-236.
- Haga N., N. Fujita and T. Tsuruo. 2003. "Mitochondrial aggregation precedes cytochrome c release from mitochondria during apoptosis". *Oncogene*; 22(36): 5579-85.
- Halliwell B. 1991. "Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease". *Am. J. Med.*; 91(3C): 14S-22S.
- Halliwell B. 1994. "Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence?". *Lancet*, 344 (8924): 721-724.
- Halliwell B. 1996. "Antioxidants in human health and disease". *Annu. Rev. Nutr.*, 16: 33-50.
- Halliwell B. and J.M.C. Gutteridge. 1989. "Free radicals in biology and medicine". Oxford, Clarendon Press, Reino Unido.
- Halliwell, B. 2007. "Oxidative stress and cancer: have we moved forward?". *Biochem J*, 401(1): 1-11.

- Hansen J.M. K.K. Harris, M.A. Philbert and C Harris. 2002. "Thalidomide modulates nuclear redox status and preferentially depletes glutathione in rabbit limb versus rat limb". *J Pharmacol Exp Ther*, 300(3): 768-76.
- Hansen J.M., Y.M. Go and D.P. Jones. 2006. "Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signalling". Review. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 46: 215-234.
- Harris J.W. and H.M. Patt. 1969. "Non-protein sulfhydryl content and cell-cycle dynamics of Ehrlich ascites tumor". *Exp Cell Res*, 56(1): 134-41.
- Hartwell L.H. and T.A. Weinert. 1989. "Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events". *Science*, 246 (4930): 629-34.
- Henry-Mowatt J., C. Dive, J.C. Martinou and D. James. 2004. "Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer". *Oncogene*, 23: 2850–2860.
- Hentze H., M. Latta, G. Küntzle, R. Lucas and A. Wendel. 2003. "Redox control of hepatic cell death". *Toxicol Lett.*; 139(2-3): 111-8.
- Herrmann J.L., E. Bruckheimer and T.J. McDonnell. 1996. "Cell death signal transduction and Bcl-2 function". *Biochem Soc Trans*, 24(4): 1059-65.
- Hinchman C.A. and N. Ballatori. 1990. "Glutathione-degrading capacities of liver and kidney in different species". *Biochem. Pharmacol*, 40(5): 1131-5.
- Ho Y.F. and Guenther T.M. 1994. "Uptake and biosynthesis of glutathione by isolated hepatic nuclei". *Toxicologist*, 14: 178.
- Hockenbery D.M., Z.N. Oltvai, X.M. Yin, C.L. Millman and S.J. Korsmeyer. 1993. "Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis". *Cell.*, 75 (2): 241-251.
- Hoetelmans R.W.M., C.J.H. Van de Velde and J.H. Van Dierendonck. 2003. "The presence of 19-kDa Bcl-2 in dividing cells". *Cell Prolif.*, 36: 293–306.
- Hoffman A., L.M. Spetner and M. Burke. 2008. "Ramifications of a redox switch within a normal cell: its absence in a cancer cell". *Free Radic Biol Med*, 45(3): 265-8.

Referencias bibliográficas

- Hollenbeck P.J. and W.M. Saxton. 2005. "The axonal transport of mitochondria". *J Cell Sci.*; 118(Pt 23): 5411–5419.
- Holmgren A. 1979. "Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Purification and characterization of glutaredoxin from *Escherichia coli*". *J Biol Chem.*; 254(9): 3664-71.
- Hopkins F. 1929. "On glutathione: a reinvestigation". *Journal of Biological Chemistry*, 84: 269-320.
- Hu Y., M.A. Benedict, L. Ding and G. Núñez. 1999. "Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis". *Embo J*, 18(13): 3586-95.
- Hüttemann M., I. Lee, A. Pecinota, P. Pecina, K. Przyklenk and J.W. Doan. 2008. "Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease". *J Bioenerg Biomembr.*, 40: 445–456.
- Hutter D.E., B.G. Till and J.J. Greene. 1997. "Redox state changes in density-dependent regulation of proliferation". *Exp Cell Res*, 232(2): 435-8.
- Ingerman E., E.M. Perkins, M. Marino, J.A. Mears, J.M. McCaffery, J.E. Hinshaw and J. Nunnari. 2005. "Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria". *J. Cell Biol.*, 170 (7): 1021–1027.
- Ishihara N., A. Jofuku, Y. Eura and K. Mihara. 2003. "Regulation of mitochondrial morphology by membrane potential, and DRP1-dependent division and FZO1-dependent fusion reaction in mammalian cells". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 301: 891–898.
- Ishihara N., Eura Y. and Mihara K. 2004. "Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity". *J. Cell Sci.* 117, 6535–6546.
- Ishihara N., Y. Fujita, T. Oka and K. Mihara 2006. "Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1". *EMBO J.*, 25: 2966–2977.

- Jakobs S. 2006. "High resolution imaging of live mitochondria". *Biochim. Biophys. Acta*, 1763: 561–575.
- Jakobs S., A.C. Schauss and S.W. Hell. 2003. "Photoconversion of matrix targeted GFP enables analysis of continuity and intermixing of the mitochondrial lumen". *FEBS Lett.*, 554: 194–200.
- Jacobson J. and M.R. Duchon. 2004. "Interplay between mitochondria and cellular calcium signalling". *Mol Cell Biochem*; 256/257: 209–218.
- Jamieson E.R. and Lippard S.J. 1999. "Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts". *Chem. Rev.*, 99: 2467–2498.
- Jang J.H. and Surh Y.J. 2003. "Potentiation of cellular antioxidant capacity by Bcl-2: implications for its antiapoptotic function". *Review. Biochem. Pharmacol.*, 66: 1371-1379.
- Jevtovic-Todorovic V. and T.M. Guenther. 1992. "Depletion of a discrete nuclear glutathione pool by oxidative stress, but not by buthionine sulfoximine. Correlation with enhanced alkylating agent cytotoxicity to human melanoma cells in vitro". *Biochem Pharmacol*, 44(7): 1383-93.
- Jiang X. and X. Wang. 2000. "Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1". *J Biol Chem.*, 275(40): 31199-203.
- Jones D.P. 2002. "Redox potential of GSH/ GSSG couple: assay and biological significance". *Methods Enzymol.*; 348: 93-112.
- Jones D.P. 2006. "Redefining oxidative stress". *Antioxid Redox Signal*, 8(9-10): 1865-79.
- Kagan V.E., B. Gleiss, Y.Y. Tyurina, V.A. Tyurin, C. Elenström-Magnusson, S.X. Liu, F.B. Serinkan, A. Arroyo, J. Chandra, S. Orrenius and B. Fadeel. 2002. "A role for oxidative stress in apoptosis: oxidation and externalization of phosphatidylserine is required for macrophage clearance of cells undergoing Fas-mediated apoptosis". *J Immunol.*; 169(1): 487-99.
- Kaim G. and P. Dimroth. 1999. "ATP synthesis by F-type ATP synthase is obligatorily dependent on the transmembrane voltage". *EMBO J.*, 18: 4118–4127.

Referencias bibliográficas

- Kakkar P. and B. K. Singh. 2007. "Mitochondria: a hub of redox activities and cellular distress control". *Mol Cell Biochem.*, 305: 235–253.
- Karbowski M. and R.J. Youle. 2003. "Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis". *Cell Death and Differentiation*, 10: 870–880.
- Karbowski M., D. Arnoult, H. Chen, D.C. Chan, C.L. Smith and R.J. Youle. 2004. "Quantitation of mitochondrial dynamics by photolabeling of individual organelles shows that mitochondrial fusion is blocked during the Bax activation phase of apoptosis". *J. Cell Biol.*, 164: 493–499.
- Kartalou M. and J.M. Essigmann. 2001. "Mechanisms of resistance to cisplatin". *Mutation Research*; 478: 23–43.
- Kartalou M. and Essigmann J.M. 2001. "Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins". *Mutat. Res.*, 478: 1–21.
- Kass G.E. and S. Orrenius. 1999. Calcium signaling and cytotoxicity". Review. *Environ Health Perspect.*; 107 Suppl 1: 25-35.
- Keller A., A. Mohamed, S. Dröse, U. Brandt, I. Fleming and R.P. Brandes. 2004. "Analysis of dichlorodihydrofluorescein and dihydrocalcein as probes for the detection of intracellular reactive oxygen species". *Free Radic. Res.*; 38(12): 1257-67.
- Kerr J.F.R., A.H. Wyllie and A.R. Currie. 1972. "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics". *Br J Cancer*; 26: 239-57.
- Ketterer B. 1986. "Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases". *Xenobiotica*, 16: 957-973.
- Kim I., S. Rodriguez-Enriquez and J.J. Lemasters. 2007. "Selective degradation of mitochondria by mitophagy". *Arch. Biochem. Biophys.*, 462: 245–253.
- Kim J.S., T. Qian and J.J. Lemasters. 2003. "Mitochondrial permeability transition in the switch from necrotic to apoptotic cell death in ischemic rat hepatocytes". *Gastroenterology*, 124(2): 494–503.

- Kissova I., M. Deffieu, S. Manon and N. Camougrand. 2004. "Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria". *J. Biol. Chem.*, 279: 39068–39074.
- Klevecz R.R., J. Bolen, G. Forrest and D.B. Murray. 2004. "A genomewide oscillation in transcription gates DNA replication and cell cycle". *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(5): 1200-5.
- Koopman G., C.P. Reutelingsperger, G.A. Kuijten, R.M. Keehnen, S.T. Pals and M.H. van Oers. 1994. "Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis". *Blood*; 84(5): 1415-20.
- Korshunov S.S., V.P. Skulachev and A.A. Starkov. 1997. "High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria". *FEBS Lett.*, 416: 15–18.
- Kosower N.S. and E.M. Kosower. 1978. "The glutathione status of the cells". *Int. Rev. Cytol.*, 54: 109-160.
- Kosower N.S. and E.M. Kosower. 1983. "Glutathione and cell membrane thiol status. Functions of glutathione". A. Larson, S. Orrenius, A. Holmgren and B. Mannervik. Nueva York, Editorial Raven.: 307-315.
- Krajewski S., S. Tanaka, S. Takayama, M.J. Schibler, W. Fenton and J.C. Reed. 1993. "Investigation of the subcellular distribution of the Bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes". *Cancer Res*, 53(19): 4701-14.
- Krendel M., Sgourdas G. and Bonder E.M. 1998. "Disassembly of actin filaments leads to increased rate and frequency of mitochondrial movement along microtubules". *Cell Motil Cytoskeleton*; 40: 368-378.
- Kroemer G. 1997. "The protooncogen bcl-2 and its role in regulating apoptosis". *Nat Med.*; 3: 614-620.
- Kroemer G. 2003. "Mitochondrial control of apoptosis: an introduction". *Biochem Biophys Res Commun.*; 304(3): 433-5.
- Kroemer G. and J.C. Reed. 2000. "Mitochondrial control of cell death". *Nat Med*, 6(5): 513-9.

Referencias bibliográficas

- Kroemer G., Dallaporta B., Resche-Rigon M. 1998. "The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis". *Annu Rev Physiol.*; 60: 619-642.
- Kroemer G., Galluzzi L. and Brenner C. 2007. "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death". *Physiol Rev.*; 87(1): 99-163.
- Kuwana T., M.R. Mackey, G. Perkins, M.H. Ellisman, M. Latterich, R. Schneider, D.R. Green and D.D. Newmeyer. 2002. "Bid, Bax and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane". *Cell*, 111(3): 331-42.
- Laberge R.M., J. Karwatsky, M.C. Lincoln, M.L. Leimanis and E. Georges. 2007. "Modulation of GSH levels in ABCC1 expressing tumor cells triggers apoptosis through oxidative stress". *Biochem Pharmacol*, 73(11): 1727-37.
- Lee H.C. and Wei Y.H. 2005. "Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress". *Int J Biochem Cell Biol.*; 37(4): 822-34.
- Lee M.A., R.C. Dunn, D.E. Clapham and L. Stehno-Bitte. 1998. "Calcium regulation of nuclear pore permeability. Review". *Cell Calcium*, 23(2/3): 91-101.
- Legros F., A. Lombes, P. Frachon and M. Rojo. 2002. "Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins". *Mol. Biol. Cell*, 13: 4343-4354.
- Leist M., B. Single, A.F. Castoldi, S. Kühnle and P. Nicotera. 1997. "Intracellular adenine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis". *J Exp Med.*; 185 (8): 1481-1486.
- Lemasters J.J., A.L. Nieminen, T. Qian, L.C. Trost, S.P. Elmore, Y. Nishimura, R.A. Crowe, W.E. Cascio, C.A. Bradham, D.A. Brenner and B. Herman. 1998. "The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy". Review. *Biochim. Biophys. Acta*, 1366 (1-2): 177-196.

- Lenaz G. 2001. "The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology". *Life.*; 52: 159-164.
- Lertratanangkoon K., N. Savaraj, J.M. Scimeca and M.L. Thomas. 1997. "Glutathione depletion-induced thymidylate insufficiency for DNA repair synthesis". *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 234(2):470-5.
- Li H., H. Zhu, C.J. Xu and J. Yuan. 1998. "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis". *Cell*, 94(4): 491-501.
- Li L.Y., X. Luo and X.Wang. 2001. "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria". *Nature*; 412 (6842): 95-99.
- Lieberman I., R. Abrams and P. Ove. 1963. "Changes in the metabolism of ribonucleic acid preceding the synthesis of deoxyribonucleic acid in mammalian cells cultured from the animal". *J Biol Chem*, 238: 2141-9.
- Linsdell P. and J.W. Hanrahan. 1998. "Glutathione permeability of CFTR". *Am J Physiol*, 275(1 Pt 1): C323-6.
- Liu T., W. Zhu, X. Yang, L. Chen, R. Yang, Z. Hua and G. Li. 2009. "Detection of Apoptosis Based on the Interaction between Annexin V and Phosphatidylserine". *Anal Chem*.
- Lockshin R.A. and J. Beaulaton. 1981. "Cell death: questions for histochemists concerning the causes of the various cytological changes". *Histochem J.*; 13(4): 659-666.
- Lockshin R.A. and Z. Zakeri. 2004. "Apoptosis, autophagy, and more. Review". *Int J Biochem Cell B.*; 36: 2405-2419.
- Loeffler M. and G. Kroemer. 2000. "The Mitochondrion in Cell Death Control: Certainties and Incognita. Minireview". *Experimental Cell Research*, 256, 19-26.
- Lowry O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and J. Randall. 1951. "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem*, 193: 265-275.
- Machida Y.J. and A. Dutta. 2005. "Cellular checkpoint mechanisms monitoring proper initiation of DNA replication". *J Biol Chem*, 280(8): 6253-6.

Referencias bibliográficas

- Machida Y.J., J.K. Teer and A. Dutta. 2005. "Acute reduction of an origin recognition complex (ORC) subunit in human cells reveals a requirement of ORC for Cdk2 activation". *J Biol Chem*, 280(30): 27624-30.
- MacLachlan T.K., N. Sang and A. Giordano. 1995. "Cyclins, cyclin-dependent kinases and cdk inhibitors: implications in cell cycle control and cancer". *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 5(2): 127-56.
- Malka F., O. Guillery, C. Cifuentes-Diaz, E. Guillou, P. Belenguer, A. Lombes and M. Rojo. 2005. "Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes". *EMBO Rep.*, 6: 853–859.
- Mancini M., D.W. Nicholson, S. Roy, N.A. Thornberry, E.P. Peterson, L.A. Casciola-Rosen and A.Rosen. 1998. "The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling". *J Cell Biol.*; 140(6): 1485-95.
- Martin L.P., T.C. Hamilton and R.J. Schilder. 2008. "Platinum Resistance: The Role of DNA Repair Pathways". *Clin Cancer Res*; 14(5): 1291-1295.
- Marin M.C., A. Fernandez, R.J. Bick, S. Brisbay, L.M. Buja, M. Snuggs, D.J. McConkey, A.C. von Eschenbach, M.J. Keating and T.J. McDonnell. 1996. "Apoptosis suppression by bcl-2 is correlated with the regulation of nuclear and cytosolic Ca²⁺". *Oncogene*; 12(11): 2259-66.
- Marklund L., B. Andersson, P. Behnam-Motlagh, P.E. Sandström, R. Henriksson, K. Grankvist. 2004. "Cellular potassium ion deprivation enhances apoptosis induced by cisplatin". *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*; 94(5): 245-51.
- Markossian K.A., A.A. Poghossian, N.A. Paitian and R.M. Nalbandyan. 1978. "Superoxide dismutase activity of cytochrome oxidase". *Biochem Biophys Res Commun.*, 81(4): 1336-1343.
- Markovic J., C. Borrás., A. Ortega, J. Sastre, J. Viña and F.V. Pallardó. 2007. "Glutathione is Recruited into the Nucleus in Early Phases of Cell Proliferation". *Journal Biological Chemistry*, 282(28): 20416–20424.

- Markovic J., N.J. Mora, A.M. Broseta, A. Gimeno, N. De La Concepción, J. Viña and F.V. Pallardó. "The depletion of nuclear glutathione impairs cell proliferation in 3T3 fibroblasts". PLoS ONE, in press.
- Martensson J., J.C. Lai and A. Meister. 1990. "High-affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function". Proc Natl Acad Sci USA, 87(18): 7185-9.
- Martinou J.C. and D.R. Green. 2001. "Breaking the mitochondrial barrier". Nat Rev Mol Cell Biol.; 2(1): 63-7.
- Mattenberger Y., D.I. James and J.C. Martinou. 2003. "Fusion of mitochondria in mammalian cells is dependent on the mitochondrial inner membrane potential and independent of microtubules or actin". FEBS Lett., 538: 53–59.
- McBride H.M., Neuspiel M. and Wasiak S. 2006. "Mitochondria: more than just a powerhouse". Curr Biol.; 16(14): R551-60.
- McCord J.M. and I. Fridovich. 1969. "Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemocyanin". Journal of Biological Chemistry, 244: 6049-6055.
- McCord J.M., B.B. Keele Jr. and I. Fridovich. 1971. "An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 68: 1024-1027.
- McKernan T.B., E.B. Woods and L.H. Lash. 1991. "Uptake of glutathione by renal cortical mitochondria". Arch Biochem Biophys, 288(2): 653-63.
- Meeusen S., R. DeVay, J. Block, A. Cassidy-Stone, S. Wayson, J.M. McCaffery and J. Nunnari. 2006. "Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1". Cell, 127: 383–395.
- Meeusen S.L. and J. Nunnari. 2005. "How mitochondria fuse". Curr. Opin. Cell Biol., 17: 389–394.
- Meister A. and M.E. Anderson. 1983. "Glutathione". Annu Rev Biochem.; 52: 711-760.

Referencias bibliográficas

- Mendelsohn M.L. 1962. "Autoradiographic analysis of cell proliferation in spontaneous breast cancer of C3H mouse. III. The growth fraction". *J Natl Cancer Inst*, 28: 1015-29.
- Menon S.G. and P.C. Goswami. 2007. "A redox cycle within the cell cycle: ring in the old with the new". *Oncogene*, 26(8): 1101-9.
- Menon S.G., E.H. Sarsour, D.R. Spitz, R. Higashikubo, M. Sturm, H. Zhang and P.C. Goswami. 2003. "Redox regulation of the G1 to S phase transition in the mouse embryo fibroblast cell cycle". *Cancer Res*, 63(9): 2109-17.
- Mese H, Sasaki A, Nakayama S, Alcalde RE and Matsumura T. 2000. "The role of caspase family protease, caspase-3 on cisplatin-induced apoptosis in cisplatin-resistant A431 cell line". *Cancer Chemother Pharmacol.*; 46(3): 241-5.
- Miñana J.B., L. Gomez-Cambronero, A. Lloret, F.V. Pallardó, J. Del Olmo, A. Escudero, J.M. Rodrigo, A. Pellín, J.R. Viña, J. Viña and J. Sastre. 2002. "Mitochondrial oxidative stress and CD95 ligand: a dual mechanism for hepatocyte apoptosis in chronic alcoholism". *Hepatology*, 35(5): 1205-14.
- Mitchison J.M. 1971. "The Biology of the Cell Cycle". Cambridge UK: Cambridge Univ. Press. 313pp.
- Molinari M. 2000. "Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer". *Cell Prolif*, 33: 261-274.
- Morales A., M. Miranda, A. Sánchez-Reyes, A. Biete and J.C. Fernández-Checa. 1998. "Oxidative damage of mitochondrial and nuclear DNA induced by ionizing radiation in human hepatoblastoma cells". *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 42(1): 191-203.
- Morgan D.O. 2007. "The Cell Cycle. Principles of Control". London: New Science Press. 297pp.
- Mullins J.M. 1994. "Overview of fluorophores". *Methods Mol. Biol.*, 34: 107:16.
- Mullins J.M. 1999. "Overview of fluorochromes". *Methods Mol. Biol.*, 115: 97-105.

- Navarro A. and A. Boveris. 2007. "The mitochondrial energy transduction system and the aging process". *Am J Physiol Cell Physiol.*, 292(2): C670–C686.
- Newmeyer D.D. and S. Ferguson-Miller. 2003. "Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death". *Cell*, 112: 481-490.
- Nkabyo Y.S., T.R. Ziegler, L.H. Gu, W.H. Watson, D.P. Jones. 2002. "Glutathione and thioredoxin redox during differentiation in human colon epithelial (Caco-2) cells". *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 283(6): G1352-9.
- Nurse P. 2000. "A long twentieth century of the cell cycle and beyond". *Cell* 100, 71–78.
- Oberley L.W., T.D. Oberley and G.R. Buettner. 1981. "Cell division in normal and transformed cells: the possible role of superoxide and hydrogen peroxide". *Med Hypotheses*, 7(1): 21-42.
- O'Brien V and R. Brown. 2006. "Signalling cell cycle arrest and cell death through the MMR System". *Review. Carcinogenesis*; 27(4): 682-92.
- Ochoa S. 1983. "Regulation of protein synthesis initiation in eukaryotes". *Arch. Biochem. Biophys.*; 223: 325-349.
- Ohmichi M., J. Hayakawa, K. Tasaka, H. Kurachi and Y. Murata. 2005. "Mechanisms of platinum drug resistance". *TRENDS in Pharmacological Sciences*; 26(3): 113-116.
- Orrenius S. and P. Moldeus. 1984. "The multiple roles of glutathione in drug metabolism". *Trends. Pharmacol. Sci.*; 5: 432-435.
- Orrenius S., V. Gogvadze, and B. Zhivotovsky. 2007. "Mitochondrial Oxidative Stress: Implications for Cell Death". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 47: 143–83.
- Pajares M.A., C. Durán, F. Corrales, M.M. Pliego and J.M. Mato. 1992. "Modulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase activity by glutathione". *J. Biol. Chem.*; 267(25): 17598-17605.

Referencias bibliográficas

- Pajares M.A., F. Corrales, C. Durán, J.M. Mato and L. Alvarez. 1992. "How is rat liver S-adenosylmethionine synthetase regulated?". *FEBS Letters.*; 309(1): 1-4.
- Pallardó F.V., J. Markovic, J.L. García and J. Viña. 2009. "Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation". *Mol Aspects Med.*; 30(1-2): 77-85.
- Pandey P., A. Saleh, A. Nakazawa, S. Kumar, S.M. Srinivasula, V. Kumar, R. Weichselbaum, C. Nalin, E.S. Alnemri, D. Kufe and S. Kharbanda. 2000. "Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90". *Embo J.*; 19(16): 4310-22.
- Pani G. R. Colavitti, B. Bedogni, R. Anzevino, S. Borrello and T. Galeotti. 2000. "A redox signaling mechanism for density-dependent inhibition of cell growth". *J Biol Chem*, 275(49): 38891-9.
- Papa S., F. Guerrieri and N. Capitano. 1997. "A possible role of slips in cytochrome c oxidase in the antioxygen defense system of the cell". *Bioscience Reports.*; 17(1): 23-31.
- Pardee A.B. 1974. "A restriction point for control of normal animal cell proliferation". *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 71: 1286–1290.
- Park M.K., M.C. Ashby, G. Erdemli, O.H. Petersen and A.V. Tepikin. 2001. "Perinuclear, perigranular and sub-plasmalemmal mitochondria have distinct functions in the regulation of cellular calcium transport". *EMBO J.*, 20 (8): 1863–74.
- Partikian A., B. Olveczky, R. Swaminathan, Y. Li and A.S. Verkman. 1998. "Rapid diffusion of green fluorescent protein in the mitochondrial matrix". *J. Cell Biol.*, 140: 821–829.
- Patterson S.D., C.S. Spahr, E. Daugas, S.A. Susin, T. Irinopoulou, C. Koehler and G. Kroemer. 2000. "Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition". *Cell Death Differ.*; 7(2): 137-44.

- Penaloza C., L Lin, R.A. Lockshin and Z.Zakeri 2006. "Cell death in development: shaping the embryo". *Histochem Cell Biol.*; 126: 149–158.
- Petros A.M., E.T. Olejniczak and S.W. Fesik. 2004. "Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. Review". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1644: 83– 94.
- Philpot R.M. 1991. "Characterization of cytochrome P450 in extrahepatic tissues." *Methods. Enzymol.*; 206: 623-631.
- Pineda-Molina E., P. Klatt, J. Vázquez, A. Marina, M. García de Lacoba, D. Pérez-Sala and S. Lamas. 2001. "Glutathionylation of the p50 subunit of NF-kappaB: a mechanism for redox-induced inhibition of DNA binding". *Biochemistry*, 40(47): 14134-42.
- Pinkus R., L.M. Weiner and V. Daniel. 1996. "Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF-kappaB, and glutathione S-transferase gene expression". *J Biol Chem.*; 271(23): 13422-9.
- Pletjushkina O.Y., K.G. Lyamzaev, E.N. Popova, O.K. Nepryakhina, O.Y. Ivanova, L.V. Domnina, B.V. Chernyak and V.P. Skulachev. 2006. "Effect of oxidative stress on dynamics of mitochondrial reticulum". *Biochim. Biophys. Acta*, 1757: 518–524.
- Poot M., T.J. Kavanagh, H.C. Kang, R.P. Haugland and P.S. Rabinovitch. 1991. "Flow cytometric analysis of cell cycle-dependent changes in cell thiol level by combining a new laser dye with Hoechst 33342". *Cytometry*; 12(2): 184-7.
- Post G.B., D.A. Keller, K.A. Connor, D.B.Menzel. 1983. "Effects of culture conditions on glutathione content in A549 cells". *Biochem Biophys Res Commun*, 114(2): 737-42.
- Poyton R.O. and McEwen J.E. 1996. "Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes". *Annu Rev Biochem.*; 65: 563-607.
- Pozzan T. and R. Rizzuto. 2000. "The renaissance of mitochondrial calcium transport". *Minireview. Eur. J. Biochem.*; 267: 5269-5273.
- Priault M., B. Salin, J. Schaeffer, F.M. Vallette, J.P. di Rago and J.C. Martinou. 2005. "Impairing the bioenergetic status and the biogenesis

Referencias bibliográficas

- of mitochondria triggers mitophagy in yeast". *Cell Death Differ.*, 12: 1613–1621.
- Proskuryakov S.Y., Konoplyannikov A.G. and Gabai V.L. 2003. "Necrosis: a specific form of programmed cell death? Review". *Experimental Cell Research* 283: 1–16.
- Puthalakath H. and A. Strasser. 2002. "Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins". *Cell Death Differ.*; 9(5): 505-12.
- Rabik C.A. and Dolan M.E. 2007. "Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents". *Cancer Treat Rev.*; 33(1): 9–23.
- Ravagnan L., T. Roumier and G. Kroemer. 2002. "Mitochondria, the killer organelles and their weapons". *J Cell Physiol.*; 192(2): 131-7.
- Reed D.J. 1990. "Glutathione: Toxicological implications". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*; 30: 603-631.
- Reed D.J., J.R. Babson, P.W. Beatty, A.E. Brodie, W.W. Ellis and D.W. Potter. 1980. "High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides". *Anal Biochem*, 106(1): 55-62.
- Reed J.C. 1997. "Double identity for proteins of the Bcl-2 family". *Nature*, 387: 773-776.
- Reich C.F. 3rd and D.S. Pisetsky. 2009. "The content of DNA and RNA in microparticles released by Jurkat and HL-60 cells undergoing in vitro apoptosis". *Exp Cell Res.*, 10; 315(5): 760-8.
- Reynaert, N.L., A. van der Vliet, A.S. Guala, T. McGovern, M. Hristova, C. Pantano, N.H. Heintz, J. Heim, Y.S. Ho, D.E. Matthews, E.F. Wouters and Y.M. Janssen-Heininger. 2006. "Dynamic redox control of NF-kappaB through glutaredoxin-regulated S-glutathionylation of inhibitory kappaB kinase beta". *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(35): 13086-91.
- Richman P. and A. Meister. 1975. "Regulation of g-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feed back inhibition by glutathione". *J. Biol. Chem.* 250: 1422-1426.

- Rickwood D., M.T. Wilson and V.M. Darley-Usmar. 1987. "Isolation and characteristics of intact mitochondria. Mitochondria: a practical approach". V.M. Darley-Usmar, D. Rickwood and M.T. Wilson. Oxford, I.R.L. Press Limited: 1-16.
- Rieseberg M., C. Kasper, K.F. Reardon and T. Scheper. 2001. "Flow cytometry in biotechnology". *Appl Microbiol Biotechnol.*; 56(3-4): 350-60.
- Rizzuto R., P. Pinton, W. Carrington, F.S. Fay, K.E. Fogarty, L.M. Lifshitz, R.A. Tuft and T. Pozzan. 1998. "Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses". *Science.*; 280(5370): 1763-6.
- Ronneberger O., D. Baddeley, F. Scheipl, P.J. Verveer, H. Burkhardt, C. Cremer, L. Fahrmeir, T. Cremer and B. Joffe. 2008. "Spatial quantitative analysis of fluorescently labeled nuclear structures: Problems, methods, pitfalls". *Chromosome Research*, 16: 523–562.
- Roy N., Q.L. Deveraux, R. Takahashi, G.S. Salvesen and J.C. Reed. 1997. "The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases". *Embo J.*, 16(23): 6914-25.
- Ryan M.T. and M.J. Hoogenraad. 2007. "Mitochondrial-Nuclear Communications". *Annu. Rev. Biochem.*, 76: 701–22.
- Saitoh Y., R. Ouchida, A. Kayasuga and N. Miwa. 2003. "Anti-Apoptotic Defense of bcl-2 Gene Against Hydroperoxide-Induced Cytotoxicity Together With Suppressed Lipid Peroxidation, Enhanced Ascorbate Uptake, and Upregulated Bcl-2 Protein". *Journal of Cellular Biochemistry*; 89: 321–334.
- Saleh A., S.M. Srinivasula, L. Balkir, P.D. Robbins and E.S. Alnemri. 2000. "Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70". *Nat Cell Biol.*; 2(8): 476-83.
- Saleh A., S.M. Srinivasula, S. Acharya, R. Fishel and E.S. Alnemri. 1999. "Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation". *J Biol Chem.*, 274(25): 17941-5.

Referencias bibliográficas

- Sánchez-Góngora E., J.G. Pastorino, L. Alvarez, M.A. Pajares, C. García, J.R. Viña, J.M. Mato and J.L. Farber. 1996. "Increased sensitivity to oxidative injury in chinese hamster ovary cells stably transfected with rat liver S-adenosylmethionine synthetase cDNA". *Biochem. J.*; 319 (Pt 3): 767-73.
- Sastre J., F.V. Pallardó and J. Viña. 1996. "Glutathione, oxidative stress and aging". *Age*, 19: 129-139.
- Saugstad O.D. 1990. "Oxygen toxicity in the neonatal period". *Acta Paediatr. Scand.*, 79(10): 881-892.
- Savill J., I. Dransfield N. Hogg and C. Haslett. 1990. "Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis". *Nature*, 343(6254): 170-3.
- Savill J., N. Hogg and C. Haslett. 1991. "Macrophage vitronectin receptor, CD36 and thrombospondin cooperate in recognition of neutrophils undergoing programmed cell death." *Chest.*, 99(3 Suppl): 6S-7S.
- Scaffidi C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K.J. Tomaselli, K.M. Debatin, P.H. Kramer and M.E. Peter. 1998. "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways". *Embo J.*, 17(6): 1675-87.
- Schafer F.Q. and G.R. Buettner 2001. "Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple". *Free Radic Biol Med*, 30(11): 1191-212.
- Schendel S.L., R. Azimov, K. Pawlowski, A. Godzik, B.L. Kagan and J.C. Reed. 1999. "Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, BID". *J Biol Chem.*; 274(31): 21932-6.
- Schmitz I., S. Kirchhoff, P.H. Kramer. 2000. "Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways". *Int J Biochem Cell Biol.*, 32(11-12): 1123-36.
- Schultz D.R. and W.J. Harrington Jr. 2003. "Apoptosis: Programmed Cell Death at a Molecular Level". *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 32 (6): 345-369.

- Schwarz M., M.A. Andrade-Navarro and A. Gross. 2007. "Mitochondrial carriers and pores: Key regulators of the mitochondrial apoptotic program?". *Apoptosis*, 12: 869–876.
- Scorrano L. and S.J. Korsmeyer. 2003. "Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304: 437–444.
- Shapiro H.M. 2000. "Membrane Potential Estimation by Flow Cytometry". *Methods*, 21: 271-279.
- Shapiro H.M., P.J. Natale and L.A. Kamentsky. 1979. "Estimation of membrane potentials of individual lymphocytes by flow cytometry (cyanine dyes/ionophores/lectins/ligand-receptor interactions)". *Proc. Nati. Acad. Sci. USA.*, 76 (11): pp. 5728-5730.
- Shaw J.M. and J. Nunnari. 2002. "Mitochondrial dynamics and division in budding yeast". *Trends Cell Biol.*, 12: 178–184.
- Sheridan J.W., C.J. Bishop and R.J. Simmons. 1981. "Biophysical and morphological correlates of kinetic change and death in a starved human melanoma cell line". *J Cell Sci.*, 49: 119-37.
- Shibutani S., M. Takeshita and A.P. Grollman. 1992. "Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG". *Nature*, 349(6308): 431-434.
- Shigenaga M. K., T. M. Hagen, B.N. Ames. 1994. "Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. Review". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91(23): 10771-10778.
- Sies H. 1986. "Biochemistry of oxidative stress". *Angewandte Chem.*; 25: 1058-1071.
- Sies H. 1999. "Glutathione and its role in cellular functions". *Free Radic Biol Med*, 27(9-10): 916-21.
- Sies H., G. M. Bartoli, R.F. Burk and C. Waydhas. 1978. "Glutathione efflux from perfused rat liver after phenobarbital treatment, during drug oxidations and in selenium deficiency". *Eur. J. Biochem.*, 89 (1): 113-118.

Referencias bibliográficas

- Silveira L.R., L. Pereira-Da-Silva, C. Juel and Y. Hellsten. 2003. "Formation of hydrogen peroxide and nitric oxide in rat skeletal muscle cells during contractions". *Free Radic. Biol. Med.*; 35(5): 455-64.
- Simic M.G. and K.A. Taylor. 1988. "Introduction to peroxidation and antioxidation mechanisms". *Oxygen radicals in biology and medicine*. M.G. Simic, K.A. Taylor, J.F. Ward and C. Sonntag, Ed. Plenum Press.
- Skulachev V.P. 1996. "Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants". *Quat. Rev. Biophys.*; 29(2): 169-202.
- Skulachev V.P. 1999. "Mitochondrial physiology and pathology, concepts of programmed death of organelles, cells and organisms". *Mol. Aspects Med.*; 20: 139-184.
- Skulachev V.P., L.E. Bakeeva, B.V. Chernyak, L.V. Domnina, A.A. Minin, O.Y. Pletjushkina, V.B. Saprunova, I.V. Skulachev, V.G. Tsyplenkova, J.M. Vasiliev, L.S. Yaguzhinsky and D.B. Zorov. 2004. "Thread-grain transition of mitochondrial reticulum as a step of mitoptosis and apoptosis". *Mol. Cell. Biochem.*; 256-257: 341-358.
- Slater A.F., Stefan C., Nobel I., van den Dobbelaar D.J. and Orrenius S. 1995. "Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis". *Toxicol Lett.*; 82-83: 149-53.
- Sluder G., E.H. Hinchcliffe and Rieder C.L. 1999. "Mitosis: The culmination of the cell cycle. The Molecular Basis of Cell Cycle and Growth Control. Ed. G.S. Stein, R. Baserga, A. Giordano, and D. T. Denhardt. Wiley-Liss, Inc.
- Smali S.S., Y.T. Hsu, R.J. Youle and J.T. Russell. 2000. "Mitochondria in Ca²⁺ signaling and apoptosis". Review. *J Bioenerg Biomembr.*; 32(1): 35-46.
- Smirnova E., L. Griparic, D.L. Shurland and A.M. van der Bliek. 2001. "Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells". *Mol. Biol. Cell*, 12: 2245-2256.

- Smith C.V., D.P. Jones, T.M. Guenther, L.H. Lash and B.H. Lauterburg. 1996. "Compartmentalization of glutathione: implications for the study of toxicity and disease". *Reviw. Toxicol Appl Pharmacol*, 140(1): 1-12.
- Söderdahl T., M. Enoksson, M. Lundberg, A. Holmgren, O.P. Ottersen, S. Orrenius, G. Bolcsfoldi and I.A. Cotgreave. 2003. "Visualization of the compartmentalization of glutathione and protein-glutathione mixed disulfides in cultured cells". *FASEB J.* 17 (1) , 124-126.
- Stadtman E.R. 1992. "Protein oxidation and aging. Review". *Science*; 257(5074): 1220-1224.
- Stillman, B. 1996. "Cell cycle control of DNA replication". *Science*, 274(5293): 1659-64.
- Stordal B and M. Davey. 2007. "Understanding cisplatin resistance using cellular models". *Review. IUBMB Life.*; 59(11): 696-9.
- Sun Y. and L.W. Oberley. 1996. "Redox regulation of transcriptional activators". *Free Radic Biol Med*, 21(3): 335-48.
- Suzuki H., Kumagai T., Goto A. and Sugiura T. 1998. "Increase in intracellular hydrogen peroxide and upregulation of a nuclear respiratory gene evoked by impairment of mitochondrial electron transfer in human cells". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 249: 542-545.
- Szilágyi G., L. Simona, P. Koska, G. Telek and Z. Nagy. 2006. "Visualization of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species via double staining". *Neuroscience Letters*, 399: 206-209.
- Takahashi A., P. Camacho, J.D. Lechleiter and B. Herman. 1999. "Measurement of Intracellular Calcium". *Physiol. Rev.*, 79: 1089-112.
- Tang H.L., Le A.H. and Lung H.L. 2006. "The increase in mitochondrial association with actin precedes Bax translocation in apoptosis". *Biochemical J*; 396(1): 1-5.
- Tarpey M.M., D.A. Wink and M.B. Grisham. 2004. "Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* considerations". *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 286: R431-R444.

Referencias bibliográficas

- Tateishi N., H. Shiozaki, A. Naruse, K. Nakashima and H. Shiozaki. 1977. "Rat liver glutathione: Possible role as reservoir of cysteine". J. Nutr.; 107(1): 51-58.
- Tateishi N., T. Higashi, S. Shinya, A. Naruse and Y. Sakamoto. 1974. "Studies on the regulation of glutathione level in rat liver". J Biochem, 75(1): 93-103.
- Tchou J. and A.P. Grollman. 1993. "Repair of DNA containig the oxidatively damaged base 8-oxoguanine". Mutat. Res.; 299(3-4): 277-287.
- Telford W.G., L.E. King and P.J. Fraker. 1992. "Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry". Cytometry, 13: 137-143.
- Terrádez P., M. Asensi, M.C. Lasso de la Vega, I.R. Puertes, J. Viña and J.M..Estrela. 1993. "Depletion of tumor glutathione *in vivo* by buthionine sulphoximine: Modulation by the rate of cellular proliferation and inhibition of cancer growth". Biochem. J.; 292(Pt2): 477-483.
- Tessema M., U. Lehmann and H. Kreipe. 2004. "Cell cycle and no end". Review article. Virchows Arch., 444: 313–323.
- Thelander L. and Reichard P. 1979. "Reduction of ribonucleotides" Annu. Rev. Biochem. 48, 133-158.
- Thompson C.B. 1995. "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease". Science, 267:1456-1462.
- Trump B.F. and R.E. Bulger 1967. "Studies of cellular injury in isolated flounder tubules. I. Correlation between morphology and function of control tubules and observations of autophagocytosis and mechanical cell damage". Lab Invest .; 16(3): 453-82.
- Trump B.F., I.K. Berezsky, T. Sato, K.U. Laiho, P.C. Phelps and N. DeClaris. 1984. "Cell calcium, cell injury and cell death". Environ Health Perspect.; 57: 281-7.
- Twig G., A. Elorza, A.J. Molina, H. Mohamed, J.D. Wikstrom, G.Walzer, L. Stiles, S.E. Haigh, S. Katz, G. Las, J. Alroy, M. Wu, B.F. Py, J. Yuan, J.T. Deeney, B.E. Corkey and O.S. Shirihai. 2008. "Fission and

- selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy". *EMBO J.*; 27: 433–446.
- Twig G., B. Hyde and O.S. Shirihai. 2008. "Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: The bioenergetic view". Review. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1777: 1092–1097.
- Twig G., S.A. Graf, J.D. Wikstrom, H. Mohamed, S.E. Haigh, A. Elorza, M. Deutsch, N. Zurgil, N. Reynolds and O.S. Shirihai. 2006. "Tagging and tracking individual networks within a complex mitochondrial web with photoactivatable GFP". *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 291: C176–C184.
- Tyson J.J. and B. Novak. 2008. "Temporal Organization of the Cell Cycle". Review. *Current Biology*, 18: R759–R768.
- Van Caneghem P. 1972. "Influence of substances with thiol functions and of their reagents on the fragility of lysosomes". *Biochem. Pharmacol.*; 21: 2417.
- van Delft M.F. and D.C.S. Huang. 2006. "How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. Review". *Cell Research*, 16: 203-213.
- van Engeland M., L.J. Nieland, F.C. Ramaekers, B. Schutte and C.P. Reutelingsperger. 1998. "Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure". *Cytometry*, 1; 31(1): 1-9.
- Van Gurp M., N. Festjens, G. van Loo, X. Saelens and P. Vandenabeele. 2003. "Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. Review". *Biochem Biophys Res Commun.*, 304(3): 487-97.
- Vance P.G., B.B. Keele Jr. and K.V.Rajagopalan. 1972. "Superoxide dismutase from *Streptococcus mutans*. Isolation and characterization of two forms of the enzyme". *Journal of Biological Chemistry*; 247(15): 4782-4786.
- Verhagen A.M., P.G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L.M. Connolly, G.E. Reid, R.L. Moritz, R.J. Simpson and D.L. Vaux. 2000. "Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins". *Cell*, 102(1): 43-53.

Referencias bibliográficas

- Vermes I., C. Haanen and C. Reutelingsperger. 2000. "Flow cytometry of apoptotic cell death". *J Immunol Methods.*; 243(1-2): 167-90.
- Viña J. (ed). 1990. "Glutathione: Metabolism and Physiological Function". CRC Press, Boston.
- Viña J., E. Gascó, et al. 1990. "Effect of physiological changes in cystathionase activity on aminoacid and glutathione metabolism in rat fetus. Endocrine and biochemical development of the fetus and neonate". J. M. Cuezva and A. M. Pascual-Leone. Nueva York., Editorial Plenum Press: 283-286.
- Viña J., F.J. Romero, G.T. Saez and F.V. Pallardó. 1983. "Effects of cysteine and N-acetyl cysteine on GSH content of brain of adult rats". *Experientia*; 39(2): 164-5.
- Viña J., G.T. Saez, D. Wiggins, A.F. Roberts, R. Hems and H.A. Krebs. 1983. "The effect of cysteine oxidation on isolated hepatocytes". *Biochem J*, 212(1): 39-44.
- Viña J., R. Hems and H.A. Krebs. 1978. "Maintenance of glutathione content is isolated hepatocytes". *Biochem J*, 170(3): 627-30.
- Viña J.R., M. Palacín, I.R. Puertes, R. Hernandez and J. Viña. 1989. "Role of the gamma-glutamyl cycle in the regulation of amino acid translocation". *Am. J. Physiol.*; 257 (6Pt1): E916-E922.
- Voehringer D.W., D.J. McConkey, T.J. McDonnell, S. Brisbay and R.E. Meyn. 1998. "Bcl-2 expression causes redistribution of glutathione to the nucleus". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 95(6): 2956-60.
- Wajant H. 2002. "The Fas signaling pathway: more than a paradigm". *Science*, 296(5573): 1635-6.
- Walker N.I., B.V. Harmon, et al. 1988. "Patterns of cell death". *Methods Achiev Exp Pathol.*; 13: 18-54.
- Wang T., L. Qin, B. Liu, Y. Liu, B. Wilson, T.E. Eling, R. Langenbach, S. Taniura and J.S. Hong. 2004. "Role of reactive oxygen species in LPS-induced production of prostaglandin E2 in microglia". *J. Neurochem.*; 88(4): 939-47.

- Wang D. and S.J. Lippard. 2005. "Cellular processing of platinum anticancer drugs". Review. *Nat Rev Drug Discov.*; 4(4): 307-20.
- Wang D., R. Hara, G. Singh, A. Sancar and S.J. Lippard. 2003. "Nucleotide excision repair from site-specifically platinum modified nucleosomes". *Biochemistry*; 42: 6747–6753.
- Wei M.C., T. Lindsten, V.K. Mootha, S. Weiler, A. Gross, M. Ashiya, C.B. Thompson and S.J. Korsmeyer. 2000. "tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c". *Genes Dev.*, 14(16): 2060-71.
- Weisger R.A. and I. Fridovich 1973. "Superoxide dismutase: organella specificity". *Journal of Biological Chemistry*, 248: 3582-3591.
- Westermann B. 2002. "Merging mitochondria matters: cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion". *EMBO Rep.*, 3: 527–531.
- Wolf C.R., A.D. Lewis, J. Carmichael, D.J. Adams, S.G. Allan, D.J. Ansell. 1987. "The role of glutathione in determining the response of normal and tumor cells to anticancer drugs". *Biochem Soc Trans*, 15(4): 728-30.
- Wong W.W.L. and H. Puthalakath 2008. "Bcl-2 Family Proteins: The Sentinels of the Mitochondrial Apoptosis Pathway". Review. *IUBMB Life*, 60(6): 390–397.
- Wyllie A.H., J.F. Kerr and A.R. Currie. 1980. "Cell death: the significance of apoptosis". *Int Rev Cytol.*; 68: 251-306.
- Yan N. and Shi Y. 2005. "Mechanisms of Apoptosis Through Structural Biology". *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21: 35–56.
- Yang M., Nazat N.B., Jiang X, Kelsey S.M., Blake D.R., Newland A.C. and Morris C.J. 1996. "Adriamycin stimulates proliferation of human lymphoblastic leukaemic cells via a mechanism of hydrogen peroxide (H₂O₂) production". *Brit. J. Haematol.*, 95 (2): 339- 344.
- Yang Z., L.M. Schumaker, M.J. Egorin, E.G. Zuhowski, Z. Guo and K.J. Cullen. 2006. "Cisplatin Preferentially Binds Mitochondrial DNA and Voltage-Dependent Anion Channel Protein in the Mitochondrial

Referencias bibliográficas

- Membrane of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Possible Role in Apoptosis". *Clin Cancer Res*; 12(19): 5817-5825.
- Yang Z., P.J. Faustino, P.A. Andrews, R. Monastra, A.A. Rasmussen, C.D. Ellison and K.J. Cullen. 2000. "Decreased cisplatin/DNA adduct formation is associated with cisplatin resistance in human head and neck cancer cell lines". *Cancer Chemother Pharmacol.*; 46(4): 255-62.
- Yin X.M., Y. Luo, G. Cao, L. Bai, W. Pei, D.K. Kuharsky and J. Chen. 2002. "Bid-mediated mitochondrial pathway is critical to ischemic neuronal apoptosis and focal cerebral ischemia". *J Biol Chem.*; 277(44): 42074-81.
- Yost F.J. and I. Fridovich 1973. "An iron containing Superoxide dismutase from *E. coli*". *Journal of Biological Chemistry*; 248: 2905-2908.
- Zamzami N. and G. Kroemer. 2001. "The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens". *Nat Rev Mol Cell Biol.*; 2(1): 67-71.
- Zamzami N., P. M. Castedo, D. Decaudin, A. Macho, . Hirsch, S.A. Susin, P.X. Petit, B. Mignotte and G. Kroemer. 1995. "Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive reactive oxygen species in early programmed cell death". *J Exp Med.*, 182: 367-377.
- Zanna C., A. Ghelli, A.M. Porcelli, M. Karbowski, R.J. Youle, S. Schimpf, B. Wissinger, M. Pinti, A. Cossarizza, S. Vidoni, M.L. Valentino, M. Rugolo and V. Carelli. 2008. "OPA1 mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion". *Brain*, 131: 352–367.
- Zha J., H. Harada, E. Yang, J. Jockel and S.J. Korsmeyer. 1996. "Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L)". *Cell*, 87(4): 619-28.
- Ziegler D.M. 1985. "Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation". *Annu Rev Biochem*, 54: 305-29.
- Zimmermann A.K., F.A. Loucks, E.K. Schroeder, R.J. Bouchard, K.L. Tyler and D.A. Linseman. 2007. "Glutathione binding to the Bcl-2 homology-

- 3 domain groove: a molecular basis for Bcl-2 antioxidant function at mitochondria". *J Biol Chem.*; 282(40): 29296-304.
- Zimmermann K.C., C. Bonzon and D.R.Green. 2001. "The machinery of programmed cell death". Review. *Pharmacol Ther.*; 92(1): 57-70.
- Zong W.X and C.B. Thompson. 2006. "Necrotic death as a cell fate". *Genes Dev.*; 20: 1-15.
- Zorzano A., D. Bach, S. Pich y M. Palacín. 2004. "Papel de nuevas proteínas mitocondriales en el balance energético". Artículo de revisión. *Rev. Med. Univ. Navarra*, 48(2): 30-35.
- Zou H., Y. Li, X. Liu and X. Wang. 1999. "An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9". *J Biol Chem.*, 274(17): 11549-56.