



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



ciberehd
Centro de Investigación Biomédica en Red
Enfermedades Hepáticas y Digestivas



**INSTITUTO MAIMÓNIDES DE INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DE CÓRDOBA**

Departamento de Medicina

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**REGULACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA CELULAR
POR SOBREEXPRESIÓN DE NOS3 EN LA LÍNEA DE
HEPATOMA HEPG2**

Clara Isabel Linares Luna

Córdoba, 2017

TITULO: *Regulación de la supervivencia celular por sobreexpresión de NOS3 en la línea de hepatoma HepG2*

AUTOR: *Clara Isabel Linares Luna*

© Edita: UCOPress. 2017
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

**REGULACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA
CELULAR POR SOBREENPRESIÓN DE NOS3 EN
LA LÍNEA DE HEPATOMA HEPG2**

Memoria presentada por

Clara Isabel Linares Luna

Licenciada en Biología, para optar al grado de

Doctor en Biología

Tesis doctoral realizada bajo la dirección de los Drs. Manuel de la
Mata García, Gustavo Ferrín Sánchez y Jordi Muntané Relat en el
Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba
(IMIBIC).

Programa de Doctorado de Biomedicina

La doctoranda

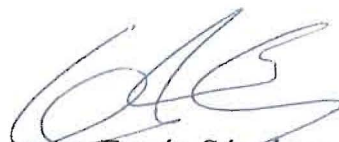


Clara Isabel Linares Luna

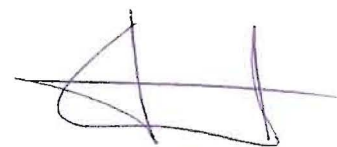
Directores



Manuel de la Mata García



Gustavo Ferrín Sánchez



Jordi Muntané Relat



TÍTULO DE LA TESIS: “Regulación de la supervivencia celular por la sobreexpresión de NOS3 en la línea de hepatoma HepG2”

DOCTORANDO/A: Clara Isabel Linares Luna

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

El trabajo de investigación que se presenta es un trabajo original que ha permitido avanzar en el conocimiento del mecanismo intracelular a través del cual la sobreexpresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (NOS3) se relaciona con la muerte celular en la línea celular de hepatocarcinoma humano HepG2. Además, se investiga la susceptibilidad a la muerte celular inducida por sobreexpresión de NOS3.

Los resultados obtenidos han sido publicados en las revistas *BBA Molecular Cell Research* y *Antioxidants & Redox Signaling*, de reconocido prestigio internacional, y tienen un evidente carácter traslacional. Así, la sobreexpresión de NOS3 ha sido propuesta como terapia génica antitumoral.

Asimismo, cabe destacar la formación técnica y científica alcanzada por la doctoranda. El desarrollo de la tesis ha permitido adquirir conocimientos teóricos y metodológicos que la habilitan para desarrollar nuevas hipótesis y participar activamente en la redacción y coordinación de nuevos artículos científicos y proyectos de investigación.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Cordoba, a 26 de Junio de 2017.

Firma de/del los director/es:

Manuel de la Mata García

Gustavo Ferrín Sánchez

Jordi Muntané Relat

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	- 5 -
ÍNDICE DE FIGURAS	- 9 -
ÍNDICE DE TABLAS	- 10 -
1. RESÚMEN/SUMMARY.....	- 11 -
2. INTRODUCCIÓN	- 17 -
2.1. El hígado.....	- 19 -
2.1.1. Anatomía y circulación sanguínea en el hígado	- 19 -
2.1.2. Histología hepática	- 21 -
2.1.2.a. Estructuras hepáticas	- 21 -
2.1.2.b. Tipos celulares hepáticos.....	- 22 -
2.1.3. Funciones del hígado	- 24 -
2.2. Hepatocarcinoma.....	- 27 -
2.3. La mitocondria.....	- 29 -
2.3.1. Estructura de la mitocondria.....	- 30 -
2.3.2. Genoma mitocondrial	- 31 -
2.3.3. Función mitocondrial.....	- 32 -
2.3.3.a. Bioenergética mitocondrial.....	- 32 -
2.3.3.b. Sistema de fosforilación oxidativa	- 33 -
2.3.3.b.1. Complejo I	- 35 -
2.3.3.b.2. Complejo II	- 36 -
2.3.3.b.3. Complejo III	- 36 -
2.3.3.b.4. Complejo IV	- 36 -
2.3.3.b.5. Complejo V	- 37 -
2.3.3.c. Generación fisiológica de especies reactivas de oxígeno.....	- 37 -
2.3.4. Mitocondria y muerte celular	- 38 -
2.4. Especies reactivas de oxígeno	- 38 -
2.4.1. Producción de EROs.....	- 38 -
2.4.2. Principales EROs.....	- 40 -
2.4.3. Estrés oxidativo y homeostasis redox.....	- 42 -
2.4.3.a. Toxicidad celular por estrés oxidativo.....	- 42 -
2.4.3.b. Defensa celular frente al estrés oxidativo.....	- 45 -
2.4.3. Actividad fisiológica de las EROs.....	- 47 -
2.5. Oxido Nítrico.....	- 48 -
2.5.1. Aspectos biológicos y fisiológicos del óxido nítrico.....	- 48 -
2.5.2. Óxido nítrico y estrés nitro-oxidativo.....	- 52 -
2.5.3. Óxido nítrico en cáncer.....	- 53 -
2.6. Muerte Celular.....	- 54 -
2.6.1. Autofagia	- 55 -

2.6.2.	Necrosis	- 56 -
2.6.3.	Necroptosis	- 56 -
2.6.4.	Apoptosis	- 57 -
2.6.3.a.	Vías de inducción de apoptosis	- 59 -
2.6.3.b.	Regulación de la maquinaria apoptótica.....	- 62 -
2.6.3.c.	Permeabilización de la membrana externa mitocondrial.....	- 63 -
2.6.4.	Vía de señalización de muerte inducida por los receptores de muerte de la familia de TNF: Estudio de la interacción Fas/FasL	- 64 -
2.6.4.a.	Vía de señalización celular Fas/FasL. Transmisión de la señal	- 65 -
2.6.4.b.	Relación con el cáncer	- 68 -
2.6.4.c.	Relación con el óxido nítrico.....	- 69 -
3.	OBJETIVOS	- 71 -
4.	MATERIAL Y MÉTODOS	- 75 -
4.1.	Cultivos celulares	- 77 -
4.1.1.	Mantenimiento.....	- 77 -
4.1.2.	Recuento celular	- 77 -
4.1.3.	Criopreservación.....	- 78 -
4.1.4.	Curva de crecimiento celular	- 79 -
4.1.5.	Administración de tratamientos.....	- 80 -
4.1.6.	Obtención de las líneas celulares 4TO y 4TO-NOS.....	- 80 -
4.1.7.	Transfección celular química.....	- 84 -
4.1.8.	Selección de las células transfectadas	- 84 -
4.2.	Cultivos de bacterias	- 85 -
4.2.1.	Transformación bacteriana por shock térmico	- 85 -
4.2.2.	Sembrado de las bacterias en placas.....	- 86 -
4.2.3.	Análisis de los resultados de transformación	- 87 -
4.2.4.	Conservación de los clones bacterianos de interés.....	- 87 -
4.3.	Manipulación de ácidos nucleicos	- 88 -
4.3.1.	Purificación de ADN	- 88 -
4.3.1.1.	Purificación de ADN plasmídico de cultivos bacterianos	- 88 -
4.3.1.2.	Purificación de ADN plásmidico en solución	- 88 -
4.3.1.3.	Purificación de ADN a partir de geles de agarosa.....	- 89 -
4.3.1.4.	Purificación de ADN total a partir de células en cultivo.....	- 89 -
4.3.1.5.	Purificación de ARN total a partir de células en cultivo	- 90 -
4.3.2.	Cuantificación de ácidos nucleicos	- 91 -
4.3.3.	Reacción de PCR utilizando ADNp como molde	- 92 -
4.3.4.	PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)	- 94 -
4.3.4.1.	Diseño de cebadores para RT-qPCR	- 95 -
4.3.4.2.	Reacción de (RT)-PCR en tiempo real.....	- 97 -
4.3.5.	Electroforesis de ácidos nucleicos	- 99 -
4.3.5.1.	Electroforesis horizontal de ADN en geles de agarosa	- 99 -

4.3.5.2.	Electroforesis vertical de ARN en geles de poliacrilamida-urea.....	- 100 -
4.3.6.	Digestión de ADN con enzimas de restricción.....	- 101 -
4.3.7.	Clonación en plásmidos bacterianos.....	- 101 -
4.3.8.	Secuenciación automática de ADN.....	- 103 -
4.4.	Manipulación de proteínas	- 105 -
4.4.1.	Lisis celular y obtención de fracciones celulares	- 105 -
4.4.1.1.	Lisis celular para la extracción de proteínas totales	- 105 -
4.4.1.2.	Obtención de la fracción protéica para su análisis mediante electroforesis bidimensional y espectrometría de masas	- 105 -
4.4.1.3.	Obtención de extractos citoplasmáticos y nucleares de células en cultivo	- 106 -
4.4.2.	Cuantificación de proteínas	- 106 -
4.4.3.	Electroforesis de proteínas.....	- 107 -
4.4.3.1.	Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE.....	- 107 -
4.4.3.2.	Electroforesis bidimensional de proteínas.....	- 109 -
4.4.3.2.1.	Isoelectroenfoque.....	- 109 -
4.4.3.2.2.	Segunda dimensión en SDS-PAGE	- 111 -
4.4.4.	Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa.....	- 111 -
4.4.5.	Tinción de los geles 2D y análisis de imagen.....	- 112 -
4.4.6.	Inmunodetección de proteínas mediante Western blot.....	- 113 -
4.4.7.	Análisis proteómico mediante espectrometría de masas	- 116 -
4.4.7.1.	Escisión de manchas, digestión y extracción de péptidos a partir del gel 2-D	- 116 -
4.4.7.2.	Identificación de proteínas mediante MALDI-TOF/TOF	- 117 -
4.5.	Purificación de mitocondrias de células en cultivo	- 118 -
4.5.1.	Purificación de mitocondrias por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa	- 118 -
4.5.2.	Purificación de mitocondrias por inmunocaptura.....	- 119 -
4.6.	Distribución subcelular de NOS3	- 120 -
4.6.1.	Inmunohistoquímica en células fijadas	- 120 -
4.6.2.	Digestión enzimática de la fracción subcelular mitocondrial.....	- 121 -
4.7.	Actividad de la Cadena de Transporte Electrónico	- 122 -
4.7.1.	Respiración acoplada / desacoplada en células intactas	- 122 -
4.7.2.	Respiración por complejos en células permeabilizadas con digitonina	- 123 -
4.8.	Ensayos de Actividad por espectrofometria	- 125 -
4.8.1.	Evaluación de la producción de ON	- 125 -
4.8.2.	Determinación del estrés oxidativo celular	- 125 -
4.8.2.1.	Concentración intracelular de especies reactivas de oxígeno.....	- 125 -
4.8.2.2.	Potencial de membrana mitocondrial	- 126 -
4.8.3.	Ensayo de medición de ATP	- 127 -
4.8.4.	Ensayo de la actividad catépsina D.....	- 128 -
4.8.5.	Evaluación de parámetros de muerte celular.....	- 129 -

4.8.5.1.	Liberación de LDH al medio extracelular	- 129 -
4.8.5.2.	Actividad caspasa	- 130 -
4.8.5.3.	Liberación de citocromo c	- 130 -
4.9.	Análisis estadístico	- 130 -
5.	RESULTADOS.....	- 133 -
5.1.	Sobreexpresión estable de NOS3 en la línea celular HepG2	- 135 -
5.1.1.	Sobreexpresión de NOS3	- 135 -
5.1.2.	Producción de óxido nítrico en la línea celular 4TO-NOS.....	- 136 -
5.2.	La sobreexpresión de NOS3 afecta a la morfología y el crecimiento celular.....	- 137 -
5.3.	NOS3 se localiza en la membrana mitocondrial externa	- 138 -
5.3.1.	Localización de NOS3 mediante microscopía confocal.....	- 139 -
5.3.2.	Localización de NOS3 mediante western blot	- 139 -
5.4.	La sobreexpresión estable de NOS3 no afecta la capacidad respiratoria celular.	- 141 -
5.4.1.	Consumo de oxígeno en células permeabilizadas con digitonina	- 141 -
5.4.2.	Capacidad respiratoria en células intactas	- 142 -
5.4.3.	Potencial de membrana mitocondrial	- 143 -
5.5.	La sobreexpresión estable de NOS3 incrementa el estrés nitro-oxidativo y el número de copias de ADNmt	- 144 -
5.5.1.	Estrés oxidativo en la línea celular 4TO-NOS	- 144 -
5.5.2.	Estrés nitro-oxidativo en la línea celular 4TO-NOS	- 145 -
5.5.3.	Número de copias de ADNmt en la línea celular 4TO-NOS	- 147 -
5.6.	La sobreexpresión de NOS3 se relaciona con la muerte celular	- 148 -
5.6.1.	Expresión de genes pro-apoptóticos	- 148 -
5.6.2.	Liberación citoplasmática de citocromo c	- 148 -
5.6.3.	Actividad caspasa	- 148 -
5.7.	Perfil proteómico de la línea celular 4TO-NOS	- 150 -
5.7.1.	Análisis proteómico.....	- 150 -
5.7.2.	Validación por Western blot.....	- 154 -
5.7.3.	Descripción funcional de las proteínas identificadas en el análisis proteómico.	- 155 -
5.8.	La expresión de Catepsina D está asociada con la muerte celular.....	- 163 -
6.	DISCUSIÓN	- 167 -
7.	CONCLUSIONES	- 181 -
8.	BIBLIOGRAFÍA	- 185 -
ANEXO I	- 185 -

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
ADNc	ADN complementario o copia
ADNmt	ADN mitocondrial
ADNn	ADN nuclear
ADNp	ADN plasmídico
ADP	Adenosín difosfato
AFP	Alfa-fetoproteína
AIF	Factor inductor de apoptosis
ANT	Translocasa de nucleótidos de adenina.
APAF-A	Factor activador de la peptidasa apoptótica 1
APS	Persulfato amónico
AR	NADPH: adrenodoxina oxidoreductasa mitocondrial
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ATP:	Adenosín trifosfato
BAX,	<i>BCL2 X associated</i>
BAK	<i>BCL2 antagonist/killer</i>
BAD	<i>BCL2 associated death promoter</i>
BCLC:	<i>Barcelona-Clinic Liver Cancer</i>
BCL-2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BIK,	<i>BCL2-interacting killer</i>
CAT	Catalasa
CATD	Catepsina D
cit c	Citocromo c
CI	Complejo respiratorio mitocondrial I
CII	Complejo respiratorio mitocondrial II
CIII	Complejo respiratorio mitocondrial III
CIV	Complejo respiratorio mitocondrial IV
CV	Complejo respiratorio mitocondrial V
CHC	Hepatocarcinoma o carcinoma hepatocelular
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
CO ₂	Dióxido de Carbono
CoQ	Coenzima Q
Ct	Ciclo umbral
CTE	Cadena de transporte electrónico
Cu ²⁺	Iones cobre
CRDs	Dominios ricos en cisteína
4TO	Línea celular control negativo
4TO-NOS	Línea celular con sobreexpresión estable de NOS-3
DcRs	Receptores señuelo
DD	Dominio de muerte
DED	Dominio efector de muerte
DHE	Dihydroethidium
DISC	<i>Death-Inducing Signalling Complex</i>

Abreviaturas

DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxinucleótidos-trifosfato
DTT	Ditiotreitol
DRs	Receptor de muerte
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFR	Factor de crecimiento epidérmico
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
ERNs	Especies reactivas de nitrógeno
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FADH ₂	Flavín adenín dinucleótido reducido
FMN	Flavín mononucleótido
FADD	<i>Fas-associated protein with a Death Domain</i>
FAF1	<i>Fas Associated Factor-1</i>
FAP-1	<i>Fas Associated Protein-1</i>
FasL	Fas ligando
FasR	Fas receptor
FCCP	Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone
FLASH	<i>FLICE-Associated Huge protein</i>
FLIP	<i>FLICE-inhibitory proteins</i>
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GCs	Guanilato ciclasa soluble
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GSH:	GlutatióNn reducido
GSS	GlutatióN sintasa
GSSG	GlutatióN disulfuro
GPX	GlutatióN peroxidasa
G6P	Glucosa-6-fosfato
H ₂ O	Agua
HepG2	Línea celular de hepatocarcinoma
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrógeno
HClO	Ácido hipocloroso
HEPES	Ácido N-2-hidroxietil-1-piperazinaetanosulfónico
H ₂ DCFDA	2',7'-diclorofluoresceína diacetato
IEF	Isoelectroenfoque
IL-1 β	Interleuquina-1 β
IL-6	Interleuquina-6
IAP	Proteína inhibidora de apoptosis
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDH	Lactato deshidrogenasa
MAM	Membrana de RE Asociada a Mitocondria
MDA	Malondialdehido
MEM	Medio Esencial Mínimo Eagle
MgCl ₂	Cloruro magnésico
MTCO2	Citocromo c oxidasa II mitocondrial
NaCl	Cloruro Sódico
NADP	Nicotinamín adenín dinucleótido
NADPH	Nicotinamín adenín dinucleótido fosfato

NAFLD	Enfermedad de hígado graso no alcohólica
NASH	Esteatohepatitis no alcohólica
NF-Kb	Factor nuclear kappa-B
NOS	Oxido nítrico sintasa
NOS1 o iNOS	Oxido nítrico sintasa inducida
NOS2 o nNOS	Oxido nítrico sintasa nuclear
NOS3 o eNOS	Oxido nítrico sintasa endotelial
NO ₂	Dióxido de nitrógeno
N ₂ O ₃	Trióxido de dinitrógeno
O ₂	Oxígeno
O ₂ ⁻	Anión superóxido
OH [•]	Radical hidroxilo
OH ⁻	Anión hidroxilo
ON	Óxido nítrico
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OXPPOS	Sistema de fosforilación oxidativa
PA	Peptatina A
PARP	poli(ADP-ribosa) polimerasa
PBS	Tampón fosfato salino
P _{CMV}	Promotor del citomegalovirus
pI	Punto isoeléctrico
PKG	Proteína quinasa G
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
PRDX	Peroxirredoxina
p75NTR	Receptor del factor de crecimiento nervioso p75
PTP	Poro de transición de permeabilidad
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
RT-PCR	Retro Transcripción-Reacción en Cadena de la Polimerasa
RPL13A	Proteína ribosomal L13A.
RE	Retículo endoplásmico
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sulfato sódico
SDHA	Succinato deshidrogenasa A
SFB	Suero fetal bovino
-SH	Grupo tiol
SOC	Caldo superóptimo con represión por catabolito
SOD	Superóxido dismutasa
SOD-1	Cu/Zn-Superóxido dismutasa
SOD-2	Mn-Superóxido dismutasa
SPOTS	<i>Signaling Protein Oligomerization Transduction Structures</i>
TBE	Tampón de electroforesis
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina
T _m	Temperatura de fusión o de <i>melting</i>
TMPD	N,N,N',N'-Tetramethyl-p-Phenylenediamine
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFR	TNF receptor
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRX	Tiorredoxina

Abreviaturas

VDAC	<i>Voltage-Dependent Anion Channel</i>
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
V-ATPasa	Bomba de protones en la membrana lisosoma

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización corpórea del hígado.....	-19-
Figura 2. Anatomía morfológica del hígado.	-20-
Figura 3. Vascularización hepática.....	-20-
Figura 4. Representación lobulillo hepático y porción de un lobulillo	-21-
Figura 5. Esquemas de la composición celular del hígado y disposición de las células hepáticas.....	-22-
Figura 6. Estructura mitocondrial.....	-31-
Figura 7 Representación esquemática del sistema OXPHOS.	-34-
Figura 8. Generación y efectos de las EROs en la mitocondria.	-39-
Figura 9. Especies Reactivas de Oxígeno (EROs).	-41-
Figura 10. Reacciones enzimáticas del sistema tiorredoxina.....	-47-
Figura 11. Reacción de síntesis de óxido nítrico catalizada por la óxido nítrico sintasa.	-48-
Figura 12. Actividad del óxido nítrico dependiente de su concentración.....	-50-
Figura 13. Efectos biológicos del óxido nítrico.	-50-
Figura 14. Relaciones químicas	-52-
Figura 15. Proceso de autofagia.....	-55-
Figura 16. Cambios morfológicos de una célula durante la muerte celular por necrosis.	-58-
Figura 17. Vías de muerte por apoptosis.....	-61-
Figura 18. Representación lineal del receptor Fas.....	-64-
Figura 19. Esquema de la señalización por Fas/FasL.	-66-
Figura 20. Esquema de la cámara de Neubauer.....	-78-
Figura 21. Esquema de la obtención de la línea celular con sobreexpresión de NOS3.....	-83-
Figura 22. Esquema de la transfección de las células HepG2	-85-
Figura 23. Esquema de extracción de ácidos nucleicos.....	-90-
Figura 24. Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	-93-
Figura 25. Imagen representativa de un ciclo umbral o Ct.....	-94-
Figura 26. Curva de eficiencia	-96-
Figura 27. Imagen representativa de una electroforesis de RNA en gel de poliacrilamida-urea.	-100-
Figura 28. Imagen de los vectores pCR2.1 y pcDNA4/TO	-102-
Figura 29. Secuencia de ADNc de NOS3.....	-104-
Figura 30. Sistema de electroforesis	-108-
Figura 31. Sistema de IEF	-110-
Figura 32. Sistema de electroforesis.....	-111-
Figura 33. Sistema de transferencia y Ponceau.....	-112-
Figura 34. Escáner de fluorescencia	-113-
Figura 35. Robot de picado de geles Propic.....	-116-
Figura 36. Espectrómetro de masas MALDI TOF-TOF	-117-
Figura 37. Electrodo de oxígeno tipo Clark termostatzado.....	-122-
Figura 38. Medida de respiración en células intactas.....	-123-
Figura 39. Consumo de oxígeno asociado a los complejos respiratorios por polarografía..	-124-
Figura 40. Reacción de luciferasa.....	-127-

Figura 41. La oxidación de NADH es proporcional a la cantidad de LDH existente en la muestra.....	-129-
Figura 42. Expresión de NOS3 en los clones seleccionados.....	-136-
Figura 43. Actividad NOS3.....	-137-
Figura 44. Efecto de la sobreexpresión de NOS3 sobre la morfología y el crecimiento celulares.....	-138-
Figura 45. Localización de NOS3 en las células 4TO-NOS.....	-140-
Figura 46. Rendimiento del sistema de fosforilación oxidativa en las células 4TO-NOS.....	-142-
Figura 47. Respiración endógena y máxima en la línea celular 4TO-NOS.....	-143-
Figura 48. Potencial de membrana mitocondrial.....	-143-
Figura 49. Efecto de la sobreexpresión de NOS3 en el estrés oxidativo celular.....	-145-
Figura 50. Efecto de la sobreexpresión de NOS3 sobre el estrés nitro-oxidativo celular.....	-146-
Figura 51. Número de copias de ADNmt y expresión de proteínas.....	-147-
Figura 52. Parámetros de apoptosis en la línea celular 4TO-NOS.....	-149-
Figura 53. Gel 2-D representativo.....	-151-
Figura 54. Efecto de la sobreexpresión de NOS3 sobre el proteoma celular.....	-152-
Figura 55. Validación de los resultados del análisis de expresión/identificación mediante western blot.....	-155-
Figura 56. Expresión de catepsina D en la línea celular 4TO-NOS.....	-164-
Figura 57. Actividad catepsina D y muerte celular.....	-165-
Figura 58. Mecanismos de muerte celular durante sobreexpresión de NOS3.....	-179-

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Líneas celulares.....	-81-
Tabla 2. Cebadores empleados para cuantificar el número de copias de ADNmt/ADNn mediante RT-qPCR.....	-96-
Tabla 3. Cebadores empleados para cuantificar por RT-qPCR los transcritos de los genes.....	96-
Tabla 4. Programa de IEF.....	-110-
Tabla 5. Lista de anticuerpos.....	-115-
Tabla 6. Lista de proteínas expresadas diferencialmente e identificadas por MS.....	-152-

1. RESÚMEN/SUMMARY



El hepatocarcinoma (CHC) representa la tercera causa de muerte relacionada con el cáncer en el mundo. Además, debido a su relación con otras patologías como la diabetes o la obesidad, su incidencia y mortalidad asociada siguen en aumento. La esperanza de vida de la mayoría de los pacientes de CHC es corta y, en la mayoría de los casos, solamente la ablación percutánea de tumores pequeños, la cirugía de resección y el trasplante hepático son capaces de curar la enfermedad. No obstante, debido a que el diagnóstico del CHC suele realizarse en estadios avanzados de la enfermedad, el porcentaje de casos con probabilidad de recibir alguno de los tratamientos curativos se sitúa entre el 40-50%. Por ello, es necesario obtener un mayor conocimiento de la enfermedad que nos permita el desarrollo de nuevas terapias frente al CHC.

Las líneas tumorales establecidas son valiosos modelos en investigación oncológica y, aunque no pueden reemplazar a los ensayos *in vivo*, constituyen una alternativa muy útil. El óxido nítrico (ON) es una molécula químicamente inestable y de vida media muy corta, la cual puede ser sintetizada en muchos tejidos (incluido el hepático) a partir de las óxido nítrico sintasas (NOS). El ON desempeña un relevante papel fisiopatológico en la transducción de la señal, ejerciendo diferentes efectos en función de distintos factores. El papel del ON como regulador de la apoptosis está bien establecido, pudiendo actuar como agente pro- o antiapoptótico. Sin embargo, el mecanismo molecular responsable de este efecto contradictorio no se conoce con profundidad. Como proapoptótico, el uso de donadores de ON ha sido sugerido como potencial terapia frente al cáncer. En este sentido, la sobreexpresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (NOS3) también ha sido relacionada con la muerte celular a través del incremento del estrés nitro-oxidativo celular y de la expresión de p53 y del receptor de muerte Fas, y ha sido sugerida como posible terapia génica frente al cáncer.

El objetivo de esta tesis fue identificar el mecanismo a través del cual la sobreexpresión de NOS3 se relaciona con la actividad antitumoral, en la línea celular de CHC humano HepG2 con sobreexpresión estable de la NOS3 (4TO-NOS). Asimismo, hemos valorado la sensibilidad de la línea 4TO-NOS a la muerte celular inducida por anti-Fas. Para ello, y considerando la naturaleza del ON y sus efectos fisiológicos, analizamos la localización de la NOS3, el efecto del ON sobre la cadena de transporte electrónico mitocondrial y el perfil de expresión diferencial de proteínas en la línea celular 4TO-NOS.

Nuestros resultados demostraron que NOS3 se localiza en la membrana mitocondrial externa. La sobreexpresión de NOS3 se asoció con el incremento del contenido mitocondrial de proteínas nitradas, pero no con la alteración de la capacidad

Resumen

respiratoria celular. En este sentido, se observó un incremento del número de copias de ADN mitocondrial en la línea 4TO-NOS, que coincidió con una mayor expresión de proteína del complejo IV mitocondrial.

La muerte celular y el estrés oxidativo relacionados con la sobreexpresión de NOS3 fueron asociados al incremento de la expresión de genes proapoptóticos y a una mayor expresión/actividad de las enzimas adrenodoxina oxidoreductasa mitocondrial (AR) y catepsina D (CATD). Interesantemente, la sobreexpresión de CATD en la línea celular 4TO-NOS se relacionó con la inducción de apoptosis de manera independiente a su actividad catalítica. Además, la inhibición de la actividad CATD no fue efectiva en bloquear la apoptosis inducida por anti-Fas. En resumen, la sobreexpresión de NOS-3 resultó en una mayor sensibilidad a la muerte celular inducida por anti-Fas, independientemente de la expresión de AR y de la actividad CATD.

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the third leading cause of cancer-related death in the world. In addition, due to its relationship with other pathologies such as diabetes and obesity, its incidence and associated mortality continues to increase. The life expectancy of most HCC patients is short and, in most cases, only surgery and liver transplantation are curative treatments. However, since the diagnosis of HCC is commonly made in advanced stages of the disease, the percentage of cases with the probability of receiving a curative treatment is between 40-50%. Therefore, it is necessary to obtain a greater knowledge of the disease that allows us the development of new therapies against HCC.

Established tumor lines are valuable models in oncology research and, although they cannot replace *in vivo* assays, they are a very useful alternative. Nitric oxide (NO) is a chemically unstable molecule with a very short half-life, which can be synthesized in many tissues (including hepatic tissue) from NO synthases (NOS). NO plays a relevant role in signal transduction in pathophysiology, exerting different effects depending on several factors. The role of NO as a regulator of apoptosis is well established, having both antiapoptotic and proapoptotic functions. However, the molecular mechanisms responsible for its opposite effect are not fully understood. As antiapoptotic, the use of NO donors has been suggested as a potential cancer therapy. In this sense, the overexpression of endothelial nitric oxide synthase (NOS3) has also been related to cell death through the increase of cellular nitro-oxidative stress and expression of p53 and Fas death receptor. In addition, NOS-3 overexpression has been suggested as a therapy against cancer.

The aim of this thesis was to identify the mechanism by which the NOS3 overexpression is related to the antitumor activity in the human HCC cell line HepG2 with stable overexpression of NOS3 (4TO-NOS). Also, we assessed the sensitivity of 4TO-NOS cells to anti-Fas-induced cell death. Taking into account factors such as the chemical nature of NO and its physiological effects, we analysed the location of NOS3, the effect of NO on the mitochondrial electronic transport chain and the differential expression profile of proteins in the 4TO-NOS cell line.

Our results showed that NOS3 is located in the outer mitochondrial membrane. This was associated with the increase in the mitochondrial content of nitrated proteins but it was not related to altered cellular respiratory capacity. In this sense, we observed an increase in mitochondrial DNA copy number in the 4TO-NOS cell line, which coincided with a greater expression of mitochondrial IV complex protein.

Cell death and oxidative stress related to NOS3 overexpression were associated with the expression increase of proapoptotic genes and with a greater expression and/or

Resumen

activity of adrenodoxin oxidoreductase mitochondrial (AR) and cathepsin D (CATD) enzymes. Interestingly, overexpression of CATD in the 4TO-NOS cell line was related to the induction of apoptosis independently of its catalytic activity. In addition, inhibition of CATD activity was not effective in blocking anti-Fas-induced apoptosis. In summary, the NOS3 overexpression resulted in increased sensitivity to anti-Fas-induced cell death, independently of AR expression and CATD activity.

2. INTRODUCCIÓN



2.1. El hígado

El hígado es uno de los órganos más complejos del cuerpo humano, ya que desempeña un papel central en el metabolismo y proporciona a los demás órganos y tejidos una mezcla adecuada de nutrientes a través del torrente circulatorio. Entre otras muchas funciones esenciales en las que participa, podemos destacar la homeostasis corporal (metabolismo lipídico, proteico y de carbohidratos), la producción y secreción de la bilis (necesaria para la digestión y absorción intestinal de las grasas), síntesis de numerosas proteínas (de coagulación, de fase aguda de la inflamación, de respuesta inmune,...), el almacenaje de glucógeno, vitaminas y minerales, así como la detoxificación y metabolización de sustancias tóxicas.

2.1.1. Anatomía y circulación sanguínea en el hígado

El hígado es la glándula más voluminosa del organismo. En humanos adultos tiene un peso aproximado de 1,5Kg y se localiza en la región superior derecha de la cavidad abdominal, debajo del diafragma y por encima del estómago, el riñón derecho y los intestinos (Figura 1).

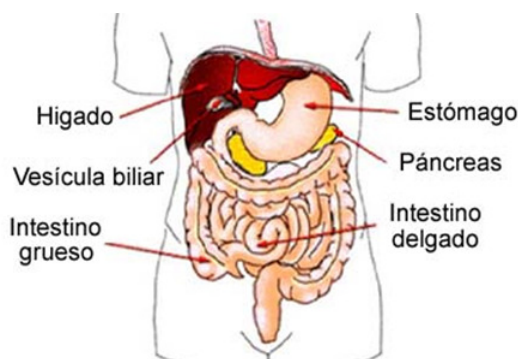


Figura 1. Localización corpórea del hígado.

El hígado se localiza bajo el diafragma del cuerpo humano por encima del borde superior del estómago. La vesícula biliar y sus vías se encuentran exactamente debajo del lado derecho del hígado. Imagen tomada de <http://www.thebody.com/content/art14623.html>

Se encuentra recubierto por el peritoneo, cápsula de Glisson o cápsula fibrosa perivascular, y su consistencia es blanda y depresible. La vena hepática media divide el hígado en los lóbulos hepático derecho e izquierdo, los cuales se dividen en ocho segmentos funcionalmente independientes según la clasificación de Couinaud de la anatomía hepática. Así, cada segmento tiene su propio flujo vascular, drenaje venoso y drenaje biliar (Figura 2):

Introducción

- En el lóbulo hepático derecho, el más grande, irrigado por la arteria hepática derecha, se identifican los segmentos VII y VIII, situados en la parte superior o infradiafragmática, y los segmentos VI y V, situados en la parte inferior. De todos ellos, el segmento VI el más lateral y el V el más medial.
- En el lóbulo hepático izquierdo se identifican los segmentos II (subdiafragmático), IV (muy medial) y III (situado por debajo del II).

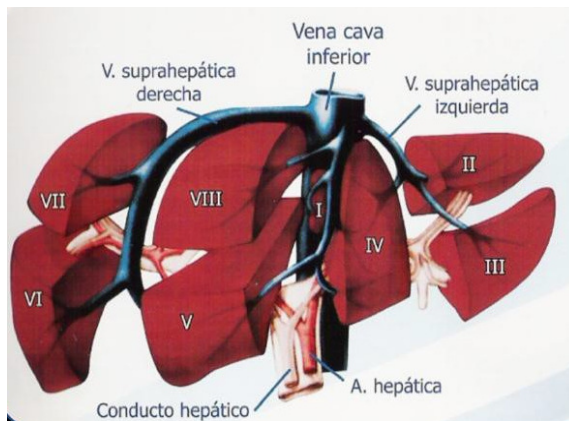


Figura 2. Anatomía morfológica del hígado. Se muestran los diferentes segmentos que constituyen los lóbulos hepáticos derecho e izquierdo. El segmento I (lóbulo caudado) está localizado posteriormente y no es visible desde una vista frontal. Imagen obtenida de <https://cirugiaconcompetencias.blogspot.com.es/p/bl>

El hígado recibe un doble aporte de sangre: (1) uno de origen arterial, con elevada presión, que depende de la arteria hepática y contiene la sangre oxigenada, y (2) otro de origen venoso, con menor presión, procedente del bazo y el tracto gastrointestinal a través de la vena porta, conteniendo sangre poco oxigenada y rica en nutrientes. La sangre arterial y venosa portal confluyen en los vasos denominados sinusoides, que drenan las distintas unidades estructurales y funcionales del hígado. Los productos del metabolismo hepático son recogidos por la vena hepática y derivados finalmente hacia la vena cava (Figura 3).

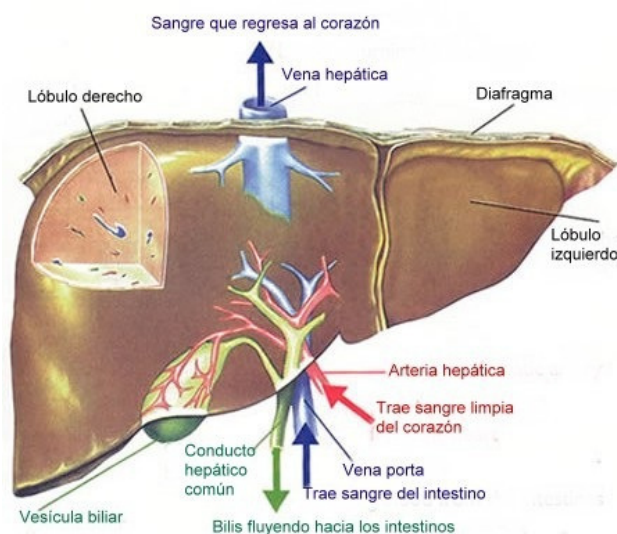


Figura 3. Vascularización hepática. Dibujo esquemático del hígado. Se muestra el lóbulo derecho e izquierdo, con la irrigación que proviene de la vena porta y de la arteria hepática, respectivamente. Imagen tomada de <http://www.cepvi.com/medicina/imagen/higado2.jpg>

2.1.2. Histología hepática

2.1.2.a. Estructuras hepáticas

Al microscopio, pueden distinguirse las siguientes estructuras básicas que conforman el tejido hepático:

1) *Parénquima hepático*: está compuesto por una estructura que puede representarse funcionalmente en dos modelos distintos, denominados lobulillo y acino hepáticos. La diferencia principal entre ambas estructuras radica en la dirección del flujo sanguíneo en relación con el centro de la unidad estructural. Así, mientras que en el lobulillo hepático la vena centrolobulillar o central se localiza en el centro de la estructura, en el acino hepático es la tríada hepática o portal (constituida por la arteriola portal, la vena portal y el conducto biliar) la que constituye el centro estructural. Esta distribución diferencial del flujo sanguíneo conlleva la distinción de diversas áreas en el hígado en función de la presión parcial de oxígeno (O_2) (Figura 4).

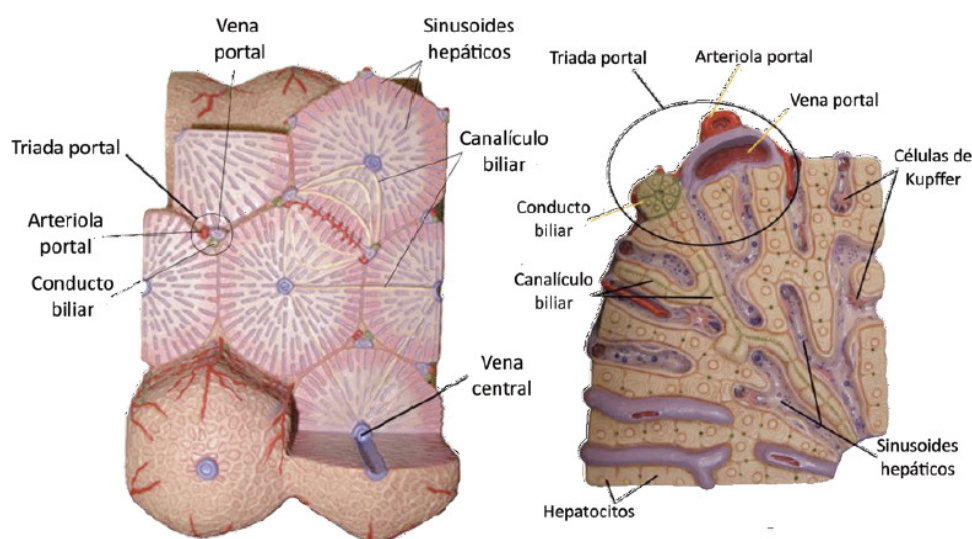


Figura 4. Representación lobulillo hepático y porción de un lobulillo. Imagen con modificaciones tomada de www.aramedylaboratorio.com

2) *Sinusoides hepáticos*: son capilares que se disponen entre las láminas de hepatocitos (el tipo celular mayoritario) y donde confluyen, desde la periferia de los lobulillos, las ramas de la arteria hepática y de la vena porta. La sangre fluye desde las tríadas hasta la vena central, circulando en forma centrípeta. La pared de los sinusoides está formada por una capa discontinua de células endoteliales con fenestraciones (poros de intercambio de nutrientes, desechos y gases) entre las células.

3) *Espacio de Disse*: es un estrecho espacio perisinusoidal que se encuentra entre la pared de los sinusoides y las láminas de hepatocitos, ocupado por una red de fibras reticulares y plasma sanguíneo que baña libremente la superficie de los hepatocitos. En el espacio de Disse se produce el intercambio metabólico entre los hepatocitos y el plasma donde se forma la abundante linfa hepática.

2.1.2.b. Tipos celulares hepáticos

El hígado está constituido por células parenquimales o hepatocitos, que representan entre el 60-80% de la masa hepática, y células no parenquimales, donde se engloban las células endoteliales, células de Kupffer (macrófagos residentes hepáticos), células estrelladas (adipocitos), células endoteliales biliares (colangiocitos), células madre u ovas y células de Pit (linfocitos *natural killer* hepáticos) (Figura 5). Esta variabilidad celular explica las diferentes funciones fisiológicas del hígado. A continuación se describen brevemente cada uno de estos tipos celulares:

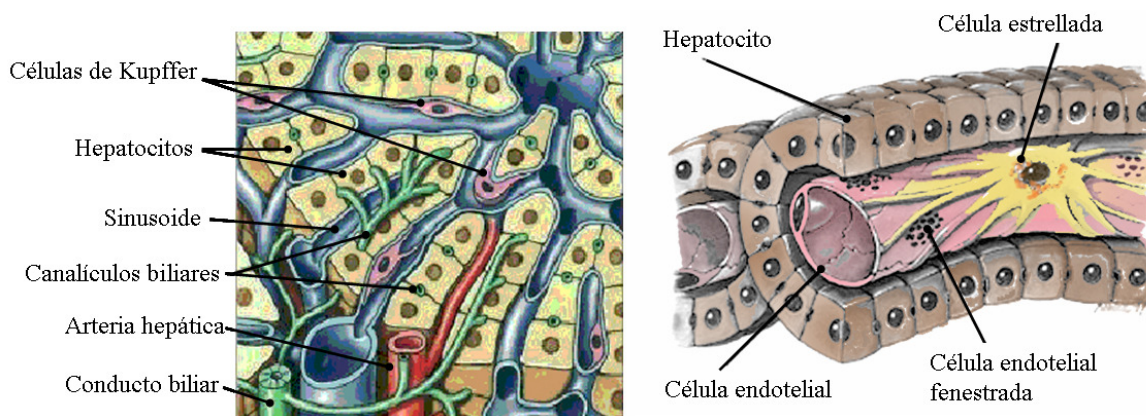


Figura 5. Esquemas de la composición celular del hígado y disposición de las células hepáticas. Información obtenida de <http://www.hepcentro.com.br/anatomia.htm>

1) **Hepatocitos:** son células poliédricas, de 40 a 50µm, que presentan un núcleo central con uno o más nucléolos evidentes. Los hepatocitos se disponen en cordones formados por una fila simple de células (dos filas en neonatos y niños hasta la edad de cuatro años), separadas del sinusoides vascular por el espacio de Disse. Son células con abundantes orgánulos, especialmente mitocondrias, ribosomas, retículo endoplásmico (RE), aparato de Golgi y lisosomas. La presencia de múltiples orgánulos en el hepatocito se relaciona con sus numerosas funciones, entre las que cabe destacar el metabolismo de

lípidos e hidratos de carbono, la síntesis de proteínas, la formación de bilis o la detoxificación de fármacos. Los hepatocitos pueden tener seis o más caras, que pueden clasificarse en tres dominios funcional y estructuralmente diferentes en función de la estructura adyacente:

- Dominio perisinusoidal: porción de la membrana que constituye el 37% de la superficie del hepatocito y forma la pared del espacio sinusoidal. Por tanto, es la región que se relaciona con el espacio de Disse. Presenta un gran número de microvellosidades que sobresalen hacia este espacio, aumentando así la superficie de absorción y facilitando el intercambio con el flujo sanguíneo. El menor contenido en colesterol aporta una mayor fluidez a este dominio de la membrana, permitiendo la actividad de diversos sistemas transportadores como la bomba de Na^+/K^+ -ATPasa, el cotransportador de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ o el transportador de Na^+ acoplado a la liberación de sales biliares, así como la presencia de proteínas ligadas a bilirrubina y ácidos grasos (Sellinger, Barrett et al. 1990).

- Dominio intercelular: Esta porción de membrana constituye el 50% de la membrana plasmática del hepatocito y supone la superficie de contacto con los hepatocitos adyacentes. Así pues, es una región especializada en la comunicación y adhesión intercelular, que presenta uniones estrechas y desmosomas y que constituye una barrera electrolítica entre el canalículo biliar y el espacio sinusoidal.

- Dominio pericanalicular: Porción de la superficie de la membrana que comprende el 13% restante de la superficie plasmática y que incluye una estría o hemicanalículo donde se ubica el canalículo biliar, delimitándolo. El elevado contenido en colesterol de este dominio explica su bajo grado de fluidez, lo cual influye en la actividad de las glicoproteínas integrantes de esta porción de membrana. Aquí se localiza la proteína transportadora de sales biliares del canalículo y los sitios de reabsorción de glutamato y glicocola. Entre sus contenidos enzimáticos destacan la 5'-nucleotidasa, la γ -glutamyltransferasa, la fosfatasa alcalina y la leucina aminopeptidasa.

2) **Células de Kupffer**: son macrófagos residentes en el hígado, pertenecientes al sistema fagocítico mononuclear, que se encuentran en la parte interna de los sinusoides y que emiten sus prolongaciones hacia el espacio de Disse. Su función es fagocitar las partículas exógenas extrañas y restos celulares que circulan por la sangre, pudiendo alterar la homeostasis del propio organismo al actuar como células presentadoras de antígeno. A través de la liberación de citoquinas tales como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), la

interleuquina-1 β (IL-1 β) o la IL-6, las células de Kupffer son capaces de regular la respuesta metabólica y proliferativa de los hepatocitos en condiciones de inflamación u otras situaciones de estrés celular. Además, estos macrófagos específicos del hígado pueden liberar óxido nítrico (ON), el cual es un importante factor vasodilatador de la vasculatura hepática que ejerce diversas funciones importantes como segundo mensajero.

3) **Células estrelladas** o células de Ito: son células grasas que se localizan en el espacio de Disse. Entre sus funciones se encuentra el almacenamiento de lípidos y vitamina A, la síntesis de diferentes proteínas del tejido conectivo y la secreción de diferentes factores de crecimiento. Cuando se produce un daño hepático, estas células se diferencian a miofibroblastos, sufriendo la pérdida de la vitamina A almacenada, e incrementan la síntesis de la matriz extracelular y de colágeno. Esta transformación es esencial en los procesos de hipertensión portal y fibrosis hepática.

4) **Células endoteliales biliares:** poseen receptores que permiten la endocitosis de sustancias como las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y el ácido hialurónico. También son capaces de producir mediadores vasoconstrictores como la endotelina-1 y diversos mediadores inflamatorios.

5) **Células madre u ovals:** están localizadas en la cercanía de los canales de Hering, ductos biliares o colangiolo, diferenciándose en su recorrido hacia la vena central. Poseen núcleo y citoplasma ovalado y mayor relación núcleo/citoplasma que otras células. En condiciones normales, estas células progenitoras permanecen en estado quiescente. Pero ante una lesión aguda severa o un daño crónico en el hígado, se activan y multiplican rápidamente participando en la recuperación de la funcionalidad hepática (Bird, Lorenzini et al. 2008).

7) **Células de Pit:** son linfocitos granulados con capacidad citotóxica, que destruyen células alteradas como células tumorales o células infectadas por virus.

2.1.3. Funciones del hígado

De acuerdo con la variabilidad celular que lo constituye, y como se ha adelantado previamente, el hígado participa activamente en múltiples funciones. Entre ellas, cabe destacar las siguientes:

1) El metabolismo de los carbohidratos: dos tercios de la glucosa presente en la sangre son absorbidos por el hígado, donde se transforma en glucosa-6-fosfato (G6P) por acción de la glucoquinasa (hexoquinasa específica del hígado). Dependiendo de las

necesidades fisiológicas del organismo, la G6P puede derivarse hacia una ruta metabólica de tipo anabólico o catabólico. Así, la G6P que no se necesita de forma inmediata es almacenada en forma de glucógeno que el hígado moviliza cuando necesita suministrar 'combustible' a los tejidos extrahepáticos (sobre todo al cerebro). La G6P también puede entrar en la ruta de las pentosas fosfato, que proporciona poder reductor en forma de nicotinamín adenín dinucleótido fosfato (NADPH), (necesario para la biosíntesis de ácidos grasos, colesterol y nucleótidos, así como para los sistemas redox antioxidantes celulares), y ribosa, necesaria para biosíntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos. El hígado es también el principal órgano gluconeogénico que sintetiza glucosa a partir de precursores no glucídicos como lactato, glicerol y aminoácidos como la alanina (Nelson 2005).

2) El metabolismo de los lípidos: La G6P puede transformarse en acetil-CoA, el cual puede utilizarse en la síntesis de ácidos grasos, fosfolípidos, colesterol y sales biliares. Éstas últimas, por su acción emulsionante, facilitan la absorción intestinal de las grasas. Además, cabe destacar que el hígado es la principal fuente de lipoproteínas plasmáticas (apolipoproteína A1, apolipoproteína B y apolipoproteína E) que regulan importantes funciones metabólicas (Anniek Werner 2009). De esta forma, el hígado es capaz de controlar el metabolismo de lípidos según el estado nutricional del individuo. Así, en condiciones de abundancia, los ácidos grasos son esterificados en el hígado y secretados a la sangre en forma de lipoproteínas de baja densidad. Estas lipoproteínas transportan los ácidos grasos hasta el tejido adiposo, donde son almacenados en forma de triglicéridos. En condiciones de ayuno prolongado, el hígado convierte los ácidos grasos en cuerpos cetónicos que son exportados a los tejidos extrahepáticos (incluido el cerebro) para ser utilizados como combustible (Berg 2002).

3) El metabolismo de los aminoácidos: los aminoácidos que entran en el hígado pueden seguir diferentes rutas metabólicas importantes. Así, pueden actuar como precursores para la síntesis de proteínas hepáticas o pueden utilizarse como precursores en la biosíntesis de nucleótidos, hormonas y otros compuestos nitrogenados. El hígado renueva constantemente sus proteínas y, además, es el órgano que sintetiza la mayoría de las proteínas plasmáticas, incluyendo las proteínas séricas implicadas en la coagulación, respuesta inmune y fase aguda de la inflamación. Por tanto, el hígado se considera el centro de respuesta a infecciones, daño tisular, crecimiento neoplásico y desórdenes inmunológicos (revisado en (Jeschke 2009)). Los aminoácidos que no son necesarios como precursores biosintéticos, se transaminan o desaminan y son transferidos a otros tejidos o

Introducción

degradados siguiendo diversas vías metabólicas. El exceso de amonio producido es transformado en urea y otros productos que, posteriormente, son eliminados por los riñones (Nelson 2005).

4) Depósito de múltiples sustancias: ciertos nutrientes, entre ellos la vitamina A, la vitamina B12 y los iones hierro y cobre, se almacenan en el hígado.

5) Detoxificación de la sangre: los hepatocitos presentan un complejo sistema multienzimático a nivel de los microsomas, encargado de la detoxificación de compuestos xenobióticos, como fármacos, contaminantes ambientales, etc. El proceso de detoxificación normalmente implica una hidroxilación de compuestos orgánicos relativamente insolubles (dependiente de citocromo P-450), para aumentar su solubilidad y facilitar su posterior degradación y excreción (Nelson 2005). Además, en el primer trimestre del desarrollo embrionario, el hígado es el principal órgano de producción de glóbulos rojos.

6) Síntesis de factores de coagulación: los factores de coagulación I (fibrinógeno), II (protrombina), V (globulina aceleradora), VII (proconvertina), IX (factor antihemofílico B) y X (factor Stuart-Prower) son sintetizados en el hígado.

Probablemente, el papel crucial que desempeña el hígado a través del elevado número de funciones vitales que realiza ha venido acompañado de la adquisición evolutiva de su peculiar capacidad regenerativa, destinada a evitar las consecuencias catastróficas que produciría la pérdida de este órgano (Michalopoulos and DeFrances 1997). Durante el desarrollo del órgano hepático en mamíferos se suceden múltiples procesos, desde la diferenciación de las células del endodermo a hepatocitos primitivos y posteriormente a hepatoblastos, hasta la maduración del hígado en la última etapa fetal, adquiriendo tras el parto las funciones propias de un hígado adulto. En esta maduración postnatal, el hepatocito adquiere gradualmente su fenotipo adulto y pierde la capacidad proliferativa, de manera que, en un hígado adulto normal, la mayoría de los hepatocitos se mantiene en estado quiescente. No obstante, tras la reducción de la masa hepática funcional por resección quirúrgica o tras un daño agudo, los hepatocitos diferenciados pueden sincronizarse rápidamente y entrar en ciclo, recuperando su capacidad proliferativa. Históricamente se pensaba que, a diferencia de lo que ocurre en otros tejidos (piel, médula ósea, etc.), la regeneración hepática no se llevaba a cabo por células madre, sino que eran las propias células maduras que componen el órgano las que se desdiferenciaban,

proliferaban y se volvían a diferenciar, haciendo a las células del hígado especialmente proclives a la transformación tumoral (Michalopoulos and DeFrances 1997). Sin embargo, tras el descubrimiento de células madre hepáticas, existen diferentes puntos de vista acerca de sus propiedades, naturaleza y participación en el proceso de regeneración hepática (revisado en (Schwartz and Verfaillie 2010)).

2.2. Hepatocarcinoma

El hepatocarcinoma o carcinoma hepatocelular (CHC) resulta de una alteración patológica de los procesos de proliferación y muerte celular en los hepatocitos. La proliferación celular tiene lugar de un modo controlado de acuerdo a las necesidades generales del tejido. Existen tanto señales extracelulares (factores de crecimiento, factores ambientales, cambios en la temperatura y pH, disminución de los niveles de nutrientes, interacciones célula-célula o de adhesión a la matriz extracelular) como señales intracelulares que regulan la proliferación celular. Mientras que las células normales son sensibles a todos estos factores, las células neoplásicas han adquirido la capacidad de proliferar independientemente a todos ellos (Jones and Thompson 2009). El cáncer es una enfermedad causada por un conjunto heterogéneo de procesos de señalización celular desordenados, implicados en la homeostasis y la proliferación celular, que se origina como consecuencia de una combinación de mutaciones genéticas y/o estímulos oncogénicos internos o externos (Cantor and Sabatini 2012). Es un proceso que ocurre en varios pasos, a través de los cuales las células cancerosas van adquiriendo diversas características relacionadas con el crecimiento incontrolado en ausencia de señales de crecimiento, la resistencia a las señales antiproliferativas, la evasión de la apoptosis, la replicación ilimitada, el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), la invasión a tejido circundante y metástasis a los órganos distales, la reprogramación del metabolismo energético y la evasión inmune (Hanahan and Weinberg 2000; Garber 2006; Hanahan and Weinberg 2011).

El CHC representa más del 90% del cáncer de hígado primario y constituye el sexto tipo de cáncer más común y la tercera causa de muerte relacionada con tumor en el mundo (2012). Además, su incidencia y mortalidad asociada siguen en aumento, siendo considerado un problema de salud global (Qi, Guo et al. 2015). El CHC se desarrolla en el contexto de un hígado cirrótico en el 90% de los casos y normalmente es identificado en etapas avanzadas de la enfermedad, cuando su pronóstico es muy pobre. Así, la infección

Introducción

crónica por el virus B o C de la hepatitis, el consumo elevado y persistente de alcohol y las alteraciones metabólicas representan causas relevantes de enfermedad hepática, cirrosis y CHC. Algunos de los principales mecanismos propuestos como responsables de la progresión de la enfermedad tumoral hepática incluyen la regeneración hepática persistente (numerosos ciclos de muerte y proliferación celular alternos) (Kitamura, Watanabe et al. 1998) o la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN), relacionada esta última con una reducida capacidad antioxidante del órgano y el incremento de la peroxidación lipídica. En este sentido, numerosos procesos celulares, entre los que se incluyen aquellos relacionados con la supervivencia, la proliferación y el ciclo celular, están controlados por factores sometidos a regulación por oxidación-reducción (regulación redox). Este hecho sustenta el papel que los sistemas reguladores del estado redox celular, como la tiorredoxina (TRX) y el glutatión (GSH), desempeñan en la biología del cáncer (Powis and Kirkpatrick 2007; Ballatori, Krance et al. 2009).

La esperanza de vida de la mayoría de los pacientes con CHC es corta y en la mayoría de los casos sólo la cirugía de resección y de trasplante hepático es capaz de curar la enfermedad. En la clasificación Barcelona-Clinic Liver Cancer (BCLC), el sistema de estadificación utilizado para la clasificación pronóstica del CHC, el cual vincula estadificación con tratamiento, se incluye también la ablación percutánea de tumores pequeños, menores a 2cm, como terapia curativa del CHC. Desgraciadamente, la resección hepática es posible sólo en un 10-15% de los pacientes dado que el diagnóstico se suele realizar en estadios avanzados de la enfermedad (Nissom, Lo et al. 2006). En conjunto, el porcentaje de casos de CHC con probabilidad de recibir alguno de los tratamientos curativos se sitúa entre el 40-50% (Bruix, Reig et al. 2016), de ahí el gran interés que despierta la identificación de nuevos marcadores de diagnóstico temprano de la enfermedad y de proteínas asociadas de forma específica con el tumor y su estadiaje, que puedan utilizarse como dianas terapéuticas (Nissom, Lo et al. 2006). La expresión de ciertos genes como el que codifica la alfa-fetoproteína (AFP), cuyo nivel se incrementa durante la regeneración hepática, también aumenta en el CHC (Abelev 1971), considerándose un marcador de la progresión del tumor (Wong, Lau et al. 2000). No obstante, pese a su valor pronóstico en los CHC ya diagnosticados y como factor de riesgo pretrasplante, la AFP tiene poca sensibilidad como marcador de cribado tumoral para la detección de casos en fase temprana, habiéndose recomendado que se suprima su

determinación en los protocolos de control semestral del paciente cirrótico (Forner, Reig et al. 2009).

Las líneas tumorales establecidas son valiosos modelos celulares en investigación oncológica y, aunque no pueden reemplazar a los ensayos *in vivo* y ensayos clínicos, son una alternativa muy útil en investigación biomédica, donde consideraciones éticas y de sentido común restringen la investigación en pacientes. Además, los estudios *in vitro* con cultivos celulares permiten un control riguroso de los factores físico-químicos del medio y de las condiciones ambientales en las que se produce el crecimiento, evitando la heterogeneidad debida a factores diferentes al propio objeto de estudio (Freshney 2001). Los estudios *in vitro* están evolucionando para la adquisición de estructuras tridimensionales que permiten el estudio de la interacción entre varios tipos celulares, aunque está lejos de la simulación del contexto homeostático del organismo en términos de una verdadera estructura tisular y de los componentes sistémicos implicados en la regulación de la homeostasis *in vivo*, como son el sistema nervioso, endocrino e inmune. Sin embargo, esta mayor simplicidad supone en muchos casos una ventaja que convierte a los ensayos *in vitro* en esenciales en investigación y muy útiles para comprender y explorar los mecanismos implicados en los diferentes procesos celulares (Polikov, Block et al. 2008). Por otra parte, las líneas celulares establecidas a partir de tumores muestran una jerarquía funcional similar a la de los tumores de los que proceden. Por todo ello, los modelos basados en cultivos celulares constituyen sistemas experimentales muy válidos para estudiar las alteraciones de las funciones celulares que acontecen en el proceso de carcinogénesis. Entre las diferentes líneas tumorales de CHC de origen humano, la línea HepG2 conserva muchas de las funciones metabólicas propias del hígado (Javitt 1990) y es utilizada como modelo *in vitro* en una gran variedad de estudios relacionados con los procesos de carcinogénesis, toxicología, diferenciación celular, etc. (21.581 entradas en la base de datos MEDLINE, en Marzo de 2017) (Stier, Fahimi et al. 1998; Song, Li et al. 2009; Jin, Li et al. 2011).

2.3. La mitocondria

Las mitocondrias son orgánulos plásticos, presentes en el citoplasma de la mayoría de las células eucariotas, capaces de modificar su forma y de sufrir procesos de fusión y fisión importantes para el mantenimiento de su función. El número de mitocondrias en cada célula, así como su morfología y localización, depende tanto del tipo celular como del

estado metabólico del mismo (Chen and Chan 2009; Palmer, Osellame et al. 2011). La explicación más aceptada sobre el origen evolutivo de la mitocondria es la hipótesis endosimbiótica, según la cual este orgánulo se originó a partir de un único ancestro perteneciente al grupo de las α -proteobacterias, que se introdujo dentro del precursor de la célula eucariota actual y le confirió la propiedad de aprovechar la energía de las fuentes de carbono de una forma más eficaz mediante el uso del O_2 . Durante la evolución hasta la formación de las actuales células eucariotas, el endosimbionte ha transferido muchos de sus genes esenciales a los cromosomas nucleares, aunque sigue conservando un sistema genético propio con características del ancestro bacteriano (Gray, Burger et al. 1999).

2.3.1. Estructura de la mitocondria

El uso de la microscopía electrónica permitió a principios de los años 50 determinar que la mitocondria presenta dos membranas (Palade 1953): una externa (60% proteínas, 40% lípidos), que la separa del citoplasma y que es permeable a todas aquellas moléculas inferiores a 10 kDa, y una interna, que tiene un alto contenido en proteínas (80% proteínas, 20% lípidos) y que constituye una barrera muy selectiva para el paso de moléculas. La membrana interna, a su vez, define dos compartimentos adicionales: el espacio intermembrana, comprendido entre la membrana mitocondrial externa y la interna, y la matriz mitocondrial (Figura 6). El primero de ellos, permite el mantenimiento de un gradiente electroquímico de protones, originado por la cadena de transporte electrónico (CTE) situada en la membrana interna, y necesario para la síntesis del adenosín trifosfato (ATP). Por su parte, la matriz mitocondrial alberga las moléculas de ácido desoxirribonucleico mitocondrial (ADNmt) y proteínas necesarias para su replicación y transcripción, los ribosomas encargados de la traducción de las proteínas codificadas en dicho genoma, así como otras muchas proteínas implicadas en diversos procesos metabólicos como el ciclo de Krebs, la β -oxidación de ácidos grasos, el ciclo de la urea o la biosíntesis de pirimidinas (Attardi and Schatz 1988).

La membrana mitocondrial interna posee una mayor superficie que la externa y presenta dos regiones diferenciadas: las crestas mitocondriales, invaginaciones que sobresalen hacia la matriz mitocondrial, y la membrana interna que rodea la matriz (Figura 6). Esta última transcurre adyacente a la membrana externa, con la que establece contactos puntuales en los llamados sitios de contacto. Ambas regiones se conectan a través de estrechas aperturas tubulares con diámetros de entre 12 y 40 nm llamadas uniones de las

crestas (Zick, Rabl et al. 2009). Este hecho determina un nuevo compartimento mitocondrial denominado espacio intercrestal. La formación de las crestas es un proceso dinámico, reversible, vinculado al estado respiratorio debido a que es en ellas donde tiene lugar la fosforilación oxidativa. Las crestas mitocondriales son, además, esenciales durante el proceso de apoptosis y liberación del citocromo c (cit c) (Gilkerson, Selker et al. 2003; Wurm and Jakobs 2006; Frey and Sun 2008).

La membrana mitocondrial externa puede asociarse físicamente al RE a través de estrechos contactos de la membrana del RE asociada a mitocondria (MAM). La distancia mínima descrita entre ambos es de 10-25nm. Se estima que sólo un 12% de la superficie de la membrana mitocondrial externa participa en estas asociaciones, que tienen por objeto la regulación de los niveles de calcio en la mitocondria y el transporte lipídico (Giorgi, De Stefani et al. 2009; Hayashi, Rizzuto et al. 2009).

A



B

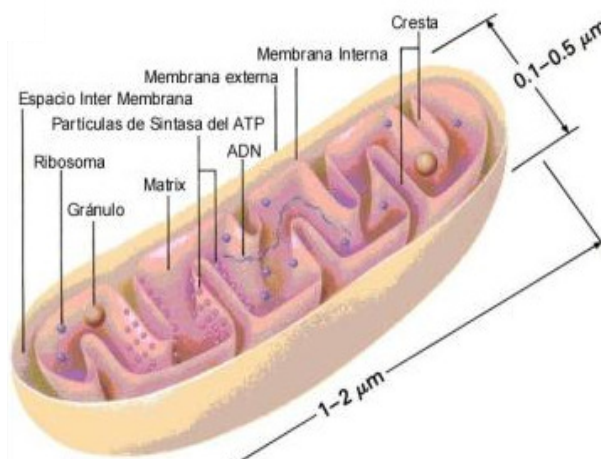


Figura 6. Estructura mitocondrial. A) Imagen longitudinal de una mitocondria obtenida mediante microscopía electrónica (http://halimabio.blogspot.com.es/2013/12/la-celula-y-sus-organulos_10.html). B) Esquema de la estructura mitocondrial (imagen obtenida de la página web http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesalfonso_romero_barcojo/actividades_tic/trabajos_profesorado/unidades_didacticas/ciencias_naturales/ud_celula/contenido/organulos.html).

2.3.2. Genoma mitocondrial

La característica más singular de las mitocondrias es la de poseer su propio genoma: el ADNmt. El ADNmt de mamíferos es una molécula circular de doble cadena, de aproximadamente 16,5kb, que se replica y transcribe en la matriz mitocondrial de forma

independiente al ciclo celular (Clayton 1982; Clayton 1991). Cada mitocondria contiene entre 2 y 10 copias de ADNmt, y cada célula entre cientos y miles de mitocondrias, dependiendo del tejido y de las necesidades energéticas de la célula (Satoh and Kuroiwa 1991). Este segundo sistema genético celular, a pesar de contener un número muy pequeño de genes, es indispensable para la vida celular porque codifica proteínas integrantes de los complejos respiratorios mitocondriales y elementos esenciales para la síntesis de estas proteínas, los ácidos ribonucleicos (ARN) transferentes y ribosómicos mitocondriales. Sin embargo, las mitocondrias no son genéticamente autosuficientes: tanto la formación del orgánulo como la expresión de su genoma depende de un gran número de proteínas codificadas en el núcleo, que son sintetizadas en los ribosomas citoplasmáticos e importadas a la mitocondria. Así pues, la biogénesis mitocondrial representa un caso único en la célula animal, ya que su formación está bajo el control de los dos sistemas genéticos celulares que deben actuar coordinadamente: el nuclear y el mitocondrial (Goffart and Wiesner 2003; Kelly and Scarpulla 2004).

2.3.3. Función mitocondrial

En cuanto a su función, las mitocondrias están implicadas en varias rutas metabólicas fundamentales como son la β -oxidación y la biosíntesis de pirimidinas, aminoácidos, fosfolípidos, nucleótidos, ácido fólico, grupo hemo, urea y una gran variedad de metabolitos (Attardi and Schatz 1988). No obstante, la función principal de estos orgánulos es la producción de energía en forma de ATP mediante el proceso de fosforilación oxidativa. Dicho proceso es impulsado por la transferencia de electrones procedentes de la oxidación de combustibles (p. ej. glúcidos, lípidos y proteínas), en forma de nicotín adenín dinucleótido (NADH) y flavín adenín dinucleótido (FADH₂), para cedérselos al O₂ y producir agua.

2.3.3.a. Bioenergética mitocondrial

La glucosa constituye la principal fuente de energía utilizada por las células animales para la producción de ATP. La oxidación de la glucosa empieza en el citoplasma celular con la glucólisis y puede proporcionar una cantidad suficiente de energía para garantizar la supervivencia celular, incluso en ausencia de mitocondrias funcionales. Sin embargo, este proceso conlleva la obtención de tan sólo 2 moléculas de ATP por molécula de glucosa, frente a las ~30-32 que se logran mediante su oxidación completa en la fosforilación oxidativa mitocondrial, hasta dióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O). Así, el piruvato

obtenido en la etapa final de la glucólisis y en el metabolismo de aminoácidos, es importado a la matriz mitocondrial donde se oxida a acetil-CoA. Asimismo, los ácidos grasos, tras una serie de reacciones de oxidación, también se transforman en acetil-CoA. La oxidación de esta molécula mediante las reacciones que constituyen el ciclo de Krebs, genera el poder reductor necesario para ser utilizado por el sistema de fosforilación oxidativa o sistema OXPHOS para la síntesis de ATP. El ATP generado mediante este proceso es liberado al citosol celular mediante su intercambio por adenosín difosfato (ADP) a través de la translocasa de nucleótidos de adenina (ANT, *Adenine Nucleotide Translocator*).

2.3.3.b. Sistema de fosforilación oxidativa

El sistema OXPHOS consta de una CTE formada por los complejos respiratorios I (CI), II (CII), III (CIII) y IV (CIV), dos transportadores de electrones móviles (coenzima Q -CoQ- y cit c) y una ATP sintasa o complejo V (CV). Mientras que el CII está constituido por subunidades codificadas exclusivamente en el genoma nuclear, el resto de complejos está formado por múltiples subunidades proteicas codificadas tanto en el ADN nuclear (ADNn) como en el mitocondrial. Los electrones procedentes de la oxidación del NADH y FADH₂ son transportados a través de este sistema, acoplado a la generación de un gradiente de protones, para producir H₂O y ATP a partir de O₂ y ADP (Figura 7). De manera resumida, el CI recibe los electrones del NADH y los cede a la ubiquinona (embebida en la membrana interna mitocondrial), que los transporta hasta el CIII. De aquí, los electrones pasan al cit c (asociado a la membrana interna mitocondrial por el espacio intermembrana), que los transporta al CIV, quien finalmente se los cede al O₂ y lo reduce a H₂O (Figura 7). De forma alternativa, el FADH₂ a través del CII y de otras enzimas como la glicerol-3-P deshidrogenasa (GAPDH), la EFTP ubiquinona oxidorreductasa (enzima que toma dos electrones procedentes de la primera reacción de la β-oxidación de los ácidos grasos) o la dihidroorotato deshidrogenasa (enzima implicada en la biosíntesis de pirimidinas), cede sus electrones a la ubiquinona a través de la cual se continúa el proceso de fosforilación oxidativa.

Actualmente existen dos modelos alternativos que explican la organización de la CTE: el modelo sólido y el modelo de colisión al azar 'clásico' o modelo fluido. Aunque ambos coinciden en el número de complejos (I-IV) que participan en la cadena, mientras que el modelo sólido propone que todos los complejos se asocian en supercomplejos que

Introducción

forman el respirosoma, el modelo de colisión al azar defiende que los complejos no interaccionan físicamente sino que los electrones son transferidos entre ellos por acción del CoQ y el cit c. Recientemente, se ha propuesto un modelo de plasticidad, más plausible, que integraría a los dos anteriores, permitiendo una organización más dinámica de la CTE (Enriquez and Lenaz 2014; Moreno-Loshuertos and Enriquez 2016).

En el CI, CIII y CIV de la cadena de transporte electrónico, el flujo electrónico está acoplado a un bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembrana. De esta manera, se genera un gradiente electroquímico o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) que es aprovechado por el CV para llevar a cabo la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi, completándose así el proceso de fosforilación oxidativa (Figura 7) (Mitchell 1961; Mitchell and Moyle 1967). En este proceso es necesaria la ANT, que facilita la salida del ATP generado y la entrada del ADP a fosforilar en la matriz mitocondrial.

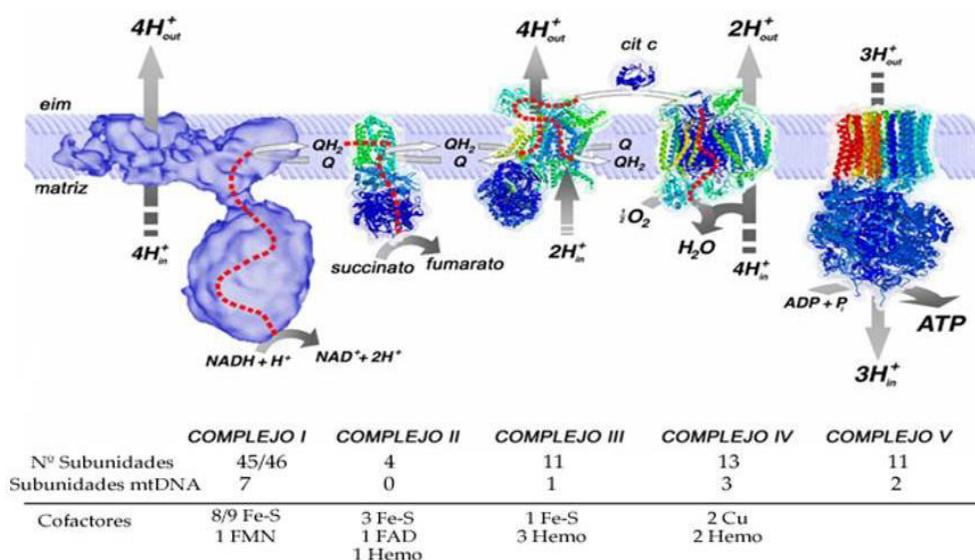


Figura 7. Representación esquemática del sistema OXPHOS. En la figura se muestran los complejos de la cadena respiratoria organizada según el modelo tradicional de colisión al azar. Se indica en qué puntos se produce el bombeo de protones, así como el número de subunidades que componen los diferentes complejos y los cofactores que contienen. El complejo V o ATP sintasa completa el sistema de fosforilación oxidativa. (Modificado de Nijtmans et al. 2004)

Así pues, el sistema OXPHOS es la vía final donde convergen diversas rutas metabólicas como son la oxidación del piruvato, la β -oxidación de los ácidos grasos y el ciclo de los ácidos tricarbóxicos o ciclo de Krebs. El ATP generado en este proceso (el 80-90% del ATP celular) es utilizado por los distintos tejidos para mantener las

necesidades energéticas celulares. Por tanto, aquellos tejidos que sean más dependientes de ATP serán los más afectados en el caso de producirse fallos en su producción. En este sentido, el hígado es un órgano que depende en gran medida del metabolismo mitocondrial. Las mitocondrias son la principal fuente de energía en los hepatocitos y juegan un papel fundamental en el metabolismo oxidativo, la supervivencia celular y la normal funcionalidad del hígado. Por tanto, no resulta extraño que numerosas patologías hepáticas cursen con disfunción de este orgánulo. Las enfermedades hepáticas de evolución crónica como la enfermedad hepática inducida por alcohol, la enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD) y la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), las hepatitis virales, las colestasis primaria y secundaria, la hemocromatosis o la enfermedad de Wilson, han sido documentadas como patologías que transcurren con alteración de la función mitocondrial (Hassanein and Frederick 2004; Grattagliano, Russmann et al. 2011). De hecho, se ha sugerido que determinadas patologías hepáticas, como el CHC, son el resultado de una producción excesiva de ERO, consecuencia de la disfunción mitocondrial (Fujinaga, Tsutsumi et al. 2011; Facciorusso, Villani et al. 2016). Los principales cambios observados ocurren a nivel del sistema OXPHOS, síntesis de ATP y biogénesis mitocondrial, entre otros.

2.3.3.b.1. Complejo I

El CI, también llamado NADH:ubiquinona oxidorreductasa o NADH deshidrogenasa (EC 1.6.5.3), es el principal punto de entrada de los electrones en la cadena respiratoria y cataliza la transferencia de dos electrones desde el $\text{NADH} + \text{H}^+$ a la ubiquinona o CoQ, acoplándola a la translocación de cuatro protones hacia el espacio intermembrana. El CI es el mayor de los complejos del sistema OXPHOS, con un peso molecular en torno a 980 kDa. Está formado por 44 subunidades, 7 de las cuales están codificadas en el ADNmt (ND1 a ND-6 y ND4L) y las restantes se sintetizan en el citosol. Estructuralmente, se sabe que el CI tiene forma de “L”, ya que está formado por dos brazos, uno hidrofóbico y otro hidrofílico, dispuestos perpendicularmente entre sí (Grigorieff 1998; Sazanov, Peak-Chew et al. 2000; Friedrich and Bottcher 2004; Giachin, Bouverot et al. 2016). Así, mientras que el brazo hidrofóbico se encuentra embebido en la membrana interna mitocondrial y contiene las 7 subunidades codificadas en el genoma mitocondrial, el brazo hidrofílico sobresale hacia la matriz y está constituido exclusivamente por subunidades nucleares.

2.3.3.b.2. Complejo II

El CII o succinato deshidrogenasa (SDH; EC 1.3.5.1) se localiza en la membrana interna mitocondrial, expuesto hacia la matriz, conectando la CTE con el ciclo de Krebs (Cecchini 2003). Oxida el succinato a fumarato con la consiguiente reducción del cofactor FAD. A continuación, transfiere los electrones del FADH₂ a la CoQ. Está formado por cuatro subunidades codificadas en el genoma nuclear (Hagerhall 1997): las subunidades SDHA y SDHB, que forman el centro catalítico, y las subunidades SDHC y SDHD, que permiten el anclaje del complejo a la membrana interna. Mientras que SDHA contiene el cofactor FAD unido covalentemente y el sitio de unión del succinato, SDHB posee tres centros sulfoférricos (Fe-S) que permiten la transferencia de electrones al CoQ (Sun, Huo et al. 2005). Sin embargo, la superficie de contacto de SDHB con SDHA y SDHC es similar y el núcleo catalítico no existe como una entidad funcional libre en ausencia de las subunidades de anclaje a membrana, lo que sugiere que las subunidades de membrana participan de algún modo en la reacción enzimática (Rutter, Winge et al. 2010). Además de ser el único complejo de la cadena respiratoria con todas sus subunidades codificadas en el núcleo, es el único que no ejerce bombeo de protones.

2.3.3.b.3. Complejo III

El CIII, citocromo bc₁ ó ubiquinol:citocromo c oxidoreductasa (EC 1.10.2.2), transfiere electrones desde el CoQ reducido al cit c en un proceso acoplado a la translocación de cuatro protones hacia el espacio intermembrana. Tiene una estructura de homodímero simétrico y se localiza en la membrana interna mitocondrial. En mamíferos, cada “monómero” consta de 11 subunidades, de las que solamente una, MTCYB, se codifica en el ADNmt. El centro catalítico de la enzima consta de tres subunidades, las cuales contienen centros metálicos que permiten la transferencia electrónica. Estas son: MTCYB, CYC1 y la proteína de Rieske Fe-S (UQCRFS1 ó RISP). Mientras que la primera de ellas posee 8 hélices transmembrana, las otras dos subunidades se anclan a la membrana a través de un solo dominio transmembrana y exponen sus dominios globulares, conteniendo el grupo hemo c y 2 grupos Fe-S, respectivamente, hacia el espacio intermembrana.

2.3.3.b.4. Complejo IV

El CIV o citocromo c oxidasa (COX, EC 1.9.3.1) es el complejo final de la CTE y, por tanto, cataliza la transferencia electrónica desde el cit c reducido al O₂. Está formado

por 13 subunidades, de las que solamente tres están codificadas en el ADNmt: MTCO1, MTCO2 y MTCO3. Las dos primeras forman parte del centro catalítico y contienen los grupos hemo a y hemo a₃ y los centros CuA y CuB, necesarios para la transferencia de electrones. MTCO3, la subunidad mitocondrial restante, forma parte del núcleo estructural de la enzima y podría promover la translocación de protones al espacio intermembrana.

2.3.3.b.5. Complejo V

El CV o ATP sintasa mitocondrial (EC 3.6.3.14) aprovecha la energía generada por la CTE en la creación de un gradiente de protones en el espacio intermembrana para llevar a cabo la fosforilación del ADP. Las proteínas que lo forman constituyen dos dominios funcionales, F1 y F0, conectados por un tallo. La región F1 se localiza en la matriz mitocondrial, constituyendo la fracción soluble de la enzima y su dominio catalítico, y se compone de cinco subunidades distintas ensambladas en una estequiometría de $3\alpha:3\beta:1\delta:1\gamma:1\varepsilon$ (Abrahams, Leslie et al. 1994). La región F0 ancla al CV en la membrana interna mitocondrial y está compuesta por ocho tipos de proteínas (a, b, c, d, e, f, g y A6L). El tallo puede dividirse en dos zonas diferentes: el tallo central, que contiene algunas de las proteínas de la región F1 (δ , γ , ε), y el tallo periférico, compuesto por las subunidades OSCP, F6, b y d (Collinson, Runswick et al. 1994; Stock, Leslie et al. 1999). A excepción de las subunidades a y A6L, todas las demás se encuentran codificadas en el genoma nuclear (Anderson, Bankier et al. 1981). La región F0 funciona como un poro de protones y dirige la energía liberada en la disipación del gradiente electroquímico a la parte F1, que es donde se forma el ATP. La energía se transfiere de una parte a otra mediante un mecanismo de motor rotatorio (Stock, Leslie et al. 1999). Cuando disminuye el gradiente de protones, la ATP sintasa puede funcionar de modo inverso, hidrolizando ATP para bombear protones al espacio intermembrana, contribuyendo así a mantener el $\Delta\Psi_m$. Esta actividad hidrolítica se regula mediante la unión de la proteína inhibitoria natural IF1 (Cabezón, Montgomery et al. 2003).

2.3.3.c. Generación fisiológica de especies reactivas de oxígeno

En la célula, la formación de EROs es inherente al propio metabolismo aerobio, siendo su principal fuente la CTE mitocondrial. En los apartados posteriores se explica con detalle la participación de la mitocondria en este proceso y su relación con el estrés oxidativo y la toxicidad celular (apartado 2.4).

2.3.4. Mitocondria y muerte celular

Es bien conocido el papel de la mitocondria en el proceso de muerte celular programada o apoptosis, actuando como reservorio de proteínas pro-apoptóticas tales como *cit c*, SMAC/DIABLO, factor inductor de apoptosis (AIF), endonucleasa G o procaspasas-2, -3, -8 y -9 (Hengartner 2000). La liberación de estas proteínas al citosol conduce a una secuencia de eventos moleculares y morfológicos que van desde la condensación nuclear hasta la exposición de fosfatidilserina y moléculas de adhesión en la superficie de las células que han entrado en apoptosis (Amarante-Mendes and Green 1999). Por tanto, la mitocondria actúa como el escenario integrador de una cadena de estímulos inductores de apoptosis y desencadena una serie de cascadas de señalización que pueden desembocar en la muerte celular. En el apartado 2.6 se explica con más detalle la participación de la mitocondria en la muerte celular por apoptosis.

2.4. Especies reactivas de oxígeno

2.4.1. Producción de EROs

Como hemos visto, los organismos aerobios acoplan la reducción del O_2 a la producción de energía durante la respiración celular. Este proceso proporciona ventajas energéticas evidentes frente a otros procesos de fermentación o de respiración que utilizan otros aceptores de electrones. Sin embargo, una pequeña parte del O_2 utilizado en dicho proceso, aproximadamente un 5%, se reduce monoelectrónicamente con la consiguiente formación de EROs (anión superóxido, peróxido de hidrogeno y radical hidroxilo) (Halliwell and Gutteridge 1984). Además de ésta, existe otra vía extracelular a través de la cual puede verse incrementada la concentración intracelular de EROs por la acción de numerosos agentes externos. A continuación, se analizan estas dos vías:

a) Producción intracelular de EROs

En la mitocondria, la producción de EROs se encuentra asociada a la acción de enzimas como las NAD(P)H deshidrogenasas y a componentes no enzimáticos como la semiquinona (Boveris and Chance 1973). Durante el proceso de fosforilación oxidativa, los electrones fluyen a través de los grupos flavina, centros Fe-S, grupos hemo e iones cobre (Cu^{2+}) que poseen las proteínas que conforman los complejos respiratorios mitocondriales, siendo cualquiera de ellos susceptible de donar un electrón al O_2 en lugar de al siguiente componente de la cadena. En particular, son los complejos respiratorios CI y CIII los

principales puntos donde se generan EROs (Figura 8). En concreto, el grupo FMN (flavín mononucleótido) del CI ha sido propuesto como el principal responsable de la formación de EROs en la mitocondria (Liu, Fiskum et al. 2002). En condiciones normales se producen bajas cantidades de EROs que pueden actuar como mensajeros intracelulares y ser detoxificados por enzimas presentes en la matriz mitocondrial, como la superóxido dismutasa (SOD) dependiente de manganeso (Mn-SOD ó SOD2) o la glutatión peroxidasa 4 (GPX4) (Cadenas and Davies 2000). En estas condiciones, la producción de EROs aumenta de manera proporcional al incremento de la actividad de la CTE, es decir, de la respiración aeróbica. Sin embargo, cuando se produce un defecto o un bloqueo en la CTE, la acumulación de poder reductor puede conducir también a una mayor producción de EROs y, por tanto, a un mayor daño oxidativo (Turrens 2003; Balaban, Nemoto et al. 2005; Koopman, Verkaart et al. 2005). Por ejemplo, los defectos funcionales del CI promueven un incremento de la producción de EROs y la sobreexpresión de la SOD2 (Pitkanen and Robinson 1996; Luo, Pitkanen et al. 1997). Sin embargo, este mecanismo compensatorio no resulta suficiente para neutralizar la elevada concentración de EROs. Así, la exposición a estas moléculas y/o la ineficiencia de los sistemas de detoxificación puede conducir a daños en las membranas mitocondriales y a la generación de nuevas mutaciones en el ADNmt. Por tanto, y debido al papel que juega la mitocondria en el inicio del proceso apoptótico, el defecto en el sistema OXPHOS puede desencadenar la desregulación de este proceso y la muerte celular (Smeitink, Zeviani et al. 2006).

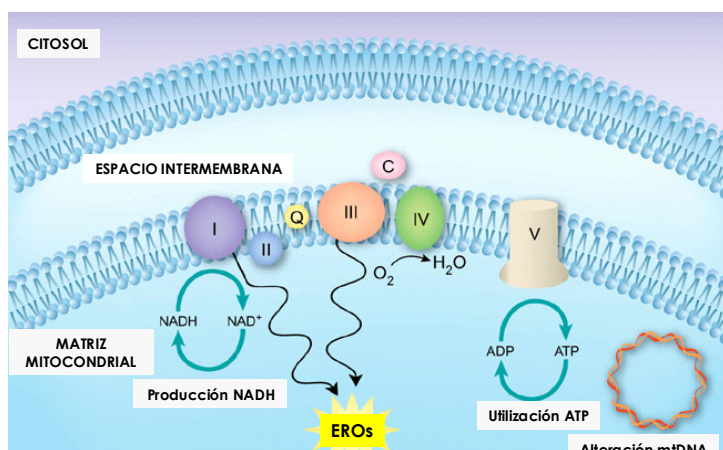


Figura 8. Generación y efectos de las EROs en la mitocondria.

El desequilibrio entre la producción de NADH y la utilización de ATP puede alterar la cadena de transporte electrónico (complejos I-IV) e incrementar la producción intracelular de EROs (Baughman and Mootha, 2006).

Introducción

Aunque la CTE es considerada la fuente principal de EROs en el interior de la célula, existen muchos otros procesos biológicos, tanto espontáneos como enzimáticos, que implican reacciones monoelectrónicas capaces de generar radicales libres. Así, además de en la mitocondria, las EROs pueden generarse en otros compartimentos celulares como los peroxisomas. Los peroxisomas constituyen una importante fuente de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) celular, gracias a la acción de diferentes enzimas como, por ejemplo, la acil-CoA oxidasa, y son especialmente importantes en el hígado (Thannickal and Fanburg 2000). Los hepatocitos y otros tipos celulares como macrófagos, células polimorfonucleares y células endoteliales, presentan otra fuente importante de EROs: la NADPH oxidasa. Esta enzima se localiza en la membrana plasmática y cataliza la transferencia de un electrón desde el NADPH hasta el O_2 con la formación concomitante de anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Este puede transformarse enzimáticamente a H_2O_2 mediante la actividad SOD, o bien transformarse en otras especies radicales como el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) o el ácido hipocloroso (HClO). Las EROs así formadas, junto a las ERNs, constituyen un mecanismo fundamental de regulación y de defensa celular del sistema inmune frente a patógenos (DeLeo and Quinn 1996).

b) Producción extracelular de EROs

Además de las EROs que se forman durante el metabolismo aerobio, numerosos agentes externos pueden elevar los niveles intracelulares de EROs. Entre ellos, cabe destacar las radiaciones ionizantes, xenobióticos que participan en ciclos redox, miméticos de la reacción de Fenton, inhibidores de las enzimas antioxidantes SOD y catalasa (CAT), y metales. Éstos últimos merecen una consideración especial debido al creciente número de estudios que relacionan su capacidad generadora de EROs con el estrés oxidativo y el cáncer. Los iones de los metales de transición Fe y, en ocasiones, Cu pueden actuar como catalizadores de la reducción monoelectrónica del O_2 para generar $O_2^{\bullet-}$ y OH^{\bullet} a través de la reacción de Fenton. Este hecho explica que sus niveles se regulen de forma estricta a través de proteínas quelantes que impiden su biodisponibilidad (Crichton, Wilmet et al. 2002).

2.4.2. Principales EROs

Como se ha adelantado previamente, las principales EROs que se producen a nivel celular como consecuencia de la reducción parcial del O_2 son las siguientes (Figura 9):

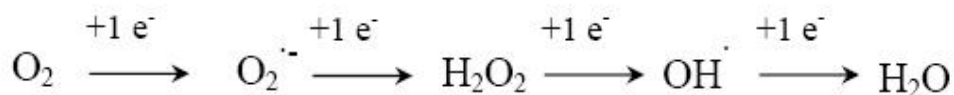
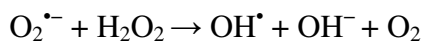
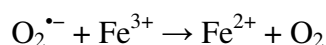


Figura 9. Especies Reactivas de Oxígeno (EROs). El anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), se producen por la reducción parcial de la molécula de oxígeno (O_2).

a) Anión superóxido: es el resultado de la transferencia de un electrón al O_2 . Esta molécula es relativamente poco reactiva y posee baja capacidad para atravesar las membranas biológicas, aunque sí puede hacerlo bajo su forma protonada, el radical hidroperóxido (HO_2^{\cdot}), mucho más reactivo. Se la considera la ERO primaria ya que se forma en todas las células aerobias mediante una gran variedad de mecanismos y, al interactuar con otras moléculas, es capaz de generar otras EROs. De hecho, se piensa que la mayor parte de la toxicidad del $\text{O}_2^{\cdot-}$ se debe a la generación del radical OH^{\cdot} , derivado del acoplamiento de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss catalizada por hierro (Fridovich 1978):



El $\text{O}_2^{\cdot-}$ también es capaz de combinarse con ON para producir un intermedio muy reactivo: el peroxinitrito (ONOO^-) (Pacher, Beckman et al. 2007).

b) Peróxido de hidrógeno: se forma por la transferencia de dos electrones al O_2 o por la dismutación del anión $\text{O}_2^{\cdot-}$, espontánea o catalizada enzimáticamente por la actividad SOD. Es una molécula pequeña y estable, ya que no posee electrones desapareados, y, por tanto, puede difundir sin dificultad a través de las membranas biológicas (Halliwell and Gutteridge 1984). Su toxicidad es variable y depende de las diferentes capacidades enzimáticas para eliminarlo y transformarlo en otras especies más reactivas (Halliwell and Gutteridge 1990). El H_2O_2 es un oxidante de muchas moléculas biológicas, especialmente de aquellas que contienen grupos sulfidrilo o sulfoférricos. Estas características le permiten actuar como mensajero intracelular modificando la actividad de proteínas quinasas y fosfatasa. Además, es capaz de regular la actividad de factores de transcripción oxidando los grupos sulfidrilo de sus residuos de cisteína (Groeger, Quiney et al. 2009).

c) Radical hidroxilo: la transferencia de tres electrones al dioxígeno o la reducción monoeléctrica del H_2O_2 provoca la escisión del enlace O-O, generándose anión hidroxilo (OH^-) y OH^\bullet . El OH^\bullet es uno de los radicales más reactivos de los formados en los sistemas biológicos. Con una vida media de menos de 10^{-9} s, es capaz de reaccionar con prácticamente la totalidad de los componentes celulares. Esto hace que, *in vivo*, su reactividad se vea limitada únicamente por su capacidad de difusión, reaccionando con las biomoléculas cercanas a su lugar de síntesis (Novo and Parola 2008).

2.4.3. Estrés oxidativo y homeostasis redox

Como consecuencia de la reactividad de las EROs y de su elevada capacidad oxidante, los organismos aerobios han desarrollado a lo largo de la evolución diversos mecanismos y estrategias destinadas a controlar su concentración intracelular, así como el mantenimiento del equilibrio redox celular (Nordberg and Arner 2001). Sin embargo, como se ha comentado previamente, en determinadas circunstancias la concentración de EROs sobrepasa la capacidad protectora de estos mecanismos, produciéndose una situación de estrés oxidativo. Dicha situación puede producirse tanto por un incremento en la generación de EROs *per se*, como por una disminución o disfunción de los sistemas antioxidantes celulares. El estrés oxidativo se considera implicado en diversos procesos fisiológicos y/o patológicos como el envejecimiento, la arterioesclerosis, la artritis, los desórdenes neurodegenerativos y la carcinogénesis (Valko, Rhodes et al. 2006; Valko, Jomova et al. 2016), así como en la toxicidad de tratamientos tales como los antitumorales (Lawenda, Kelly et al. 2008). La magnitud y duración del estrés oxidativo, así como el tipo celular afectado, son factores importantes que influyen en el destino final de las células (Martindale and Holbrook 2002).

2.4.3.a. Toxicidad celular por estrés oxidativo

Los daños oxidativos provocan un amplio rango de respuestas celulares que van desde la proliferación hasta la parada del ciclo celular, la senescencia o, en último extremo, la muerte celular. Debido a su naturaleza química, las EROs tienen una capacidad oxidante mucho mayor que la del propio O_2 , pudiendo provocar múltiples daños celulares que afectan a toda clase de biomoléculas: carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos y proteínas.

1) Daño oxidativo en carbohidratos

La desoxirribosa es propensa a la degradación oxidativa (Dedon 2008). Los polisacáridos como el ácido hialurónico pueden ser degradados por ataque oxidativo (Kennett and Davies 2009). De igual modo, los proteoglicanos pueden sufrir roturas por estrés oxidativo (Kennett, Rees et al. 2010). En general, los carbohidratos son susceptibles a su degradación en presencia de EROs (particularmente frente a $O_2^{\bullet-}$ y OH^{\bullet}), lo que probablemente altera la función de los proteoglucanos de los que forman parte. Así, este proceso ha sido relacionado con la patogenia del proceso inflamatorio (Moseley, Waddington et al. 1997).

2) Daño oxidativo en lípidos

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de los fosfolípidos y de otros componentes lipídicos de las membranas son muy susceptibles al daño por EROs a través de la peroxidación lipídica (Wong-Ekkabut, Xu et al. 2007). De hecho, los niveles de sus productos, malondialdehído (MDA) y 4-hidroxiacetaldehído (4-HNE), suelen utilizarse como marcadores de estrés oxidativo (Nielsen, Mikkelsen et al. 1997; Butterfield, Bader Lange et al. 2010). La oxidación de los PUFA desemboca en cambios en las características físico-químicas de las membranas celulares, disminuyendo su fluidez al verse modificadas las interacciones que ocurren entre estos ácidos grasos y las proteínas (Wong-Ekkabut, Xu et al. 2007).

3) Daño oxidativo en ácidos nucleicos

Las EROs pueden reaccionar con el ADN modificando las bases púricas (Adenina -A- y Guanina -G-) y pirimidínicas (Citosina -C- y Timina -T-) que constituyen el material genético. La no reparación del material genético por daño oxidativo se considera el primer paso de la mutagénesis, carcinogénesis y envejecimiento (Marnett 2000). El principal responsable de estas modificaciones es el OH^{\bullet} , capaz de interactuar con todos los componentes del ADN: bases y esqueleto de azúcar-fosfato. La lesión oxidativa del ADN más abundante y más estudiada implica la hidroxilación del C8 de la guanina, generando 8-oxoguanina. Esta lesión induce transversiones GC→TA presentes en oncogenes y genes supresores de tumores mutados (Hussain and Harris 1998). La alteración de la T da lugar a 5-hidroximetil-uracilo, que es capaz de emparejarse de forma errónea con la G, produciendo transiciones TA→CG. La 8-hidroxiadenina, que se forma por la modificación oxidativa de la A, también produce este tipo de mutaciones (Barone, McCulloch et al.

2007). Aparte de las mutaciones puntuales que provocan en el ADN, si las lesiones oxidativas no son reparadas pueden bloquear el avance de la maquinaria de replicación y provocar la muerte celular. Por ello, las células disponen de diversos sistemas de reparación de estos daños, entre los que cabe destacar el sistema de reparación por escisión de nucleótidos y el sistema de reparación por escisión de bases.

4) Daño oxidativo en proteínas

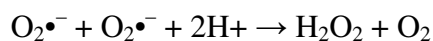
Las proteínas son la principal diana de las EROs debido a su abundancia en los sistemas biológicos y a sus elevadas constantes de reacción con los oxidantes. La oxidación de las proteínas puede tener lugar a varios niveles, pudiendo afectarse tanto el esqueleto peptídico como las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos, en función del tipo de ERO y de diversos factores adicionales. Así, el OH^\bullet , debido a su alta reactividad, es capaz de producir oxidaciones inespecíficas. Sin embargo, otras EROs son más selectivas en su capacidad oxidativa (Davies 2005). Entre los aminoácidos, los residuos que contienen azufre, cisteína y metionina son los más susceptibles a sufrir oxidación. En general, las cisteínas también pueden sufrir nitrosilación, sulfurilación y acilación, desencadenadas por ON, ácido sulfhídrico y acil-CoA, respectivamente, así como generar tiohemiacetales de forma reversible por reacción con aldehídos (Jones 2010). La oxidación de cisteínas en determinadas proteínas se ha llegado a relacionar con determinadas condiciones patológicas como la diabetes, enfermedades cardiovasculares y pulmonares, cáncer y enfermedades neurodegenerativas (Mieyal, Gallogly et al. 2008). La carbonilación es otra modificación oxidativa muy común de las proteínas. Las cadenas laterales de los residuos de lisina, arginina, prolina y treonina pueden oxidarse a grupos aldehídos y cetonas reactivos (Rinalducci, Murgiano et al. 2008). La carbonilación de proteínas se considera un marcador del daño oxidativo producido en las proteínas bajo condiciones de estrés oxidativo (Butterfield and Kanski 2001; Valko, Rhodes et al. 2006). Además de la modificación de las cadenas laterales de los aminoácidos, los enlaces peptídicos también son susceptibles de ser atacados por los radicales libres. Estos enlaces pueden romperse tras la oxidación de residuos de prolina por OH^\bullet o $\text{O}_2^{\bullet-}$. Las proteínas oxidadas que no se reparan son degradadas, bien por el proteosoma bien por autofagia (Wooten, Hu et al. 2006).

2.4.3.b. Defensa celular frente al estrés oxidativo

Halliwell, en el año 1995, definió a los antioxidantes como sustancias que, ya sea directa o indirectamente, protegen a las células contra los efectos adversos de xenobióticos, drogas, carcinógenos y reacciones tóxicas (Halliwell, Aeschbach et al. 1995). Los antioxidantes pueden eliminar directamente las diferentes EROs o pueden estimular los mecanismos de detoxificación celulares, previniendo así el desarrollo de numerosos procesos patológicos. Los sistemas antioxidantes celulares pueden clasificarse en enzimáticos y no enzimáticos. El primer grupo de ellos incluye proteínas tales como SOD, CAT, GPX, hemoxigenasa (HO), TRX, peroxirredoxina (PRDX) o glutarredoxina (GRX) (Mates, Perez-Gomez et al. 1999). Los antioxidantes no enzimáticos incluyen a moléculas como el GSH, α -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), flavonoides naturales, carotenoides, ácido lipoico, melatonina y otros (McCall and Frei 1999).

En respuesta a una situación de estrés oxidativo, las células activan rutas de señalización y factores de transcripción específicos que desencadenan la expresión de proteínas antioxidantes encargadas de restablecer los niveles redox intracelulares y de reparar los desperfectos causados por los oxidantes. Los sistemas dependientes de TRX y de GSH son los encargados de mantener en su estado reducido el potencial redox intracelular que, junto a la generación de EROs, controla los mecanismos redox de señalización celular dependientes de grupos tioles (Arner and Holmgren 2000). Ambos sistemas utilizan el poder reductor del NADPH generado principalmente en el proceso de oxidación de la glucosa a través de la ruta de las pentosas fosfato. A continuación, se describen brevemente las principales enzimas antioxidantes cuya expresión ha sido determinada en esta tesis doctoral:

– **Superóxido dismutasa:** constituye una de las primeras barreras de la defensa antioxidante celular. Cataliza la reacción de eliminación de $O_2^{\bullet-}$ mediante su transformación en H_2O_2 , el cual puede ser posteriormente eliminado por la acción de la CAT o GPX.

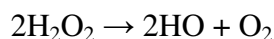


Existen tres tipos de SOD (Mates, Perez-Gomez et al. 1999): Cu/Zn SOD citosólica o SOD1 (con un átomo de cobre y otro de zinc en su sitio activo unidos por interacciones hidrofóbicas y electrostáticas), Mn-SOD o SOD2 mitocondrial (con un átomo de Mn en su sitio activo) y EC-SOD o SOD3 extracelular (de naturaleza glicoproteica). La regulación

Introducción

de la expresión de SOD tiene lugar por acción de citoquinas y mediadores inflamatorios (Kemp, Gray et al. 2010).

– **Catalasa:** es una de las enzimas más eficientes al no poder ser saturada por sustrato. Cataliza la siguiente reacción:



La CAT es un tetrámero de 4 cadenas polipeptídicas con 4 grupos hemo porfirina que permiten a la CAT reaccionar con el H_2O_2 . La CAT se localiza normalmente en los peroxisomas y, aunque no es esencial para algunos tipos de células en condiciones normales, tiene un importante papel en la adquisición de tolerancia al estrés oxidativo en la respuesta adaptativa de las células.

– **Glutación peroxidasa:** es una proteína formada por cuatro subunidades idénticas, conteniendo cada una de ellas un residuo de selenocisteína esencial para su actividad enzimática. La GPX es capaz de catalizar la reacción llevada a cabo por la CAT y, además, la reducción de diferentes hidroperóxidos (ROOH y H_2O_2) usando el poder reductor del GSH según la siguiente reacción:



En mamíferos se han identificado 7 isoenzimas de GPX, presentes en diferentes tejidos y estructuras celulares: GPX1 (citoplasmática), GPX2 (citoplasmática y sintetizada en hígado y tracto gastrointestinal), GPX3 (plasmática), GPX4 (citoplasmática, nuclear y mitocondrial), GPX5 (secretada al epidídimo genital), GPX6 (secretada y expresada en el epitelio olfativo) y GPX7 (secretada al medio extracelular). Entre todas, la GPX4 es la que presenta mayor capacidad antioxidante, ya que reduce directamente los fosfolípidos hidroperóxidos existentes en membranas y lipoproteínas (Maiorino, Thomas et al. 1991).

– **Tiorredoxina:** es uno de los principales sistemas de control redox celular (Figura 10). Existen dos isoformas: TRX-1, citoplasmática, y TRX-2, mitocondrial. Ambas son selenoproteínas mantenidas en estado reducido mediante la acción del NADPH y las tiorredoxina reductasa-1 (TRXR1) y -2 (TRXR2), respectivamente (Holmgren 1985; Arner and Holmgren 2000; Damdimopoulos, Miranda-Vizueté et al. 2002). A través de la reacción redox reversible de la TRX-1 se puede regular la actividad de diferentes sustratos proteicos en numerosas rutas, incluyendo miembros de la familia de las PRDX, que tienen como función principal la degradación de H_2O_2 (Rhee, Chae et al. 2005). La TRX-1 y -2 comparten sistemas de acción similares y participan en el control redox asociado a diversas

patologías donde el estrés oxidativo tiene un papel relevante, como en la isquemia aguda tisular (Aota, Matsuda et al. 1996). Así, se han detectado elevados niveles plasmáticos de TRX en pacientes de CHC.

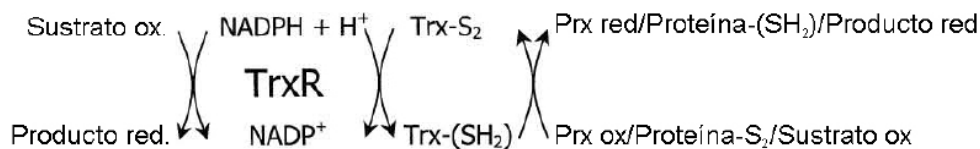


Figura 10. Reacciones enzimáticas del sistema tiorredoxina. La enzima tiorredoxina reductasa (TrxR) reduce directamente el centro activo disulfuro presente en la proteína tiorredoxina (Trx) y en otros diversos sustratos, bajo el consumo de NADPH. La Trx es altamente eficiente reduciendo disulfuros en proteínas y péptidos, incluyendo las peroxirredoxinas (Prx) y el glutatión oxidado (GSH). (Imagen modificada de Arner E, 2000)

– **Peroxiirredoxina:** son un grupo de peroxidases que contribuyen al control redox celular gracias a su capacidad de eliminar hidroperóxidos orgánicos (LOOH) y H_2O_2 (Rhee, Chae et al. 2005). Existen diferentes tipos de PRDX según su localización intracelular: citoplasma, mitocondria, medio extracelular y peroxisoma. Todas ellas poseen un sitio catalítico, cisteína peroxidásica (cisteína reactiva, Cys- S_pH), que es oxidado a ácido sulfénico (Cys-SOH) por el peróxido. Dicho ácido rápidamente forma puentes disulfuro con otro residuo de cisteína en la subunidad C-terminal. La regeneración de la cisteína es catalizada por el sistema TRX/TRXR (Wood, Schroder et al. 2003).

2.4.3. Actividad fisiológica de las EROs

Como se ha comentado, las EROs pueden modular directa o indirectamente la función de muchas enzimas y factores de transcripción a través de diferentes cascadas de señalización. En último término, estas señales producen cambios en la expresión génica. Así, se sabe que las EROs pueden actuar como segundos mensajeros promoviendo la activación de la transcripción, apoptosis, crecimiento celular o quimiotaxis (Thannickal and Fanburg 2000; Dragin, Smani et al. 2006), e incluso actuar en la defensa contra agentes infecciosos (DeLeo and Quinn 1996). Es decir, las EROs tienen la capacidad de regular la función celular.

En particular, las EROs ejercen un importante papel regulador sobre la biogénesis mitocondrial (Moreno-Loshuertos, Acin-Perez et al. 2006). En células humanas, el ADNmt es más susceptible al daño oxidativo que el ADNn, debido a su exposición a altos niveles

de EROs generados durante la respiración, falta de histonas protectoras y la limitada capacidad de reparación de daños. En consecuencia, el ADNmt adquiere mutaciones a una tasa más alta que el ADNn (Ames, Shigenaga et al. 1993). De esta forma, el exceso en la producción de EROs provoca un daño oxidativo que inicia el proceso de envejecimiento o muerte celular. No obstante, el estrés oxidativo también tiene un papel fundamental en el aumento de la abundancia mitocondrial y en el número de copias de ADNmt de las células humanas y animales, que garantiza la supervivencia celular (Lee and Wei 2005). En este sentido, se ha observado que el incremento de la biogénesis mitocondrial mediada por EROs actúa como mecanismo compensatorio para ocultar las diferencias energéticas y respiratorias de las células (Moreno-Loshuertos, Acin-Perez et al. 2006).

2.5. Óxido Nítrico

2.5.1. Aspectos biológicos y fisiológicos del óxido nítrico

El ON es una molécula gaseosa que fue considerada un contaminante atmosférico hasta que, a partir de 1987, diversos estudios demostraron que era sintetizado *in vivo* y que, además, era responsable de una serie de procesos fisiológicos incluyendo la vasodilatación, inhibición de la agregación plaquetaria, neurotransmisión y actividad antimicrobiana (Knowles, Palacios et al. 1989; Rees, Palmer et al. 1989; Stuehr, Gross et al. 1989; Moncada, Rees et al. 1991). En el interior celular, el ON es sintetizado mediante el catabolismo de L-arginina a L-citrulina, a través de una compleja reacción catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) (Figura 11) (Knowles and Moncada 1994; Marletta 1994; Alderton, Cooper et al. 2001).

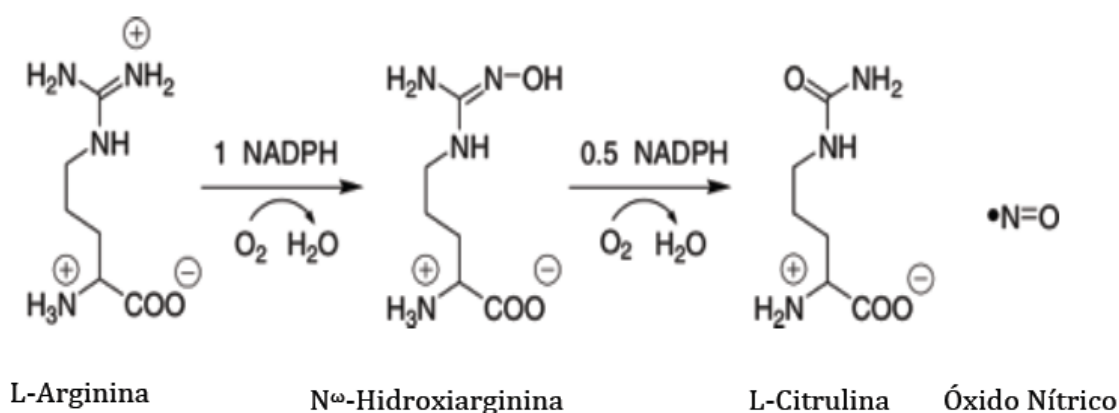


Figura 11. Reacción de síntesis de óxido nítrico catalizada por la óxido nítrico sintasa.

En mamíferos, las células están dotadas con tres isoformas de la NOS, codificadas por tres genes distintos, cuya actividad resulta de su ensamblaje en forma de dímeros (130-150kDa/monómero) que poseen en su sitio activo una flavina, un grupo hemo y un sitio de unión para el complejo Ca^{2+} -calmodulina. A continuación, se enumeran estas tres isoformas:

- **NOS1** ó isoforma neuronal (nNOS): se clonó inicialmente de células neuronales, se expresa de forma constitutiva y es dependiente de la concentración de calcio.

- **NOS2** ó isoforma inducible (iNOS): se identificó inicialmente en macrófagos, se expresa de forma inducible y es independiente de calcio. Es inducida por estímulos inmunológicos en células de mamíferos. Una vez inducida, la enzima puede producir altas concentraciones ON durante horas e incluso días.

- **NOS3** ó isoforma endotelial (eNOS): se clonó inicialmente en células endoteliales, se expresa de forma constitutiva y es dependiente de la concentración de calcio.

Aparte de estas, ha sido descrita una cuarta isoforma adicional como la NOS mitocondrial. Sin embargo, mientras que unos autores afirman que se trata de una isomorfa nueva, de localización exclusivamente mitocondrial, otros autores argumentan que podría tratarse de la NOS1 ó NOS3, capaces de ser importadas hacia dicho orgánulo (Kanai, Pearce et al. 2001; Elfering, Sarkela et al. 2002; Gao, Chen et al. 2004; Zaobornyj and Ghafourifar 2012; Tengan and Moraes 2017).

El ON tiene una vida media corta, siendo capaz de difundir fácilmente a través de las membranas celulares y reaccionar con diversas dianas moleculares, actuando como una importante molécula de señalización celular o segundo mensajero. Las acciones del ON son altamente dependientes de su concentración celular, la cual varía en función de la isoforma expresada por un tipo celular concreto que se encuentra expuesto a unas circunstancias determinadas. A dosis bajas, relacionado con la actividad NOS3, la acción del ON se asocia con la regulación de funciones fisiológicas tales como el tono vascular o la neurotransmisión, a través de la estimulación de la guanilato ciclasa soluble (GCs), el incremento de guanósín monofosfato cíclico (GMPC) y la activación de la proteína quinasa G (PKG) (Stone and Marletta 1994). A dosis moderadas o altas, de manera equivalente a lo que ocurre tras la inducción de la isoforma NOS2, la actividad del ON ha sido relacionada con los procesos de supervivencia celular (dependientes o no de GMPC) y la inducción de apoptosis (Figura 12).

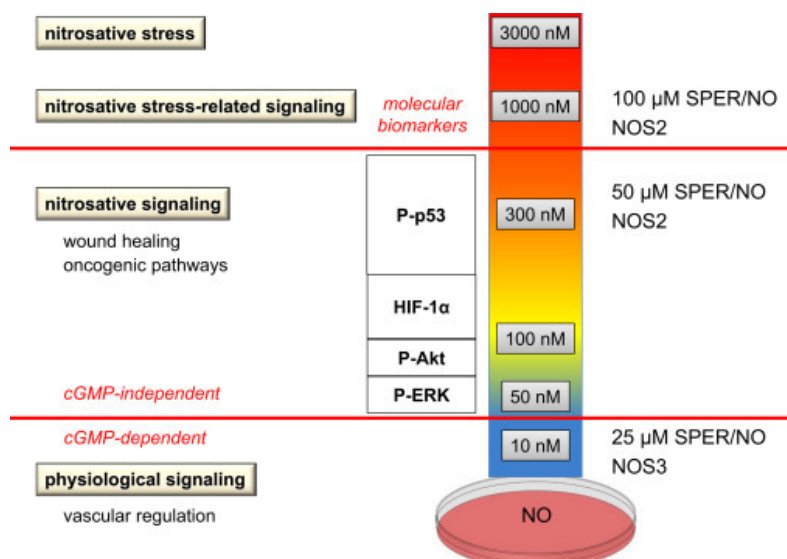


Figura 12. Actividad del óxido nítrico dependiente de su concentración. Imagen de(Thomas, Heinecke et al. 2015)

Debido al elevado número de proteínas y moléculas cuya actividad puede ser moduladas por el ON, resulta fácil aceptar la diversidad de efectos biológicos a los que ha sido asociada su actividad. Entre otros, se incluyen la inhibición de la agregación plaquetaria o la actividad antimicrobiana (Figura 13). Del mismo modo, como consecuencia del elevado número de efectos biológicos del ON, la desregulación de su síntesis se ha asociado al desarrollo de múltiples condiciones patológicas, incluyendo la artritis, la aterosclerosis, la diabetes, las enfermedades degenerativas neuronales, el infarto cerebral, el infarto de miocardio o el cáncer (Culotta and Koshland 1992; Gross and Wolin 1995; Taysi, Uslu et al. 2003).

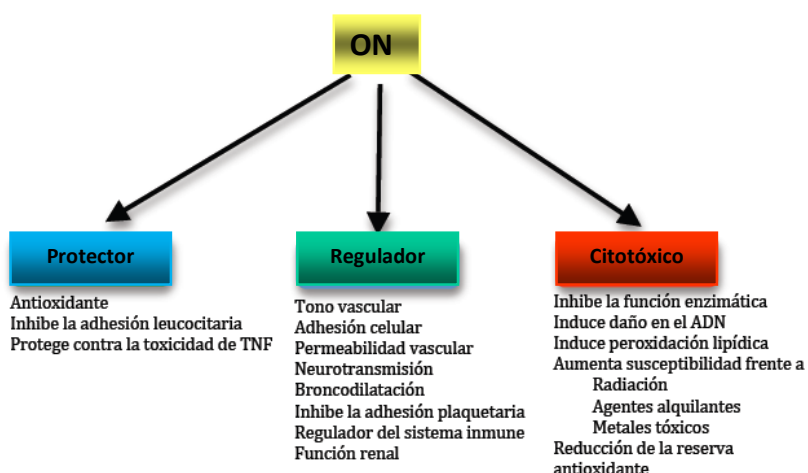


Figura 13. Efectos biológicos del óxido nítrico.

En el hígado, considerando la cantidad de funciones que este órgano desempeña en diversos procesos metabólicos e inmunes, la modificación de proteínas mediada por ON y su implicación fisiológica han sido objeto de estudio en los últimos años. Ambos efectos del ON, citoprotector y citotóxico, han sido demostrados en el hígado (Li and Billiar 1999; Ronco, Alvarez Mde et al. 2004; Wiley 2007), donde NOS2 y NOS3 son las principales isoformas que se expresan. Así, mientras que el ON derivado de NOS3 parece ejercer un efecto protector frente a distintas patologías hepáticas, el que se produce a través de NOS2 actúa principalmente como mediador proinflamatorio y potencialmente oncogénico (Iwakiri and Kim 2015).

La expresión de NOS2 puede ser inducida en diferentes células del hígado, incluyendo las células endoteliales sinusoidales, los hepatocitos, las células de Kupffer, las células estrelladas, las células musculares lisas, los colangiocitos y otras células inmunes (Ishimura, Bronk et al. 2005; Abu-Amara, Yang et al. 2012; Carnovale and Ronco 2012). Una vez que se induce su expresión, se genera una elevada cantidad de ON de manera sostenida, que funciona como un importante regulador y efector durante la infección y la inflamación (Ronco, Alvarez Mde et al. 2004). Entre las distintas condiciones que regulan la expresión de NOS2 en el hígado se encuentran la endotoxemia, el shock hemorrágico, la isquemia-reperfusión, la sepsis, la hepatitis, la exposición a ozono o la regeneración hepática (Martin-Sanz, Hortelano et al. 2002). Nuestro grupo ha demostrado que la regulación de la expresión de NOS2 por PGE1 (Muntane, Rodriguez et al. 2000) (Siendones, Fouad et al. 2004) y α -tocoferol (Gonzalez, Collado et al. 2007) contribuye al efecto protector que ejercen ambas moléculas durante la hepatotoxicidad por D-galactosamina.

Por otro lado, la expresión de NOS3 en el hígado ocurre de manera mayoritaria a partir de las células endoteliales sinusoidales y las células endoteliales de la arteria hepática, vena porta, vena central y vasos linfáticos. En condiciones normales, la expresión de NOS3 es constitutiva y es responsable de la liberación de una pequeña cantidad de ON en respuesta a estímulos tales como el estrés y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). El ON derivado de NOS3 mantiene la homeostasis del hígado, regula la perfusión hepática e inhibe las condiciones patológicas en el hígado, entre otras funciones. Por tanto, el ON puede tener distintos efectos en el hígado dependiendo de la fuente que lo produce (Iwakiri and Kim 2015).

2.5.2. Óxido nítrico y estrés nitro-oxidativo

Como hemos visto anteriormente, las EROs producidas como consecuencia del metabolismo aeróbico normal o cuando un organismo es expuesto a una variedad de estímulos, pueden causar un daño general a las moléculas biológicas (Gutierrez, Ballinger et al. 2006), siendo particularmente sensibles los grupos tioles de las proteínas. De manera similar, el ON puede modular la actividad celular mediante la modificación post-traduccionales de proteínas. Dicha modificación puede ocurrir de manera directa o a través de la interacción del ON con otras EROs para formar las distintas ERNs. En la figura 14 se muestran las relaciones químicas entre las diferentes EROs y ERNs, así como algunas de las modificaciones post-traduccionales en las que participan, tales como la S-nitrosilación en cisteína, la glutatiónilación y la nitración de tirosina (Martinez-Ruiz and Lamas 2004; Martinez-Ruiz and Lamas 2004). La reacción entre el ON y el $O_2^{\bullet-}$ genera $ONOO^-$, que es altamente reactivo (Beckman, Beckman et al. 1990) y capaz de dañar a una gran variedad de moléculas, incluyendo el ADN y las proteínas, y causar la muerte celular (Meguro, Katsuramaki et al. 2003; Figueira, Barros et al. 2013). Por tanto, al estar relacionada con una elevada producción de ON, la actividad NOS2 es muy importante en este proceso.

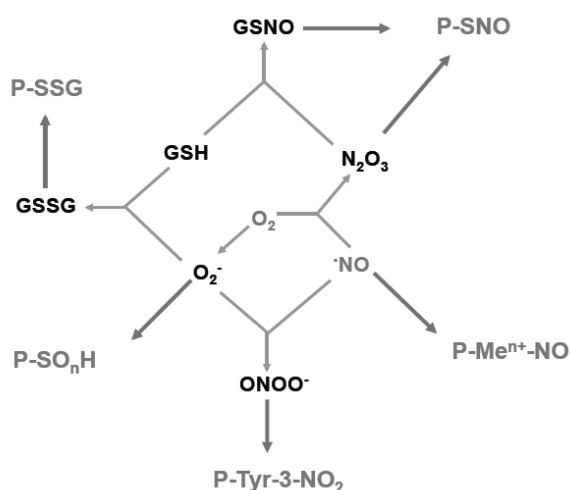


Figura 14. Relaciones químicas entre las diferentes EROs y ERNs y su influencia en algunas modificaciones post-traduccionales de proteínas. Imagen modificada de Martinez-Ruiz, 2004.

La reacción más común del $ONOO^-$ con los aminoácidos es la oxidación de cisteína y, aunque no directamente, la nitración de tirosina. Estas reacciones afectan a la estructura y función proteica y, por tanto, a la viabilidad celular (Abdelmegeed and Song 2014). Cabe destacar que el $ONOO^-$ puede afectar a la fosforilación oxidativa a través de la inhibición de los complejos respiratorios mitocondriales CI, CIII y CV. Además, el $ONOO^-$ puede

reaccionar con otras moléculas para formar otras ERNs tales como el dióxido de nitrógeno (NO_2), el trióxido de dinitrógeno (N_2O_3) u otros tipos de radicales libres como el nitrosoperoxicarbonato (ONOOCO_2^-) o el radical carbonato ($\text{O}=\text{C}(\text{O}\cdot)\text{O}^-$).

2.5.3. Óxido nítrico en cáncer

En las dos últimas décadas, la función del ON en la regulación del proceso tumoral ha sido extensamente investigado (Wink, Vodovotz et al. 1998; Williams and Djamgoz 2005; Cheng, Wang et al. 2014). Según se ha indicado anteriormente, la activación de GMPc y otros mecanismos independientes de GMPc que tienen lugar a dosis bajas de ON participan en la supervivencia celular y pueden tener carácter oncogénico. Por otro lado, los niveles elevados de ON ($\geq 100\text{nM}$) se relacionan con ciertas propiedades antitumorales (Dong, Staroselsky et al. 1994; Xie, Huang et al. 1995; Xie, Dong et al. 1996; Cheng, Wang et al. 2014). En este sentido, el ON induce la acumulación de la oncoproteína p53, la cual actúa como un punto de control en el ciclo celular permitiendo la reparación del daño en el ADN. Cuando dicha reparación no es posible, p53 actúa como transactivador del gen proapoptótico BAX y transrepressor del gen antiapoptótico BCL-2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*), activando la vía apoptótica de muerte celular (Inoue, Tomiya et al. 2002; Chae, Park et al. 2004; Ronco, Alvarez Mde et al. 2004). Sin embargo, existen diferentes estudios *in vitro* cuyos resultados indican la presencia de mutaciones de importancia biológica en el oncogén p53 inducidas por ON (Murata, Tada et al. 1997). De hecho, este oncogén se encuentra mutado en alrededor del 50% de todos los tumores humanos (Oren 1999). Es más, en estadios iniciales del carcinoma de pulmón existe una correlación significativa entre la actividad NOS y la presencia de mutaciones en p53 (Fujimoto, Sasaki et al. 1998). En el caso de NOS2, p53 actúa como un inhibidor de su expresión mediante retroalimentación negativa, en condiciones de elevada concentración de ON celular (Ambs, Merriam et al. 1998). Esta relación tiene implicaciones importantes en el cáncer. De este modo, se ha sugerido que en diversas situaciones, como la inflamación, el ON puede provocar la inactivación del gen p53 y favorecer el desarrollo tumoral. Por lo tanto, el ON puede tener también actividad mutagénica y promover la formación y progresión del cáncer (Tozer, Prise et al. 1997; Felley-Bosco 1998; Bing, Miyataka et al. 2001). Así pues, no resulta fácil clasificar al ON como molécula pro- o antitumoral, ya que depende de diversos factores como el tipo celular (Ishikawa, Yoshida et al. 2003), la dosis (Le, Wei et al. 2005), el órgano involucrado (Ishikawa, Yoshida et al. 2003) o incluso la etapa de influencia metastásica (Cheng, Wang et al. 2014). En el hígado, la expresión de las

isoformas inducible y endotelial de la NOS ha sido relacionada con el desarrollo de cáncer a través de actividades pro- y antiapoptóticas. En el caso concreto de la NOS2, su actividad ha sido asociada con la modulación de varios eventos relacionados con el cáncer, como la angiogénesis, la apoptosis, el ciclo celular, la invasión o la metástasis (Muntane and la Mata 2010). Por el contrario, la activación de NOS3 se ha relacionado con la inhibición del crecimiento y proliferación de células de CHC (Diaz-Troya, Najib et al. 2005). Además, el uso de moléculas donadoras de ON ha demostrado poseer propiedades antitumorales *in vitro* e *in vivo* (Rigas and Williams 2008; Gonzalez, Ferrin et al. 2013). Los mecanismos a través de los que el ON ejerce su actividad antitumoral han sido relacionados con la inhibición de la CTE mitocondrial y la inducción de estrés nitro-oxidativo (Riobo, Clementi et al. 2001; Sarti, Forte et al. 2012).

2.6. Muerte Celular

La muerte celular no es solamente un evento que tenga lugar durante el desarrollo embrionario para la destrucción/generación de nuevos tejidos, sino que también tiene lugar en el organismo adulto para el recambio celular como consecuencia de su senescencia o afectación patológica. La muerte celular es esencial en la homeostasis del organismo, pues elimina las células con lesiones importantes en su función celular (disfunción mitocondrial y/o permeabilidad de la membrana plasmática) y por la acumulación de mutaciones en el ADN celular. Atendiendo a criterios morfológicos y bioquímicos, se han identificado cuatro tipos de muerte celular: autofagia, apoptosis, necroptosis y necrosis. El proceso de autofagia es consecuencia de los procesos de adaptación a cambios homeostáticos del entorno celular. Los procesos de apoptosis y necrosis ocurren como consecuencia de alteraciones o daños importantes en la permeabilidad celular, la función celular o en estructuras celulares. Existe una transición (subrutina de la necrosis) entre ambas formas de muerte celular denominada necroapoptosis (necroptosis), que posee características mixtas de ambas en relación con el grado de alteración de la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial y/o disfunción mitocondrial. Aún con ciertas variaciones, una célula muere por apoptosis o necrosis según la naturaleza, magnitud y tiempo de aplicación del estímulo inductor de muerte, así como el tipo de célula afectada, la etapa de desarrollo del tejido y el estado fisiológico celular (Fiers, Beyaert et al. 1999).

2.6.1 Autofagia

La autofagia se define como un tipo de muerte celular que se produce en ausencia de condensación de cromatina, pero acompañada por la vacuolización autofágica máxima del citoplasma. La autofagia es un proceso catabólico, altamente regulado y conservado en organismos eucariotas, que está caracterizado por el secuestro de material citoplasmático y orgánulos intracelulares dentro de unas vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas (Levine and Kroemer 2008), que se fusionan con los lisosomas para ser degradados por enzimas hidrolíticas ó hidrolasas (Nikoletopoulou, Markaki et al. 2013). La activación de dichas enzimas requiere un pH más ácido que el del citosol, pH 5, que se logra por la acción de una bomba de protones en la membrana lisosomal (V-ATPasa). La membrana del lisosoma es impermeable a dichas enzimas y resistente a la acción de éstas. Una vez que los autofagosomas se han fusionado con los lisosomas, las vesículas resultantes se denominan autolisosomas, y en ellos se lleva a cabo el reciclaje de las macromoléculas resultantes de la digestión (Figura 15).

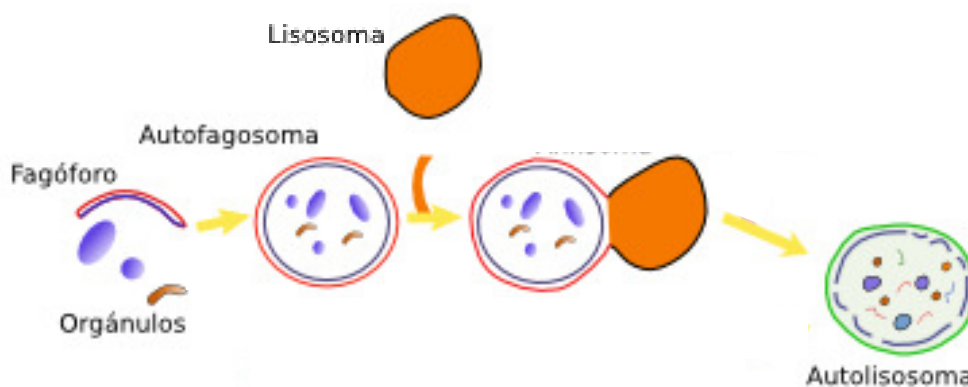


Figura 15. Proceso de autofagia. Tras la aparición del fagóforo se produce el cierre de sus membranas y se forma el autofagosoma, que está rodeado por una doble membrana. Tras esto, se fusiona con un lisosoma para formar el autolisosoma, donde se degrada su contenido y la membrana interna. (Modificado de Klionsky 2007).

El proceso de autólisis juega un papel esencial en la adaptación celular a las condiciones ambientales cambiantes, en la remodelación celular durante el desarrollo y en la eliminación de orgánulos alterados durante condiciones adversas o durante el envejecimiento (Bergamini, Cavallini et al. 2007). Distintos estudios muestran que la autofagia es clave para la producción de vacunas más eficaces (contra la tuberculosis) (Jagannath, Lindsey et al. 2009), en la comprensión del cáncer (gliomas) (Salazar, Carracedo et al. 2009) y otros procesos de patogénesis.

2.6.2. Necrosis

La muerte celular por necrosis se produce en situaciones patológicas y en condiciones de lesión grave (tóxicos, trauma mecánico, etc.), cuando se origina un daño importante de las membranas celulares. La alteración de las funciones normales de la membrana plasmática compromete su capacidad para el mantenimiento de la homeostasis celular y conlleva la entrada descontrolada de iones y agua del medio extracelular hacia el interior celular, provocando un aumento del volumen de la propia célula y de las diferentes estructuras citoplasmáticas (RE, mitocondrias, ...) que conduce a la rotura de su estructura. En esta “explosión celular” se produce la ruptura de la membrana plasmática y la lisis celular, con la consecuente liberación al medio extracelular de enzimas lisosomales que completan la lisis de los componentes celulares y, a su vez, dañan al tejido circundante (Figura 16). La liberación del contenido citoplasmático atrae a los macrófagos y otras células del sistema inmunitario, que originan una intensa respuesta inflamatoria con la liberación de citoquinas, radicales libres y proteasas al medio extracelular, incrementando el daño tisular (Nikoletopoulou, Markaki et al. 2013). A diferencia de lo que ocurre en la muerte celular por apoptosis, el núcleo se vuelve distendido y sigue en gran parte intacto.

El fenómeno de necrosis incluye alteraciones mitocondriales, con generación de estrés nitro-oxidativo y permeabilización de la membrana mitocondrial (Nicotera, Bernassola et al. 1999), cambios lisosomales, cambios nucleares y degradación lipídica (Kroemer, Galluzzi et al. 2009). La alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática incrementa la concentración de Ca^{2+} , que activa a la calpaína e induce la liberación de enzimas lisosomales como las catepsinas de tipo B, D, H y L (Nicotera and Melino 2004; Festjens, Vanden Berghe et al. 2006). Las catepsinas son enzimas con actividad proteolítica, que se encuentran en tejidos animales y que participan en la degradación de las proteínas, catalizando su hidrólisis a polipéptidos. Además de su papel fundamental en el recambio proteico celular, las catepsinas han sido involucradas en diversas patologías humanas, incluyendo el cáncer (Zaragoza, Torres et al. 2009).

2.6.3. Necroptosis

La necroptosis representa una muerte celular programada con características similares a la necrosis, pero que guarda relación con la apoptosis en que es regulada por ATP, p53 y la familia de las proteínas BCL. La necroptosis también se asocia a la

generación de EROs y, a diferencia de la apoptosis, no implica la fragmentación del ADN (Wu et al. 2011).

Tanto la estimulación de los receptores de muerte celular proapoptóticos TNFR1(*tumor necrosis factor receptor*), TNFR2, TRAIL1-2 (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) y Fas, como el daño al ADN, pueden inducir necroptosis en condiciones de baja concentración de ATP o en presencia de inhibidores de caspasas. De todas ellas, la señalización mediante la vía de TNF- α es considerada la más importante. La caspasa-8 es el inhibidor principal de la necroptosis, siendo una de sus dianas el receptor de interacción de la proteína quinasa RIPK1(*receptor interacting protein kinase*), un transductor de señal crucial para dicho proceso. RIPK1 y RIPK3 regulan la necroptosis y determinan la respuesta necrótica al TNF- α mediante la formación del necrosoma, el cual incluye a FADD (*Fas-associated protein with a Death Domain*), cFLIP (*FLICE-inhibitory protein*) y caspasa-8. Dentro del necrosoma (o riptosoma), RIPK3 fosforila a la proteína quinasa MLKL (*lineage kinase domain-like protein*), la cual se integra en la membrana plasmática y facilita la liberación de componentes intracelulares al medio extracelular. Este proceso conlleva una respuesta inflamatoria y la ruptura de la membrana celular. La poli(ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1) también ha sido sugerida como elemento participativo durante la necroptosis, funcionando a modo de interruptor entre los procesos de apoptosis y necrosis. Además de la caspasa-8, los IAP (inhibidores apoptóticos) también pueden contrarrestar la necroptosis por poliubiquitinación de RIPK1, resultando en la activación del factor de transcripción NF- κ B(Mazzolini, Sowa et al. 2016).

Respecto a la participación del proceso de necroptosis en la fisiopatología hepática, debido a la baja expresión de RIPK3 en el hígado, continúa siendo tema de debate. No obstante, cabe señalar que esta observación no se cumple en el caso de la NASH (Mazzolini, Sowa et al. 2016).

2.6.4. Apoptosis

La muerte celular por apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso de muerte activo, con gasto energético y controlado genéticamente, cuya finalidad es eliminar células no necesarias o dañadas. El nombre de apoptosis fue propuesto por Kerr y cols. en 1972, y deriva del griego Apo y Ptois, que significa la caída o prolapso de un órgano o parte de él. Constituye un procedimiento de autodestrucción celular que sucede como parte del desarrollo normal del organismo y como respuesta a una variedad de estímulos

Introducción

fisiológicos o patológicos. Este tipo de muerte origina cambios estructurales en las células, que conducen a su redondeo morfológico, la reducción del volumen celular, condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y subfraccionamiento celular mediante invaginaciones de la membrana plasmática, para formar pequeños corpúsculos, denominados cuerpos apoptóticos, que contienen diversos componentes celulares. Finalmente, y a diferencia de la necrosis, estos restos celulares son captados por las células fagocíticas sin originar una respuesta inflamatoria. Así pues, el proceso apoptótico es identificado y distinguido del necrótico por sus características tanto morfológicas como bioquímicas (Cohen 1993). La figura 16 muestra las características diferenciales entre apoptosis y necrosis. La apoptosis es una forma común de muerte celular durante la embriogénesis, tumorigénesis y selección clonal del sistema inmune (Ellis, Yuan et al. 1991; Schwartzman and Cidlowski 1993). Sin embargo, la desregulación de dicho proceso se asocia con varias enfermedades, incluyendo muchas dolencias hepáticas.

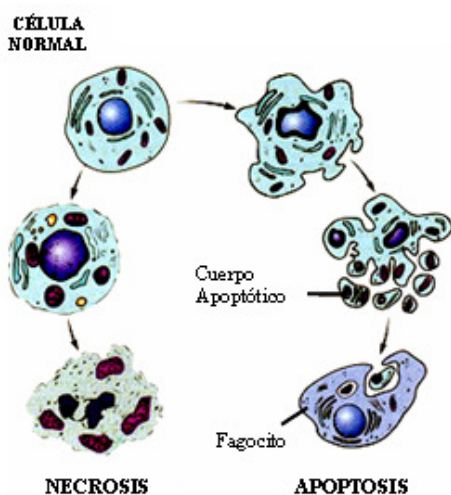


Figura 16. Cambios morfológicos de una célula durante la muerte celular por necrosis y apoptosis. Información obtenida a través de la página web (<http://www.cecs.cl/web/>).

Los efectores de la apoptosis son enzimas que se activan en la fase final de esta vía o proceso, y que inician el programa de destrucción celular. Entre estos destacan las endonucleasas y las proteasas. Las caspasas son proteasas que pertenecen a este grupo de efectores y que se caracterizan por presentar una cisteína en su centro activo y por reconocer un residuo de aspartato dentro de su secuencia diana, de ahí su nombre: Cisteinil-ASpartato-proteASAS. Durante la apoptosis, la activación secuencial de las caspasas permite la amplificación rápida de la señal de muerte celular. Las distintas caspasas que participan en dicho proceso pueden dividirse en dos grupos: caspasas iniciadoras (caspasa-2, -8, -9, -10 y 12) y caspasas efectoras o ejecutoras (caspasa-3, -6 y -

7) (Boatright and Salvesen 2003). Las caspasas iniciadoras son activadas en respuesta a señales de estrés, de daño celular o de muerte, y participan en la activación proteolítica del segundo grupo de caspasas, cuya actividad se relaciona directamente con el cambio morfológico celular observado durante este proceso. La principal caspasa efectora es la caspasa-3, aunque también ejercen funciones ejecutoras las caspasas-6 y-7. La caspasa-3 es responsable de la condensación de la cromatina, la fragmentación del ADN y la formación de los cuerpos apoptóticos mediante la activación y proteólisis de otros sustratos. Asimismo, existen una serie de caspasas inflamatorias (caspasa-1, -4, -5 y -14) que están implicadas en la proteólisis y liberación de las citoquinas en las células inflamatorias (Boatright and Salvesen 2003; Fuentes-Prior and Salvesen 2004). En cualquier caso, la activación de las caspasas es dependiente de ATP (Elmore 2007).

2.6.3.a. Vías de inducción de apoptosis

Existen dos vías de inducción de apoptosis: una vía extrínseca, en la que una señal externa interacciona con una serie de receptores de muerte de la membrana celular (Locksley, Killeen et al. 2001), y una vía intrínseca o mitocondrial, activada por estrés (radiaciones, ...) o agentes genotóxicos (drogas, toxinas, ...), en la que se produce la activación de la maquinaria apoptótica mitocondrial (Newmeyer and Ferguson-Miller 2003). Estos estímulos, sean externos o internos a la célula, constituyen el primer paso del proceso de apoptosis. A partir de este, se suceden la fase de transducción de la señal de muerte, la fase efectora y la fase post-mortem, en la que se produce la condensación de la cromatina y la degradación del ADN (Vaux and Strasser 1996).

En función de la vía de apoptosis mayoritariamente activada, las células pueden dividirse en dos tipos:

- Células de tipo I: En ellas, la muerte celular ocurre por activación de la ruta extrínseca de la apoptosis.

- Células de tipo II: En estas, la muerte celular ocurre por activación de la ruta intrínseca de la apoptosis. Los hepatocitos se incluyen dentro de esta categoría.

Sin embargo, existen evidencias de que ambas vías de muerte celular por apoptosis están conectadas, y que las moléculas de una ruta pueden influir en la otra (Igney and Krammer 2002; Elmore 2007). Algunos tipos celulares requieren esta conexión de vías como amplificación de la señal de apoptosis.

A continuación, se describen las dos vías de la apoptosis (Figura 17):

1) *Vía extrínseca de la apoptosis*

Como hemos mencionado anteriormente, a ella pertenecen las células de tipo I. Esta vía involucra a los receptores de muerte celular de la superfamilia de genes del receptor del TNF (Locksley, Killeen et al. 2001). Los miembros de la familia del receptor TNF comparten dominios extracelulares similares, ricos en cistena, y poseen un dominio citoplasmático de, aproximadamente, 80 aminoácidos, llamado dominio de muerte (DD, *death domain*). Este dominio de muerte juega un papel crítico en la transmisión intracelular de la señal de muerte desde la superficie celular. Los ligandos mejor caracterizados y sus receptores de muerte correspondientes son: FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 y Apo2L/DR5 (Elmore 2007).

La secuencia de eventos que definen la fase extrínseca de la apoptosis está mejor caracterizada a partir de los modelos FasL/FasR, TNF- α /TNFR1 y TRAIL/TRAILR1. En el caso de Fas, la unión del ligando (FasL ó CD95L) produce el reclutamiento del receptor (FasR ó CD95) a un dominio en la membrana plasmática (caveola), donde trimeriza y se asocia a una serie de moléculas adaptadoras FADD, responsables de la unión y activación de la procaspasa-8. El complejo formado por el dominio de muerte del receptor, FADD y la procaspasa-8 recibe el nombre de DISC (*Death-Inducing Signalling Complex*). La activación de la caspasa-8 dará lugar, a su vez, a la activación de una cascada de caspasas que desencadenará el proceso apoptótico. Además, esta vía extrínseca de la apoptosis está íntimamente asociada a la vía intrínseca a través de la acción de la caspasa-8 sobre la proteína BID (*BH3 interacting domain death agonist*), la cual, una vez truncada, accede a la mitocondria y favorece la liberación de cit c.

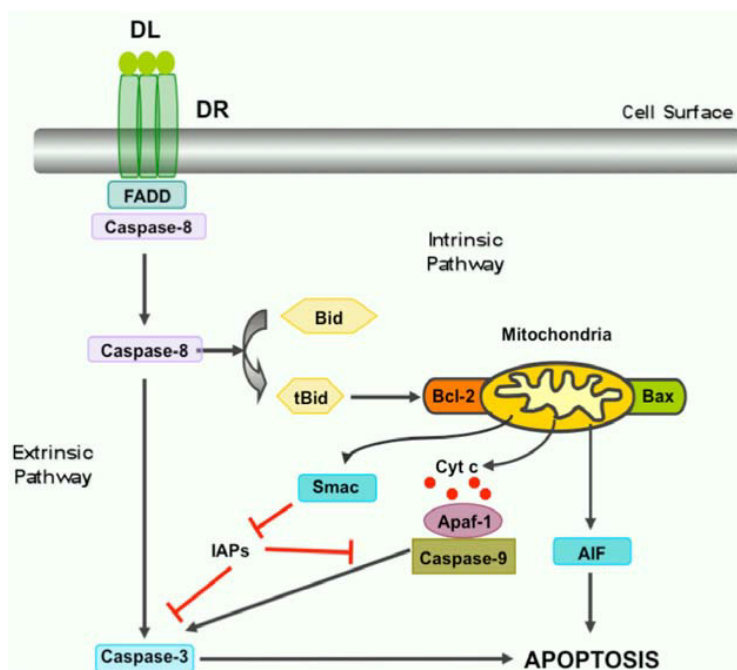


Figura 17. Vías de muerte por apoptosis. En la vía extrínseca, la activación de caspasas es desencadenada por la interacción de un ligando de muerte de la familia de TNF (TRAIL, ligando Fas/CD95, TNF- α) con sus correspondientes receptores de muerte (TRAIL-R - DR4, DR5-, Fas/CD95, TNFR1). Estas proteínas reclutan en sus dominios citosólicos a proteínas adaptadoras tales como FADD, que posteriormente se unen a procaspasa-8, activándola. En algunas células, se genera suficiente

capasa-8 para activar directamente a la caspasa-3 y otras proteasas. Por otro lado, la vía intrínseca de la apoptosis es inducida por la liberación de cit c de la mitocondria, que es provocada por estímulos tales como el incremento del nivel de proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2, tales como Bax o Bak. En el citosol, el cit c se une a las proteínas Apaf-1 y pro-caspasa-9, formando el denominado apoptosoma. La caspasa-9 puede ahora activar a la caspasa-3, desencadenando la apoptosis. La proteína SMAC/DIABLO también es liberada desde la mitocondria al citosol tras el estímulo pro-apoptótico, donde se une a proteínas inhibitoras de la apoptosis (IAPs), como XIAP, las cuales participan en la inhibición de las caspasas.

2) *Vía intrínseca de la apoptosis*

Las células de tipo II se caracterizan por inducir el proceso de apoptosis a través de esta ruta de forma mayoritaria. En ella, diversos estímulos no mediados por receptores son canalizados a través de señales intracelulares que convergen en la mitocondria. Todos estos estímulos provocan cambios en la membrana mitocondrial que se traduce en la apertura de un poro de transición relacionado con la permeabilidad mitocondrial, la pérdida de potencial transmembrana mitocondrial y la liberación de una serie de proteínas presentes en la membrana interna y el espacio intermembrana mitocondrial, tales como el cit c, las proteínas inhibitoras de las IAPs SMAC/DIABLO y HTRA2/Omi, el factor inductor de apoptosis AIF o la endonucleasa G (Du, Fang et al. 2000; Saelens, Festjens et al. 2004; Garrido, Galluzzi et al. 2006). Estas proteínas, a su vez, activan la ruta mitocondrial dependiente de caspasas.

BCL-2 es una familia de proteínas formada por alrededor de 25 miembros que regulan este proceso de permeabilización mitocondrial, y constituyen un punto clave en la vía intrínseca de apoptosis celular. Dentro de esta familia encontramos proteínas anti-apoptóticas (BCL-2, BCL1-XL, BCL-W, MCL-1, BCL2A1, etc.) y pro-apoptóticas (BAX (*BCL2 associated X protein*) BAK (*BCL2 antagonist/killer*), BAD (*BCL2 associated death promoter*), BID, BIK(*BCL2-interacting killer*), PUMA, NOXA, etc.). Durante el proceso apoptótico se produce la translocación de la forma truncada de BID a la mitocondria, la oligomerización de BAX/BAK y la liberación de cit c desde el espacio intermembrana mitocondrial hasta el citosol. Este constituye uno de los eventos clave en la vía intrínseca de la apoptosis (Danial and Korsmeyer 2004). El cit c citoplasmático se une a la proteína APAF-1 (*Apoptosis protease-activating factor-1*) y a la pro-caspasa-9, activándola. El complejo formado por cit c, APAF-1 y caspasa-9 se conoce con el nombre de apoptosoma y media la apoptosis inducida por fármacos, agentes oxidantes y factores de crecimiento a través de la activación de la caspasa-3. Esta caspasa ejecutora es, a su vez, capaz de activar a otras pro-caspasas, amplificando la cascada de activación proteolítica y favoreciendo el proceso apoptótico (Rathmell and Thompson 1999).

2.6.3.b. Regulación de la maquinaria apoptótica

La maquinaria apoptótica se encuentra finamente regulada a varios niveles. Las proteínas FLIPs (*FADD-like interleukin-1-converting enzyme (FLICE) inhibitory proteins*) interfieren directamente con el inicio de la vía extrínseca de la apoptosis a nivel de los receptores de muerte, ya que poseen homología con la pro-caspasa-8 pero carecen de su sitio catalítico (Krueger, Baumann et al. 2001). Por tanto, su estructura les permite unirse al complejo DISC, inhibiendo el procesamiento y activación de la caspasa-8.

Como se ha comentado anteriormente, los miembros de la familia BCL-2 son otro importante grupo de reguladores de la apoptosis a nivel mitocondrial (Martinou and Green 2001; Zamzami and Kroemer 2001), regulando la permeabilidad de la membrana de este orgánulo. Dentro de la familia BCL-2 existen dos subfamilias: proapoptótica y antiapoptótica. El balance entre una y otra determinará el tipo de proceso celular implicado (autofagia o apoptosis) y por tanto el destino de la célula.

Las IAPs constituyen un tercer grupo de reguladores (Deveraux and Reed 1999), capaces de unirse e inhibir a las caspasas, o promover su degradación a través de su actividad ubiquitin-ligasa. Las IAPs son a su vez reguladas por las proteínas inhibidoras de

las IAPs, como la proteína SMAC/DIABLO, que se libera de la mitocondria junto al cit c durante la apoptosis, promoviendo la activación de las caspasas (Du, Fang et al. 2000; Verhagen, Ekert et al. 2000).

2.6.3.c Permeabilización de la membrana externa mitocondrial

Existen dos modelos capaces de explicar cómo ocurre la permeabilización de la membrana externa mitocondrial durante el proceso de apoptosis:

1) Modelo de formación de canales: Propone la formación de canales multiméricos por proteínas pro-apoptóticas de la familia BCL-2, como BAX, mediante su oligomerización en la membrana externa mitocondrial. Esto permitiría la salida de proteínas de gran tamaño (como SMAC/DIABLO) y de factores apoptogénicos (cit c, AIF, etc.) al citosol, sin alterar la función mitocondrial. Si los niveles de ATP son suficientes y la célula es capaz de activar el apoptosoma, la célula morirá por apoptosis. En caso contrario, la muerte podría ser independiente de caspasas y progresar a necroptosis o necrosis. Este modelo explicaría las situaciones en las que se produce liberación de factores apoptogénicos antes de la despolarización mitocondrial.

2) Modelo de apertura del poro de transición de permeabilidad: Propone la existencia del denominado poro de transición de permeabilidad (PTP), constituido por VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channel*), ANT y ciclofilina D, junto con otras proteínas. La apertura de dicho poro en los lugares de contacto entre la membrana mitocondrial interna y externa, provocaría la pérdida del $\Delta\Psi_m$ y de ATP. Los solutos y el agua entrarían en la matriz mitocondrial, provocando el hinchamiento del orgánulo y la rotura de la membrana externa, permitiendo la liberación de proteínas del espacio intermembrana al citosol. Dependiendo de la intensidad del estímulo, este proceso terminaría en necrosis (estímulo intenso) o apoptosis (estímulo moderado). Asimismo, se ha descrito la participación de proteínas de la familia de BCL-2 en el control de la apertura del PTP. De esta forma, mientras que los miembros pro-apoptóticos interaccionarían con ANT o VDAC para permitir la apertura del poro, los miembros anti-apoptóticos mediarían el cierre (Marzo, Brenner et al. 1998; Shimizu, Narita et al. 1999). Este modelo explicaría aquellas situaciones en las que la pérdida de $\Delta\Psi_m$ precede a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y la activación de caspasas.

2.6.4. Vía de señalización de muerte inducida por los receptores de muerte de la familia de TNF: Estudio de la interacción Fas/FasL

Como hemos comentado anteriormente, una de las vías apoptóticas mejor caracterizada es aquella inducida por la unión Fas/FasL. Fas (CD95, APO-1 ó DR2) es una proteína transmembrana de tipo I de 36kDa, que fue descrita por vez primera en 1989 (Trauth, Klas et al. 1989; Yonehara, Ishii et al. 1989) como una molécula de superficie, expresada en linfocitos humanos y capaz de desencadenar la muerte celular por apoptosis al unir a su ligando FasL o tras su activación por anticuerpos. Fas pertenece a la familia de receptores de TNF, que se caracteriza por poseer un dominio extracelular compuesto de 2 a 6 dominios ricos en cisteína (CRDs, *cysteine-rich domains*; 3 dominios en el caso de Fas), un dominio transmembrana y un DD intracelular de unos 80 aminoácidos altamente conservado (Figura 18), a través del cual participa en la vía extrínseca de la apoptosis mediante el reclutamiento de proteínas adaptadoras (Curtin and Cotter 2003). La expresión de Fas es ubicua, aunque es particularmente abundante en timo, hígado, corazón y riñón (Nagata 1997).

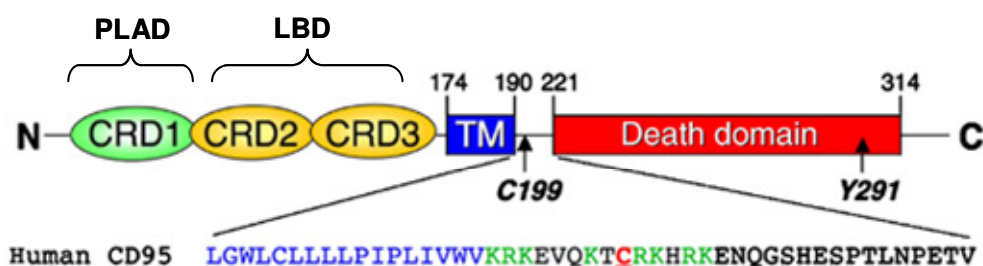


Figura 18. Representación lineal del receptor Fas. CRD: Dominio extracelular rico en cisteína; TM: Dominio transmembrana; Death domain: Dominio intracelular de muerte; N: extremo amino terminal; C: extremo carboxilo terminal; LBD: Dominio de unión al ligando FasL; PLAD: Dominio de asociación pre-ligando. Se marcan las posiciones en la secuencia de aminoácidos (Feig, Tchikov et al. 2007)

Además de Fas, se ha caracterizado un importante número de receptores de muerte (DRs, *Death Receptors*) pertenecientes a la familia de receptores de TNF. Así, podemos mencionar a TNFR1 (DR1, CD120a, p55 ó p60), DR3 (APO-3, LARD, TRAMP ó WSLT), TRAILR1 (DR4 ó APO-2), TRAILR2 (DR5, KILLER ó TRICK2), DR6, el receptor de la ectodisplasina A y el receptor del factor de crecimiento nervioso p75 (p75NTR) (Lavrik, Golks et al. 2005). Los ligandos que activan a estos DRs (con excepción del p75NTR) son moléculas relacionadas estructuralmente, que pertenecen a la

superfamilia del TNF (Smith, Farrah et al. 1994). Así, tenemos a: FasL (CD95L), que se une y activa a Fas; TNF α y linfotóxina α , que se unen a TNFR1; TL1A (VEGI), que se une a DR3; y TRAIL, que se une a DR4 y a DR5 (Ashkenazi and Dixit 1998). Además, los ligandos de los DRs también pueden interactuar con los denominados “receptores señuelo” (DcRs, *Decoy Receptors*), que no tienen DD y, por tanto, no forman complejos de señalización de muerte. Se conocen 4 DcRs: TRAILR3 (DcR1), TRAILR4 (DcR2), DcR3 y osteoprotegerina (OPG). FasL está expresado predominantemente en linfocitos T activados y en células “*natural killer*”, y, de manera constitutiva, en los denominados “sitios con privilegio inmune”, como los testículos y los ojos (Nagata 1997). Además, se localiza principalmente en la superficie celular, donde muestra una preasociación en homotrímeros (Siegel, Frederiksen et al. 2000).

2.6.4.a. Vía de señalización celular Fas/FasL. Transmisión de la señal

El receptor Fas interactúa consigo mismo a través de un segmento en el extremo amino-terminal, llamado dominio de asociación pre-ligando, siendo requerida dicha asociación para una transmisión eficiente de la señalización (Siegel, Frederiksen et al. 2000). La unión con FasL ocurre entre el segundo y tercer CRD del receptor Fas, contando desde el extremo N-terminal (Golstein 2000) (Figura 18). En modelos de linfocitos T citotóxicos, FasL se inactiva por proteólisis y da lugar a una forma soluble que puede unirse al receptor pero no desencadenar los mecanismos apoptóticos. Los experimentos de Holler y col. (Holler, Tardivel et al 2003) demuestran que trímeros y hexámeros de FasL son capaces de unirse a Fas, pero sólo en este último caso es cuando se produce la respuesta apoptótica. Trímeros de FasL podrían interactuar unos con otros a través de sus dominios intracelulares, o bien a través de la región que une su dominio transmembrana al dominio homólogo a TNF (Holler, Tardivel et al. 2003). La unión de formas multiméricas de FasL a trímeros preasociados de Fas, da lugar a pequeñas estructuras llamadas SPOTS (*Signaling Protein Oligomerization Transduction Structures*) en un proceso independiente de caspasas (Figura19) (Siegel, Muppidi et al. 2004).

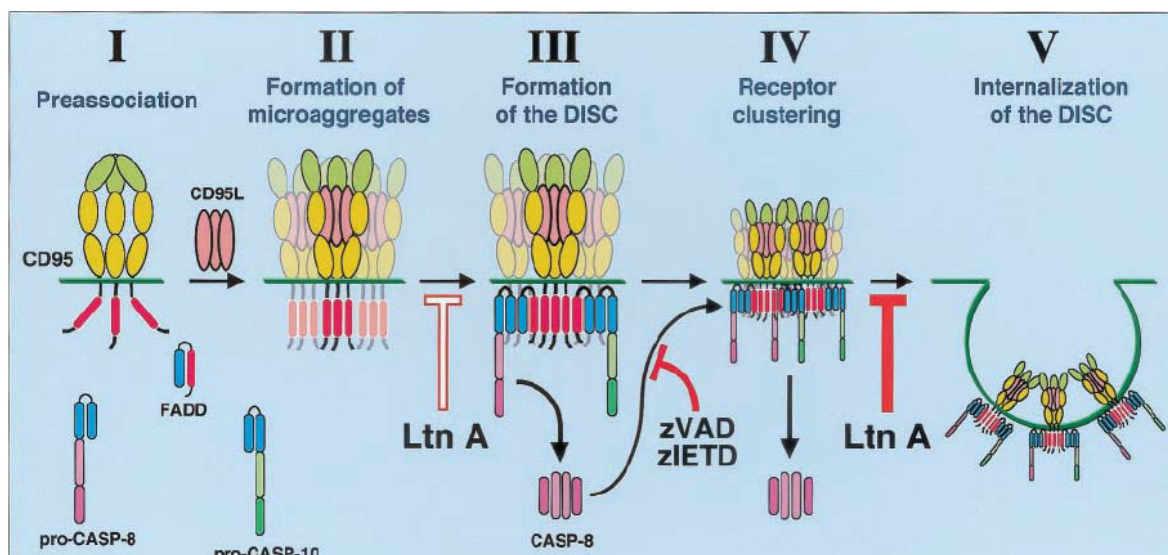


Figura 19. Esquema de la señalización por Fas/FasL. En la primera fase (I) se aprecia la preexistencia de la asociación de receptores independiente de ligando. Tras la unión del ligando (II) se forman los microagregados o SPOTs, y, posteriormente, al mismo tiempo que tiene lugar la colocalización en estructuras mayores, ocurre la formación del DISC (III y IV). Esta fase es inhibida por la toxina LtnA, que impide la correcta organización de los microfilamentos de actina, y por inhibidores de caspasas. Por último, tiene lugar la internalización del DISC en un proceso también dependiente de actina (V). Adaptado de (Algeciras-Schimnich A, et al., 2002).

A continuación, se induce la segregación lateral de los receptores en la membrana plasmática y la colocalización en regiones o “clusters” llamados “cap”, en un polo de la célula y en un proceso dependiente de caspasas y de la formación de ceramida (Cremesti, Paris et al. 2001). De hecho, mientras estos eventos ocurren en la parte externa de la membrana plasmática, en la parte interna se va formando el DISC. En este proceso, la molécula adaptadora FADD, dos isoformas de procaspasa-8 (procaspasa-8a y procaspasa-8b), la procaspasa-10 y la proteína FLIP, interaccionan con el receptor Fas gracias a contactos homotípicos. El DD del receptor interacciona con el DD del adaptador FADD, mientras que el dominio efector de muerte (DED, *death-effector domain*) de FADD permite la interacción con la procaspasa-8, la procaspasa-10 y la proteína FLIP. La activación de la procaspasa-8 parece seguir un modelo de activación inducida por proximidad, por el cual, altas concentraciones locales de procaspasa-8 permiten una activación autoproteolítica. Este es un proceso de corte múltiple que resulta en la formación de un heterotetrámero formado por dos subunidades largas (p18) y dos subunidades más pequeñas (p10), que se liberan al citosol y propagan la señal apoptótica. La procaspasa-10 también se procesa en el DISC, dando lugar a la formación de un

heterotetrámero activo. Sin embargo, la caspasa-10 no es necesaria para la transmisión de la señal apoptótica y no puede realizar la misma función que la caspasa-8 (Sprick, Rieser et al. 2002).

FLIP es una proteína que contiene dos DED en tándem, altamente homólogos al extremo amino-terminal de la caspasa-8. Existen diferentes isoformas, aunque FLIP_L y FLIP_S son las mejor caracterizadas. FLIP_S contiene tan solo el tándem DED, pero FLIP_L contiene, además, un dominio tipo proteasa, muy similar al de caspasa-8. FLIP_L y FLIP_S pueden evitar el procesamiento de la procaspasa-8 en el DISC a través de un mecanismo que parece ocurrir a través del reclutamiento de la caspasa-8 (Peter and Krammer 2003). Se han descrito otras muchas moléculas que parecen ser reclutadas en el complejo DISC por interacción directa con alguno de sus componentes, aunque la función de todas ellas todavía no está clara. Entre estas, destacan las proteínas Daxx, FAP-1 (*Fas Associated Protein-1*), FLASH (*FLICE-Associated Huge protein*), RIP (*Receptor-Interacting Protein*), FAF1 (*Fas Associated Factor-1*) y Dap3 (Peter and Krammer 2003).

El ensamblaje del DISC puede diferir entre tipos celulares y variar la eficiencia de la inducción de muerte. Se pueden distinguir dos tipos de señalización mediados por Fas. Las llamadas células tipo I se caracterizan por tener un alto nivel de formación del DISC y, por consiguiente, una elevada cantidad de caspasa-8 activa, suficiente para la activación directa de las caspasas efectoras. En cambio, las células tipo II poseen menor expresión de Fas y niveles de caspasa-8 activa más bajos (Scaffidi, Fulda et al. 1998). En estas células, la señalización apoptótica requiere de amplificación mitocondrial a través del procesamiento de la proteína BID por caspasa-8 y su translocación a la mitocondria.

Aunque el papel de Fas se ha relacionado clásicamente con la inducción de muerte, hay evidencias que lo relacionan con la proliferación celular, incluida la regeneración hepática (Desbarats, Birge et al. 2003; Imamura, Konaka et al. 2004). Una de las vías responsables de este efecto es la del factor nuclear kappa B (NF-κB). En este caso, parece ser que la activación de NF-κB por Fas tiene lugar a través de la formación de un complejo macromolecular que incluye FADD, procaspasa-8 y RIP. Mientras que para la señal apoptótica es imprescindible la actividad caspasa-8, para la activación de NF-κB no lo es. Este hecho podría hacer suponer nuevas funciones para la caspasa-8 (Kreuz, Siegmund et al. 2004).

Miembros de la familia MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) también han sido involucrados en la señalización por Fas. Concretamente ERK1/2, relacionada con el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia celular. Los efectos antiapoptóticos parecen tener lugar a nivel o por encima de la activación de caspasa-8, puesto que su inhibición no afecta a los efectos debidos a la activación de ERK (Tran, Holmstrom et al. 2001).

2.6.4.b. Relación con el cáncer

Debido al importante papel que desarrolla Fas en la vía de apoptosis celular, su implicación en el desarrollo y proliferación del cáncer resulta evidente. Así, Fas es una de las pocas moléculas que utilizan las células inmunitarias para activar la apoptosis en las células cancerosas. No obstante, muchas de las células cancerosas son relativamente resistentes a la apoptosis inducida por Fas, incluso con altos niveles de expresión del receptor en la superficie celular (Algeciras-Schimmich, Pietras et al. 2003). En este sentido, existen numerosas estrategias, descritas en distintos tipos tumorales, relacionadas con la regulación del sistema Fas/FasL, la resistencia a la apoptosis y la supervivencia tumoral. Entre ellas, encontramos las siguientes: la regulación de la expresión del receptor Fas (Ivanov, Lopez Bergami et al. 2003; Ivanov, Ronai et al. 2006); la sobreexpresión de FLIP, capaz de inhibir la interacción de la caspasa-8 y -10 con el complejo DISC (Irmeler, Thome et al. 1997); la inhibición de la expresión de las proteínas FADD y caspasa-8; la desregulación de la expresión de las proteínas de la familia BCL-2 o de los inhibidores de proteínas de apoptosis (Peter, Hadji et al. 2015).

En el CHC, en concreto, la reducción del sistema Fas/FasL ha sido descrito como mecanismo de supervivencia de las células transformadas (Higaki, Yano et al. 1996; Lee, Shin et al. 2001). No obstante, además del papel que juega el sistema Fas/FasL en la apoptosis, se ha descrito que es necesaria una expresión basal del mismo para la supervivencia de las células tumorales. Así, se ha observado que, en el hígado, la expresión de Fas es necesaria durante la regeneración hepática tras una hepatectomía parcial o para la proliferación de células estrelladas quiescentes a través de la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Peter, Hadji et al. 2015).

Por tanto, y debido al hecho de que tumores de muy diversos tipos expresan este receptor de muerte en su superficie celular, la apoptosis mediada por Fas podría ser una terapia antitumoral prometedora. Así, la inducción de apoptosis en células cancerígenas a

través de Fas es el único escenario en el que FasL recombinante podría ser utilizado como agente terapéutico (Peter, Hadji et al. 2015). Además, existen distintas drogas citotóxicas capaces de inducir la expresión celular de Fas. La combinación de estas drogas con anticuerpos anti-Fas o con FasL podría resultar útil como estrategia antitumoral. Sin embargo, y como se ha adelantado previamente, no todas las células que expresan Fas son sensibles a la muerte celular inducida por Fas. Además, el tratamiento sistémico con anticuerpos anti-Fas o con FasL recombinante ha sido relacionado con el daño hepático severo (Ogasawara, Watanabe-Fukunaga et al. 1993) (Huang, Hahne et al. 1999). En definitiva, el uso de la activación de la vía de señalización Fas/FasL como estrategia apoptótica antitumoral requeriría la administración local de FasL o el uso de terapia génica con vectores inducibles de expresión de Fas/FasL (Timmer, de Vries et al. 2002; Gonzalez, Ferrin et al. 2013).

2.6.4.c. Relación con el óxido nítrico

La vía de señalización de Fas/FasL se encuentra relacionada con el ON, de manera que la producción de ON se asocia a la sobreexpresión de Fas y la muerte celular inducida por esta ruta en células de músculo liso de la arteria pulmonar (Hayden, Lange et al. 2001) y en neuronas (Martin, Chen et al. 2005). De manera similar, la inyección intratumoral de células microencapsuladas que sobreexpresan NOS2 también ha sido asociada al aumento de la expresión del sistema Fas/FasL y a la reducción del crecimiento tumoral en un modelo murino de xenoinjerto (Xu, Liu et al. 2002; Muntane, De la Rosa et al. 2013).

De acuerdo con un modelo de regulación de la producción de ON por estrés oxidativo, la inducción de muerte celular por estrés oxidativo se considera uno de los primeros eventos de señalización que promueve el tráfico de Fas a la membrana plasmática (Reinehr and Haussinger 2007). Estos datos coinciden con estudios previos en los cuales la inducción de muerte celular por estrés oxidativo es paralela al incremento de la expresión de Fas (Vogt, Bauer et al. 1998; Gonin, Diaz-Latoud et al. 1999; Minana, Gomez-Cambronero et al. 2002).

La inducción de la expresión de receptores de muerte como Fas, TNF-R1 o TRAIL-R1 a través del ON ha sido relacionada con la acumulación de p53 en células de CHC. Este hecho guardaría relación con la capacidad que poseen ciertos donadores de ON para sensibilizar a las células tumorales a compuestos quimioterapéuticos (Muntane, De la Rosa et al. 2013)

3. HIPOTESIS/OBJETIVOS



La NOS3 ha sido propuesta como una proteína de localización celular difusa, posiblemente asociada a mitocondria, cuyo producto de reacción, el ON, es un importante regulador de la actividad de la CTE a través de su inhibición reversible. Además, el ON puede regular el proceso de apoptosis, actuando como agente pro- o antiapoptótico. Durante la hepatocarcinogénesis experimental, la inducción de la producción de ON ha sido sugerida como una estrategia terapéutica potencialmente útil. En este sentido, la sobreexpresión de NOS3 en la línea de hepatocarcinoma humano HepG2 (denominada 4TO-NOS) ha sido relacionada con el incremento de la expresión del receptor Fas y la muerte celular.

Nuestra hipótesis de trabajo fue que la sobreexpresión de NOS3 podría estar favoreciendo la acumulación de EROs y el estrés oxidativo a través de la inhibición de la CTE. Además, la mayor expresión del receptor Fas podría incrementar la susceptibilidad a la muerte inducida por anti-Fas en la línea 4TO-NOS.

Los objetivos principales de esta tesis doctoral fueron los siguientes:

- 1) Estudiar el efecto de la sobreexpresión de NOS3 en la proliferación y en la muerte celular inducida por anticuerpos anti-Fas en la línea de hepatocarcinoma humano HepG2.
- 2) Determinar la correlación existente entre la inducción de muerte celular promovida por la sobreexpresión de NOS3 y la alteración de la función mitocondrial y el estrés oxidativo celular.
- 3) Identificar los elementos que pudieran participar en el proceso de muerte celular promovido por la sobreexpresión de NOS3. Realizar el análisis proteómico comparativo en presencia y ausencia de anti-Fas. Valorar la presencia de modificaciones postraduccionales.

4. MATERIAL Y MÉTODOS



4.1. Cultivos celulares

4.1.1. Mantenimiento

Las líneas celulares se mantuvieron en atmósfera estéril a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO₂. Las células se crecieron a una densidad de 150.000 células/cm², en Medio Esencial Mínimo Eagle pH 7,4 (MEM 31095-029, Gibco, Life Technologies, California, EE.UU) complementado con suero fetal bovino (SFB, v/v) al 10%, piruvato sódico 1mM y antibiótico-antimicótico 1X, (concentración final). Cuando se utilizó medio de cultivo sin rojo fenol (MEM 51200-046 Gibco), además de lo anterior, se añadió glutamina 2mM.

Cuando las células alcanzaron la confluencia (densidad celular) adecuada en la placa de cultivo, se dividieron para el mantenimiento del cultivo celular y se utilizaron para los distintos experimentos o fueron criopreservadas para futuros estudios. En cualquier caso, fue preciso despegar las células de la superficie de la placa de cultivo. Para ello, se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con solución tampón fosfato (PBS) 100mM pH 7,4 para así retirar las proteínas del SFB que podrían inhibir la acción de la tripsina. A continuación, se retiró el PBS y se añadió tripsina-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0,05%-0,02% en PBS (Boiwest, Nuaille, Francia). Tras incubar 8min a 37°C, se detuvo la acción de la tripsina mediante la adición de medio de cultivo complementado con 10% de SFB. La suspensión celular se resuspendió concienzudamente con ayuda de un pipeteador electrónico durante 2min para separar las células y, posteriormente, se centrifugó durante 5min a 240g. El precipitado (pellet) celular obtenido fue resuspendido en el volumen necesario de la solución apropiada en función de su destino. Cada vez que una línea celular se levantó con tripsina, se contó como un nuevo pase de la misma. De este modo, se evitó trabajar con células con un pase elevado.

4.1.2. Recuento celular

Cuando fue necesario conocer la densidad celular de una suspensión obtenida por tripsinización, se realizó el recuento celular de la misma mediante el método de exclusión del azul tripán (Sigma-Aldrich, Missouri, EE.UU). Mediante este método se puede determinar el número y la viabilidad celular. El colorante azul tripán es permeable a la membrana plasmática de células muertas, tiñiendo todo su citoplasma, mientras que es impermeable para células vivas. Para realizar el recuento celular, se mezclaron a partes iguales un volumen de la suspensión celular con otro de azul tripán 0,4% en NaCl 0,15M. A continuación, se colocó un cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer (Figura 20) y se

depositaron 10µl de la mezcla anterior, de manera que difundieron por capilaridad entre la cámara y el cubreobjetos. Finalmente, se colocó la cámara en un microscopio óptico invertido (AE31 Motic, Hong Kong, China) y se contaron las células translúcidas (vivas) presentes en los cuatro cuadrantes. Para el cálculo del número de células/ml en la suspensión celular se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ células/ml} = \frac{(\text{n}^\circ \text{ células contadas}) \times 10.000 (\text{dimensiones cámara}) \times 2 (\text{dilución})}{4 (\text{n}^\circ \text{ de cuadrantes contados})}$$

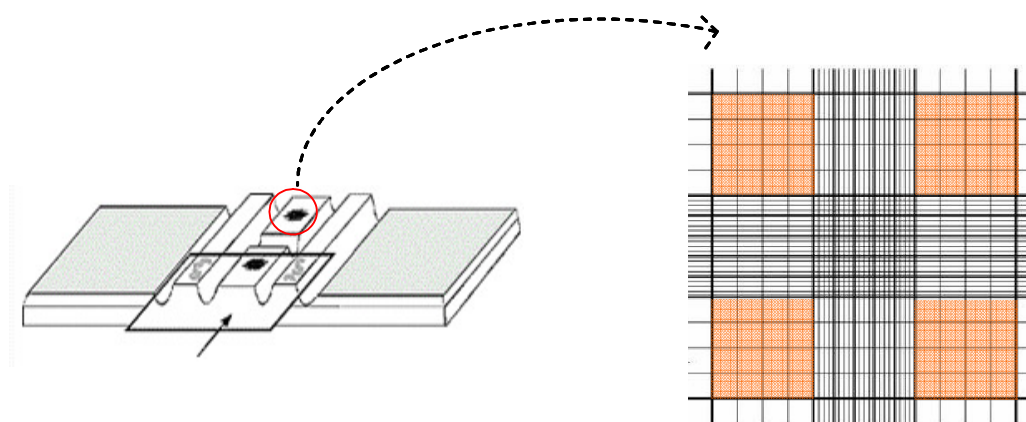


Figura 20. Esquema de la cámara de Neubauer. En color naranja se muestran los 4 cuadrantes donde se realiza el recuento celular.

4.1.3. Criopreservación

La criopreservación de las células se realizó en pequeñas alícuotas, cuando la línea celular tenía pocos pases, para disponer de ella en caso de necesidad. Para llevar a cabo la criopreservación, tras la tripsinización y posterior recuento celular, se separó una alícuota de 5×10^6 células y se centrifugó a 240g durante 5min. A continuación, se resuspendió el pellet celular resultante en 1ml de una solución conteniendo 90% de SFB y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich), se transfirió a un criotubo (identificando el nombre, número de pase de la línea celular y la fecha de congelación) y se congeló a -80°C en un contenedor de plástico protegido por una cámara rellena de isopropanol. Transcurridas 24h, el criotubo fue sacado del congelador de -80°C y almacenado en un contenedor de nitrógeno líquido hasta su uso.

El DMSO es un disolvente orgánico sin color, de bajo peso molecular y permeable a través de la membrana celular, que se utiliza para conseguir congelaciones con descenso gradual de la temperatura a 1°C/min. De esta forma, previene la acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelación, desplazando el agua del interior de la célula y evitando la formación de cristales de hielo intercelulares capaces de romper la estructura celular. El isopropanol, por otro lado, consigue una congelación más gradual. El objetivo de usar ambos compuestos fue obtener una mayor supervivencia celular tras la criopreservación.

Cuando se requirió descongelar las células, se sacó un criotubo del contenedor de nitrógeno líquido y se resupendió su contenido en 5 ó 6ml de medio de cultivo a 37°C. Este proceso se realizó rápidamente, sin dejar descongelar previamente el tubo, para reducir al máximo la toxicidad del DMSO. A continuación, las células se centrifugaron a 240g durante 5min y el pellet resultante se resupendió en un volumen adecuado de medio para ser puesto en cultivo.

4.1.4. Curva de crecimiento celular

El crecimiento normal de las células en cultivo fue observado mediante un microscopio óptico invertido. Durante este proceso, se obtuvieron imágenes de las mismas a diferentes pases para el estudio de la morfología celular. Cuando se necesitó analizar la velocidad de crecimiento, es decir, el tiempo que una línea celular tarda en duplicarse (tiempo de duplicación, $T_{1/2}$), se sembraron 1×10^4 células/pocillo en una placa de 6 pocillos ($8,96\text{cm}^2$) (Techno Plastic Products -TPP-, Trasadingen, Suiza), utilizando tantos pocillos como días consecutivos fueran a ser considerados en el análisis. En nuestro caso, sembramos 5 pocillos en cada experimento, analizando el crecimiento celular a las 0, 24, 48, 72 y 96h. El tiempo 0 fue establecido a las 24h de haber sembrado las células, permitiendo que éstas se pegasen a la superficie de la placa. En cada uno de los tiempos del análisis, las células fueron recogidas por tripsinización y contadas mediante el método de exclusión del azul tripán (ver apartado 4.1.2). Tras cada recuento, el medio de cultivo de los pocillos restantes fue cambiado por medio fresco. Terminado el recuento celular de los diferentes tiempos establecidos para la curva de crecimiento, se calculó el $T_{1/2}$ como el nº de horas de crecimiento/PD, siendo $PD = \ln(n_2/n_1) / \ln 2$, donde n_1 es el número de células sembradas y n_2 es el número de células tras el contaje (Armstrong, Hughes et al. 2006).

4.1.5. Administración de tratamientos

A lo largo del estudio, se han administrado los siguientes tratamientos en los medios de cultivo celular según requerimiento del diseño experimental:

Anti-Fas (0,5µg/ml) (Anti-Human Fas o CD95, MBL, Nagoya, Japón): es un agente inductor de muerte celular. Se administró tras 48h de la puesta en cultivo. Las células se recogieron 2h después de la administración de anti-Fas.

L-arginina (2,5mM) (Sigma-Aldrich): este aminoácido es el sustrato de la reacción catalizada por la NOS para la síntesis de ON. Se administró en el medio de cultivo tras 24h de la puesta en cultivo para evitar la limitación de sustrato en la reacción.

L-NAME o N ω -Nitro-L-arginina metil éster clorhidrato (5mM) (Sigma-Aldrich): es un inhibidor permeable celular de la oxido nítrico sintasa. Se añadió al medio de cultivo 24h después de la siembra celular.

Pepstatina A (20µM y 50µM) (Santa Cruz Biotechnology, California, EE.UU): es un potente inhibidor de aspartato proteasas tales como la pepsina y las catepsinas D y E. Se administró 24h después de la puesta en cultivo.

Zeocina (Invitrogen Life technologies, California, EE.UU): es un antibiótico utilizado para la selección de las células transfectadas. Se administró al medio de cultivo utilizado para la selección (30µg/ml) y mantenimiento (15µg/ml) de las líneas celulares 4TO y 4TO-NOS.

4.1.6. Obtención de las líneas celulares 4TO y 4TO-NOS

Las líneas celulares con las que hemos trabajado en este proyecto proceden de la línea celular establecida HepG2. Esta línea, obtenida de la European Collection of Cell Cultures (ATCC, Virginia, EE.UU), deriva de un hepatoma bien diferenciado en un varón caucásico de 15 años de edad y conserva la mayoría de las funciones específicas de los hepatocitos humanos (Javitt 1990).

La sobreexpresión de la proteína NOS3 en la línea HepG2 fue realizada en nuestro laboratorio mediante transfección estable con el plásmido pcDNA4/TO (Invitrogen Life technologies) conteniendo el ADN complementario o copia (ADNc) del gen humano (NCBI Reference Sequence BC063294) y posterior selección con antibiótico. La línea celular así generada fue denominada 4TO-NOS. Como control fue utilizada la línea HepG2

transfectada de manera estable con el plásmido pcDNA4/TO sin inserto. A esta línea celular control se la denominó 4TO. En la tabla 1 se resumen las líneas celulares utilizadas.

Tabla 1. Líneas celulares

Nombre	Descripción	Tipo
HepG2	Hepatocarcinoma humano (ATCC: HB-8065)	Línea parental
4TO-NOS	Trasflectante estable de HepG2 con el plásmido pcDNA4/TO conteniendo ADNc NOS3	Sobreexpresión estable de NOS3
4TO	Trasflectante estable de HepG2 con el plásmido pcDNA4/TO	Control negativo

A continuación se describen, de manera resumida, los pasos seguidos para la obtención de las líneas celulares 4TO y 4TO-NOS (Figura 21):

1. El plásmido conteniendo el ADNc del gen NOS3 fue obtenido a partir de las bacterias transformadas adquiridas a través de la empresa ImaGenes GmbH (Source BioScience LifeSciences, Berlín, Alemania; Full Length cDNA Clone IRAKp961E09133Q). Para ello, las bacterias fueron crecidas y posteriormente lisadas para purificar el plásmido mediante un kit comercial.

2. A continuación, se procedió a la amplificación del ADNc de NOS3 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el uso de oligonucleótidos específicos que permitían su posterior clonación en el vector plasmídico pcDNA4/TO, que contenían la secuencia del epítipo HA en el extremo 3'.

3. Tras comprobar el tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa, el producto de PCR fue clonado en el plásmido pCR2.1 mediante ligación (vector pCR2.1-NOS). A partir de este nuevo constructo y con objeto de obtener suficiente material para continuar el proceso, fueron transformadas bacterias competentes.

4. Una vez seleccionados los clones de bacterias de interés, se secuenció completamente el inserto y, tras verificar que la secuencia del ADNc de NOS3 no tenía errores, se clonó en el plásmido pcDNA4/TO (vector pcDNA4/TO-NOS) previa digestión enzimática con endonucleasas específicas y purificación en gel de agarosa.

Material y Métodos

5. A continuación, se transformaron bacterias competentes con el vector pcDNA4/TO-NOS y se seleccionó aquel clon que contenía un ADN plasmídico (ADNp) del tamaño esperado, con el ADNc de NOS3 clonado en la dirección correcta. Ese clon fue crecido en masa para obtener una cantidad de vector suficiente para transfectar células HepG2, con el objeto de sobreexpresar la proteína NOS3.

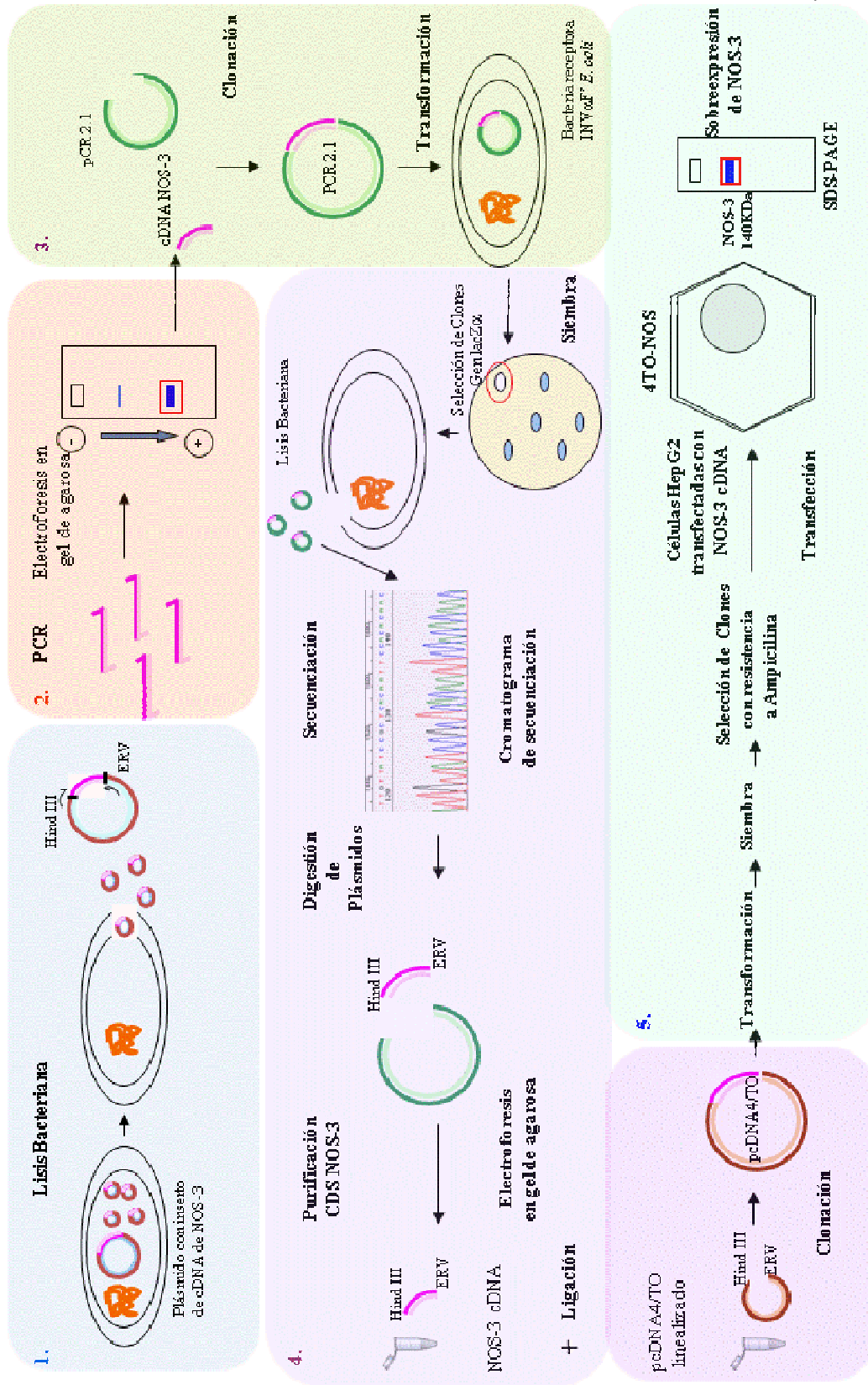


Figura 21. Esquema de la obtención de la línea celular con sobreexpresión de NOS3, 4TO-NOS

4.1.7. Transfección celular química

Antes de la transfección de la línea celular HepG2, y con el objetivo de incrementar el éxito de la misma, se procedió a la linealización del plásmido pcDNA4/TO-NOS con la endonucleasa NruI. Esta enzima de restricción tiene un único sitio de reconocimiento en la secuencia del plásmido, justo por delante de la región del promotor del citomegalovirus (P_{CMV}) que controla la expresión del inserto, mientras que no reconoce ningún sitio de corte en el ADNc de NOS3. La correcta linealización del plásmido se comprobó tras correr el producto de su digestión en un gel de agarosa al 1%.

Para este tipo de transfección se utilizó el reactivo comercial FuGENE 6 (Roche Basel, Suiza), el cual es un compuesto no liposómico diseñado para transfectar ADNp en una amplia variedad de líneas celulares con alta eficiencia y baja toxicidad. El día previo a la transfección, las células fueron sembradas en una placa de cultivo de 60,1cm² (TPP), a una densidad de 66.000 células/cm² y en un volumen final de 10ml de medio suplementado. A un volumen de 576µl de medio MEM sin suplementos (sin suero ni antibióticos/antimicóticos), se le añadieron 24µl de FuGENE 6 (sin tocar la “pared” del tubo Eppendorf) y se incubó durante 5min a temperatura ambiente. A continuación, fueron añadidos 4µg del vector linealizado y se volvió a incubar durante 30min (relación 1:6µg plásmido: µl FuGENE 6). Transcurrido ese tiempo, se añadió el volumen del tubo a la placa de cultivo con las células HepG2 a transfectar, se mezcló bien para repartirlo por toda la superficie y se dejó en la estufa de CO₂ hasta el día siguiente, que se cambió el medio. Pasados dos días de la transfección se volvió a cambiar el medio por otro selectivo con el antibiótico zeocina (Invitrogen).

4.1.8. Selección de las células transfectadas

La selección de las células que habían integrado el ADNp de manera eficaz se realizó a partir de las 48h tras la transfección. Para ello, y debido a que el plásmido confería resistencia al antibiótico zeocina, se añadió dicho antibiótico al medio de cultivo celular. Previamente, se realizó una curva de crecimiento celular donde se determinó la concentración de selección para el antibiótico, es decir, la concentración mínima de zeocina que causa la muerte de la línea celular HepG2. Dicha concentración resultó ser de 30µg/ml.

Durante la selección, el medio de cultivo fue cambiado a diario hasta la aparición de los clones celulares resistentes (Figura 22). En ese momento, se recuperaron numerosos

clones individuales por separado, utilizando para ello discos de clonaje estériles empapados en tripsina. Así, tras desechar el medio de cultivo de la placa y lavar con PBS, los discos fueron depositados sobre cada clon, dejando actuar la tripsina durante 5min. A continuación, y con ayuda de unas pinzas estériles, los discos fueron recogidos y depositados, de manera individual, en pocillos de placas de cultivo de 24 pocillos (1,86cm², TPP). Transcurridos unos días, los discos fueron retirados y el medio de selección fue sustituido por medio de mantenimiento, conteniendo una dosis de zeocina de 15µg/ml. Cuando se alcanzó una densidad celular adecuada, las células fueron tripsinizadas y transferidas a placas de 12 y 6 pocillos (3,59 y 8,56cm², respectivamente; TPP), en sucesivas veces. Finalmente, las células fueron transferidas a placas de 60,1cm² y crecidas para su criopreservación (ver apartado 4.1.3) tras confirmar la sobreexpresión de NOS3 (ver apartados 4.3.4 y 4.4.6).

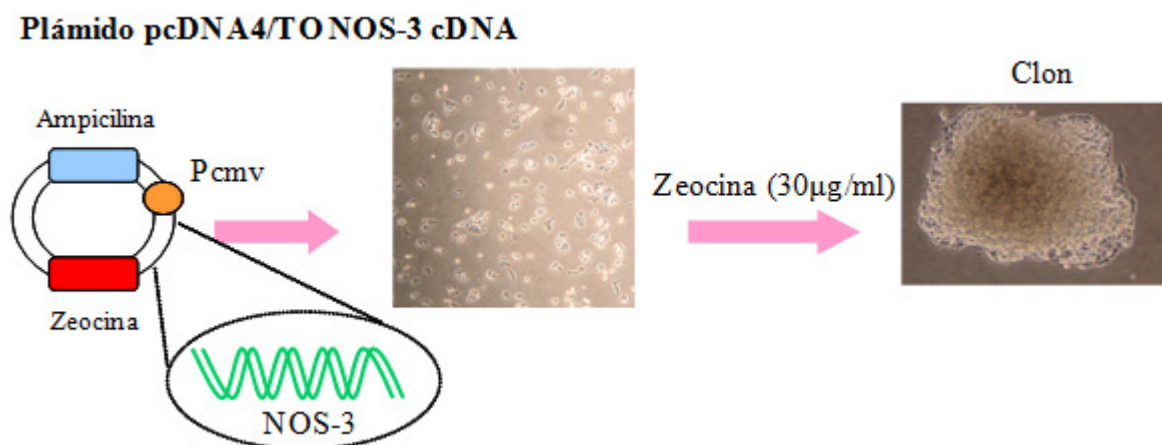


Figura 22. Esquema de la transfección de las células HepG2 con el plásmido pcDNA4/TO-NOS y selección de los clones resistentes al antibiótico zeocina que ha incorporado el plásmido en su ADN genómico.

4.2. Cultivos de bacterias

4.2.1. Transformación bacteriana por shock térmico

Con el fin de obtener el suficiente número de copias de un determinado plásmido, fueron transformadas bacterias *E. coli* de la cepa INVαF' químicamente competentes, obtenidas de manera comercial (Invitrogen). La cantidad de plásmido usado para transformar fue de 20-50ng. Antes de empezar, se tomó una alícuota de 25-50µl de bacterias competentes del congelador de -80°C y se descongeló en hielo. A continuación,

Material y Métodos

se les añadió el volumen necesario de ADNp con el que se deseaba transformarlas (mezclando suavemente con la pipeta) y se dejaron en hielo durante 30min. El vial conteniendo las bacterias y el plásmido fue sumergido en un baño de agua a 42°C durante 30 s y rápidamente traspasado a hielo. Tras añadir 250µl de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 0,05% (p/v), MgCl₂ 10mM y glucosa 20mM, pH 7,0), se colocó en una rueda giratoria a 37°C durante 1h. Finalmente, se sembraron entre 40-80µl de la mezcla de transformación en una placa de LB-agar o se conservó dicha mezcla a 4°C hasta entonces. El medio de caldo superóptimo con represión por catabolito o medio SOC se utiliza en el paso final de la transformación bacteriana para obtener una eficacia de transformación máxima de *E. coli*.

4.2.2. Sembrado de las bacterias en placas

Se utilizaron placas de LB-agar (triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 1% y 7,5g de agar, pH 7,0), suplementadas con el antibiótico ampicilina (100µg/ml) para crecer aquellas bacterias transformadas con plásmidos con resistencia a dicho antibiótico (plásmidos pCR2.1 y pcDNA4/TO). Las placas se prepararon con antelación a su uso, a partir de la solución de LB-agar previamente esterilizada (30min a 120°C) y enfriada hasta los 55°C, aproximadamente. A continuación, se añadió el antibiótico y la mezcla líquida se vertió en placas de Petri de 10cm de diámetro (~20ml/placa) a las que, una vez solidificado el agar, se les dio la vuelta y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Antes de sembrar las bacterias, las placas se equilibraron a 37°C durante 30min. Cuando dichas bacterias fueron transformadas con el vector pCR2.1, el cual contiene el gen de la β-galactosidasa interrumpido por el sitio de clonaje múltiple, se añadieron a cada placa 40µl de una solución de X-Gal (Sigma-Aldrich) 40 mg/ml en dimetilformamida, repartiéndola por toda su superficie y dejando reposar hasta que todo el líquido fue absorbido. Por cada mezcla de transformación bacteriana se sembraron entre 40-80µl, que fueron repartidos uniformemente por toda la superficie de la placa con ayuda de una espátula de cristal estéril. Finalmente, se invirtieron las placas y se incubaron a 37°C durante, al menos, 18h. El resto de la mezcla de transformación se conservó a 4°C para volver a sembrar un volumen mayor de bacterias en caso de obtener pocas colonias.

4.2.3. Análisis de los resultados de transformación

Aproximadamente, entre cinco y diez colonias individuales obtenidas a partir de cada transformación fueron recogidas en condiciones estériles con ayuda de un palillo o punta de pipeta, y se crecieron a 37°C durante una noche en medio líquido LB (triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 1%, pH 7,0) conteniendo 100µg/ml de ampicilina.

Las bacterias transformadas con el vector pCR2.1 conteniendo el inserto deseado (producto de PCR) dan lugar a colonias de color blanco al crecerlas en LB-agar conteniendo el sustrato X-Gal. Sin embargo, aquellas que han sido transformadas con el vector sin el inserto (en el cual no ha sido interrumpido el gen de la β-galactosidasa) dan lugar a colonias de color azul, debido a que son capaces de transformar el sustrato X-Gal en el producto 5-bromo-4-cloro-indoxil, el cual dimeriza espontáneamente y se oxida para formar el pigmento azul insoluble 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo.

A partir de las colonias bacterianas transformadas, seleccionadas y crecidas en medio LB, se aisló el ADNp tal y como se detalla en el apartado 4.3.1.1. La presencia del inserto dentro de los plásmidos purificados se confirmó por PCR (ver apartado 4.3.3). Para secuenciar el inserto se utilizó el plásmido entero y, como cebadores, oligonucleótidos universales situados próximos al sitio de clonación, más dos parejas de cebadores internos.

4.2.4. Conservación de los clones bacterianos de interés

Los clones de interés, crecidos en medio LB, se conservaron a -20°C y a -80°C en alícuotas de 1ml de volumen final conteniendo un 15% de glicerol estéril en medio LB. Cuando se recurrió a ellos para volverlos a crecer, la alícuota a -20°C se depositó en hielo y, antes de que se descongelara totalmente, se introdujo un palillo estéril en ella y se depositó en un tubo de 15 ó 50ml conteniendo unos 5 ó 15ml de medio LB, respectivamente. Rápidamente, la alícuota volvió a congelarse y los tubos se incubaron a 37°C en agitación, durante toda la noche, en un orbital modelo CH-4103 (HT-INFORS AG, Suiza). La alícuota a -80°C se reservó para una conservación más prolongada en el tiempo.

4.3. Manipulación de ácidos nucleicos

4.3.1. Purificación de ADN

4.3.1.1. Purificación de ADN plasmídico de cultivos bacterianos

A partir del cultivo bacteriano, el ADNp se extrajo mediante el kit comercial “GenElute™ Plasmid Miniprep Kit” (Sigma-Aldrich) siguiendo las indicaciones marcadas en el protocolo del mismo. Así, una vez centrifugado dicho cultivo y resuspendido el pellet de bacterias resultante en una solución conteniendo ribonucleasa (ARNasa), se procedió a la lisis bacteriana y posterior purificación del ADNp mediante columnas conteniendo membranas de sílice. Para ello, el volumen obtenido tras las lisis alcalina-SDS fue depositado sobre una de dichas columnas y centrifugado a máxima velocidad durante 1min. El ADN retenido en la membrana fue lavado y finalmente eluído mediante centrifugación en un volumen apropiado de la solución de elución proporcionada. El ADNp obtenido de esta manera fue posteriormente cuantificado (ver apartado 4.3.2) y utilizado para distintas técnicas biotecnológicas como la transfección celular (apartado 4.1.7), la PCR (apartado 4.3.3), la clonación (apartado 4.3.6 y 4.3.7) o la secuenciación (apartado 4.3.8). Cuando no fue utilizado inmediatamente, el ADNp fue conservado a -20°C.

4.3.1.2. Purificación de ADN plásmidico en solución

Mediante el “Gel/PCR Purification Kit” (Favorgen Biotech Corp., Kaohsiung, Taiwan) fueron purificados los productos de digestión de ADN de tamaño comprendido entre los 50pb – 10kb. Así, fueron purificados los vectores pcDNA4/TO y pcDNA4/TO-NOS tras su linearización mediante digestión enzimática (ver apartado 4.3.6) y previamente a su uso en la técnica de transfección. De nuevo, el protocolo consistió en la unión del ADN a una matriz de fibra de vidrio situada dentro de una columna. Tras mezclar 5 volúmenes de solución de unión con 1 volumen de muestra de ADN, el volumen resultante se cargó en una columna y se centrifugó. Una vez desechado el volumen eluído, se lavó la columna mediante la adición de un tampón de lavado y posterior centrifugación, y se recuperó el ADN retenido en la matriz añadiendo en esta ocasión el tampón de elución proporcionado. Cuando no fue utilizado inmediatamente, esta solución de ADN se cuantificó (ver apartado 4.3.2) y se conservó a -20°C hasta su uso.

4.3.1.3. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Una vez clonado el ADNc de NOS3 en el plásmido de transición pCR2.1 y con el fin de clonarlo en el vector pcDNA4/TO, los productos de digestión enzimática del vector comercial pcDNA4/TO y del vector pCR2.1 conteniendo el ADNc de NOS3 fueron purificados a partir de un gel de agarosa del 1%. Así, tras separar los productos de digestión mediante electroforesis en gel de agarosa (ver apartado 4.3.5), las bandas de ADN correspondientes al plásmido pcDNA4/TO linearizado y al ADNc de NOS3 fueron visualizadas mediante una fuente de luz UV y recortadas con un bisturí estéril, procurando arrastrar la menor cantidad posible de agarosa. Estas bandas de agarosa fueron depositadas en tubos estériles independientes de 1,5ml, los cuales fueron utilizados posteriormente para la extracción del ADN mediante el kit comercial “Gel/PCR Purification Kit” (Favorgen Biotech Corp), siguiendo las indicaciones detalladas en el protocolo del mismo. Tras añadir 500µl de una solución de solubilización a la banda de agarosa recortada del gel, se incubó a 55°C durante 10min y el volumen resultante se cargó en una columna conteniendo una matriz de fibra de vidrio. Una vez centrifugada la mezcla, el ADN retenido en la matriz fue lavado y eluido con el tampón correspondiente mediante centrifugación. Con el objetivo de incrementar la eficiencia del proceso, la solución de elución se calentó a 65°C antes de añadir a la matriz. El ADN así obtenido se cuantificó (ver apartado 4.3.2) y se conservó a -20°C.

4.3.1.4. Purificación de ADN total a partir de células en cultivo

El pellet celular obtenido tras tripsinización y centrifugación a partir de una placa de cultivo de 22,1 ó 60,1cm², fue resuspendido en 250µl de tampón TE 10:1 (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 7,5) e incubado durante toda la noche a 37°C (ó durante 3h a 50°C) tras haberle añadido 1,25µl de proteinasa K 20 mg/ml, 5µl de ARNasa 10 mg/ml y 5µl de SDS 25%. Al día siguiente, el ADN fue purificado mediante una doble extracción fenólica. Para ello fueron añadidos 50µl de acetato amónico 7,5M y entre 1-1,5 volúmenes (300-450µl) de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:25:1) (Sigma-Aldrich), se agitó en vórtex durante 1min y se centrifugó durante 5min a 18.000g. A continuación, sobre la fase acuosa recuperada tras la centrifugación (evitando tomar la interfase), se realizó una nueva extracción de ADN, de la misma forma en que se hizo anteriormente. A la fase acuosa final le fueron añadidos 2 volúmenes de etanol 99% frío y, tras mezclar bien, fue incubada durante toda la noche a -20°C, o durante 1-3h a -70°C. Finalmente, la mezcla se centrifugó

Material y Métodos

a 18.000g durante 30min a 4°C. Tras eliminar el etanol con una pipeta y secar el precipitado mediante centrifugación en vacío, el ADN fue resuspendido en un volumen de entre 100-300µl de Tris-HCl 10mM pH 8 y se dejó mezclando a 37°C durante toda la noche y con agitación. Al día siguiente, la muestra de ADN fue cuantificada (apartado 4.3.2) y conservada a -20°C.

4.3.1.5. Purificación de ARN total a partir de células en cultivo

El ARN total se aisló mediante el método descrito por Chomczynsky y Sacchi (Chomczynski and Sacchi 1987). Tras retirar el medio de cultivo de la placa, las células se lavaron dos veces con PBS y fueron lisadas con la solución comercial TRIsure, siguiendo las indicaciones del fabricante (Boiline, Londres, Reino Unido). Al lisado celular resultante se le añadió cloroformo (en relación 1:5, v:v), se agitó durante 10s y se dejó reposar 5min a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se centrifugó a 12.000g durante 15min a 4°C, tomándose la fase acuosa superior resultante y descartándose el resto. Dicha fase se mezcló con un mismo volumen de isopropanol y se dejó reposar durante 10min a temperatura ambiente para ayudar a precipitar el ARN. Tras este tiempo, la muestra se centrifugó a 12.000g durante 10min a 4°C, y el pellet resultante se lavó con etanol al 75%. Finalmente, la muestra se centrifugó a 7.500g durante 5min a 4°C, dejándose secar el pellet de ARN a temperatura ambiente tras eliminar el sobrenadante. El ARN se disolvió en agua libre de ARNasas (Sigma-Aldrich), incubando a 60°C durante 10min.

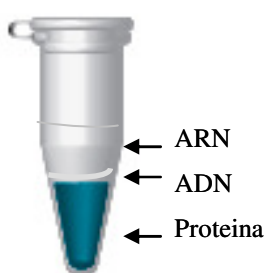


Figura 23. Esquema de extracción de ácidos nucleicos. La fase acuosa (arriba) corresponde con contenido celular de ARN soluble en cloroformo. La interfase equivale a un halo que contiene el ADN celular. La fase fenólica (abajo) contiene los restos fenólicos y el contenido proteico celular.

Una vez cuantificada la concentración de ácidos nucleicos espectrofotométricamente (ver apartado 4.3.2), las muestras fueron sometidas a un tratamiento con ADNasa para eliminar posibles restos de ADN co-purificados durante la extracción. Para ello, se utilizó el kit comercial “RQ1 RNase-Free Dnase” (M6101; Promega, Wisconsin, EE.UU) siguiendo las indicaciones del fabricante. Así, las muestras se diluyeron con agua libre de

ARNasa hasta el volumen final deseado, añadiendo el volumen necesario de tampón de reacción 10X (Tris-HCl 400mM pH 8,0, MgSO₄ 100mM y CaCl₂ 10mM) y enzima ADNasa a una concentración de 1 U/μg de ARN. Esta mezcla de reacción se incubó durante 30min a 37°C. Posteriormente, la digestión enzimática se detuvo mediante la adición del tampón de parada (20mM EGTA (ácido atilenglicoltetraacético), pH 8,0) durante 10min a 65°C. Para terminar, las muestras se depositaron en hielo y se volvió a cuantificar la concentración de ARN antes de utilizarlas o conservar a -80°C.

4.3.2 Cuantificación de ácidos nucleicos

La concentración de ácidos nucleicos en una muestra se determinó mediante espectrofotometría, utilizando el aparato ND-1000 (NanoDrop Technologies, Delaware, EE.UU). Para ello, 2μl de la muestra fueron depositados en el lugar apropiado del aparato y tras la medida, se obtuvo directamente la concentración de ADN o ARN en ng/μl, así como la relación de absorbancia entre las longitudes de onda $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ y $\lambda_{260}/\lambda_{230}$. La relación $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ indica si existe algún contaminante proteico, es decir da idea del grado de pureza de la preparación, de forma que valores ~1,8 para ADN y ~2,0 para ARN se consideran de buena pureza. La relación $\lambda_{260}/\lambda_{230}$ indica la presencia de otros contaminantes que absorben a 230nm, como puede ser el caso de los fenoles. El rango comprendido entre 2,0-2,2 indica que la solución que se está midiendo posee buena pureza en ácidos nucleicos. La lectura de absorbancia a 260nm fue utilizada para realizar la cuantificación de ácidos nucleicos. Así, una unidad de absorbancia a 260nm corresponde a una concentración de 50μg/ml de ADN de doble cadena, y de 40μg/ml de ARN o ADN de cadena simple.

Adicionalmente, la concentración de ADN de una muestra pudo ser estimada visualmente mediante electroforesis en gel de agarosa (ver apartado 4.3.5), al comparar la señal de la muestra con la señal de un patrón comercial de ADN de concentración y tamaño conocidos (“Low DNA Mass Ladder”, Invitrogen). Puesto que se conocía el volumen de muestra cargado en el gel y la concentración del patrón comercial, se calculó la cantidad aproximada de ADN por volumen de muestra problema. Este método fue empleado principalmente para la cuantificación de fragmentos de ADN procedentes de digestión con enzimas de restricción (ver apartado 4.3.6).

La calidad del ARN tras su extracción y cuantificación se comprobó mediante electroforesis en gel del 5% de acrilamida:bisacrilamida 29:1 (p/v) (ver apartado 4.3.5.2).

Cuando las bandas de electroforesis correspondientes a los ARN ribosómicos 28S y 18S fueron visualizadas nítidamente en el gel, se confirmó la no degradación de la muestra.

4.3.3. Reacción de PCR utilizando ADNp como molde

La PCR es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de ADN a partir un fragmento de ADN molde y un par de oligonucleótidos complementarios a dicha secuencia de ADN, que delimitan la región a amplificar. La PCR se realizó para amplificar el ADNc de NOS3 clonado en el vector comercial de la empresa comercial ImaGenes GmbH, introduciéndole en este paso la secuencia del epítipo HA (TAC CCC TAT GAT GTG CCA GAT TAC GCC) en el extremo 3' (extremo carboxi-terminal de la proteína) y las secuencias de reconocimiento para las endonucleasas HindIII (AAGCTT; extremo 5') y EcoRV (GATATC; extremo 3'). Estos sitios de corte fueron introducidos para una correcta inserción posterior del ADNc de NOS3 dentro del plásmido pcDNA4/TO. El epítipo HA se añadió en el marco de lectura apropiado, obviando el codón de parada de la traducción natural del gen, para un seguimiento inequívoco de la proteína NOS3.

Tras cuantificar el ADNp obtenido a partir del cultivo bacteriano (ver apartado 4.3.2), se preparó la siguiente mezcla de reacción utilizando los oligonucleótidos sentido (S; 5'-**AAG CTT AAC ATG GGC AAC TTG AAG AG**-3') y antisentido (AS; 5'- **GAT ATC TTA TCA GGC GTA ATC TGG CAC ATC ATA GGG GTA GGG GCT GTT GGT GTC TGA GC**-3'):

• ADNp:	50-100ng	
• Tampón de reacción 10X:	5µl	Concentración final 1X
• Mezcla de los 4 dNTP (10mM):	1µl	Concentración final 0,2mM
• Taq ADN polimerasa (1U/µl):	1µl	
• Cebador 1 (10µM):	2µl	Concentración final: 0,4µM
• Cebador 2 (10µM):	2µl	Concentración final: 0,4µM
• Agua	hasta 50µl	

El programa de PCR utilizado para la amplificación de fragmentos de ADN constaba de los siguientes pasos:

Desnaturalización previa (1 ciclo)	95° C	2 minutos	
Amplificación (30 ciclos)	95° C	30 segundos	Desnaturalización Hibridación Síntesis
	60° C	30 segundos	
	72° C	4 minutos	
Extensión Final	72° C	15 minutos	

El producto obtenido tras la reacción de PCR fue confirmado mediante electroforesis en gel de agarosa (ver apartado 4.3.5.1) y utilizado inmediatamente para su clonación en el vector plasmídico pCR2.1 (ver apartado 4.3.7).

La figura 24 resume de manera esquemática la reacción de PCR.

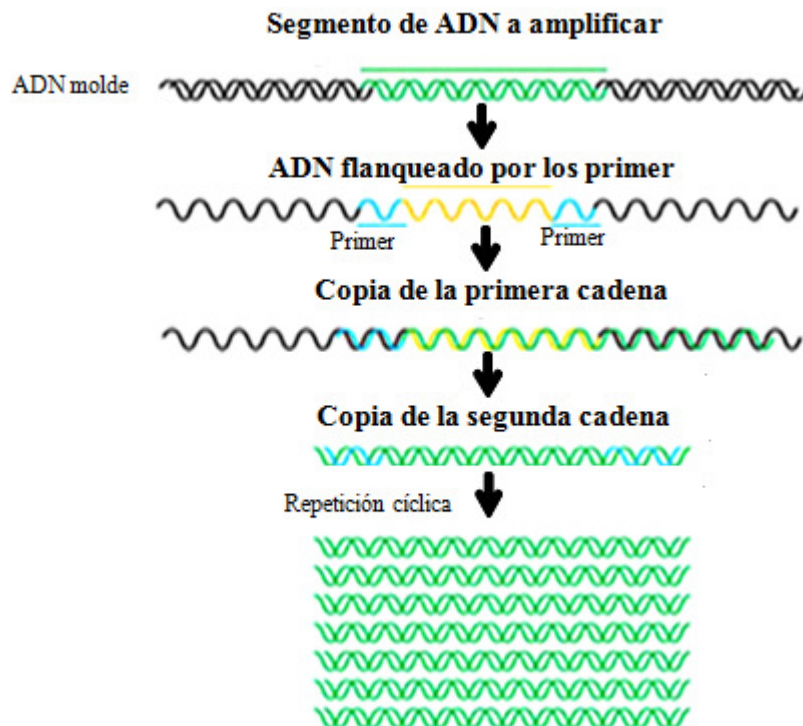


Figura 24. Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

<http://www.postgradoinvestigacion.uadec.mx/imagenes/CC27/1.jpg>

4.3.4. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Este procedimiento es un perfeccionamiento de la técnica básica de la PCR. Consiste en la cuantificación de un determinado fragmento de ADN en una muestra mediante la medida del incremento de fluorescencia durante la fase exponencial de PCR, realizando medidas en cada ciclo de amplificación (Higuchi, Fockler et al. 1993). En el presente trabajo hemos utilizado esta técnica para:

1) Cuantificación del número de copias de ADN_{mt} en relación al ADN_n, a partir de una muestra de ADN total.

2) Análisis de la expresión génica. Cuantificación del número de copias de un determinado transcrito de ARNm en una muestra de ARN total.

En cualquier caso, el tampón de reacción contenía la ADN polimerasa termoestable, iones divalentes (principalmente MgCl₂), los desoxinucleótidos-trifosfato (dNTPs) y el fluoróforo SYBRGreen. Esta molécula es capaz de unirse a la doble cadena de ADN, incrementando la emisión de fluorescencia. En el caso del análisis de expresión génica, este tampón contenía, además, la retrotranscriptasa capaz de sintetizar ADN_c a partir de ARNm. Por tanto, solamente es necesario añadir a esta mezcla de reacción los oligonucleótidos complementarios a la secuencia de ADN que se desea amplificar y la muestra de ADN o ARN.

Con cada ciclo de amplificación, la señal emitida por el fluoróforo es mayor puesto que resulta proporcional a la concentración de ADN de doble cadena. El ciclo umbral, o Ct, es el número de ciclos necesario para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base (Simpson, Feeney et al. 2000) y es inversamente proporcional al logaritmo del número de copias iniciales (Figura 25). Por tanto, un menor valor de Ct equivale a una mayor cantidad de moléculas iniciales de ADN o ARNm.

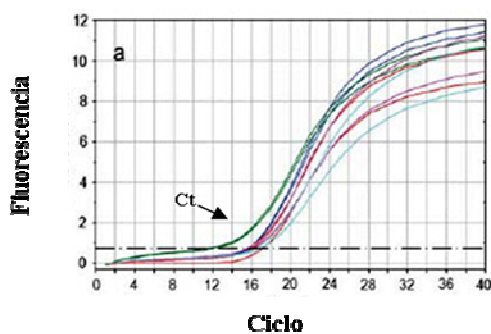


Figura 25. Imagen representativa de un ciclo umbral o Ct.

Tras la reacción de amplificación, se obtuvo la temperatura de fusión o de melting (T_m) para cada producto amplificado. Este valor hace referencia a la temperatura necesaria para separar las dos cadenas de ADN que forman dicho producto y es específica para cada amplificado. Así, al ir aumentando paulativamente la temperatura tras la reacción de PCR, las cadenas de ADN se van separando poco a poco hasta alcanzar la T_m del amplificado. En este punto, el SYBRGreen deja de estar unido al ADN y por tanto, de emitir fluorescencia. Así, una única T_m en la muestra tras la reacción significa un único producto de amplificación.

4.3.4.1. Diseño de cebadores para RT-qPCR

El diseño de los oligonucleótidos se realizó mediante el programa “Primer 3” (v.0.4.0) disponible en la página web <http://bioinfo.ut.ee/primer3/> y su síntesis fue realizada por Sigma-Aldrich. Una vez facilitada la secuencia de ADN concreta, se eligió una pareja de cebadores de entre las distintas opciones que el programa ofrecía, basándose en el tamaño del amplicón (70-200pb, preferiblemente 100-150pb), contenido de G/C (50-60%), temperatura de hibridación (60°C) y su situación dentro del gen. En cuanto a la situación, en el caso del análisis de la expresión génica, se requirió que ambos cebadores se situaran en exones diferentes, de modo que se garantizara la amplificación del ADNc y no del ADN genómico. En el caso del análisis del número de copias de ADNmt y con objeto de no amplificar el transcrito y sí el ADN genómico, se precisó que un oligo se situara en un exón y otro en un intrón.

Una vez elegida la pareja de oligonucleótidos, el siguiente paso fue comprobar su eficiencia. Para ello, se realizaron diluciones seriadas de ADN celular total (1,25, 2,5, 5, 10 y 20ng/ μ l) o de ARN total (50, 25, 12,5, 6,25, 3,12ng/ μ l), que se usaron como molde para las diferentes reacciones en un volumen final de 10 μ l. Cuando la pareja de cebadores ensayada fue cuantitativa, se obtuvo una recta de regresión lineal con pendiente $-3,3 \text{ Log}(x)$ al representar el valor de C_t frente al logaritmo de la concentración. En la figura 26 se muestra una recta de eficiencia representativa obtenida a partir de una pareja de cebadores cualesquiera. La tabla 2 recoge las parejas de cebadores utilizadas en las diferentes reacciones de RT-qPCR, para el análisis del número de copias de ADNmt/ADNn o para el estudio de la expresión génica, respectivamente. En el primer caso, los cebadores utilizados para la cuantificación del número de copias de ADNmt/ADNn amplificaban en

Material y Métodos

la secuencia de los genes MTCO2 (citocromo oxidasa II, mitocondrial) y SDHA (succinato deshidrogenasa A), nuclear.

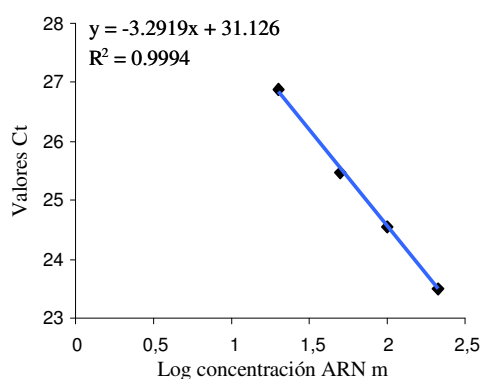


Figura 26. Curva de eficiencia representativa de los cebadores utilizados en el estudio.

Tabla 2. Cebadores empleados para cuantificar el número de copias de ADNmt/ADNn mediante RT-qPCR., Citocromo c oxidasa II (MTCO2) succinato deshidrogenasa A (SDHA).

Oligos	Gen	Posición	Secuencia (5' to 3')	Cf (μM)	Eficiencia
COII-qF	MTCO2		CGATCCCTCCCTTACCATCA	1	3,14
COII-qR	YP_003024029.1		CCGTAGTCGGTGTACTCGTAGGT		
SDHA-qF	SDHA		TCTCCAGTGGCCAACAGTGTT	0,25	3,16
SDHA-qR	NM_001294332.1		GCCCTCTTGTTCCCATCAAC		

Tabla 3. Cebadores empleados para cuantificar por RT-qPCR los transcritos de los genes glutatión peroxidasa-1 (GPX1), glutatión peroxidasa-4 (GPX4), catalasa (CAT), Cu/Zn-superóxido dismutasa (SOD1), Mn-superóxido dismutasa (SOD2), glutatión sintasa (GSS), apoptotic peptidase activating factor 1 (AFAF-1), BCL2-associated X protein (BAX), BCL-2-interacting killer (BIK) y proteína ribosomal L13A (RPL13A).

Oligos	Gen	Posición	Secuencia (5' to 3')	Cf (μM)	Eficiencia
NOS3-qF	NOS-3	3697-3719	AGGGCGACATGGAGCTGGACGAG	1	3,3
NOS3-qR	NM_000603.4	3873-3895	GTGTCTGAGCCGGGAGGGTCGAA		
GPx1-qF	GPX1	301-320	TCGGCTCCCCGTGCAACCAG	1	3,2
GPx1-qR	NM_000581.2	420-440	CGCACCGTTCACCTCGCACTT		

GPx4-qF	GPX4	403-422	CCTTCCCGTGTAACCAGTTC	0,6	3,2
GPx4-qR	NM_002085.3	587-609	ACTTGGTGAAGTTCCACTTGATG		
Cat-qF	CAT	1028-1053	TGGTAAACTGGTCTTAAACCGGAATC	1	3,1
Cat-qR	NM_001752.3	1159-1179	GGCGGTGAGTGTGTCAGGATAGG		
Sod1-qF	SOD1	430-451	TGTGGCCGATGTGTCTATTGAA	0,6	3,3
Sod1-qR	NM_000454.4	519-539	CACCTTTGCCCAAGTCATCTG		
Sod2-qF	SOD2	708-728	GGGAGCACGCTTACTACCTTC	1	3,3
Sod2-qR	NM_001024465.1	845-867	TCTTGCTGGGATCATTAGGGTAT		
GSS-qF	GSS	286-308	AGATGGACTTCAACCTGCTAGTG	0,25	3,4
GSS-qR	NM_000178.2	374-395	GTCAAAGAGACGAGCGGTAAAG		
Apaf1-qF	APAF-1	3105-3128	TGGCAGTGGTTGCTTTGTCCCAGT	0,3	3,1
Apaf1-qR	NM_013229.2	3190-3219	GGAGAAAACATCACACCATGAACCC AACTT		
Bax_qF	BAX	229-251	GCGTCCACCAAGAAGCTGAGCGA	0,3	3,1
Bax_qR	NM_138764.4	401-424	TGCTGGCAAAGTAGAAAAGGGCGA		
Bik-qF	BIK	96-118	CTTGATGGAGACCCTCCTGTATG	0,3	3,0
Bik-qR	NM_001197.4	166-186	AGGGTCCAGGTCTCTTCAGA		
Rpl13A-qF	RPL13A	541-563	CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA	0,4	3,1
Rpl13A-qR	NM_012423.3	642-666	TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA		

4.3.4.2. Reacción de (RT)-PCR en tiempo real

Comprobada la especificidad y capacidad cuantitativa de las parejas de cebadores elegidas, éstos pudieron ser usados para la reacción de PCR. Dicha reacción se desarrolló en un termociclador LightCycler[®] 480 (Roche), en placas de 96 pocillos y en un volumen final de 10µl.

- Para el análisis del número de copias de ADNmt/ADNn se utilizó como muestra una dilución de 5ng/µl de ADN total (ver apartado 4.3.1.4). A partir del kit ThermOne™ RT-PCR Premix (RBC, Taipei, Taiwan), se preparó la siguiente mezcla de reacción:

Tampón	5µl
Oligo 1 (10mM)	0,25µl / 1µl
Oligo 2 (10mM)	0,25µl / 1µl
Muestra	3µl
H ₂ O	1,5µl / 0µl (hasta 10µl finales)

Material y Métodos

El programa de amplificación constaba de los siguientes ciclos y etapas:

Activación (1 ciclo)	95° C	10 minutos	
Amplificación (30 ciclos)	94° C	20 segundos	Desnaturalización
	58° C	30 segundos	Hibridación
	72° C	30 segundos	Síntesis
Melting (1 ciclo)	95° C	1 segundos	
	65° C	15 segundos	
	98° C	0.11 segundos	

La señal se adquirió al finalizar cada ciclo de amplificación y de manera continua durante el melting desde los 65°C a los 98°C.

El cálculo para determinar el número de copias de ADN_{mt} relativo al ADN_n se determinó a partir de la diferencia entre el Ct mitocondrial y nuclear, según la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ copias ADN}_{\text{mt}}/\text{ADN}_{\text{n}} = 2^{(\Delta\text{Ct})}$$

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct nuclear} - \text{Ct mt}$$

- Para el análisis de la expresión génica se utilizó como muestra una dilución de 33ng/μl de ARN total (ver apartado 4.3.1.5). A partir del kit One-Step QuantiTect SYBRGreen Kit (Qiagen, Limburg, Países Bajos), se preparó la siguiente mezcla de reacción:

Tampón	5μl
Oligo 1 (10mM)	variable (entre 0,25 y 1μl)
Oligo 2 (10mM)	variable (entre 0,25 y 1μl)
Muestra	3μl
H ₂ O	hasta 10μl finales

En los controles negativos, el ARN fue sustituido por agua libre de ARNasas (Sigma-Aldrich).

El programa constaba de los siguientes ciclos y etapas:

Activación (1 ciclo)	55° C	20 minutos	
Activación (1 ciclo)	95° C	15 minutos	
Amplificación (35 ciclos)	95° C	15 segundos	Desnaturalización
	56° C	30 segundos	Hibridación
	72° C	30 segundos	Síntesis
Melting (1 ciclo)	95° C	1 segundos	1°C/sec
	65° C	15 segundos	
	98° C	0.11 segundos	

Una vez obtenidos los valores del ciclo umbral (Ct) de cada muestra, se cuantificó la expresión génica relativa mediante el método de comparación de Ct, usando la fórmula aritmética desarrollada por Pedersen, 2001:

$$\text{Variación en los niveles de expresión} = 2^{(\Delta C_t)}$$

$$\Delta C_t = C_t (\text{RPL13A}) - C_t (\text{gen problema})$$

Los cálculos se normalizaron con los datos del gen RPL13 (proteína ribosomal L13) que posee una expresión constitutiva, no inducible.

4.3.5. Electroforesis de ácidos nucleicos

4.3.5.1. Electroforesis horizontal de ADN en geles de agarosa

Para comprobar la eficiencia del proceso de PCR o como paso previo a la purificación de fragmentos de ADN en gel de agarosa, una alícuota del producto de PCR o el producto de la digestión enzimática del ADNp fue cargado en un gel de agarosa y sometido a electroforesis. La separación electroforética previa a la purificación de fragmentos de ADN obtenidos por digestión enzimática es un paso obligatorio para los procesos de clonación. De este modo, evitamos arrastrar el material de ADN no necesario.

Los geles se prepararon disolviendo un 1% de agarosa (p/v) en tampón de electroforesis TBE (Tris 50mM; ácido bórico 50mM; EDTA 1mM), a unos 60–70°C. Posteriormente y con el gel aún caliente, se añadió 0,5µg/ml de bromuro de etidio, se mezcló cuidadosamente y se vertió sobre el molde del gel, con el peine ya puesto, donde se dejó gelificar por enfriamiento. El bromuro de etidio es un agente intercalante del ADN

altamente cancerígeno, que permite visualizar el ADN cuando es expuesto a una fuente de luz UV.

Para cargar las muestras en el gel, estas se mezclaron con 1/3 del volumen de tampón de carga (Ficoll 400 al 30% y azul de bromofenol al 0,1% (p/v) en tampón TBE). Como marcador de peso molecular se utilizó “1 Kb Plus DNA Ladder” (Invitrogen). Cuando se deseó estimar la concentración de ADN de una muestra mediante esta aproximación electroforética, se utilizó el marcador de peso molecular “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen), el cual consiste en una mezcla equimolecular de fragmentos de ADN de 100 a 2000pb, de concentración conocida. La electroforesis se desarrolló sumergiendo el gel en tampón TBE y aplicando un voltaje constante de 80-100 V durante, aproximadamente, 30min, o hasta que los fragmentos de ADN contenidos en una misma muestra quedaron suficientemente separados.

4.3.5.2. Electroforesis vertical de ARN en geles de poliacrilamida-urea

Para la comprobación del estado del ARN una vez extraído, las muestras fueron separadas en geles verticales del 5% de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 29:1, SERVA, Heidelberg, Alemania) y 7M de urea, en tampón TBE. A continuación, para la polimerización del gel, fueron añadidos persulfato amónico (APS) al 0,04% (p:v) y N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina (TEMED) al 0,001% (v:v) (Sigma-Aldrich). El gel se vertió inmediatamente entre los cristales que forman el soporte, se colocó el peine y se dejó polimerizar. A la cantidad de ARN a cargar se le añadió el ‘colorante urea’ (1g de urea, 600µl de H₂O estéril, 0,02% azul de xilenol y 100µl del colorante que lleva Ficoll 400 al 30% y azul de bromofenol al 0,1%, en 1ml TBE) hasta llegar a un volumen total de 10-15µl. Las muestras, se calentaron durante 10min a 65°C y se enfriaron en hielo inmediatamente después. El gel se corrió en tampón TBE a un amperaje constante de 10 mA. Terminada la electroforesis, se sacó el gel y se tiñó con bromuro de etidio para poder visualizar el ARN por fluorescencia. Para la tinción se utilizaron 200ml de agua con 15µl de la solución de bromuro de etidio 10mg/ml (Figura 27).

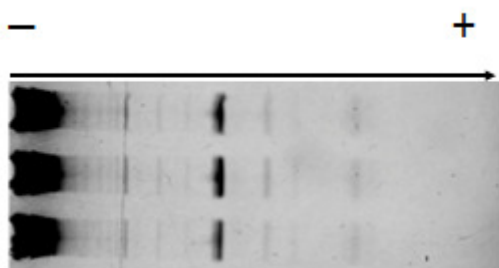


Figura 27. Imagen representativa de una electroforesis de RNA en gel de poliacrilamida-urea. Se observa la integridad de la muestra de RNA y la ausencia de degradación.

4.3.6. Digestión de ADN con enzimas de restricción

En el proceso de clonación del ADNc de NOS3 en el vector pcDNA4/TO, tanto éste como el plásmido pCR2.1 conteniendo dicho ADNc tuvieron que ser digeridos con las endonucleasas HindIII y EcoRV. Para ello, se preparó una mezcla de reacción conteniendo: 1-3µg de plásmido, 1-3µl de endonucleasa (10 U/µl) (NEB, Massachusetts, EE.UU) y tampón de reacción 1X, en un volumen final de 50µl en agua estéril. La reacción se llevó a cabo a la temperatura óptima de cada enzima (37°C), durante 1-2h. En nuestro caso, fue necesario realizar dos digestiones independientes debido a que ambas endonucleasas requieren diferentes condiciones para su actividad enzimática. Así pues, una vez comprobado que tras la primera digestión enzimática el plásmido circular había sido linearizado (ver apartado 4.3.5.1), éste fue purificado (ver apartado 4.3.1.2) y vuelto a digerir con la segunda de las enzimas de restricción. El producto resultante de esta segunda digestión fue separado en un gel de agarosa del 1% (ver apartado 4.3.5), recuperando o bien el plásmido linearizado con ambas endonucleasas o bien el ADNc de NOS3 (ver apartado 4.3.1.3).

4.3.7. Clonación en plásmidos bacterianos

Los productos de PCR que se desean clonar en algún vector de expresión (p.ej. pcDNA4/TO) (Figura 28) mediante digestión con enzimas de restricción específica y ligación posterior, han de ser previamente clonados en otro vector de donde escindirlos con dichas endonucleasas. El vector plasmídico utilizado para tal fin fue el denominado pCR2.1, suministrado en el 'TA Cloning® Kit' (Invitrogen).

Para que la ligación del producto de PCR dentro del plásmido pCR2.1 sea posible, es necesario añadir un ciclo final de amplificación a 72°C en el programa de PCR (o a cualquiera que sea la temperatura óptima de la ADN polimerasa) durante 3-5min. Este ciclo añade una simple deoxiadenosina (A) al extremo 3' de los amplificados, necesaria para poder clonarlos en el vector. Por este mismo motivo, debido a que las (A)s añadidas al extremo 3' se degradan fácilmente, la ligación se realizó con el producto de PCR recién sintetizado.

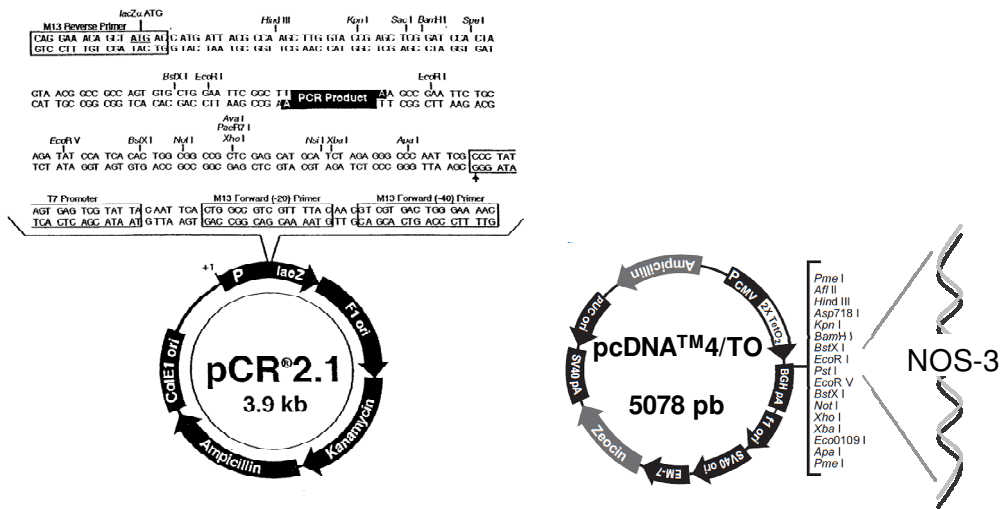


Figura 28. Imagen de los vectores pCR2.1 y pcDNA4/TO (Invitrogen). El ADNc de NOS-3, conteniendo el epítipo HA y los sitios de corte para las endonucleasas HindIII y EcoRV, fue clonado en el plásmido pCR2.1 y, a partir de este, en el plásmido pcDNA4/TO bajo control del promotor del citomegalovirus (P_{CMV}). pcDNA4/TO confiere resistencia a ampicilina y a zeocina, lo que permite su selección en bacterias y células eucariotas, respectivamente.

En el caso de la ligación del producto de digestión enzimática en el plásmido pcDNA4/TO, se requiere que tanto el inserto de ADN como el vector sean previamente digeridos mediante las mismas endonucleasas (ver apartado 4.3.6) y que se purifiquen posteriormente a partir de un gel de agarosa (ver apartado 4.3.1.3). Este paso de purificación permite separar el ADN de interés del resto, que podría ocasionar resultados indeseables.

Con el objetivo de calcular la cantidad de inserto necesaria para conseguir una relación 1:1 vector:inserto en la reacción de ligación, se utilizó la siguiente fórmula:

$$X \text{ ng inserto de ADN} = \frac{(\text{pb inserto de ADN}) \times (50 \text{ ng vector})}{(\text{pb vector})}$$

El protocolo seguido para la ligación del inserto en el vector pcDNA4/TO fue el siguiente: 1) en un tubo Eppendorf añadir 50ng de vector (5078pb), 36ng de inserto (3660pb) (ver fórmula de arriba), 1µl de tampón de ligación 10X, 1µl de enzima T4 ADN ligasa (4U/µl), y completar con H₂O estéril hasta un volumen final de 10µl; 2) incubar esta mezcla a 14°C durante toda la noche. Finalmente, se procedió inmediatamente a

transformar bacterias competentes (ver apartado 4.2.1) o se guardó la mezcla a -20°C hasta su uso. En el caso de ligación de productos de PCR en el vector pCR2.1, se optó por añadir directamente a la mezcla de ligación 2µl de la muestra de PCR, una vez confirmada mediante electroforesis en gel de agarosa (ver apartado 4.3.5.1). El resto del protocolo se desarrolló de la misma manera descrita anteriormente.

4.3.8. Secuenciación automática de ADN

Con objeto de confirmar que la amplificación de NOS3 no había introducido cambios en la secuencia del ADNc y que, por tanto, la secuencia clonada era 100% homóloga a la descrita en la base de datos del NCBI, se procedió a secuenciar el plásmido pCR2.1 conteniendo el inserto de NOS3. Asimismo, se secuenció el plásmido pcDNA4/TO tras clonar el mismo inserto, para comprobar que éste se había ligado en la dirección correcta. En el primer caso, se utilizaron los oligonucleótidos universales M13 F y M13 R, que franquean el sitio de clonaje múltiple del vector pCR2.1, más las parejas de oligos internos que hibridan dentro de la secuencia de NOS3, diseñadas en nuestro laboratorio (pareja 1: sentido 5'-AGG TCT GCA CAG GAA ATG TTC-3', y antisentido 5'-CAG GGC AAG CTG GGA TCG-3'; pareja 2: sentido 5'-AGA ATG AGC AGA AGG CCA G-3', y antisentido 5'-GCA GAC ACC TAT GTG GTC C-3'). En el segundo caso, se utilizaron los cebadores universales CMV (cytomegalovirus)-sentido y BGH (bovine growth hormone)- antisentido.

La secuenciación de las muestras de ADN se realizó en la Unidad de Proteómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba (UCO). La cantidad total de ADN necesaria por cada reacción de secuenciación dependía del tipo de ADN. En el caso de la secuenciación a partir de vectores plasmídicos, la cantidad necesaria de ADN y oligonucleótidos para una única reacción de secuenciación fue de 300-500ng y 3,2pmol, respectivamente. Los cromatogramas enviados por el Servicio de Secuenciación fueron recibidos por correo electrónico y analizados en un PC mediante el programa BioEdit 7.2.5.

Material y Métodos

Figura 29. Secuencia del ADNc de NOS3. Los números indican la posición en la secuencia (NM_000603.4). Se indican los codones de inicio (verde) y final (rojo) de la traducción, la secuencia de los cebadores utilizados en la clonación del ADNc (negrita), los sitios de reconocimiento para las endonucleasa HindIII (extremo 5') y EcoRV (extremo 3') (mayúscula subrayado) y la secuencia del epítipo HA (mayúscula sin subrayar). El códon de parada fue eliminado en el proceso de clonación

```

                                     AAGCTTaacatgg      301
gcaacttgaa gagcgtagcc caggagcctg ggccaccctg cggcctgggg ctggggctgtg      361
gcottgggct gtgcgcaag cagggcccag ccaccocggc ccctgagccc agccggggccc      421
cagcatccct actcccacca ggcaccagaac acagccccc gagctccccg ctaaccacagc      481
ccccagaggg gcccaagttc cctcgtgtga agaactggga ggtggggagc atcacctatg      541
acaccctcag cgcccaggcg cagcaggatg ggccctgcac cc caagacgc tgcctggggt      601
ccctggtatt tccacggaaa ctacagggcc ggccctcccc cggccccccg gccctgagc      661
agctgctgag tcaggcccgg gacttcatca accagtaacta cagctccatt aagaggagcg      721
gctcccaggc ccacgaacag cggettcaag aggtggaagc cgaggtggca gccacaggca      781
cctaccagct tagggagagc gagctggtgt tcggggctaa gcaggcctgg cgaacgcctc      841
cccgctgcgt gggccggatc cagtggggga agctgcagggt gttcgatgcc cgggactgca      901
ggtctgcaca ggaaatgttc acctacatct gcaaccacat caagtatgcc accaacgggg      961
gcaaccttcg ctcgccca tc acagtgttcc cgcagcgtg ccctggccga ggagacttcc      1021
gaatctggaa cagccagctg gtgctctacg cgggctaccg gcagcaggat ggctctgtgc      1081
ggggggacc agccaacgtg gagatcaccc agctctgcat tcagcacggc tggaccaccag      1141
gaaacggtcg cttcgacgtg ctgcccctgc tgcctgaggg ccc agatgat ccccagaac      1201
tcttccttct gccccccgag ctggtccttg aggtgcccct ggagcaccoc acgctggagt      1261
ggtttgcagc cctgggctcg cgctggtacg ccctcccggc agtgtccaac atgctgctgg      1321
aaattggggg cctggagttc cccgcagccc ccttcagttg ctggtacatg agcactgaga      1381
tcggcacag gaacctgtgt gacctcacc gctacaacat cctggaggat gtggctgtct      1441
gcaatgacct ggatacccgg accacctcgt ccctgtggaa agacaaggca gcagtggaaa      1501
tcaacgtggc cgtgctgcac agttaccagc tagccaaaagt caccatcgtg gaccaccacg      1561
cggccacggc ctctttcatg aagca cctgg agaattagca gaaggccagg ggggctgcc      1621
ctgcagactg ggcctggatc gtgcccccca tctcgggcag cctcactcct gttttccatc      1681
aggagatggt caactatttc ctgtccccgg ctttcgcta ccagccagac ccctggaagg      1741
ggagtgcgc caagggcacc ggcacacca ggaagaagac ctttaaagaa gtggccaacg      1801
ccgtgaagat ctccgcctcg ctcatgggca cgggtgatggc gaagcgagtg aaggcgacaa      1861
tctctgatgg ctccgagacc ggccggggcc agagctacgc acagcagctg ggagactct      1921
tccggaaggg ttttgatccc cgggtcctgt gtatggatga gtatgacgtg gtgtccctcg      1981
aacacgagac gctggtgctg gtaacatgg gacatattgg gaatggggat ccccggaga      2041
atggagagag ctttgagct gccctgatgg agatgtccgg cccctacaac agctcccctc      2101
ggccggaaca gcacaagagt tataagatcc gcttcaacag catctcctgc tcagaccac      2161
tgggtgtcctc ttggcggcgg aagaggaagg ag tccagtaa cacagacagt gcaggggccc      2221
tgggcaccct caggttctgt gtgttcgggc tcggctccc ggcatacccc cacttctgcg      2281
cctttgctcg tgcctgggac acacggctgg aggaactggg cggggagcgc ctgctgcagc      2341
tgggcccagg cgacgagctg tgcggccagg aggaggcctt ccgaggctgg gccccaggc tg      2401
ccttccaggc cgcctgtgag acctctgtgt tgggagagga tgccaaggcc gccgcccag      2461
acatcttcag ccccaaacgg agctggaagc gccagaggtg ccggctgagc gcccaggccg      2521
agggcctgca gttgctgcca ggtctgatcc acgtgcacag gcggaagatg ttcaggcta      2581
caatccgctc agtggaaaac ctgcaaagca gcaagtccac gaggggccacc atcctggtgc      2641
gcctggacac cggaggccag gaggggctgc agtaccagcc gggggaccac ataggtgtct      2701
gcccgcacca ccggcccggc cttgtggagg cgctgctgag ccgctgagg gacccgcccg      2761
cgcccactga gcccgtggca gtagagcagc tggagaaggg cagccctggt ggccctcccc      2821
ccggctgggt gcgggacccc cggctgcccc cgtgcaecgt gcgccaggct ctacactct      2881
tcttgacat cacctcccca cccagccctc agctcttgcg gctgctcagc accttggcag      2941
aagagcccag ggaacagcag gagctggagg ccctcagcca ggatccccga cgtacagagg      3001
agtggaagtg gttccgctgc cccacgctgc tggagggtgt ggagcagttc ccgtcggtg      3061
cgctgcctgc cccactgctc ctcaccacgc tgcctctgct ccagccccgg tactactcag      3121
tcagctcggc acccagcacc caccaggag agatccacct cactgtagct gtgctggcat      3181
acaggactca ggatgggctg g gcccctgc actatggagt ctgctccacg tggctaagcc      3241
agctcaagcc cggagaccct gtgcctgct tcatccgggg ggtcccctcc ttcgggtgc      3301
caccgatcc cagcttgccc tgcactctgg tgggtccagg cactggcatt gcccccttcc      3361
ggggattctg gcaggagcgg ctgcctgaca ttgagagcaa agggctg cag cccactccca      3421
tgactttggt gttcggctgc cgatgctccc aacttgacca tctctaccgc gacgaggtgc      3481
agaacgcccc gcagcgggg gtgtttggcc gactcctcac cgccttctcc cgggaacctg      3541
acaaccccaa gacctacgtg caggacatcc tgaggacgga gctggctgcg gagggtgacc      3601
gcgtgctgtg cctcgagcgg ggccacatgt ttgtctcgg cgatgttacc atggcaacca      3661
acgtcctgca gaccgtgcag cgcactctgg cgacggagg cgacatggag ctggacgagg      3721
cggcgacgt catcgcgctg ctgcccggatc agcaacgcta ccacaagac attttcgggc      3781
tcacgctgcg caccaggag gtgacaagc c gatacgcac ccagagcttt tccttgagg      3841
agcgtcagtt cgggggcgca gtgcctggg cgttcgacc tccc gctca gacacca aaca      3901
gccccggaTACCCCTATGATGTGCCAGATTACGCCTGATAAGATATC

```

4.4. Manipulación de proteínas

4.4.1. Lisis celular y obtención de fracciones celulares

4.4.1.1. Lisis celular para la extracción de proteínas totales

Para la obtención del lisado celular total se preparó una solución de lisis compuesta por HEPES 50mM pH 7,5, EDTA 2mM, NaCl 100mM y Nonidet NP-40 1% (v/v), incluyéndose, inmediatamente antes de usar, los inhibidores de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM, aprotinina 5µg/ml y leupeptina 10µg/ml (Sigma-Aldrich). Tras retirar el medio de cultivo de la placa que contiene las células, éste se centrifugó a 240g durante 5min, reservándose el pellet celular resultante y conservando el sobrenadante a -80°C para la cuantificación del ON y lactato deshidrogenasa (LDH) (ver apartados 4.8.1 y 4.8.5.1, respectivamente). Mientras tanto, las células adheridas a la placa de cultivo fueron recogidas con ayuda de un rascador tras haber añadido un volumen de solución de lisis de, aproximadamente, 22µl/cm². La suspensión de lisis así obtenida se juntó con el pellet celular reservado anteriormente y, tras resuspender, se incubó 10min en hielo. A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 20.000g durante 5min y los sobrenadantes fueron conservados a -80°C hasta el momento de su uso. Adicionalmente, se reservó una pequeña alícuota para la cuantificación de la concentración de proteína.

4.4.1.2. Obtención de la fracción protéica para su análisis mediante electroforesis bidimensional y espectrometría de masas

La fracción de proteínas citoplásmicas se obtuvo mediante homogenización manual de las células con micropistilos, en un tampón conteniendo Tris-HCl 20mM pH 7,6, sacarosa 0,5M, KCl 0,15M, DTT (ditiotreitól) 20mM, PMSF 1mM, leupeptina 1,2µM y un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete Mini EDTA-free, Roche). El homogenado celular obtenido se centrifugó a 14.000g durante 15min para eliminar los restos subcelulares. A continuación, el sobrenadante se trató con benzonasa 500U/ml (Novagen, Dinamarca) a temperatura ambiente durante 30min, para eliminar la contaminación residual con ácidos nucleicos, y se centrifugó a máxima velocidad durante 5min a 4°C en la microcentrífuga. Finalmente, se recuperó el sobrenadante, donde se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (apartado 4.4.2). La muestra se dividió en distintas alícuotas y se almacenó a -80°C hasta su uso.

4.4.1.3. Obtención de extractos citoplasmáticos y nucleares de células en cultivo

Para la obtención de la fracción citoplasmática se preparó una solución de lisis compuesta por HEPES 10mM, EDTA 0,1mM, EGTA 0,1mM, KCl 10mM y Nonidet NP-40 0,6% (v/v) y se ajustó a un pH de 7,9 con NaOH (Schreiber, Matthias et al. 1989), incluyéndose en el momento de uso los inhibidores de proteasas PMSF 0,5mM, DTT 1mM, aprotinina 5µg/ml y leupeptina 10µg/ml. Las células se lisaron con un volumen de 22µl/cm² (200µl para placas celulares de 6 pocillos) y fueron recogidas con ayuda de un rasador e incubadas durante 5min en hielo. Los lisados resultantes fueron sometidos a agitación durante 20 s y posterior centrifugación a 18.000g durante 3min a 4°C. El sobrenadante obtenido, compuesto por proteínas citoplasmáticas, se alícuotó y almacenó a -80°C hasta su uso, reservándose una pequeña alícuota para la cuantificación de la concentración de proteína. El precipitado compuesto por núcleos y restos de membranas celulares se trató con 50µl de la solución de lisis compuesta por HEPES 20mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM y NaCl 0,4M y se ajustó a pH 7,9 con NaOH (Schreiber, Matthias et al. 1989), incluyendo los inhibidores de proteasas PMSF 1mM, DTT 1mM, aprotinina 5µg/ml y leupeptina 10µg/ml justo antes de usar. La muestra se mantuvo en hielo durante 20min y se mezcló en un agitador durante 30 s cada 5min de incubación. Posteriormente, se centrifugó a 18.000g durante 5min a 4°C. El sobrenadante obtenido, compuesto por proteínas nucleares, se alícuotó y almacenó a -80°C hasta el momento de su uso, reservándose de nuevo una pequeña alícuota para la cuantificación de la concentración de proteína.

4.4.2. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas en una muestra se estimó por el método colorimétrico de Bradford (Bradford 1976), utilizando el reactivo comercial concentrado 'Protein Assay Dye Reagent Concentrate' (BioRad, Munich, Alemania). Dicho reactivo interacciona con las proteínas formando complejos colorimétricos relativamente estables con un pico de absorbancia a 595nm. El reactivo de Bradford fue inicialmente diluido 1:10 con H₂O bidestilada a partir del concentrado 10X. El soporte utilizado para la reacción y posterior medición fue una placa de 96 pocillos (SPL Life Sciences Inc, Seúl, Corea del Sur). En cada pocillo se añadieron 20µl de muestra (a la dilución adecuada en H₂O bidestilada) y, a continuación, se añadió a cada muestra 180µl del reactivo de Bradford 1X. Tras incubar la placa durante 5min en oscuridad, se midió la absorbancia a 595nm en un volumen total de 200µl, a temperatura ambiente, en un lector de placas (TECAN). Para la elaboración de la

recta patrón a la cual fueron referidos los datos obtenidos para la determinación de la concentración de proteína, se utilizó la albúmina de suero bovino (BSA) (Bio-Rad) como proteína estándar a las concentraciones de 0, 0,14, 0,28, 0,56, 0,84, 1,12, 1,4, 1,68, 1,96, 2,24, 2,52 y 2,8 μ g de proteína.

4.4.3. Electroforesis de proteínas

El análisis de la expresión de proteínas se realizó mediante electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y posterior western-blot, o mediante electroforesis bidimensional acoplada a espectrometría de masas. La electroforesis es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico. A partir de la separación electroforética de las proteínas, se estudió la distribución celular de la proteína NOS3 (apartado 4.6) y la expresión de las proteínas de los diferentes complejos mitocondriales, se cuantificó el grado de nitración de proteínas, o se identificaron aquellas proteínas expresadas de manera diferencial entre las distintas líneas celulares y los distintos tratamientos ensayados.

4.4.3.1. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE

El dodecilsulfato sódico (SDS) es un detergente aniónico que se une a las proteínas dotándolas de carga neta negativa, de forma que, al ser aplicado un campo eléctrico, las proteínas de una muestra pueden ser separadas en función de su peso molecular y no de su carga. Para la realización de SDS-PAGE se requirió la preparación de las siguientes soluciones y tampones:

- Acrilamida-bisacrilamida (AB) (37,5:1, 40%) (Bio-Rad)
- Tampón del gel separador 2X: 742mM Tris-HCl pH 8,8, 0,2% SDS
- Tampón del gel concentrador 2X: 247mM Tris-HCl pH 6,8, 0,2% SDS
- Tampón de electroforesis 10X: 247mM Tris-HCl pH 8,8, 1,9M glicina, 1% SDS
- Tampón de carga 5X: 30% glicerol, 310mM Tris-HCl pH 6,8, 10% SDS, 5% β -mercaptoetanol y 0,1% azul de bromofenol.

El gel separador se preparó con un porcentaje final de acrilamida-bisacrilamida del 10% ó 12% dependiendo del tamaño de la proteína estudiada, más el volumen necesario de tampón separador. El gel concentrador se preparó con un porcentaje del 4% de AB, más tampón concentrador. La polimerización de los geles se realizó con la adición de 0,1% APS y 0,05% TEMED a la mezcla del gel. El gel separador se vertió entre los cristales que

Material y Métodos

forman el soporte (Mini Protean® System 1658050, Bio-Rad), (Figura 30) dejando unos 2cm libres en la parte superior para el gel concentrador. Ese espacio fue cubierto cuidadosamente con isopropanol para evitar la formación de menisco o curvatura en el gel separador. Cuando polimerizó dicho gel, se retiró el isopropanol y se lavó su superficie con agua destilada. Tras retirar el exceso de agua con un papel secante, se vertió el gel concentrador, rellenando el espacio que anteriormente ocupaba el isopropanol. Finalmente, se insertó el peine con cuidado y se esperó a la polimerización del gel antes de retirarlo. Cuando polimerizó, los pocillos se lavaron (con ayuda de una jeringa) con el propio tampón de electroforesis para retirar los restos de acrilamida y SDS antes de cargar las muestras.

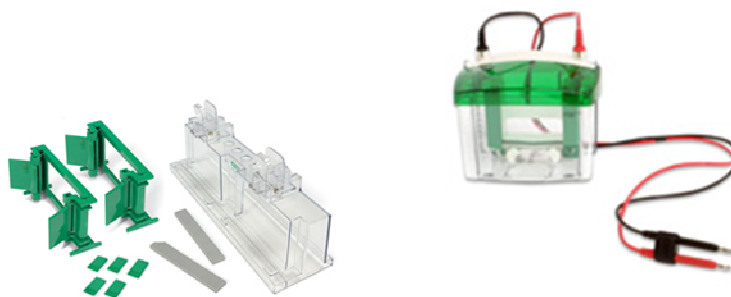


Figura 30. Sistema de electroforesis (BioRad). Imagen de la cubeta de electroforesis junto con los soportes de los geles y los peines.

Las muestras de proteínas se resolvieron en el gel descrito, montado en un sistema “Mini-PROTEAN® Tetra Cell” (Bio-Rad) (Figura 30), al aplicar una corriente eléctrica de 100V y 70 mA durante el tiempo necesario. Previamente, el gel fue sumergido en tampón de electroforesis y las muestras fueron cargadas junto con el patrón de peso molecular “Precision Plus Protein Standards Dual Color” (BioRad), tras haber sido mezcladas con el volumen correspondiente de tampón de carga y calentadas durante 5min a 95°C.

Para el análisis de expresión de las proteínas correspondientes a los complejos respiratorios mitocondriales I (NDUFB6), II (SDHB), III (UQCRC2) y IV (MTCO2), se partió de una muestra de 40µg de proteína total extraída como se detalla en el apartado 4.4.1.1. En el caso de la cuantificación de la nitración en tirosina producida por ONOO⁻, se utilizó de 10µg de proteína mitocondrial obtenida como se detalla en el apartado 4.5.2. En este caso, ni el tampón de carga utilizado contenía β-mercaptoetanol (condiciones no

reductoras), ni las muestras fueron sometidas a altas temperaturas para evitar romper los enlaces nitrotirosina.

Al finalizar la electroforesis, las proteínas se transfieren desde el gel hasta una membrana de nitrocelulosa (ver apartado 4.4.4), donde podrán ser detectadas y cuantificadas mediante western blot (ver apartado 4.4.6).

4.4.3.2. Electroforesis bidimensional de proteínas

La separación electroforética de proteínas en dos dimensiones se realizó para el análisis de la expresión diferencial de proteínas entre las líneas celulares en estudio y en las distintas condiciones ensayadas, y como paso previo a la identificación de proteínas por espectrometría de masas. Las proteínas se separaron en una primera dimensión en función de su punto isoeléctrico (pI) por isoelectroenfoque (IEF). A continuación, en una segunda dimensión, las proteínas se separaron según su tamaño mediante SDS-PAGE. Cada muestra de proteínas, procedente de la mezcla equitativa de las muestras obtenidas a partir de 4 experimentos independientes, fue analizada por triplicado.

Dada la alta sensibilidad de la técnica de espectrometría de masas, en todas las etapas del análisis proteómico se extremaron las precauciones para evitar la contaminación por queratinas. Todo el material se lavó antes de su uso con etanol y agua miliQ y siempre se trabajó con guantes previamente lavados con etanol. Asimismo, toda la manipulación experimental se llevó a cabo en una campana de flujo vertical. Las soluciones se prepararon a partir de agua miliQ y reactivos de grado analítico.

4.4.3.2.1. Isoelectroenfoque

El IEF se llevó a cabo utilizando el sistema “Protean IEF cell” (BioRad) (Figura 31). Las tiras de gel utilizadas (“Immobiline DryStrips Gels”, GE Healthcare) abarcaban un gradiente de pH no lineal de 3 a 11 y tenían una longitud de 18cm.

Durante la preparación de la muestra, se mezclaron 300µg de proteínas citosólicas (apartado 4.4.1.2) con tampón de rehidratación (urea 8M, CHAPS 2% p/v, IPG Buffer 3-11 NL, DTT recién preparado 2,8 mg/ml y trazas de azul de bromofenol (GE Healthcare)) hasta alcanzar un volumen final de 450µl. Esta mezcla se incubó durante 30min a temperatura ambiente para conseguir la desnaturalización completa de las proteínas. A continuación, la muestra se puso en contacto con la tira de gel en la cubeta, colocando entre el electrodo y el gel una tira de papel Whatmann, y se cubrió con aceite mineral para

Material y Métodos

evitar la evaporación de la muestra. Se utilizaron tantas tiras de gel como muestras de proteínas a analizar. El IEF se llevó a cabo a 20°C, siguiendo el protocolo que se resume en la tabla 4.



Figura 31. Sistema de IEF (BioRad)

Tabla 4. Programa de IEF.

Paso	Tiempo	Voltaje (v)	Voltios-hora (Vh)	Gradiente
Rehidratación pasiva	6:00	-	-	-
Rehidratación activa	6:00	50	-	rápida
1	1:30	500	-	lineal
2	1:30	1000	-	lineal
3	1:30	2000	-	lineal
4	1:30	4000	-	lineal
5	2:00	8000	-	lineal
6	∞	8000	52000	rápida

Una vez finalizado el programa de IEF, se sacaron las tiras de gel y se incubaron durante 30min en tampón de equilibrado (Tris-HCl 50mM pH 8,8, urea 6M, glicerol 30%, SDS 2% y trazas de azul de bromofenol) con DTT recién preparado a la concentración de 65mM. Seguidamente, los geles se volvieron a incubar durante 30min en tampón de equilibrado con iodoacetamida 25mM para proteger los grupos -SH libres de las proteínas y mejorar la separación electroforética posterior.

4.4.3.2.2. Segunda dimensión en SDS-PAGE

La segunda dimensión (2-D) se llevó a cabo mediante SDS-PAGE, usando el sistema “Protean Plus Dodeca Cell” (BioRad) (Figura 32). Para ello, la tira de IEF ya equilibrada se colocó horizontalmente sobre un gel desnaturalizante del 12% de poliacrilamida, evitando la formación de burbujas de aire entre la tira y el gel. En una esquina, junto al extremo básico de la tira de IEF, se situó un trozo de papel Whatman embebido en la solución que contenía el marcador de peso molecular (rango de 10-250 kDa, BioRad). Una vez terminado este proceso, tanto la tira como el papel Whatman fueron sellados con agarosa al 0,5%.

La electroforesis se llevó a cabo en dos pasos: (1) 2,5 W/gel durante 10min; y (2) 10 W/gel hasta finalizar la separación electroforética, durante, aproximadamente, 6h (Romero-Ruiz, Carrascal et al. 2006). El tampón de electroforesis utilizado fue: 50mM Tris pH 8,3, 400mM Glicina y 0,1% SDS.

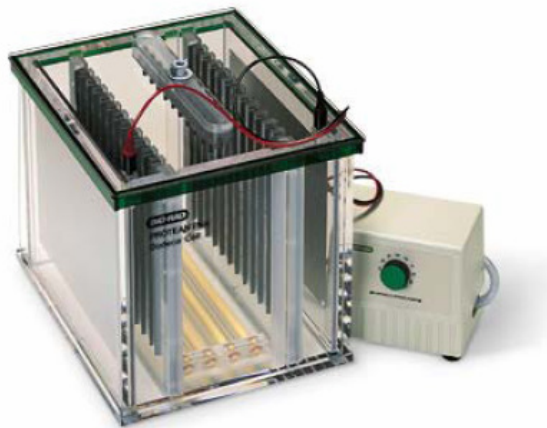


Figura 32. Sistema de electroforesis *Protean®plus Dodeca™cell* (BioRad).

4.4.4. Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa

Tras la electroforesis, las proteínas separadas en el gel de SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa mediante el sistema de transferencia semiseco “Trans-blot SD Semi-Dry Transfer Cell” (Bio-Rad) (Figura 33). Para ello, se recortó una membrana de nitrocelulosa (PALL Life Sciences BioTrace NT, Portsmouth, Gran Bretaña) y dos trozos de papel Whatman de 2,45 mm de grosor (BioRad) y del tamaño del gel, y, junto con el gel, se sumergieron por separado en tampón de transferencia (Tris 50mM, glicina 191mM, SDS 0,02% y metanol 20%) durante 10min a temperatura ambiente. Transcurrido este

Material y Métodos

tiempo, sobre el polo positivo del sistema de transferencia se montó un sándwich constituido por papel Whatman empapado en tampón de transferencia, la membrana de nitrocelulosa, el gel y, por último, el otro trozo de papel Whatman. A continuación, se colocó la tapa del sistema (polo negativo) y se aplicó un voltaje constante de 25V durante 1h a temperatura ambiente. Finalmente, para confirmar la transferencia de las proteínas desde el gel hasta la membrana, ésta última se tiñó con solución rojo Ponceau (solución de Ponceau 0,1% en ácido acético 5%; Sigma-Aldrich) durante 20min en agitación, y, tras hacer varios lavados con agua destilada hasta observar claramente las bandas de proteína, fue fotografiada con el sistema de imagen LAS3000 o LAS4000 (FujiFilm, Tokio, Japon).

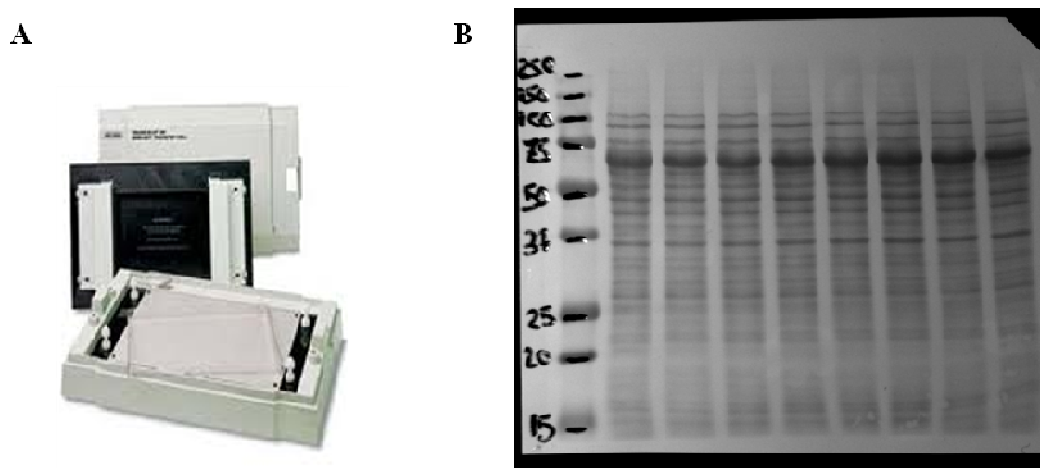


Figura 33. Sistema de transferencia y Ponceau. A. Imagen del Transfer blot (BioRad) utilizando en esta tesis para realizar transferencia semiseca. B. Imagen representativa de una membrana de nitrocelulosa teñida en rojo Ponceau.

4.4.5. Tinción de los geles 2D y análisis de imagen

Los geles de SDS-PAGE bidimensionales se tiñeron con la solución fluorescente SYPRO Ruby (BioRad) para la tinción de proteínas, siguiendo las indicaciones del fabricante. Este es un método altamente sensible que permite la visualización de proteínas poco abundantes, y es compatible con la identificación de proteínas por espectrometría de masas. Para ello, los geles se sumergieron en solución de fijación (etanol 50% y ácido acético 3% v/v en agua bidestilada) durante 30min y, a continuación, se incubaron durante toda la noche con SYPRO Ruby. Posteriormente, se retiró la solución de tinción y se eliminó el exceso cubriendo los geles con una solución del metanol 10% y ácido acético 7% (v/v, en agua bidestilada) durante 45min en agitación. Finalmente, los geles se lavaron

3 veces con agua destilada durante 10min, y fueron escaneados con un escáner de fluorescencia “FX Pro Plus Multiimager” (BioRad) en la Unidad de Proteómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba (SCAI-UCO) (Figura 34). Las imágenes resultantes del escaneo de los geles se analizaron con el programa “PDQuest v8.0” (BioRad), normalizando la intensidad de fluorescencia de las manchas de proteína mediante el método “Total Quantity in Valid Spot”. Dicho método se basa en la intensidad total de todas las manchas válidas, corrigiéndose diferencias debidas a la tinción de los geles. Además, resulta el método de normalización más adecuado cuando se comparan muestras muy parecidas con pocas proteínas que varíen su expresión entre las condiciones que se comparan. En nuestro caso, hemos comparado la misma línea celular expuesta a diferentes condiciones de sobreexpresión de NOS3 o de adición de anti-Fas. Se consideraron como diferencialmente expresadas aquellas manchas (proteínas resueltas en la electroforesis 2D) cuyas intensidades de fluorescencia en las condiciones experimentales que se comparaban resultaron estadísticamente significativas aplicando un test *t* de Student con una $p \leq 0,05$ y $p \leq 0,01$. La normalización, junto con el análisis estadístico de las tres repeticiones, aseguró que las diferencias encontradas eran debidas a las circunstancias experimentales analizadas y no a la manipulación durante el experimento.



Figura 34. Escáner de fluorescencia *FX Pro Plus Multiimager* (BioRad).

4.4.6. Inmunodetección de proteínas mediante Western blot

Una vez comprobada la correcta transferencia de las proteínas, la membrana de nitrocelulosa (apartado 4.4.4) se lavó durante 5min con tampón TTBS (Tris 20mM pH 7,6, NaCl 150mM, Tween-20 0,2% (v/v)) (Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente y con agitación suave, para eliminar completamente los restos de rojo Ponceau. Durante el

Material y Métodos

proceso de inmunodetección por western blot, todos los lavados e incubaciones se realizaron con agitación suave. Dicho proceso se inició con el bloqueo de la membrana durante 1h a temperatura ambiente (o toda la noche a 4°C) con TTBS conteniendo un 5% de leche en polvo sin grasa (Asturiana, Asturias, España). De esta forma, se neutralizaron los posibles sitios de unión inespecífica del anticuerpo primario.

Seguidamente, la membrana se incubó con el correspondiente anticuerpo primario (Tabla 5) diluido en la misma solución de bloqueo con leche al 2%, durante 2h a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. A continuación, tras retirar la solución de anticuerpo primario, la membrana se lavó 3 veces durante 10min con TTBS y se incubó durante 1h con el anticuerpo secundario correspondiente (Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:30.000 en la misma solución que el anticuerpo primario. Tras 3 lavados de 5min en TTBS, la banda de proteína inmunodetectada en la membrana se visualizó empleando un método quimioluminiscente en el que la peroxidasa conjugada con el anticuerpo secundario cataliza la oxidación del sustrato luminol en presencia de H₂O₂ (ECL-Advance, GE Healthcare, Connecticut, EE.UU). Para ello, se utilizó el sistema de análisis de imagen LAS-3000 ó LAS-4000 (Fujifilm, Tokio, Japón), capaz de detectar la señal de fluorescencia emitida en dicha reacción. El análisis densitométrico de la señal se llevó a cabo mediante el software “Quantity One” (BioRad). El análisis densitométrico de las diferentes muestras fue referido al Ponceau como control interno de carga de la proteína.

Tabla 5 Lista de anticuerpos.

Proteína	Anticuerpo primario			Anticuerpo secundario		
	Tipo	Dilución	Marca	Tipo	Dilución	Marca
NOS-3 sc-654	Policlonal conejo	1:1.000	Santa Cruz Biotech.	Anti-IgG sc-2301	1:30.000	Santa Cruz Biotech
MTCO2 ab3298	Monoclonal ratón	1:400	Abcam	Anti- IgG sc-2031	1:30.000	Santa Cruz Biotech
COII A6404	Policlonal ratón	1:10.000	Life Technolog.	Anti-IgG sc-2031	1:30.000	Santa Cruz Biotech.
TOM40 sc-11025	Policlonal cabra	1:1.000	Santa Cruz Biotech.	Anti-IgG sc-2056	1:30.000	Santa Cruz Biotech.
NDUFB A21359	Monoclonal ratón	1:10.000	Life Technolog.	Anti-IgG sc-2031	1:30.000	Santa Cruz Biotech.
SDHB A21345	Monoclonal ratón	1:5.000	Life Technolog.	Anti-IgG sc-2031	1:30.000	Santa Cruz Biotech.
UQCRC A11143	Monoclonal ratón	1:10.000	Life Technolog.	Anti-IgG sc-2031	1:30.000	Santa Cruz Biotech.
MTCO2 A6404	Monoclonal ratón	1:10.000	Life Technolog.	Anti-IgG sc-2031	1:30.000	Santa Cruz Biotech.
3-nitrotyrosine N5538	Monoclonal ratón	1:10.000	Sigma- Aldrich	Anti-IgG sc-2031	1:30.000	Santa Cruz Biotech
Cytochrome c sc-7159	Policlonal conejo	1:500	Santa Cruz Biotech.	Anti-IgG sc-2301	1:30.000	Santa Cruz Biotech
β -actin ab8227	Policlonal conejo	1:5.000	Abcam	Anti-IgG sc-2301	1:30.000	Santa Cruz Biotech
HSP60 sc-13115	Monoclonal ratón	1:500	Santa Cruz Biotech	Anti-IgG sc-2031	1:30.000	Santa Cruz Biotech
PDI sc-20132	Policlonal conejo	1:500	Santa Cruz Biotech	Anti-IgG sc-2301	1:30.000	Santa Cruz Biotech
ADX Reductase sc-374436	Monoclonal ratón	1:500	Santa Cruz Biotech	Anti-IgG sc-2031	1:30.000	Santa Cruz Biotech
PRDX III sc-59663	Monoclonal ratón	1:500	Santa Cruz Biotech	Anti-IgG sc-2031	1:30.000	Santa Cruz Biotech

4.4.7. Análisis proteómico mediante espectrometría de masas

Las manchas de proteínas que mostraron una expresión diferencial entre las diferentes condiciones experimentales comparadas mediante el análisis cuantitativo de las imágenes de los geles 2-D, fueron recortadas de los propios geles y analizadas por espectrometría de masas con objeto de identificar las proteínas.

4.4.7.1. Escisión de manchas, digestión y extracción de péptidos a partir del gel 2-D

Las manchas con expresión diferencial se recortaron en una estación automática de picado de geles “Investigator Propic” (Genomic Solutions, Cambridge, Reino Unido) (Figura 35) en la Unidad de Proteómica del SCAI-UCO. El uso de un sistema robotizado reduce la manipulación del gel y su posible contaminación con queratinas.



Figura 35. Robot de picado de geles Propic (Genomic Solutions).

Los fragmentos de gel resultantes se procesaron oportunamente antes de ser digeridos con tripsina y como paso previo a su deposición sobre la placa MALDI de manera automática en una estación “Digilab ProPrep II” (Genomic Solutions Inc.). El protocolo de procesamiento y digestión de los fragmentos de gel fue el siguiente: 1) dos pasos de destinción de 30min en una solución conteniendo acetonitrilo 50% (v/v) más bicarbonato amónico 100mM; 2) dos rondas de lavado con bicarbonato amónico 25mM durante 15min, y acetonitrilo 50% más bicarbonato amónico 25mM durante 15min, respectivamente; 3) deshidratación con acetonitrilo 100% durante 5min y secado de la muestra; 4) rehidratación con 10 μ l de tripsina a 12,5 ng/ μ l en bicarbonato amónico 25mM durante 10min a temperatura ambiente y posterior digestión a 37°C durante 12h. La digestión se detuvo añadiendo a cada muestra 10 μ l de una solución de trifluoroacético

(TFA) al 0,5% en agua. Los péptidos resultantes de la digestión enzimática se purificaron mediante una microcolumna de resina C18 (ZipTip, Millipore, Darmstadt, Germany), siguiendo las indicaciones del fabricante y eluyéndolos directamente sobre una placa MALDI con una solución de matriz (ácido α -ciano-4-hidoxicinnámico 3 mg/ml en acetonitrilo 70% más TFA 0,1%) en un volumen de 1 μ l.

4.4.7.2. Identificación de proteínas mediante MALDI-TOF/TOF

Tras la cocrystalización de las proteínas depositadas sobre la placa MALDI, las muestras se analizaron en la Unidad de Proteómica del SCAI-UCO para obtener la huella peptídica en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF (4800 Proteomics Analyzer; Applied Biosystems, Ontario, Canada) (Figura 36) equipado con extracción retardada, en modo reflector positivo, rango masa/carga (m/z) de 800-4.000 Da y un voltaje de aceleración de 20kV. La calibración interna de los espectros se realizó utilizando las relaciones m/z de los péptidos resultantes de la autólisis de la tripsina porcina ($M+H^+=842,509$, $M+H^+=2211,104$), obteniéndose de esta manera una precisión en la medida de las m/z de ± 20 ppm.

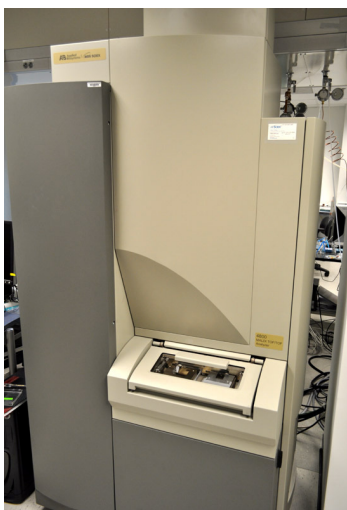


Figura 36. Espectrómetro de masas MALDI TOF-TOF.

A continuación, en base a los resultados de masa molecular obtenidos en el análisis de huella peptídica por MALDI-TOF, se seleccionaron de forma automática hasta 8 iones de cada muestra para obtener sus correspondientes espectros de fragmentación (MALDI-TOF/TOF, MS/MS) que proporcionan la secuencia del péptido. La identificación de

proteínas se realizó combinando los espectros MS y sus correspondientes MS/MS sobre la base de datos Uniprot (www.uniprot.org/), utilizando MASCOT (MatrixScience, Londres, Reino Unido) como motor de búsqueda y limitando la categoría taxonómica a humanos, con carbamidometilación completa de los residuos de cisteína y oxidación parcial de los residuos de metionina. Mediante este sistema, se identifican coincidencias entre las masas de los péptidos obtenidos en la digestión trípica de la muestra y las masas de los péptidos teóricos, es decir, obtenidos en la digestión “*in silico*” de las secuencias de proteínas incluidas en las bases de datos. El error máximo permitido en la búsqueda fue de 100 ppm y el número máximo de errores en el corte de la proteasa fue uno.

4.5. Purificación de mitocondrias de células en cultivo

La obtención de la fracción mitocondrial a partir de células en cultivo se realizó mediante dos aproximaciones diferentes: mediante lisis celular y ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, o mediante el kit comercial “Mitochondria isolation kit” (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania).

4.5.1. Purificación de mitocondrias por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa

La fracción mitocondrial purificada mediante esta metodología fue utilizada posteriormente en el análisis de la localización celular de la proteína NOS3 por digestión enzimática y western blot.

El pellet celular obtenido por tripsinización y centrifugación, se resuspendió en PBS pH 7,4 a 4°C y, tras contar el número de células, se centrifugó a 200g durante 5min a 4°C. Tras homogeneizar el precipitado celular en tampón hipotónico (HEPES 5mM pH 7,4, MgCl₂ 1mM, sacarosa 70mM, EGTA 0,5mM, manitol 210mM, aprotinina 5µg/ml, leupeptina 10µg/ml, PMSF 0,5mM y digitonina 0,01%; 1ml tampón / 8x10⁶ células) con ayuda de un homogeneizador de teflón-vidrio, se añadió tampón de homogenización (es el mismo que el hipotónico pero sin digitonina; 400µl / 8x10⁶ células) más una solución de sacarosa 1,6M (100µl / 8x10⁶ células). A continuación, se centrifugó a 1.000g durante 5min a 4°C, recuperándose el sobrenadante y conservando el pellet conteniendo los *restos de membranas* para posteriores análisis. El sobrenadante obtenido se volvió a centrifugar a 10.000g durante 10min a 4°C. Al finalizar esta centrifugación, el sobrenadante resultante compuesto por la *fracción citoplasmática* celular libre de orgánulos se guardó a -80°C para

posteriores análisis. El precipitado, compuesto por los diferentes orgánulos celulares, se resuspendió en 500µl de medio A (HEPES 2mM pH 7,4, sacarosa 0,32M) y se depositó sobre un gradiente discontinuo de sacarosa previamente establecido mediante la adición sucesiva de volúmenes de 500µl de soluciones decrecientes de sacarosa 1,6, 1,4, 1,2, 1,0, y 0,8M pH 7,4, en un tubo de ultracentrífuga de 4ml. La muestra se centrifugó a 95.000g durante 90min a 4°C, localizándose la *fracción mitocondrial* purificada entre la fase de sacarosa con densidad 1,2 y 1,4M del gradiente discontinuo. Una vez recuperada, la fracción mitocondrial se resuspendió en un volumen 100µl de medio A y fue almacenada a -80°C hasta su uso.

4.5.2. Purificación de mitocondrias por inmunocaptura

Las mitocondrias obtenidas por este procedimiento fueron empleadas posteriormente para el análisis de cuantificación de proteínas mitocondriales nitradas.

Mediante el kit de la casa comercial Miltenyi Biotec (Auburn, EE.UU), las mitocondrias obtenidas a partir de la lisis celular fueron inmunocapturadas con el anticuerpo anti-TOM22 marcado con microesferas magnéticas. TOM22 es una proteína integral de membrana que se encuentra de manera específica en la membrana mitocondrial externa. Tras añadir el producto de la inmunocaptura a una columna proporcionada en el kit, se aplicó un campo magnético para retener a las mitocondrias marcadas con el anticuerpo. El resto de orgánulos y componentes celulares, al no ser retenidos, pasaron a través de la columna y se perdieron con los sucesivos lavados. Finalmente, tras retirar el campo magnético, las mitocondrias fueron eluidas en el volumen deseado de tampón de elución.

El protocolo que se realizó fue el siguiente: el pellet obtenido tras la tripsinización y centrifugación de 2×10^6 de células fue lavado con PBS frío y posteriormente resuspendido en 1ml de tampón hipotónico (ver apartado 4.5.1). Tras incubar 1min en hielo, el lisado celular se centrifugó a 250g durante 5min, y el pellet resultante se resuspendió en 400µl de tampón de homogenización (el mismo que el hipotónico pero sin digitonina). A continuación, se utilizó una jeringa con aguja de calibre 27G por la que se hizo pasar 20 veces la solución conteniendo las células para facilitar su ruptura. Al lisado celular resultante se le añadió 100µl de sacarosa 1,6M y se centrifugó a 1.000g durante 5min. Seguidamente, se recogió el sobrenadante y se volvió a centrifugar a 13.000g durante 5min. El sobrenadante obtenido tras esta centrifugación correspondía al citoplasma celular,

el cual fue alicuotado y conservado a -80°C . El pellet, conteniendo los orgánulos celulares incluidas las mitocondrias, se resuspendió con el tampón de lisis que proporcionaba el kit. Posteriormente, se mezclaron en un tubo con fondo cónico 1ml de esta suspensión subcelular junto con 9ml de tampón de separación más 50 μl del anticuerpo anti-TOM22 marcado con las microesferas. La mezcla se incubó a 4°C durante 1h con agitación. Terminada la incubación y tras lavar la columna de separación proporcionada con 3ml del tampón correspondiente, ésta fue situada en un soporte imantado y el volumen total de la mezcla fue pasado por la columna en tandas sucesivas de 3,5ml. Así, mientras que las mitocondrias marcadas con el anticuerpo anti-TOM22 eran retenidas en el interior de la columna gracias al campo magnético, el resto de componentes celulares era eluído y recogido como *restos celulares*. Para terminar, se realizaron 3 lavados de la columna con 3ml de tampón de separación y, seguidamente, tras retirar la columna del imán, se añadió 1,5ml de tampón para eluir las mitocondrias retenidas en la columna con la ayuda de un émbolo. Dicha fracción mitocondrial fue centrifugada a 13.000g durante 2min y el pellet obtenido se resuspendió en 100 μl de tampón de almacenamiento antes de ser alicuotado y almacenado a -80°C .

4.6. Distribución subcelular de NOS3

La distribución celular de la proteína NOS3 fue estudiada en la línea celular que sobreexpresa NOS3 mediante inmunohistoquímica y microscopia confocal. Adicionalmente, se recurrió a la digestión enzimática y western blot (apartado 4.4.6) para valorar la presencia de la proteína en la fracción mitocondrial purificada mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (apartado 4.5.1).

4.6.1. Inmunohistoquímica en células fijadas

La localización celular de NOS3 se evaluó por microscopia confocal en la línea celular 4TO-NOS. Para ello, las células fueron crecidas en placas de 24 pocillos (TPP) sobre cubreobjetos de vidrio redondos esteriles depositados en el fondo. Antes de comenzar con el protocolo de detección, las células fueron lavadas con PBS y posteriormente fijadas en 4% de paraformaldehído (Panreac) durante 30min a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se lavaron con PBS y se incubaron durante toda la noche a 4°C en una solución de PBS-Azida sódica 0,05% conteniendo BSA 5%, Triton-X100 0,3% y los anticuerpos primarios anti-NOS3 (C-20, Santa Cruz Biotechnology) y anti-MTCO2 (Abcam, Cambridge, Reino Unido), a una dilución de 1/200 y 1/400,

respectivamente. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 2h a temperatura ambiente y en oscuridad, con una mezcla conteniendo los anticuerpos secundarios conjugados Alexa Fluor 488 IgG anti-ratón y Alexa Fluor 594 IgG anti-conejo (Life technologies), diluídos 1/200 en la misma solución anterior. Pasado el periodo de incubación, las células se lavaron con PBS y, manteniendo las condiciones de oscuridad, se tiñeron los núcleos con DAPI (Invitrogen) durante 10min a temperatura ambiente. Finalmente, los cubreobjetos conteniendo a las células se lavaron con PBS y se depositaron boca-abajo sobre portas de cristal conteniendo una solución de montaje compuesta por glicerol 70% en PBS. Los márgenes del cubre fueron sellados con laca de uñas. La especificidad de la inmunoreactividad se verificó mediante el uso de controles negativos, es decir, células incubadas con anticuerpos secundarios pero no con anticuerpos primarios.

Tras el protocolo de marcaje, las muestras se observaron inmediatamente en el microscopio confocal (LSM 5 Exciter Carl Zeiss, Munich, Alemania), manteniendo las condiciones de oscuridad. Al terminar, las muestras se guardaron a -20°C y en oscuridad, con objeto de ser conservadas en las mejores condiciones en caso de ser necesario volver a visualizarlas en los siguientes días. El análisis de colocalización de las señales obtenidas para las proteínas NOS3 y MTCO2 (de membrana interna mitocondrial) fue realizado mediante los complementos correspondientes del programa ImageJ de análisis de imagen (National Institutes of Health, Maryland, EE.UU).

4.6.2. Digestión enzimática de la fracción subcelular mitocondrial

Con objeto de detectar la presencia o ausencia de la proteína NOS3 en mitocondria, la fracción mitocondrial obtenida a partir de la línea celular 4TO-NOS mediante ultracentrifugación (apartado 4.5.1) fue tratada con tripsina (6 ó 20µg/100µg de proteína) o proteinasa K (10 ó 40µg/100µg de proteína), durante 25min a 37°C. A continuación, la reacción se detuvo mediante la adición de un volumen de SFB 10% o PMSF 2mM en PBS, respectivamente, y las mezclas se centrifugaron a 4°C durante 1h a 18.000g. Finalmente, los pellets de mitocondrias resultantes se resuspendieron en tampón de lisis y 10µg de cada una de las muestras de proteínas se cargaron en un gel de SDS-PAGE (apartado 4.4.3.1). A partir de este gel, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (apartado 4.4.4), donde la proteína NOS3 y las proteínas de membrana mitocondrial externa TOM40 (Santa Cruz Biotechnology) e interna MTCO2 (Life Technologies) fueron detectadas mediante western blot con el uso de anticuerpos específicos (apartado 4.4.6).

4.7. Actividad de la Cadena de Transporte Electrónico

La actividad de la cadena respiratoria mitocondrial se estudió a través del consumo de O₂, que fue medido en un electrodo tipo Clark termostatzado (Figura 37). El oxímetro de Clark está compuesto por un cátodo de platino y un ánodo de plata-cloruro de plata, inmersos en una solución de cloruro potásico saturado al 50% y separados por una membrana de teflón permeable al O₂. Sobre la pieza que contiene los electrodos se coloca una pieza que incluye la cámara de reacción rodeada por otra cámara termostatzada que mantiene la reacción a la temperatura deseada de 37°C.



Figura 37. Electrodo de oxígeno tipo Clark termostatzado (Oxytherm, Hansatech Instruments).

4.7.1. Respiración acoplada / desacoplada en células intactas

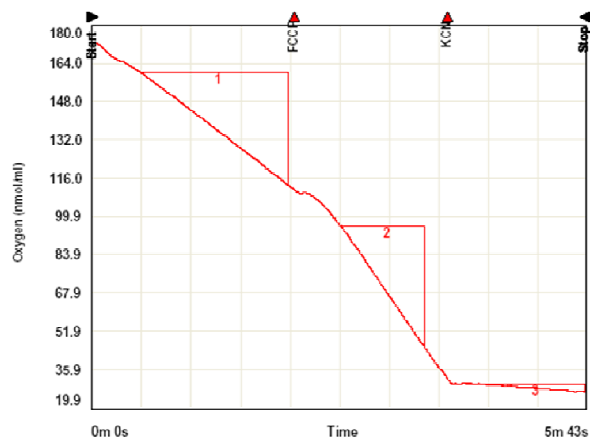
Para la medida del consumo de O₂ en células intactas, se sembraron tantas placas de 60,1cm² como medidas deseaban hacerse. Tras el periodo que rigen los tratamientos empleados, 6x10⁶ células fueron recogidas de una placa, lavadas con PBS y resuspendidas en 1ml de medio de cultivo. A continuación, las células fueron introducidas en la cámara del oxímetro (previamente calibrado, a 37°C y con agitación), que se cerró antes de iniciar la medida, una vez estabilizado.

La pendiente alcanzada transcurrido el tiempo necesario (1min, aproximadamente) corresponde al O₂ consumido cuando la CTE se encuentra acoplada a la síntesis de ATP (respiración endógena) (Figura 38). A partir de este momento, se añadieron 5µl de carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) 1,25mM (Sigma-Aldrich) y, tras mezclar cuidadosamente, se midió la pendiente correspondiente durante aproximadamente 1min. En este caso, el consumo de O₂ era debido al desacoplamiento provocado por el FCCP entre de la cadena de transporte y la síntesis de ATP. El FCCP es un ionóforo capaz de transportar protones a través de la membrana mitocondrial antes de

que puedan ser utilizados para proporcionar energía en la fosforilación oxidativa. Por tanto, la pendiente obtenida tras la adición de FCCP corresponde a la capacidad respiratoria celular máxima.

Para terminar, se añadieron 10 μ l de cianuro potásico (KCN) 400mM (Sigma-Aldrich) (inhibidor del CIV mitocondrial) para detener el consumo de O₂ asociado a la cadena de transporte mitocondrial. Antes de realizar una nueva medida, la cámara del oxímetro fue concienzudamente lavada con agua destilada.

Figura 38. Medida de respiración en células intactas. La gráfica corresponde a la respiración endógena y desacoplada de 6x10⁶ células. Se observa el cambio de pendiente tras la adición del FCCP, consecuencia del desacoplamiento entre la respiración y la síntesis de ATP, que constituye la tasa de respiración celular máxima. La adición de KCN inhibe totalmente la actividad respiratoria celular



Para la preparación de la solución madre FCCP 39,3mM, se mezclaron 10 mg de FCCP con 1ml de ethanol al 95%. A partir de esta solución se preparó la solución de trabajo a 2,5mM diluido en ethanol absoluto (Panreac).

4.7.2. Respiración por complejos en células permeabilizadas con digitonina

Al igual que el apartado anterior, fueron sembradas tantas placas 60,1cm² como medidas a realizar. Tras el periodo que rigen los tratamientos empleados, 6x10⁶ células fueron recogidas, lavadas con PBS y resuspendidas en 1ml de medio de respiración (HEPES 20mM, Sacarosa 250mM, MgCl₂ 10mM, ADP 1mM, KH₂PO₄ 2mM, pH 7,1; el ADP y KH₂PO₄ se añaden justo antes de comenzar). Tras introducir las células en la cámara del oxímetro (previamente calibrado a 37°C y con agitación), y sin cerrarla, se añadieron 4,8 μ l de digitonina (Sigma-Aldrich) al 1% en DMSO y se dejó que se estabilizase el consumo de O₂ (al consumirse los sustratos endógenos) durante 10min. A continuación, se cerró la cámara y se añadió (sustrato e inhibidor de cada complejo), en este orden y dejando que se estabilizase la pendiente de consumo de O₂ entre la adición de un reactivo y el siguiente (Sigma-Aldrich):

Material y Métodos

- 10µl de Glutamato 5mM+Malato 2 µM
- 10µl de Rotenona 1mM
- 10µl de Succinato / Gliceraldehido-3-P 0,5M
- 10µl de Antimicina A 10µM
- 10µl de N,N,N',N'-Tetramethyl-p-Phenylenediamine (TMPD) 120mM
- 10µl de KCN 400mM

Restando la pendiente obtenida tras la adición del inhibidor a la obtenida con el sustrato del complejo respiratorio correspondiente, y teniendo en cuenta que la solubilidad del O₂ en medio acuoso a 37°C es de 217nmol/ml, se calculó el consumo de O₂ asociado a los complejos I, a los complejos II+III y al complejo IV de manera independiente (ver Figura 39).

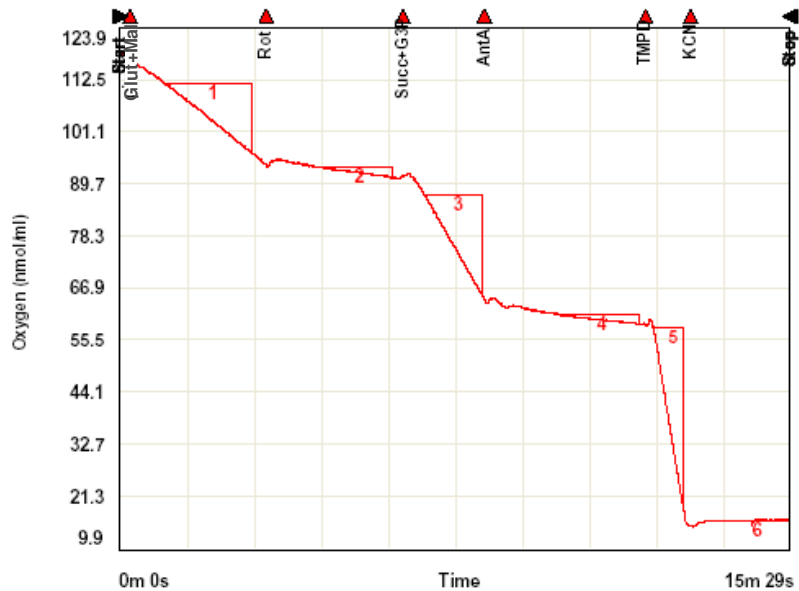


Figura 39. Consumo de oxígeno asociado a los complejos respiratorios por polarografía. En la figura se muestra una gráfica de polarografía obtenida en un experimento con 6×10^6 de células. Se observan los cambios de pendiente que se producen tras la adición de cada uno de los sustratos e inhibidores de los diferentes complejos respiratorios mitocondriales. Las actividades de cada uno de ellos se calcularon así: CI = (pendiente 1) – (pendiente 2); CII+III = (pendiente 3) – (pendiente 4); CIV = (pendiente 5) – (pendiente 6).

4.8. Ensayos de Actividad por espectrofometria

4.8.1. Evaluación de la producción de ON

La producción celular de ON se cuantificó en el medio de cultivo a partir de sus productos finales, nitratos y nitritos, mediante el ensayo de Griess (Green, Wagner et al. 1982). El primer paso del ensayo consiste en la reducción de los nitratos a nitritos por acción de la nitrato reductasa. Tras parar la reacción mediante la adición de LDH y ácido pirúvico en exceso (los cuales consumen el NADH_2 requerido por la enzima), se adicionan los reactivos de Griess que reaccionan con el nitrito resultante dando lugar a un compuesto de color púrpura cuya absorbancia es proporcional a la concentración de nitrito.

El ensayo se comenzó realizando una recta patrón con diferentes concentraciones de NaNO_3 (250, 50, 12,50, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78, 0,39 μM), a la cual se le aplicó el mismo protocolo que a las muestras a medir. Las muestras utilizadas fueron alicuotas de medio de cultivo obtenidas del sobrenadante del cultivo celular después de 2h de incubación con los tratamientos adecuados. Tras centrifugar las muestras a 240g durante 5min a 4°C para eliminar los restos celulares, se tomaron 200 μl y se incubaron con nitrato reductasa 0,2 mU/ μl (Roche), FAD 48,22 μM y NADPH 48 μM (Sigma-Aldrich) durante 20min a 37°C en oscuridad. A continuación, la reacción se detuvo mediante la adición de piruvato sódico 10mM y lactato deshidrogenasa 0,025 mg/ml (Roche), incubando la mezcla durante 5min a 37°C en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se precipitaron las proteínas mediante una centrifugación de 5min a 18.000g, previa adición de ZnSO_4 52mM. El sobrenadante resultante se unió a un mismo volumen de reactivo de Griess (sulfanilamida 58mM (Sigma-Aldrich), PO_4H_3 al 2,5% (Panreac, Barcelona, España), n-naftil-etileno-diamina 3,85mM (Sigma-Aldrich) y se incubó durante 10min a temperatura ambiente. Finalmente, los productos de reacción fueron cuantificados a 540 nm mediante un espectrofotómetro de microplacas (GENios TECAN Spectra Fluor, Hombrechtikon, Suiza).

4.8.2. Determinación del estrés oxidativo celular

4.8.2.1. Concentración intracelular de especies reactivas de oxígeno

La producción de EROs se analizó *in situ* con el uso de las sondas fluorescentes 2´7´-diclorodihidrofluorescina diacetato (H_2DCFDA) y dihidroetidio (DHE) (D-399 y D-1168, Life Technologies). La H_2DCFDA detecta H_2O_2 , pero también radical hidroxilo, radical carbonato, dióxido de nitrógeno y radicales tiilo resultantes de la oxidación de tioles. El

DHE detecta $O_2^{\cdot -}$ citosólico, OH^{\cdot} y reacciona con oxidantes derivados del $ONOO^{\cdot}$. Ambos compuestos son lipofílicos y difunden con facilidad a través de la membrana plasmática. El método utilizado por la H_2DCFDA consiste en la emisión de una fluorescencia verde intensa tras su reacción con las EROs, como consecuencia de la desacilación y la posterior oxidación de la misma. En el caso de DHE, es un compuesto que se convierte en etidio fluorescente tras reaccionar con las EROs descritas. En ambos casos, la intensidad de fluorescencia emitida es proporcional a la concentración de EROs en la muestra.

El estudio se realizó a partir de placas de cultivo celular de 24 pocillos con paredes negras y fondo transparente (DDBioLab, Barcelona, España), para evitar interferencia en la señal de fluorescencia entre los diferentes pocillos. El protocolo seguido para este ensayo fue el siguiente: tras lavar cuidadosamente las células en PBS, éstas fueron incubadas con una solución $5\mu M$ DHE ó $10\mu M$ H_2DCFDA en PBS durante 10 ó 20min en oscuridad y a $37^{\circ}C$, respectivamente. Una vez pasado el tiempo de incubación, las células se observaron al microscopio para confirmar que se mantenían adheridas a la superficie de la placa. A continuación, se añadió $5mM$ glucosa, dando inicio a la medida. La fluorescencia emitida por las sondas DHE (λ_{ex} 510nm, λ_{em} 590nm) y H_2DCFDA (λ_{ex} 500nm, λ_{em} 520nm) se cuantificó con un lector de microplacas (TECAN). En el caso de la H_2DCFDA , se realizó una cinética durante 30min, tomando datos cada 2min. Cuando se utilizó el DHE, solamente se tomó una medida puntual tras los 10min de incubación debido a que dicha sonda se satura antes.

4.8.2.2. Potencial de membrana mitocondrial

El $\Delta\Psi_m$ se analizó *in situ* utilizando la sonda fluorescente tetrametilrodamina metil ester (TMRM) (T668, Life Technologies). La TMRM es un marcador fluorescente derivado de la rodamina, que flourece al acumularse en el interior de mitocondrias activas de forma directamente proporcional a la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial, la cual es una de las principales fuentes de EROs celular. En bajas concentraciones, el fluorocromo TMRM no suprime la respiración celular (Scaduto and Grotyohann 1999). El protocolo seguido en este estudio fue similar al descrito en el apartado anterior. Las células fueron incubadas con $10\mu M$ TMRM en PBS, durante 20min, a $37^{\circ}C$ y en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación, las células fueron observadas al microscopio para confirmar que mantenían la morfología adecuada y se encontraban adheridas a la placa. Tras añadir $5mM$ glucosa al pocillo, se inició la reacción y la medida del $\Delta\Psi_m$. La

fluorescencia emitida por la TMRM (λ_{ex} 550nm, λ_{em} 570nm) se evaluó con un lector de microplacas (TECAN).

Tanto en el caso de la determinación de la concentración intracelular de EROs como del $\Delta\Psi_m$, los resultados fueron referidos a la cantidad de proteína presente en cada muestra. Así pues, tras la medida, se procedió a lisar las células de los correspondientes pocillos de la placa de cultivo siguiendo el protocolo del apartado 4.4.1.1. Para ello, las células fueron recogidas con la ayuda de un rascador de células y en el propio PBS donde se realizó la medida. Seguidamente, se centrifugaron a 1.500g durante 5min a 4°C, y el pellet resultante se lisó en el tampón adecuado durante 10min en hielo. Transcurrido el tiempo, las muestras se agitaron durante 20 s en vortex y se centrifugaron a 18.000g durante 5min a 4°C. Por último, se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la proteína por método Bradford (ver apartado 4.4.2).

4.8.3. Ensayo de medición de ATP

La cuantificación del ATP se realizó siguiendo las indicaciones del kit comercial “Adenosine 5´triphosphate (ATP) Bioluminescent Assay Kit” (FL-AA, Sigma-Aldrich), el cual es sensible a concentraciones de ATP comprendidas entre 2×10^{-12} y 8×10^{-15} moles/l. Durante la reacción enzimática que tiene lugar (Figura 40), la luciferasa cataliza la oxidación de la D-luciferina, consumiendo el ATP presente en la muestra biológica y emitiendo luminiscencia que es detectada en un lector multiplaca (TECAN).

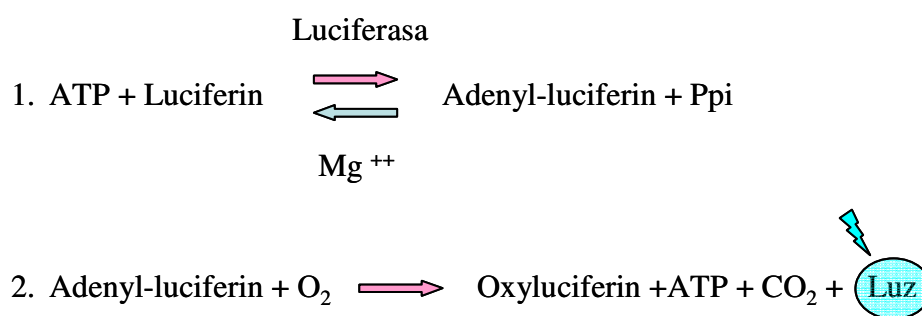


Figura 40. Reacción de luciferasa. La reacción 1 es reversible y se encuentra lejos del equilibrio de la derecha. La reacción 2 es esencialmente irreversible. Cuando el ATP es el reactivo limitante, la luz emitida es proporcional al ATP presente.

Las muestras a medir se obtuvieron a partir de cultivos celulares de la siguiente forma: las células adheridas a la placa de cultivo (3×10^6 células / $22,1 \text{cm}^2$) se lisaron en $300 \mu\text{l}$ de ácido perclórico 85mM . Seguidamente, los lisados se agitaron en vórtex durante 20 s y se centrifugaron a 15.000g durante 5min a 4°C , conservando los sobrenadantes obtenidos a -80°C hasta el momento de su uso. La medida de la concentración de ATP en los lisados celulares se realizó mediante el kit descrito anteriormente, utilizando placas de paredes negras y fondo transparente. Con objeto de referir los resultados de luminiscencia obtenidos a la concentración de proteína de cada muestra, los pellets celulares resultantes de la centrifugación anterior fueron resuspendidos en $300 \mu\text{l}$ de tampón de lisis total. Tras incubar 5min en hielo, las muestras se centrifugaron a 20.000g y se recuperó el sobrenadante para cuantificar la concentración de proteína por el método Bradford (ver apartado 4.4.2).

4.8.4. Ensayo de la actividad catepsina D

La actividad proteolítica de la catepsina D se cuantificó en las muestras de lisado celular mediante el kit comercial “Cathepsin D activity fluorometric assay kit” (Biovision, California, EE.UU), en un ensayo de fluorescencia. Dicho ensayo utiliza como sustrato de reacción un péptido marcado con metil-cumaril-amida, cuya secuencia (GKPILFFRLK(Dnp)-D-R-NH₂) es reconocida por la proteasa. Durante la reacción, la fluorescencia que se libera como consecuencia de la actividad enzimática puede ser cuantificada en un espectrofluorímetro a una longitud de onda de excitación/emisión de $340/465 \text{nm}$.

El protocolo seguido para realizar el ensayo de actividad catepsina D fue el siguiente:

1) Para la obtención de la muestra, las células fueron recogidas por tripsinización y centrifugación. Tras el recuento celular, 10^6 células fueron lisadas en un volumen de $100 \mu\text{l}$ del tampón de lisis proporcionado, dejando incubar en hielo durante 10min. A continuación, se centrifugó a 4°C , en la microcentrífuga, durante 5min a máxima velocidad para, posteriormente, recuperar el sobrenadante donde se midió la actividad enzimática. 2) Para el ensayo de actividad, se utilizó una placa de 96 pocillos de paredes y fondo negro. Tras depositar $50 \mu\text{l}$ del lisado celular en cada pocillo, se añadieron $52 \mu\text{l}$ de una mezcla conteniendo el tampón de reacción con el sustrato sintético de la catepsina D, y se incubó a 37°C durante 1h. Como control negativo, se añadieron $50 \mu\text{l}$ de tampón de lisis en lugar de muestra. Finalmente, se midió la fluorescencia emitida en el lector de placas GENios

(TECAN), expresándose la actividad catepsina D como unidades de fluorescencia relativa (RFU) por millón de células.

4.8.5. Evaluación de parámetros de muerte celular

La inducción de necrosis y/o apoptosis se evaluó en la línea celular con sobreexpresión de NOS3 y durante el tratamiento con anti-Fas, mediante la determinación de parámetros relacionados con dichos procesos. Así, como parámetro de necrosis se evaluó la liberación de LDH al medio de cultivo extracelular. Como parámetros de apoptosis se determinaron: 1) la actividad caspasa; 2) la liberación citoplasmática de cit c; y 3) la expresión de genes apoptóticos (apartado 4.3.4.2).

4.8.5.1. Liberación de LDH al medio extracelular

La liberación de la enzima LDH al medio extracelular se evaluó a partir de la cuantificación de su actividad enzimática asociada en el medio de cultivo. El método utilizado para determinar la actividad LDH consiste en la cuantificación de la reducción de piruvato a lactato, asociada a la oxidación del NADH. La figura 41 ilustra un esquema de la reacción catalizada por la LDH.

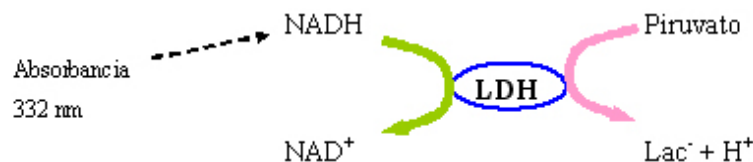


Figura 41. La oxidación de NADH es proporcional a la cantidad de LDH existente en la muestra.

La mezcla de reacción, con un volumen final de 200µl, estaba compuesta por 130µl de medio de cultivo, 50µl de β-NADH 2mM y 20µl de piruvato sódico 4mM (Sigma-Aldrich). La reacción tuvo lugar a una temperatura de entre 20-30°C. Así, tras la adición de la muestra al medio de reacción, se registró el consumo de NADH mediante el descenso de la absorbancia a 334nm, a intervalos de 1min durante 5min, en un espectrofluorímetro (TECAN). A partir del suero comercial “Calibrator for automated systems” (Cobas, Roche), se definieron las unidades de actividad enzimática considerando el valor de

absorbancia a 332nm y la constante del suero estimada por la casa comercial. Los datos fueron expresados como unidades de absorbancia por ml de medio.

4.8.5.2. Actividad caspasa

La actividad proteolítica de la caspasa-3 y caspasa-9 se cuantificó a partir del sustrato comercial Ac-DEVD-AFC y Ac-LEHD-AFC, respectivamente (Enzo life sciences, Bubendorf, Suiza). Se trata de unos oligopéptidos de reconocimiento específico para sendas caspasas, que se encuentran unidos mediante un enlace peptídico a una molécula que, en estado libre, tras la proteólisis por la caspasa-3 o caspasa-9, emite fluorescencia que puede ser detectada por espectrofluorimetría.

La reacción se desarrolló en un volumen final de 100µl, en un tampón compuesto por HEPES 50mM pH 7,4, EDTA 1mM, NaCl 100mM, sacarosa 10% (p/v), CHAPS 0,1% (p/v), DTT 5mM y Ac-DEVD-AFC o Ac-LEHD-AFC 100µM. La reacción se inició tras la adición de 50 ó 100µg de proteína citoplasmática o proteína de lisado total, y transcurrió durante 2h a 37°C. Durante este periodo de tiempo, se adquirieron datos de fluorescencia a intervalos de 15min, a una longitud de onda de excitación/emisión de 400/505nm. La actividad proteolítica se expresó como el incremento de la intensidad de fluorescencia en 120min por mg de proteína.

4.8.5.3. Liberación de citocromo c

La localización de cit c en la fracción citoplasmática se cuantificó mediante SDS-PAGE y western blot. A partir de un gel desnaturalizante del 14% de poliacrilamida, se cargaron 50µg de proteína citoplasmática (apartado 4.4.3) y se corrió la electroforesis. Realizada la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (apartado 4.4.4), se llevó a cabo la inmunodetección del cit c mediante el uso del anticuerpo primario anti-cit c (sc-7159, Santa Cruz Biotechnology) (apartado 4.4.6). Como control interno de la carga de proteína en el gel se utilizó un anticuerpo primario frente a la β-actina (ab8227, Abcam). Finalmente, tras la detección quimioluminiscente de la proteína, la imagen obtenida fue densitometrada y los datos obtenidos fueron representados como la relación cit c/β-actina referida a la línea celular control (4TO) en condiciones basales.

4.9. Análisis estadístico

Todos los datos se presentan como la media ± el error estándar de la media (SEM) de, al menos, tres experimentos independientes. La significación estadística de las

diferencias entre las muestras de referencia y las muestras problema se determinó mediante el uso de los tests no-paramétricos de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney para la búsqueda de diferencias entre grupos con un tamaño muestral inferior a 30. Todas las pruebas y cálculos se realizaron con el paquete estadístico SPSS 15.0 para Windows (IBM). La significación estadística fue establecida a partir de una $p \leq 0,05$, y se indica como: (*) diferencia estadísticamente significativa debida a la sobreexpresión de NOS3 para una misma condición (comparación de las células 4TO vs. células 4TO-NOS, con o sin tratamiento); (#) diferencias estadísticamente significativas debida a las diferentes condiciones dentro de una misma línea celular (comparación de anti-Fas vs. basal; L-NAME vs. basal; y anti-Fas + L-NAME vs. anti-Fas)

5. RESULTADOS

5.1. Sobreexpresión estable de NOS3 en la línea celular HepG2

Es conocida la dificultad que presentan las células primarias hepáticas para ser transfectadas (Poole, Zhou et al. 2006); por ello, en primer lugar, se procedió a establecer las condiciones experimentales óptimas para la sobreexpresión de NOS3 en la línea celular de CHC humano HepG2. Dicha línea fue transfectada con el ADNc humano de NOS3 conteniendo el epítipo HA en su extremo 3', clonado en el plásmido pcDNA4/TO bajo el control del promotor del citomegalovirus. Las células transfectadas fueron seleccionadas por la adición de 30µg/ml zeocina (Life Technologies Inc). Como control negativo utilizamos la línea celular derivada de HepG2 transfectada con el plásmido pcDNA4/TO sin inserto.

5.1.1. Sobreexpresión de NOS3

Una vez seleccionados los clones de células resultantes de la transfección estable con el plásmido pcDNA4/TO-NOS, se estudió la expresión de NOS3 mediante SDS-PAGE y western blot, utilizando un anticuerpo comercial frente al epítipo HA (apartados 4.4.3.1 y 4.4.6). La figura 42A muestra el resultado del western blot para los diferentes clones seleccionados. Entre ellos, los que demostraron una mayor sobreexpresión de NOS3 fueron, en este orden, los clones número 21, 14 y 1. El resto, o bien no sobreexpresaron la proteína, o bien la sobreexpresión fue mucho más débil que los citados clones. Así pues, fue el clon número 21 el que seleccionamos para continuar el estudio. A partir de este momento, este clon fue denominado como 4TO-NOS. La expresión de NOS3 a nivel de ARNm (apartado 4.3.4.2) confirmó el resultado del western blot (Figura 42B).

Como era de esperar, ninguno de los clones seleccionados a partir de la transfección estable con el plásmido pcDNA4/TO vacío (sin inserto) mostró expresión de NOS3 cuando ésta fue valorada con el anticuerpo anti-HA. En este caso, tras comprobar que su tasa de duplicación celular era similar al de la línea HepG2 de partida (datos no mostrados), seleccionamos el clon número 1 como línea celular control para proseguir el estudio. Dicho clon fue denominado como 4TO. La figura 42B muestra las diferencias de expresión de NOS-3 entre las líneas 4TO-NOS y 4TO control, cuando esta fue valorada por RT-qPCR o mediante western blot a partir del anticuerpo anti-NOS3.

Resultados

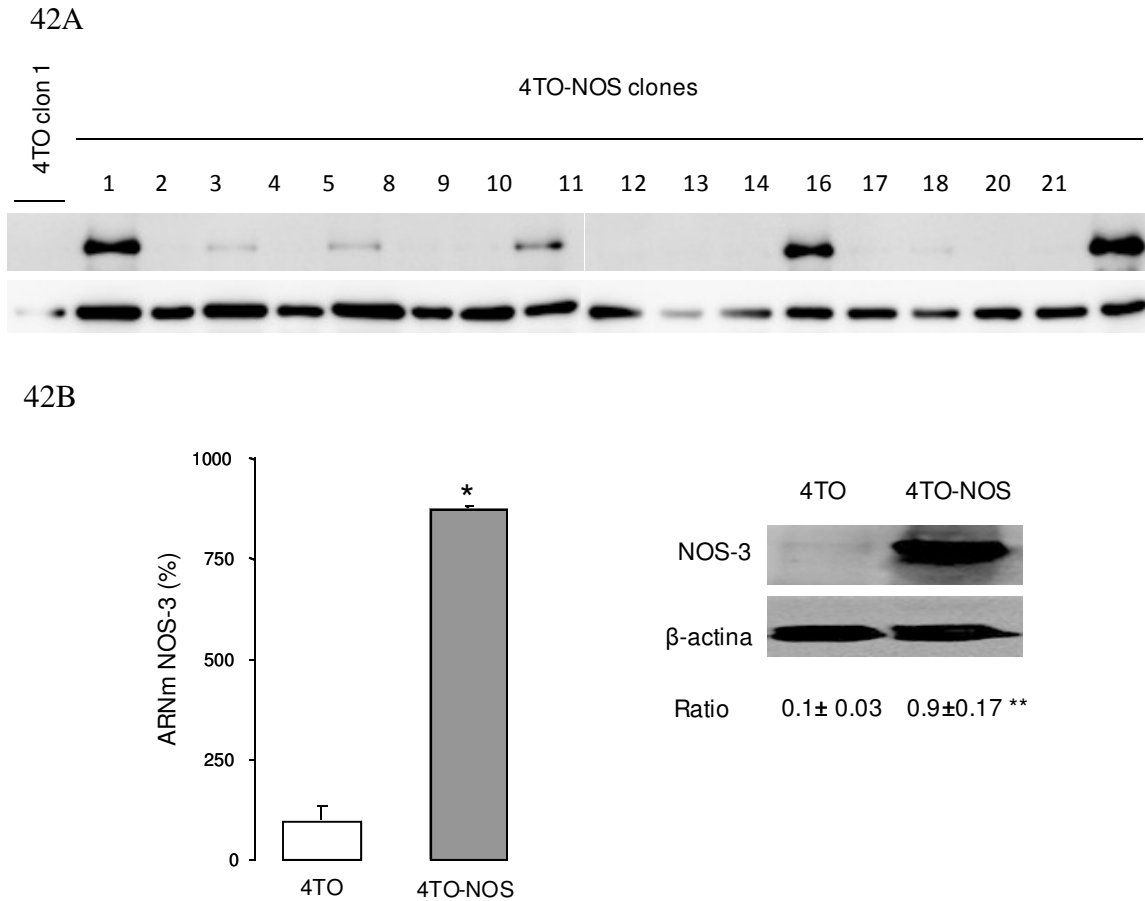


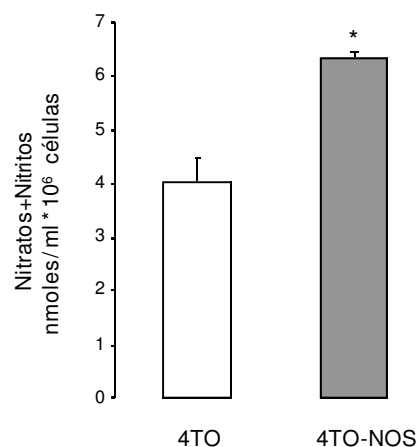
Figura 42. Expresión de NOS3 en los clones seleccionados. (A) La sobreexpresión de NOS3 fue valorada por western blot a partir de los lisados celulares obtenidos de los distintos clones seleccionados tras la transfección de la línea celular HepG2 con el plásmido pcDNA4/TO-NOS. Se muestran las imágenes obtenidas para los anticuerpos anti-HA (imagen superior; revela la expresión de NOS3 consecuencia de la transfección) y anti- β -actina (imagen inferior). (B) La expresión del ARNm de NOS3 ($877\% \pm 4,06$; $p < 0,001$), cuantificada mediante RT-qPCR (izquierda), confirmó lo observado por western blot (derecha) ($p < 0,01$) para los clones número 1 y 21, de las líneas celulares 4TO y 4TO-NOS, respectivamente. Los resultados se expresan como media \pm SEM de tres experimentos independientes. (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre ambas líneas celulares.

5.1.2. Producción de óxido nítrico en la línea celular 4TO-NOS

La actividad de NOS3 en la línea celular 4TO-NOS fue cuantificada a través de la acumulación de los productos finales del ON, nitratos y nitritos, en el medio de cultivo extracelular (apartado 4.8.1). Como se muestra en la figura 43, la línea celular con sobreexpresión de NOS3 acumuló una mayor cantidad de nitratos y nitritos respecto a la

línea celular 4TO. Estos datos fueron obtenidos tras restar el valor obtenido en presencia del inhibidor de la actividad NOS, L-NAME.

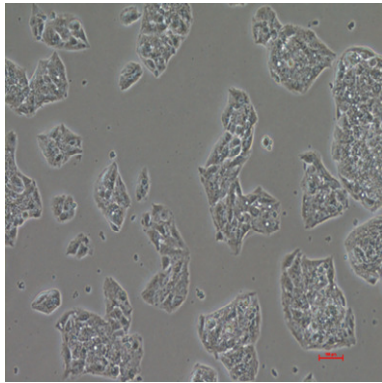
Figura 43. Actividad NOS3. Análisis de la concentración de nitratos+nitritos en el medio de cultivo extracelular, evaluado en las líneas celulares 4TO y 4TO-NOS a las 48 h de cultivo. Los resultados se expresan como media \pm SEM de cinco experimentos independientes. (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre ambas líneas celulares.



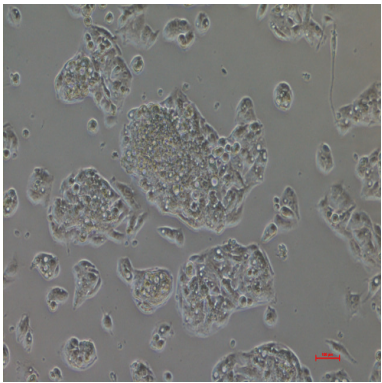
5.2. La sobreexpresión de NOS3 afecta a la morfología y el crecimiento celulares

La sobreexpresión estable permite analizar parámetros que no podrían estudiarse en una transfección transitoria, tales como su efecto sobre la morfología y el crecimiento celulares (apartado 4.1.4). Como muestra la Figura 44, ambos aspectos se vieron afectados por la sobreexpresión de NOS3. Así, la línea 4TO-NOS mostró una morfología más redondeada (Figura 44A) y creció de forma más lenta (Figura 44B), respecto a la línea celular control. Pese a que la velocidad de crecimiento de las células 4TO-NOS fue significativamente inferior al de las 4TO, la línea celular con sobreexpresión de NOS3 creció formando acúmulos de células más tempranos (Figura 44A). A su vez, la menor tasa de proliferación celular de la línea 4TO-NOS se asoció a un incremento en la liberación citoplasmática de LDH (apartado 4.8.5.1) al medio de cultivo extracelular (Figura 44C).

44A

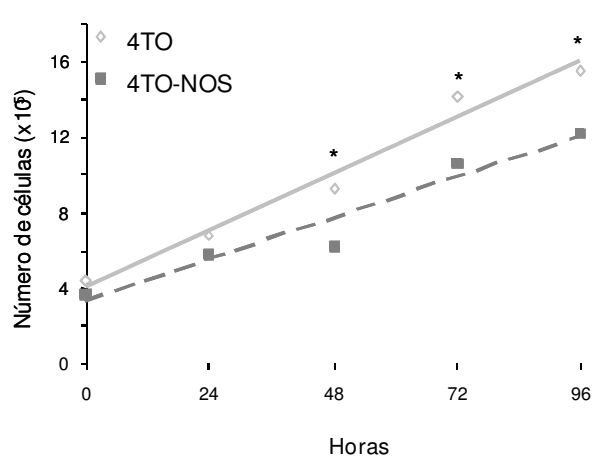


4TO



4TO-NOS

44B



44C

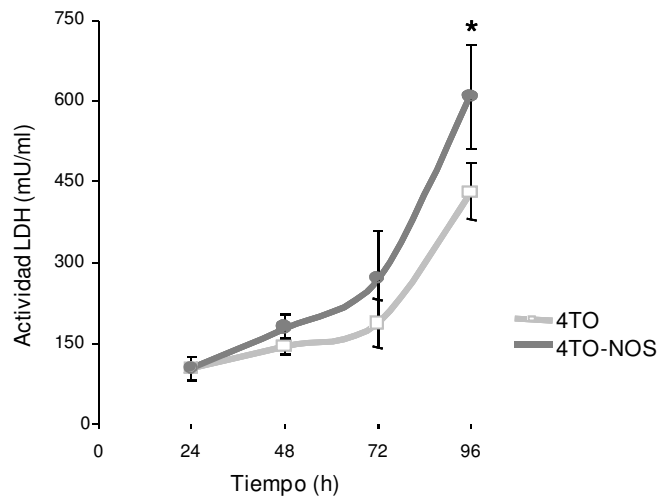


Figura 44. Efecto de la sobreexpresión de NOS3 sobre la morfología y el crecimiento celulares. (A) Imágenes representativas de las líneas celulares 4TO y 4TO-NOS vistas al microscopio óptico (10X); (B) Curva de crecimiento celular representada mediante una cinética cada 24h, hasta las 96 h de cultivo; (C) Estudio cinético de liberación de la lactato deshidrogenasa (LDH) al medio de cultivo extracelular.. Los resultados se expresan como media \pm SEM, representativos de tres experimentos independientes. (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre ambas líneas celulares.

5.3. NOS3 se localiza en la membrana mitocondrial externa

Una vez comprobada la sobreexpresión de la proteína, a continuación, se determinó su localización intracelular. Teniendo en cuenta la controversia existente acerca de la presencia de NOS3 en la mitocondria y el efecto del ON en la actividad respiratoria

celular, nos centramos en investigar la localización de la misma en la mitocondria (Navarro and Boveris 2008) . Para ello, utilizamos dos aproximaciones diferentes.

5.3.1. Localización de NOS3 mediante microscopía confocal

En primer lugar, se realizó un estudio de inmunolocalización del marcador mitocondrial MTCO2 y de la proteína NOS3 mediante microscopía de fluorescencia confocal (apartado 4.6.1). Tal y como muestra la figura 45A, NOS3 fue localizada principalmente en la membrana plasmática y en el citoplasma celular de las células que sobreexpresan NOS3. Sin embargo, la colocalización entre NOS3 y la mitocondria no pudo ser confirmada por este método.

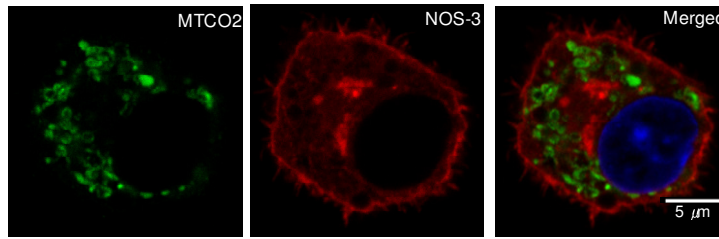
5.3.2. Localización de NOS3 mediante western blot

A continuación, se estudió la localización de NOS3 en la fracción mitocondrial mediante análisis por western blot (apartados 4.5.1 y 4.4.6). Como se observa en la figura 45C, la presencia de la proteína fue verificada en dicha fracción subcelular, obtenida mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. Además, el tratamiento proteolítico de dicha fracción con las enzimas tripsina o proteinasa K (apartado 4.6.2) hizo indetectable la presencia de NOS3 y de la translocasa de la membrana mitocondrial externa TOM40, sin afectar a la proteína de membrana mitocondrial interna MTCO2 (Figura 45B).

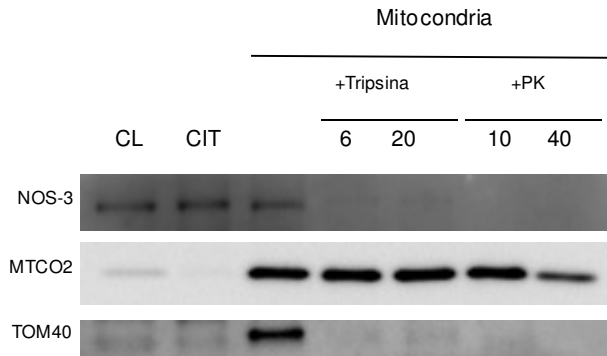
Por otro lado, con el fin de evaluar el efecto de la administración de anti-Fas en la distribución subcelular de NOS3 y su posible relación con la susceptibilidad a la muerte celular de la línea 4TO-NOS, se estudió la localización mitocondrial de la proteína en presencia del inductor de apoptosis. Como muestra la figura 45C, el aumento no significativo de la expresión de NOS3 inducido por anti-Fas en la línea celular 4TO-NOS coincidió con una menor localización de la proteína en la fracción mitocondrial (0,24 vs. 0,06; $p=0,021$).

Resultados

45A



45B



45C

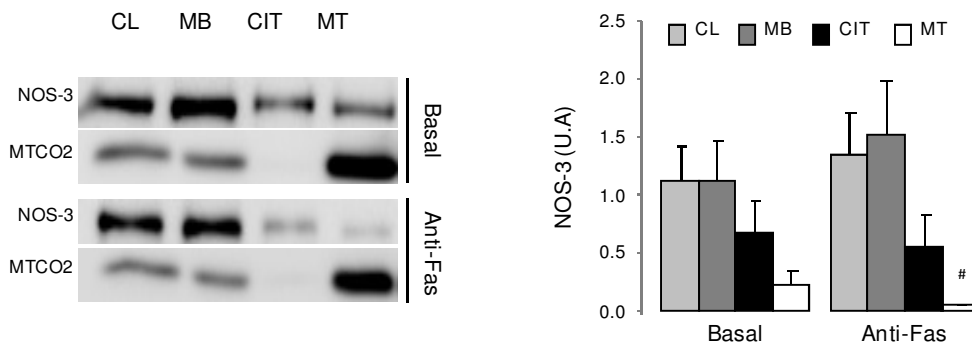


Figura 45. Localización de NOS3 en las células 4TO-NOS. (A) Imagen representativa de la inmunolocalización celular de NOS3 por microscopia confocal (n=3). Verde: citocromo c oxidasa II (MTCO2), Rojo: NOS3, Azul: tinción nuclear con DAPI. Se muestra la imagen superpuesta de todos los fluorocromos; (B) Localización mitocondrial de NOS3 evaluada por western blot en la fracción mitocondrial de la línea celular 4TO-NOS sometida a digestión enzimática con tripsina (6 y 20µg/100µg de proteína) o con proteinasa K (PK; 10 y 40µg/100µg de proteína). La figura muestra una imagen significativa (n=3) (C) Efecto de la administración de anti-Fas sobre la localización de NOS3 en mitocondria. Se muestran los datos obtenidos a partir del análisis densitométrico de los distintos estudios (n=3). MTCO2 se utilizó como control de carga para el lisado celular (CL), la fracción de membranas (MB) y la fracción mitocondrial (MT). La fracción citoplasmática (CYT) fue referida a la carga de proteína en el SDS-PAGE. ^(#) Indica diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

5.4. La sobreexpresión estable de NOS3 no afecta la capacidad respiratoria celular

Una vez comprobado que NOS3 se localiza en mitocondria, y debido al efecto inhibitorio que el ON tiene sobre el sistema de OXPHOS y a su capacidad para difundir a través de las membranas celulares, se decidió investigar la capacidad respiratoria de la línea celular 4TO-NOS. Para ello, se estudió el consumo de O₂ asociado a los complejos respiratorios mitocondriales y la capacidad respiratoria celular mediante un electrodo tipo Clark (apartado 4.7). Además, se analizó el $\Delta\Psi_m$ por espectrofotometría (apartado 4.8.2.2). Como se hizo anteriormente, se analizó el efecto de la administración de anti-Fas sobre estos mismos parámetros.

5.4.1. Consumo de oxígeno en células permeabilizadas con digitonina

A partir de la permeabilización celular con digitonina y la administración de sustratos e inhibidores específicos, se analizó el consumo de oxígeno asociado a los complejos mitocondriales CI, CII+III y CIV. Como se muestra en la figura 46, la sobreexpresión de NOS3 se relacionó con un sutil aumento de la actividad respiratoria del CII+III (119%, $p=0,024$), sin afectar al consumo de oxígeno dependiente del CI y CIV. La administración del inhibidor de NOS, L-NAME aumentó el consumo de O₂ dependiente del CI y CII+III, tanto en la línea celular control (166% $p=,014$ y 118% $p=0,033$, respectivamente) como en 4TO-NOS (154% $p=0,025$ y 138% $p=0,052$, respectivamente).

La inducción de apoptosis por anti-Fas provocó una disminución del consumo de O₂ en la línea celular 4TO-NOS debido principalmente a la pérdida del 30% de la actividad del CI ($p=0,011$). La administración simultánea de anti-Fas y L-NAME tuvo un efecto similar al causado por la adición exclusiva de L-NAME en las células 4TO. Por el contrario, en las células 4TO-NOS, L-NAME inhibió el efecto provocado por anti-Fas sobre el CI ($p=0,053$).

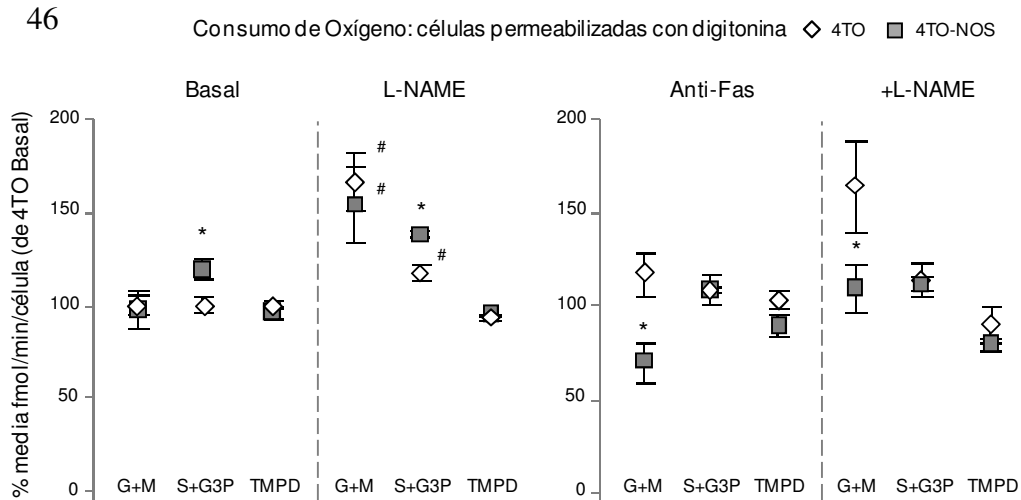


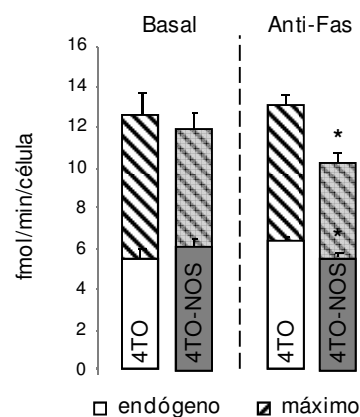
Figura 46. Rendimiento del sistema de fosforilación oxidativa en las células 4TO-NOS. Consumo de oxígeno de las células permeabilizadas con digitonina en presencia de donadores de electrones para el complejo I (Glutamato+Malato, G+M), el complejo II+III (Succinato+Gliceraldehído-3-P, S+G3P) y complejo IV (TMPD). Se realizaron 9 medidas independientes para la condición basal; con anti-Fas, n=6 y n=8 para las células 4TO y 4TO-NOS, respectivamente; con L-NAME, n=3; con anti-Fas más L-NAME (+L-NAME), n=3. Se representa la media \pm SEM. (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre las líneas celulares para una misma condición; (#) indica diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Anti-Fas o L-NAME vs. Basal; +L-NAME vs. Anti-Fas) en la misma línea celular.

5.4.2. Capacidad respiratoria en células intactas

La sobreexpresión de NOS3 estudiada por polarografía en células intactas, se relacionó con un aumento no significativo de la capacidad respiratoria celular endógena. Del mismo modo, la capacidad respiratoria celular máxima tampoco se vió alterada por la sobreexpresión de la proteína (Figura 47).

La administración de anti-Fas, sin embargo, redujo la capacidad respiratoria endógena (5,4 vs. 6,3, $p=0,050$) y la capacidad respiratoria máxima (10,1 vs. 12,9 $p=0,050$) en las células 4TO-NOS respecto a la línea celular control (Figura 47).

Figura 47. Respiración endógena y máxima en la línea celular 4TO-NOS. Estudio de la tasa de consumo de oxígeno en las células intactas (en condición basal: n=5 y n=4 para 4TO y 4TO-NOS, respectivamente; con anti-Fas: n=3). Se representa la media \pm SEM. (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre las líneas celulares para una misma condición.



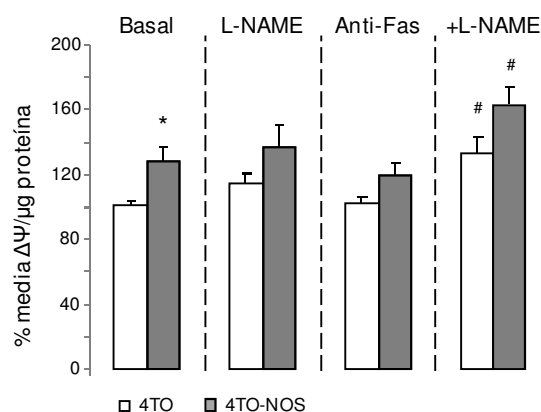
5.4.3. Potencial de membrana mitocondrial

En el sistema OXPHOS, la energía que se obtiene a través de la transferencia de electrones a lo largo de la CTE es usada para bombear protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, creando un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna. Así, tras estudiar la capacidad respiratoria celular se planteó estudiar el $\Delta\Psi_m$ asociado al sistema OXPHOS (apartado 4.8.2.2). Como muestra la figura 48, la sobreexpresión de NOS3 se asoció con un aumento de dicho potencial (129%, p=0,004). La adición del inhibidor L-NAME no causó ningún efecto, pero eliminó las diferencias observadas entre ambas líneas celulares al incrementar levemente el valor del $\Delta\Psi_m$ en la línea celular 4TO.

La administración de anti-Fas no tuvo efecto sobre el $\Delta\Psi_m$ en ambas líneas celulares, aunque redujo las diferencias observadas entre ambas en condiciones basales. Cuando el inductor de muerte se administró junto con L-NAME, se produjo un incremento del $\Delta\Psi_m$ en ambas líneas celulares respecto a la situación con anti-Fas (Figura 48).

Figura 48. Potencial de membrana mitocondrial.

Se representa la media \pm SEM de 7 experimentos independientes. (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre ambas líneas celulares para una misma condición; (#) indica diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Anti-Fas o L-NAME vs. Basal; +L-NAME vs. Anti-Fas) en la misma línea celular.



5.5. La sobreexpresión estable de NOS3 incrementa el estrés nitro-oxidativo y el número de copias de ADNmt

Debido a que la actividad NOS está estrechamente relacionada con el estrés nitro-oxidativo y la biogénesis mitocondrial a través de la generación de EROs y ERNs, a continuación, estudiamos dichos parámetros en la línea celular 4TO-NOS.

5.5.1. Estrés oxidativo en la línea celular 4TO-NOS

Las EROs intracelulares desempeñan diferentes papeles en la regulación de procesos vitales, tales como el crecimiento, la diferenciación y la muerte celular. Por este motivo, se estudió la producción celular de dichas especies mediante el uso de las sondas fluorescentes H₂DCFDA (DCF) y DHE (apartado 4.8.2.1). Al mismo tiempo, estudiamos el sistema redox mediante el análisis de la expresión de genes antioxidantes por RT-qPCR (apartado 4.3.4).

Las células que sobreexpresan NOS3 mostraron un aumento general en la producción de EROs (168%, $p < 0,001$ y 149%, $p < 0,05$, para DCF y DHE, respectivamente) comparada con la línea celular 4TO (Figura 49A). Este incremento coincidió con la sobrerregulación de los genes que codifican para las proteínas antioxidantes SOD1, SOD2, CAT, GPX1, GPX4 y GSS (Figura 49B). La administración del inhibidor de la actividad NOS no redujo el estrés oxidativo en 4TO-NOS (Figura 49A) cuando se utilizó la sonda fluorescente DCF.

La adición de anti-Fas indujo la expresión de los genes antioxidantes en la línea celular control 4TO, pero no tuvo ningún efecto adicional ni sobre la expresión génica ni sobre el estrés oxidativo celular en la línea 4TO-NOS.

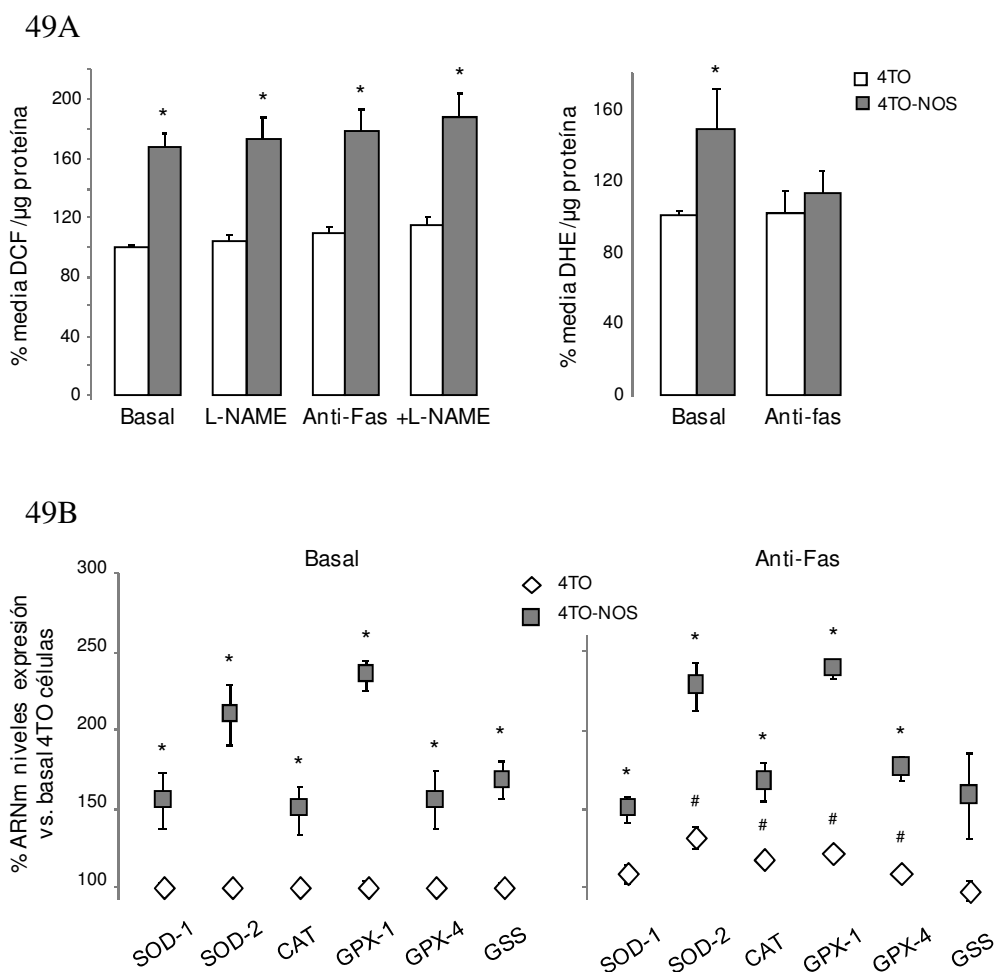


Figura 49. Efecto de la sobreexpresión de NOS-3 en el estrés oxidativo celular. (A) Producción general de EROs cuantificada a partir de las sondas fluorescentes DCF (n=11 para basal y anti-Fas; n=4 para L-NAME y +L-NAME) y DHE (n=8). (B) Análisis de la expresión de los genes antioxidantes GPX-1, GPX-4, Catalasa, SOD-1, SOD-2 and GSS (n=4). Los datos muestran la media \pm SEM. (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre líneas celulares para una misma condición; (#) indica diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Anti-Fas o L-NAME vs. Basal; +L-NAME vs. Anti-Fas) en la misma línea celular.

5.5.2. Estrés nitro-oxidativo en la línea celular 4TO-NOS

El ON puede reaccionar con el $O_2^{\cdot-}$ produciendo el $ONOO^{\cdot-}$, el cual es altamente reactivo y, junto con sus derivados, constituyen las denominadas ERNs. El radical $ONOO^{\cdot-}$ es capaz de modificar los residuos de tirosina de las proteínas, generando 3-nitrotirosina. Este proceso, conocido como nitración, es un mecanismo de regulación post-traduccional implicado en diversos procesos celulares, enter los que se encuentra la muerte celular. En

Resultados

el presente trabajo, el estrés nitro-oxidativo celular fue cuantificado por western blot (apartado 4.4.6) como la presencia de 3-nitrotirosina en la fracción mitocondrial obtenida por inmunocaptura (apartado 4.5.2).

La sobreexpresión de NOS3 se asoció con una mayor producción de ERNs y un aumento del nivel de nitración de proteínas mitocondriales (85,4 vs 35,8 p=0,05) (Figura 50A). En este caso, y dado que los datos fueron obtenidos 2h después del cambio de medio de cultivo, el incremento de estrés nitro-oxidativo no se asoció con una mayor acumulación de nitratos+nitritos en el medio extracelular (apartado 4.8.1) (Figura 50B). La administración de L-NAME causó una reducción en la nitración de proteínas mitocondriales en la línea 4TO-NOS (Figura 50A), que fue relacionada con una drástica disminución en la acumulación de nitratos y nitritos en el medio de cultivo celular (Figura 50B).

Cuando anti-Fas fue añadido al medio de cultivo, los niveles de nitración de las proteínas mitocondriales en la línea celular 4TO-NOS disminuyeron significativamente, equiparándose a los observados en la línea celular control (Figura 50A).

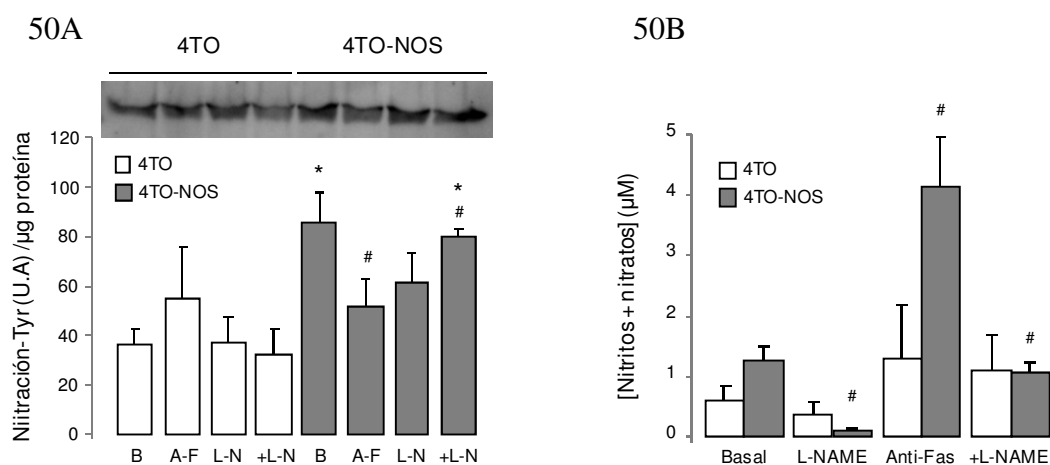


Figura 50. Efecto de la sobreexpresión de NOS3 sobre el estrés nitro-oxidativo celular. (A) Cuantificación de las proteínas nitradas en la fracción mitocondrial por western blot (n=3). Se muestra una imagen representativa. (B) Acumulación de productos finales del óxido nítrico en medio de cultivo celular tras 2h de incubación (n=3). Se representa la media ± SEM. (*) indica diferencias estadísticas significativas entre líneas celulares para una misma condición. (#) indica diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Anti-Fas o L-NAME vs. Basal; +L-NAME vs. Anti-Fas) en la misma línea celular.

5.5.3. Número de copias de ADNmt en la línea celular 4TO-NOS

El estrés nitro-oxidativo puede regular la biogénesis del ADNmt bajo diferentes condiciones. Una vez comprobado que la sobreexpresión de NOS3 se asociaba al incremento del estrés nitro-oxidativo celular, se analizó su relación con el contenido de ADNmt y la expresión de proteínas mitocondriales constituyentes de los complejos respiratorios (apartados 4.3.4 y 4.4.6).

Como muestra la figura 51A, la sobreexpresión de NOS3 se asoció con un incremento del número de copias de ADNmt respecto al ADNn (148%, $p < 0,001$). Este hecho coincidió con una mayor expresión de la subunidad MTCO2 del CIV mitocondrial (163%, $p = 0,019$), pero no de las subunidades NDUFB6, SDHB y UQCRC2, constituyentes de los complejos respiratorios I, II y III, respectivamente (Figura 51B).

La adición de anti-Fas indujo la expresión de las proteínas correspondientes a los CIII y CIV en la línea celular control 4TO, lo que provocó la reducción del efecto observado en el CIV en condiciones basales.

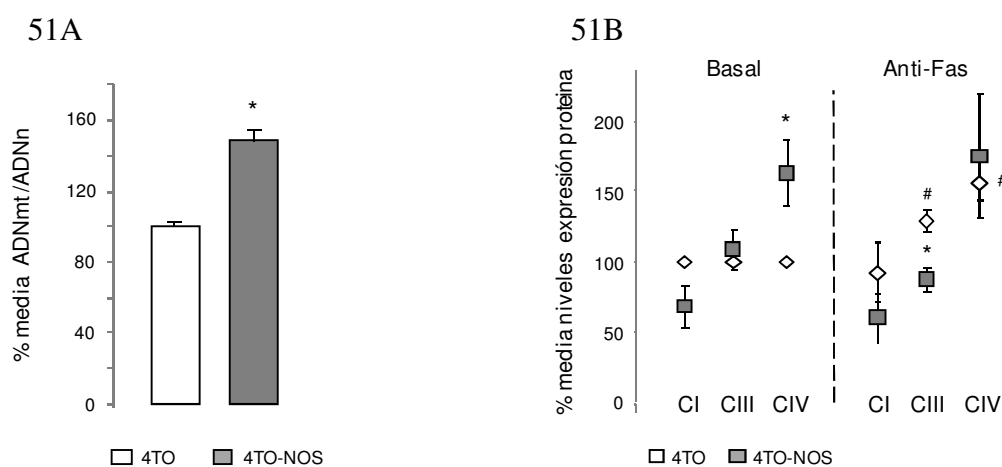


Figura 51. Número de copias de ADNmt y expresión de proteínas. (A) Número de copias de ADNmt referido al ADNn cuantificado en las líneas 4TO y 4TO-NOS mediante RT-qPCR ($n=9$). (B) Análisis de expresión de las proteínas NDUFB6, SDHB, UQCRC2 y MTCO2, constituyentes de los complejos mitocondriales I, II, III y IV, respectivamente ($n=4$). Los resultados se expresan como media \pm SEM. (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre ambas líneas celulares para una misma condición. (4TO vs. 4TO-NOS). (#) indica diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Anti-Fas vs. Basal) en la misma línea celular.

5.6. La sobreexpresión de NOS3 se relaciona con la muerte celular

Independientemente del efecto ejercido sobre la capacidad respiratoria, la sobreexpresión estable de NOS3 se había asociado con un menor crecimiento celular. A continuación, se analizaron diferentes parámetros de muerte celular y activación de la vía apoptótica que pudieran relacionarse con este hecho. De nuevo, se analizaron estos mismos parámetros en el modelo de administración de anti-Fas con el objetivo de estudiar la susceptibilidad de la línea 4TO-NOS al inductor de muerte.

5.6.1. Expresión de genes pro-apoptóticos

En primer lugar, se realizó el análisis de expresión de genes pro-apoptóticos mediante RT-qPCR (apartado 4.3.4.). Como se muestra en la figura 52A, la sobreexpresión de NOS3 se asoció con una mayor expresión de los genes pro-apoptóticos BAX (164% $p=0,003$), BIK (354% $p=0,002$) y APAF-1 (168% $p=0,002$) en condiciones basales.

La administración de anti-Fas estimuló la expresión de BIK en las líneas celulares 4TO (146% $p=0,010$) y 4TO-NOS (563% $p=0,007$), sin afectar a BAX ni a APAF-1.

5.6.2. Liberación citoplasmática de citocromo c

En segundo lugar, se determinó la liberación de cit c en lisados celulares (apartado 4.4.1.3) mediante western blot (apartado 4.4.6). Como muestra la figura 52B, la sobreexpresión de NOS3 fue asociada con una mayor localización de cit c en el citoplasma, en condiciones basales (168% $p=0,019$). En esta ocasión, sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la liberación de cit c tras la administración de anti-Fas respecto a la situación basal (Figura 52B).

5.6.3. Actividad caspasa

El siguiente parámetro a estudiar relacionado con la apoptosis fue la actividad caspasa (apartado 4.8.5.2). Las células 4TO-NOS mostraron un aumento de la actividad caspasa-9 (124%; $p=0,047$) y caspasa-3 (166%; $p=0,011$) respecto a la línea celular control 4TO en condiciones basales (Figura 52C).

La administración de anti-Fas indujo un aumento de la actividad caspasa-3 en ambas líneas celulares (153% y 318%, en 4TO y 4TO-NOS respectivamente; $p<0,050$), así como una mayor actividad caspasa-9 solamente en 4TO-NOS (229%, $p=0,034$) (Figura 52C).

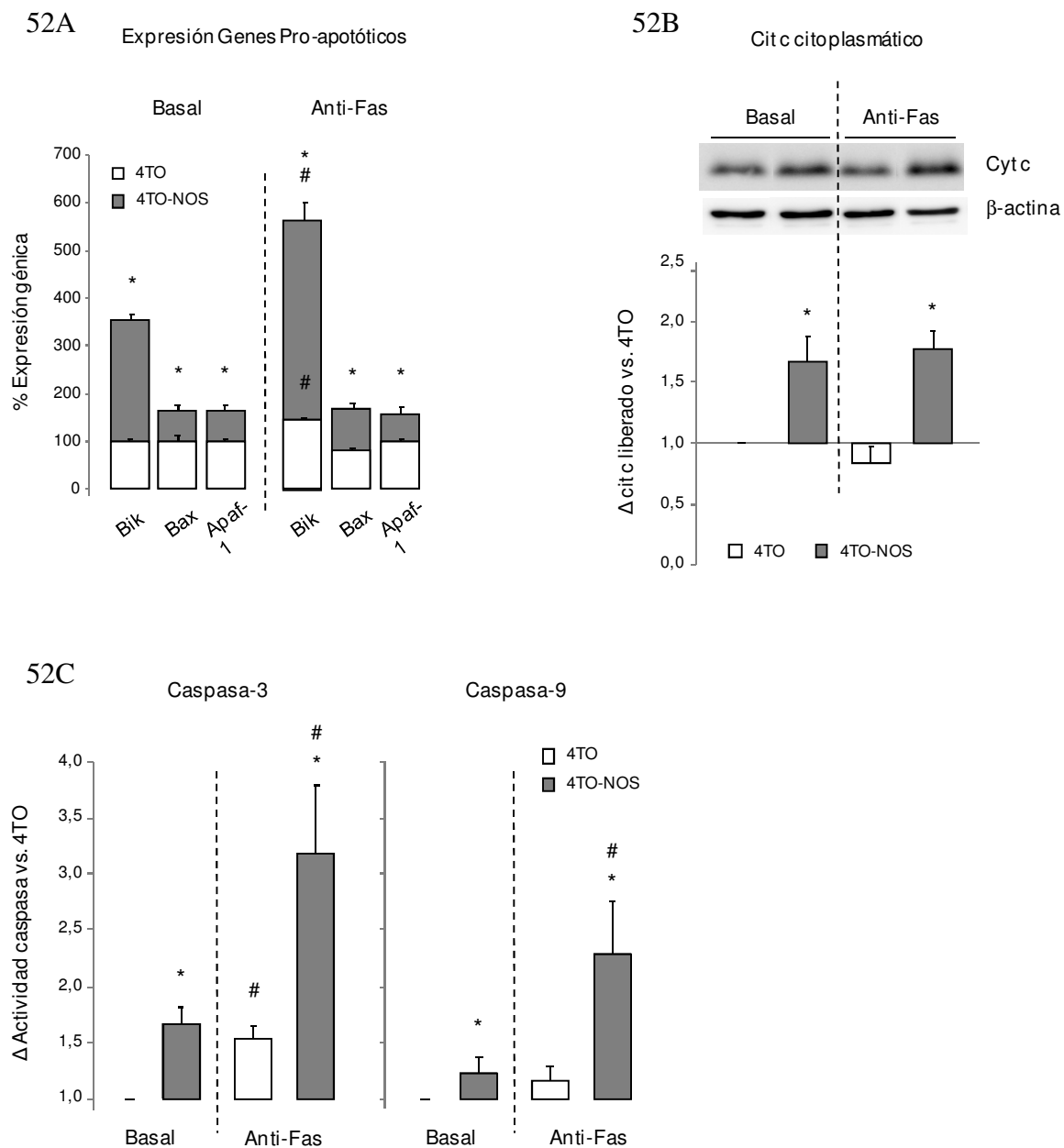


Figura 52. Parámetros de apoptosis en la línea celular 4TO-NOS. (A) Análisis de expresión de los genes pro-apoptóticos Bik, Bax y APAF-1 mediante RT-qPCR (n=4). (B) Cuantificación de la expresión de cit c en la fracción citoplasmática mediante western- blot. Representación de la relación cit c/ β -actina (n=3). (C) Actividad enzimática caspasa-9 y caspasa-3 ensayada por espectrofotometría (n=4). Se representan los datos referidos a la línea control 4TO en la condición basal. Los datos muestran la media \pm SEM. (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre las líneas celulares para una misma condición; (#) indica diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Anti-Fas vs. Basal) en la misma línea celular.

5.7. Perfil proteómico de la línea celular 4TO-NOS

A continuación, y con objeto de identificar proteínas expresadas de manera diferencial entre ambas líneas celulares que pudieran participar en los procesos de generación de EROs y de muerte celular en la línea 4TO-NOS en condiciones basales, se analizó el perfil de expresión de proteínas y se comparó con el observado en la línea celular control. Del mismo modo, se realizó dicho análisis tras la adición de anti-Fas para estudiar la mayor susceptibilidad de la línea NOS3 a la inducción de muerte celular por esta vía.

5.7.1. Análisis proteómico

El análisis proteómico se efectuó a partir de la separación de las proteínas del lisado celular mediante electroforesis bidimensional (apartado 4.4.3.2). Posteriormente, y tras seleccionar mediante el programa de análisis PDQuest las manchas de proteína con expresión diferencial entre las distintas líneas celulares y los diferentes tratamientos, estas fueron identificadas por espectrometría de masas (MS). Así, de un total de 110 manchas de proteínas con expresión diferencial estadísticamente significativa, 56 fueron identificadas como 42 proteínas diferentes.

La figura 53 muestra una imagen representativa de un gel 2-D. En la figura 54A se resume el número de manchas de proteínas con expresión diferencial positiva (inducidas o sobreexpresadas) y negativa (reprimidas o inhibidas), en la línea celular 4TO-NOS respecto a la línea 4TO, en condición basal o con anti-Fas. La figura 54B muestra un gel máster 2-D virtual generado por el software de análisis de imagen PDQuest a partir de la integración de los 12 geles obtenidos (3 repeticiones x 4 condiciones experimentales analizadas). Sobre ella, se localiza la posición de las proteínas que mostraron una expresión diferencial estadísticamente significativa cuando se compararon los proteomas de las células control y de las células con sobreexpresión de NOS3, con y sin tratamiento con el inductor de muerte. Sólomente están representadas aquellas proteínas que fueron posteriormente identificadas por espectrofotometría de masas como proteínas.

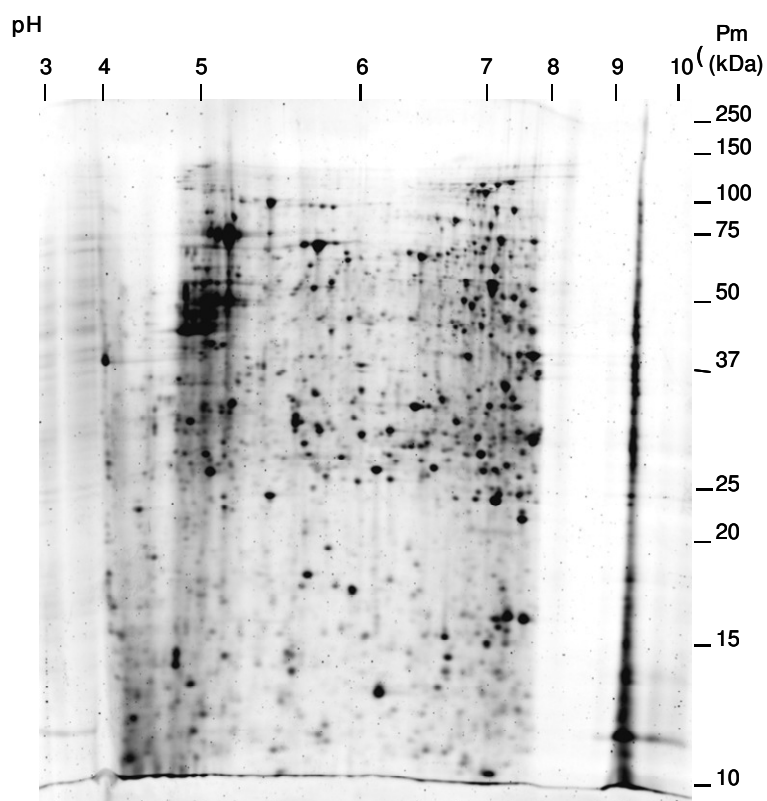


Figura 53. Gel 2-D representativo. La muestra de proteínas obtenida a partir de la lisis celular se separó mediante electroforesis 2-D, utilizando una tira de gel para isoelectroenfoque de 18cm y rango no lineal de pH de 3-10, y un gel de SDS del 12% de acrilamida:bisacrilamida que permite un rango de 10-250 kDa.

La Tabla 6 recoge la identificación proteómica mediante MS de las manchas expresadas diferencialmente. Como se observa, se han agrupado las proteínas en función de sus principales funciones biológicas: metabolismo (11), citoesqueleto (2), procesamiento de ácidos nucleicos (5), procesamiento (8) y degradación (6) de proteínas, y homeostasis redox (10).

Resultados

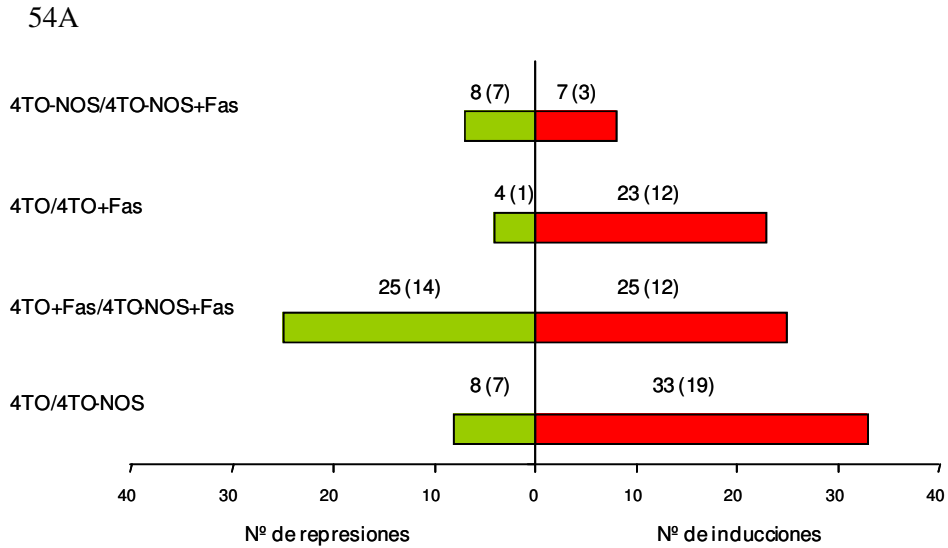


Figura 54. Efecto de la sobreexpresión de NOS3 sobre el proteoma celular. (A) Número de manchas de proteínas con expresión desregulada (incrementada, en rojo; disminuida, en verde) en la línea 4TO-NOS y/o la adición de anti-Fas. Entre paréntesis se indica el número de proteínas que fueron posteriormente identificadas como proteínas diferentes por espectrometría de masas (MS). (B) Gel maestro, generado con el programa de análisis PDQuest. Las diferencias en el perfil de expresión se obtuvieron mediante el programa PDQuest, aplicando una prueba t de Student con una $p < 0,05$ y $p < 0,01$. Se marcan las manchas de proteínas que fueron identificadas por MS.

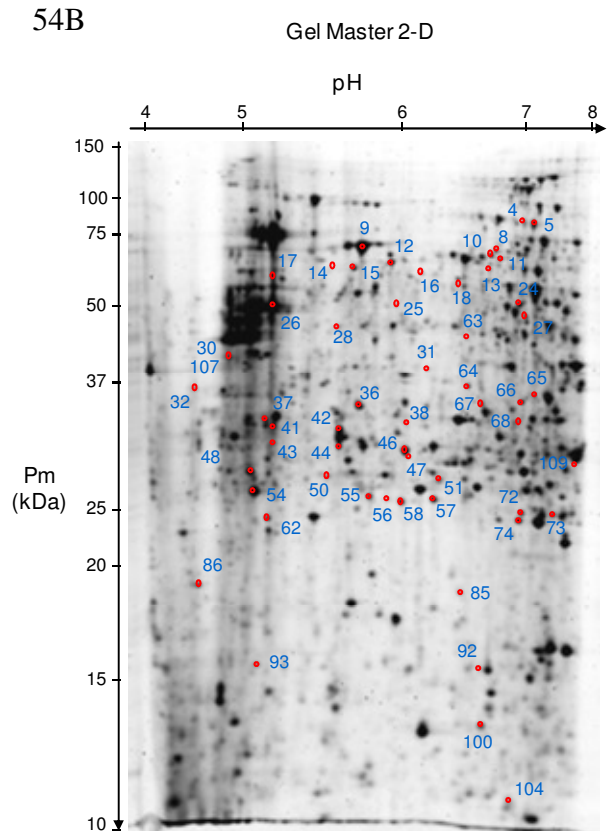


Tabla 6. Lista de proteínas expresadas diferencialmente e identificadas por MS. Se indica: nombre de entrada y número de acceso en la base de datos de UniProt, función molecular, número correspondiente de la mancha en el gel 2D, puntuaciones “Mowse score” (MS) e “Ion score” (IS) y número de veces que cambia su expresión (en negrita indica un valor de $p < 0,01$; en caso contrario, $p < 0,05$). La palabra ‘NOS’ sustituyendo a un número indica que la proteína identificada solo se expresa en 4TO-NOS. En el cabecero: “NOS” significa “línea celular 4TO-NOS”; el símbolo + significa “condiciones de administración de anti-Fas”.

	Nombre Proteína (Nº acceso)	Función Molecular	Spot Nº	MS	IS	NOS	NOS+	4TO+	NOS+
						vs. 4TO	vs. 4TO+	vs. 4TO	vs. NOS
Metabolismo	Enoil-CoA hidratasa, mitocondrial (P30084)		46	589	470	1.3	1.7		
	Acil-CoA deshidrogenasa mitocondrial de cadena media (B7Z9I1)	β-oxidacion	27	379	290	5.4			-1.5
	Acil-CoA deshidrogenasa mitocondrial de cadena corta y ramificada (B4DQ51)		28	215	155	2.8		1.4	
	GAPDH (P04406)		65	124	77	2.3		3.0	
	Alfa-enolasa (P06733)	Glicolisis	18	136	97				1.5
	D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (O43175)	Aminoacidos	8	269	157	-2.1	-1.8		
	Retinal deshidrogenasa 1 (P00352)	Retinol	10	651	543	-3	-2.0		1.7
	Proteína 14B alfa/beta hidrolasa (B4DQI4)	Hydrolasa	56	72	39	-2.5			2
	Sulfotransferasa (J3KPV7)	Transferasa	64	264	195	1.5			-1.5
	AMP deaminasa 2 (Fragment) (H0Y360)	IMP	104	48					5.2
Adenilato quinasa 2, mitocondrial (F8VY04)	Energia	109	141	121				1.5	
Procesamiento ARN	hnRNPL (P14866)		4	132	111		-2.8		
	hnRNPH (P31943)	hnRNP/ componente 28S	5	206	173		-1.9		
	hnRNPD0 (H0YA96)		12	674	569	-1.6			
	hnRNPK (P61978)		24	273	229		-1.4		
	28S RNPS22, mitocondrial (P82650)		50	360	314		-2.1		
	63		278	185	2.6				
Degradación proteínas	Aminopeptidasa citosólica (P28838)		11	573	417	-2.1	-2.0		
	Aminoacilasa-1 (Q03154)		25	135	79		2.6	-1.9	
	Serina proteasa HTRA2, mitocondrial (O43464)		31	249	189		2.6		
	Proteína 2, mitocondrial con dominio isocorismatasa (Q96AB3)	Proteolisis /Proteína de	73	264	217	3.7	2.3		
	Catepsina B (P07858)	ensamblaje stability	37	288	204		1.4	1.8	
			54	407	332		-1.5	1.3	
	Catepsina D (P07339)		41	498	389	NOS	NOS+		
		42	598	475	2.3	2.8			
		44	268	223	1.9	2.1			
Procesamiento proteínas	Proteína de choque térmico de 60 KDa, mitocondrial (P10809)		14	130	114		-4.1		-3.7
			15	415	350			-1.2	-1.5
			16	136		2.0	3.9		
			17	287	210		-1.9		
			32	98	78		2.1		
	Proteína de 78 KDa regulada por glucosa (P11021)	Chaperona /Proteína de ensamblaje	48	513	434		-1.2		-1.3
			66	610	463		-1.8		
			86	157	140	1.8			-1.4
			93	131	113		-1.5		-1.6
	Proteína de choque térmico beta-1 (P04792)		47	300	255				1.8
Proteína DJ-1 (Q99497)		57	183	102		1.3			
GrpE proteína homóloga 1, mitocondrial (Q9HAV7)		58	313	271		2.5			
Proteína de estres-70, mitocondrial (P38646)		68	441	386	1.8				
Factor I de ensamblaje del complejo F1 de la ATP sintasa mitocondrial (H0YD21)		38	70			8.4		3.1	
Calreticulina (P27797)		100	133	107		-1.5			
Citoesqueleto	Actina, citoplasmica 2 (P63261)		26	761	614			1.7	
			43	119	103		1.7		
	Microtubulos-actina cross-linking factor 1, isoformas 1/2/3/5 (F5GZL7)		92	48	11		-2.6		
Homeostasis redox	Tiorredoxina (Fragmento) (H7BZJ3)		36	148	128	1.4			-1.2
	Peroxirredoxina-3 (E9PH29)		51	353	313	3.2	3.6		
	NADPH:adenodoxina oxidorreductasa, mitocondrial (P22570)		55	582	506	3.7	3.1		
	Peroxirredoxina-2 (P32119)		62	800	323	2.1	1.4	1.7	
	Peroxirredoxina-1 (Q06830)		72	407	279			2.0	
	SOD [Mn] mitocondrial (P04179)	Oxido- reductasa /Isomerasa	74	450	375	3.2			
	Aldo-ceto reductasa familia 1 miembro C1 (Q04828)		85	328	258	6.9	2.0	2.8	
	Proteína disulfuro isomerasa familia A, miembro 3, isoforma CRA_b (G5EA52)		9	943	636		-5.1	3.7	
			13	350	266		-2.1		-1.7
			67	406	299			1.9	
Proteína disulfuro-isomerasa (H7BZ94)		30	196	149	-2.4				
Proteína disulfuro-isomerasa (I3L2P8)		107		91	-2.4				

Resultados

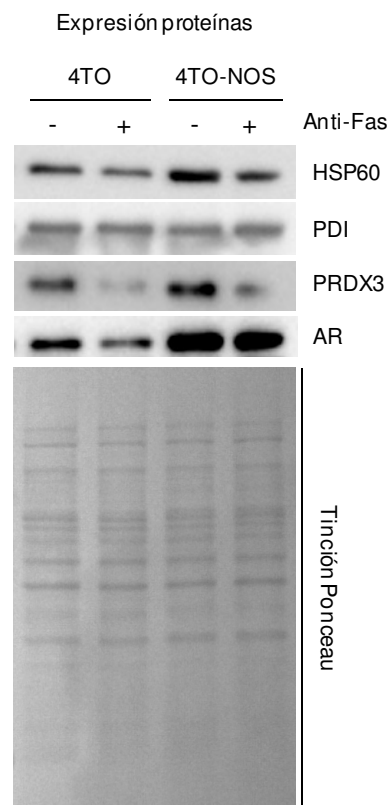
La sobreexpresión de NOS3 afectó principalmente a la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo (8) y el sistema redox (8). Entre las proteínas metabólicas, tres se relacionaron con la β -oxidación y la glucólisis: acetil-CoA deshidrogenasa de cadena media y corta (+5,4/+2,8, respectivamente) y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH; +2,3). En el siguiente grupo más numeroso de proteínas desreguladas por la sobreexpresión de NOS3, encontramos sobreexpresión de proteínas tanto del sistema antioxidante como prooxidante celular: peroxirredoxina 3 (PRDX3; +3,2), peroxirredoxina 2 (PRDX2; +2,1), superóxido dismutasa [Mn] mitocondrial (SOD2; +3,2), y NADPH:adrenodoxina oxidoreductasa mitocondrial (FDXR; +3,7). Por último, cabe destacar la identificación de catepsina D (CATD) como una proteasa sobrerregulada por la sobreexpresión de NOS3, en dos manchas diferentes (+2,3 y +1,9), así como en una tercera mancha adicional solamente detectada en la línea celular 4TO-NOS.

La inducción de muerte celular por anti-Fas puso de relieve diferencias en el perfil de expresión proteica como consecuencia de la sobreexpresión de NOS3. Las proteínas identificadas como diferencialmente expresadas entre ambas líneas estaban principalmente involucradas en el procesamiento (6) y degradación (6) de proteínas, así como en la homeostasis redox (5). Estas proteínas fueron identificadas en varias manchas sobrerreguladas y/o reprimidas, debido probablemente a modificaciones postraduccionales. El inductor de apoptosis no modificó el patrón de expresión de CATD en la línea celular 4TO-NOS.

5.7.2. Validación por Western blot

Con la intención de verificar los resultados de expresión diferencial y posterior identificación por MS, elegimos aleatoriamente 4 de las proteínas identificadas para confirmar su cambio de expresión relativa mediante western blot (apartado 4.4.6). Las proteínas elegidas fueron la HSP60 (proteína de choque térmico 60), PDI (proteína disulfuro isomerasa), AR (NADPH: adrenodoxina oxidoreductasa mitocondrial) y PRDX3. Como muestra la figura 55, el análisis por western blot confirmó los cambios relativos de expresión obtenidos por 2-D para dichas proteínas.

Figura 55. Validación de los resultados del análisis de expresión/identificación mediante western blot. Se muestra una imagen representativa del western blot para las proteínas HSP60 (proteína de choque térmico 60), PDI (proteína disulfuro isomerasa), AR (NADPH: adrenodoxina oxidoreductasa mitocondrial) y PRDX3 (peroxiredoxina III). La tinción de Ponceau de la membrana de nitocelulosa a la que fueron transferidas las proteínas separadas en el gel de SDS-PAGE fue utilizada como control de carga



5.7.3. Descripción funcional de las proteínas identificadas en el análisis proteómico

El significado biológico del perfil de expresión de las proteínas identificadas como diferencialmente expresadas, de acuerdo a las diferentes líneas celulares y distintos tratamientos, se analiza a continuación, agrupando las proteínas según su función (Tabla 1).

Metabolismo

El metabolismo es el conjunto de reacciones bioquímicas y procesos fisicoquímicos que se producen en el interior de las células. El metabolismo se divide en dos procesos acoplados: el catabolismo, que libera energía, y el anabolismo, que utiliza esa energía liberada para recomponer enlaces químicos y construir componentes de las células como las proteínas y los ácidos nucleicos. Estas reacciones están catalizadas por enzimas específicas.

La alteración del metabolismo energético es un hecho constatado en la mayoría de tumores, independientemente de su origen o tipo celular. Esta alteración consiste fundamentalmente en un incremento del consumo de glucosa y de la producción de lactato,

Resultados

aún en presencia de O₂, fenómeno que se conoce como efecto Warburg, en honor a su descubridor el bioquímico alemán Otto Warburg (Ristow 2006).

Un alto porcentaje de las proteínas identificadas como diferencialmente expresadas (11 proteínas de 42 totales; 26,2% del total) estaban relacionadas con funciones metabólicas centrales, como el metabolismo energético, el metabolismo de aminoácidos o el metabolismo lipídico (Tabla 6). En general, la expresión de 8 de las proteínas pertenecientes a esta categoría funcional se vió afectada como consecuencia de la sobreexpresión de NOS3 en un rango que osciló entre +5,4 y -3 veces. Esto supone el 33,3% del total de proteínas desreguladas identificadas en la línea 4TO-NOS cuando se comparó con la línea celular control 4TO en condiciones basales (24 en total). De ellas, 5 eran proteínas sobre-reguladas (+) y estaban implicadas en procesos de β -oxidación y glucólisis. Las 3 restantes eran proteínas reprimidas, y estaban relacionadas también con procesos metabólicos como el metabolismo de los aminoácidos, del retinol, etc.

A continuación, se enuncian las funciones biológicas de las proteínas identificadas según se describe en las diferentes bases de datos (UniProt, Gene Cards, NCBI):

- *Enoil-CoA hidratasa mitocondrial* (P30084): Miembro de la superfamilia hidratasa/isomerasa capaz de procesar tioésteres de enoil-CoA de cadena lineal de 4 carbonos y, hasta al menos, 16 carbonos. Se localiza en la matriz mitocondrial, donde cataliza el segundo paso en la ruta de la β -oxidación de ácidos grasos.

- *Acil-CoA deshidrogenasa mitocondrial* de cadena media (B7Z9I1) y de cadena corta y ramificada (B4DQ51): Las acil-CoA deshidrogenasas mitocondriales son enzimas que intervienen en la primera de las cuatro reacciones que constituyen la β -oxidación de ácidos grasos. En el caso de la acil-CoA deshidrogenasa de cadena media, su máxima actividad es para los acil-CoA grasos de 6 y 8 carbonos. La acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta y ramificada presenta una mayor actividad catalítica con los derivados de acil-CoA de cadena corta lineal o ramificada.

- *Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa* (P04406): Además de su actividad enzimática en la glucólisis presenta actividad nitrosilasa y participa en procesos tales como la transcripción, el transporte del ARN, la replicación del ADN, la organización y el ensamblaje del citoesqueleto o la apoptosis.

- *Alfa-enolasa* (P06733): Enzima multifuncional que cataliza la transformación de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato durante la glucólisis. Según la concentración de los sustratos en el medio, la enzima puede también catalizar la reacción inversa durante la gluconeogénesis. La enolasa posee tres subunidades denominadas α , β , y γ , que pueden combinarse en dímeros que son isoenzimas. Además de en la glucólisis, la enolasa participa en diversos procesos, tales como el crecimiento, la hipoxia o la respuesta alérgica. También puede funcionar en el sistema fibrinolítico intravascular y pericelular, así como estimular la producción de inmunoglobulinas.
- *3-fosfoglicerato deshidrogenasa* (O43175): Enzima que participa en los primeros pasos de la biosíntesis de L-serina, la cual es requerida para la síntesis de D-serina y otros aminoácidos en células animales.
- *Retinal deshidrogenasa 1* (P00352): Enzima implicada en el metabolismo de la vitamina A, que cataliza la oxidación del retinal a ácido retinoico.
- *Proteína 14B con dominio alfa/beta hidrolasa* (B4DQI4): Enzima hidrolasa de localización nuclear que puede regular la transcripción.
- *Sulfotransferasa* (J3KPV7): Enzima transferasa que cataliza la transferencia de un ión de azufre a una molécula de cianuro u otros compuestos tiólicos. Los grupos que participan en una sulfonación por medio de una sulfotransferasa pueden ser parte de una proteína, lípido, carbohidrato o esteroide. Puede actuar como un antioxidante, contribuir al catabolismo de la cisteína y ser un importante productor de sulfuro de hidrógeno.
- *AMP desaminasa 2 (Fragmento)* (H0Y360): Enzima que interviene en el metabolismo de las purinas. Promueve la desaminación de la adenosina dando lugar a inosina, la cual puede continuar su proceso metabólico transformándose en hipoxantina. Interviene en el desarrollo y mantenimiento del sistema inmune, en la diferenciación celular y en los sistemas de señalización que involucran los receptores acoplados a las proteínas G.
- *Adenilato quinasa 2, mitocondrial* (F8VY04): Es una isoenzima de la adenilato quinasa que cataliza la transferencia reversible del grupo fosfato terminal entre el ATP y el AMP, para formar ADP. Así pues, juega un papel importante en la homeostasis de la energía celular y en el metabolismo de nucleótidos esenciales para el crecimiento y mantenimiento celulares. La actividad adenilato quinasa es fundamental para la regulación de la utilización de fosfato y las vías de biosíntesis de AMP de novo.

Homeostasis Redox

Las reacciones metabólicas de los seres vivos son reacciones de oxidación-reducción o también llamadas reacciones redox. Está ampliamente documentado que las EROs tienen un papel clave en la génesis de procesos de activación de la apoptosis y de la carcinogénesis. Así, el estrés oxidativo contribuye a la iniciación de la malignidad celular y la progresión del cáncer por causa de una inestabilidad genómica.

El segundo grupo donde se encuentra el mayor número de proteínas significativamente desreguladas (10 proteínas de 42 totales; 23,8% del total) es el correspondiente al sistema redox. Encontramos proteínas sobreexpresadas tanto en el sistema anti-oxidante celular como en el sistema pro-oxidante. En general, la expresión de 8 de las proteínas pertenecientes a esta categoría funcional se vio afectada como consecuencia de la sobreexpresión de NOS3 en un rango que osciló entre +6,9 y -2,4 veces. Esto supone el 33,3% del total de proteínas desreguladas identificadas en la línea 4TO-NOS cuando se comparó con la línea celular control 4TO en condiciones basales. De ellas, 6 proteínas fueron sobre-reguladas y 2 proteínas desreguladas.

A continuación, se describen las funciones biológicas de las proteínas identificadas:

- *Tiorredoxina (Fragmento)* (H7BZJ3): Enzima oxidoreductasa que actúa como antioxidante, facilitando la reducción de otras proteínas a través de un intercambio tiol-disulfuro en la cisteína. Además, interactúa con lectinas y las chaperonas calreticulina y calnexina para modular el plegamiento de glicoproteínas sintetizadas *de novo* en el RE. Las tiorredoxinas son esenciales para la vida en los mamíferos.
- *Peroxirredoxina-3* (E9PH29): Enzima antioxidante mitocondrial que pertenece a la familia de las Tiorredoxinas. Protege frente al daño oxidativo celular y su expresión se relaciona con la proliferación y diferenciación celular.
- *Adrenodoxina oxidoreductasa, mitocondrial* (P22570): Actúa como la primera flavoproteína de transferencia de electrones en los sistemas P450 mitocondriales, implicados en la síntesis de hormonas esteroideas a partir del colesterol. El coenzima FAD recibe 2 electrones del NADPH y los transfiere a la adrenodoxina. Esta, a su vez, funciona como un transportador móvil de electrones hasta el P450. En el hígado, cataliza la C-27 hidroxilación de esterol.
- *Peroxirredoxina-1* (Q06830) y *Peroxirredoxina-2* (P32119): Enzimas antioxidantes que controlan los niveles de peróxido celulares con la reducción de los equivalentes

procedentes del sistema de la tiorredoxina. Pueden desempeñar un papel importante en la eliminación de los peróxidos generados durante el metabolismo. Podrían tener un efecto proliferativo a través de su participación en las cascadas de señalización de factores de crecimiento y del TNF-alfa mediante la regulación de las concentraciones intracelulares de H_2O_2 .

- *SOD [Mn] mitochondrial* (P04179): Esta enzima mitocondrial es un miembro de la familia supeóxido dismutasa de hierro/manganeso, capaz de transformar el anión supeóxido producido durante la respiración celular en H_2O_2 y O_2 . Así pues, actúa como una enzima antiapoptótica confiriendo protección celular frente al estrés oxidativo y la muerte. Su actividad catalítica puede ser regulada por nitración.

- *Aldo-ceto reductasa familia 1, miembro C1* (Q04828): Enzima capaz de convertir la progesterona en su forma inactiva, 20-alfa-dihidroprogesterona. En el hígado y el intestino, puede participar en el transporte de la bilis y en el control de la concentración de ácido biliar intrahepático.

- *Proteína disulfuro-isomerasa* (H7BZ94): Esta proteína multifuncional cataliza la formación, la rotura y reordenación de los enlaces disulfuro entre cisteínas dentro de una proteína mientras esta se está plegando. Esto permite que la proteína se pliegue correctamente. En la superficie celular, parece actuar como una reductasa que escinde los puentes disulfuro de las proteínas ancladas a la célula. De este modo, puede causar modificaciones estructurales de las proteínas externas. Mientras que a elevadas concentraciones funciona como una chaperona, inhibiendo la agregación de las proteínas mal plegadas, a bajas concentraciones facilita dicha agregación (actividad anti-chaperona).

Procesamiento y Degradación de proteínas

Durante el crecimiento tumoral se observan profundas alteraciones en el patrón de síntesis proteico. La proteólisis intracelular lleva a cabo una importante función, ya que muchos aspectos de la fisiología y del desarrollo celular están controlados por la degradación de proteínas específicas. Las proteínas están sometidas a un recambio continuo, que es el resultado del balance entre las tasas de síntesis y degradación proteica. La regulación de la proteólisis juega un papel muy importante en la homeostasis energética así como en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas.

El siguiente grupo de proteínas desreguladas (8 de 42 proteínas identificadas totales; 19,0% del total) fue el correspondiente al procesamiento de proteínas, el cual se vio afectado

Resultados

entre un rango de +2,0 y +1,8. La sobreexpresión de NOS3 afectó a la expresión de 3 de ellas de manera positiva. Esto supone el 12,5% del total de proteínas desreguladas identificadas en la línea 4TO-NOS cuando se comparó con la línea celular control 4TO en condiciones basales.

Dentro de este apartado, el otro grupo de proteínas desreguladas fue el correspondiente al relacionado con la degradación de proteínas (6 proteínas de 42 totales; 14,3% del total). La sobreexpresión de NOS3 afectó a 3 de las proteínas incluidas en este grupo en un rango que osciló entre +3,7 y -2,1, e incluyó a la catepsina D. Esto supone el 12,5% del total de proteínas desreguladas identificadas en la línea 4TO-NOS cuando se comparó con la línea celular control 4TO en condiciones basales. Respecto a la catepsina D, hay que destacar que, si bien fue identificada en dos manchas de gel independientes como una proteína sobreexpresada (+2,3 y +1,9), también lo fue en una única mancha exclusivamente identificada en la línea celular 4TO-NOS.

A continuación, se enuncian las funciones biológicas de las proteínas identificadas:

- *Proteína de choque térmico de 60 kDa, mitocondrial* (P10809): Esta chaperona está implicada en el importe de proteínas mitocondriales y el ensamblaje macromolecular. Puede evitar el mal plegamiento y promover el replegamiento y el ensamblaje correcto de polipéptidos bajo condiciones de estrés en la matriz mitocondrial.
- *Proteína de 78 kDa regulada por glucosa* (P11021): Probablemente, juega un papel en la facilitación del ensamblaje de complejos de proteínas multiméricas dentro del RE, así como en la degradación de las proteínas mal plegadas.
- *Proteína de choque térmico beta-1 (Hsp27)* (P04792): Esta proteína es una chaperona que pertenece a un grupo cuyas principales funciones son la termotolerancia, la inhibición de la apoptosis, y el desarrollo y la diferenciación celular.
- *Proteína DJ-1* (Q99497): Proteína implicada en la desglucosilación de metilglioxal-aminoácidos y glioxal-glicosilados-aminoácidos, liberando las proteínas desglucosiladas junto con lactato o glicolato, respectivamente. La desglucosilación de cisteínas, argininas y lisinas se relaciona con la reactivación de las proteínas. Juega un papel importante en la protección de las células contra el estrés oxidativo y la muerte celular actuando como chaperona y proteasa sensible a redox.
- *GrpE proteína homóloga 1, mitochondrial* (Q9HAV7): Componente esencial del complejo PAM, requerido para la translocación de proteínas que contienen péptidos de

tránsito desde la membrana interna a la matriz mitocondrial de manera dependiente de ATP.

- *Proteína de estrés-70, mitocondrial* (P38646): Proteína que pertenece a la familia de la proteína de choque térmico 70. Está implicada en el control de la proliferación celular y el envejecimiento celular. También puede actuar como una chaperona.

- *Factor I de ensamblaje del complejo F1 de la ATP sintasa mitocondrial* (H0YD21): Esta proteína se une de manera específica a la subunidad beta F1 y desempeña un papel esencial en el ensamblaje del complejo F1 mitocondrial.

- *Calreticulina* (P27797): Chaperona multifuncional de unión al calcio que promueve el plegado, ensamblaje y control de calidad de proteínas en el RE, a través del ciclo de calreticulina/calnexina. Participa en la producción de complejos mayores de histocompatibilidad de clase I, e interviene en la regulación de la expresión génica.

- *Aminopeptidasa citosólica* (P28838): Enzima proteolítica que cataliza la eliminación del residuo N-terminal de los oligopéptidos, dando lugar a péptidos más pequeños y aminoácidos libres. Así pues, participa en el procesamiento y recambio regular de las proteínas intracelulares.

- *Aminoacilasa-1* (Q03154): Enzima citosólica que participa en la hidrólisis de los aminoácidos N-acilados o N-acetilados (excepto L-aspartato).

- *Serina proteasa HTRA2 mitochondrial* (O43464): Esta proteasa mitocondrial puede ser liberada al citosol e inducir la muerte celular a través del reclutamiento de las IAPs y el incremento de la actividad caspasa. Además, promueve la degradación del represor transcripcional de unión al ADN THAP5 durante la apoptosis.

- *Proteína 2 mitocondrial con dominio isocorismatasa* (Q96AB3): Pertenece a una familia de enzimas hidrolasas. También conocida como 2,3 dihidro-2,3 dihidroxibenzoato sintasa, cataliza la conversión de isocorismato a 2,3-dihidroxibenzoato y piruvato, en presencia de agua.

- *Catepsina B* (P07858): Cistein-proteasa lisosomal que participa en la degradación de proteínas intracelulares. Ha sido implicada en diversos procesos patológicos como la inflamación, la producción de péptidos pro-necróticos y pro-apoptóticos, la muerte celular y la progresión tumoral.

Resultados

- *Catepsina D* (P07339): Aspartil-proteasa lisosomal que participa en la degradación de proteínas intracelulares. En hepatocitos, ha sido involucrada en la degradación de la insulina endosomal a pH ácido. Asimismo, podría participar en la progresión tumoral.

Procesamiento de ARN

La activación de los procesos oncogénicos viene asociada a la alteración del proceso de división celular, el cual se encuentra estrictamente regulado en el tejido normal. Las células normales dejan de dividirse cuando entran en contacto con células similares, a través de un mecanismo conocido como inhibición por contacto. Dicho mecanismo se pierde en las células cancerosas. En estas, se desequilibra el sistema de autorregulación que controla y limita la división celular. El proceso de división celular, ya sea en células normales o cancerosas, se realiza a través del ciclo celular.

Dentro del grupo de proteínas relacionadas con el procesamiento del ARN, se identificaron 5 de un total de 42 (11,9% del total). Entre ellas, 2 fueron identificadas como proteínas con expresión reprimida e inducida, respectivamente, como consecuencia de la sobreexpresión de NOS3, en un rango que osciló entre -1,6 y +2,6. Esto supone 8,3% del total de proteínas desreguladas identificadas en la línea 4TO-NOS cuando se comparó con la línea celular control 4TO en condiciones basales.

A continuación, se enuncian las funciones biológicas de las proteínas identificadas:

- *Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas L (hnRNPL)* (P14866), *hnRNPH* (P31943) y *hnRNPK* (P61978): Junto con otras hnRNPs, se asocian con ARNs heterogéneos nucleares (incluyendo precursores de ARNm y ARNm maduros) formando complejos que participan en el procesamiento del pre-ARNm y otros aspectos del metabolismo, transporte y funcionalidad de los ARNm. La hnRNPK puede jugar un papel importante en la vía de señalización de p53 en respuesta al daño al ADN, actuando a nivel tanto de activación como de represión de la transcripción. Las hnRNPs han sido localizadas tanto en núcleo como en citoplasma.

- *Proteína mitochondrial S22* (P82650): Componente estructural de la subunidad pequeña ribosomal 28S, la cual comprende al ARNr 12S más unas 30 proteínas distintas. Participa en el proceso de síntesis de proteínas mitocondriales.

Citoesqueleto

El citoesqueleto es una red tridimensional de filamentos que constituye el andamio estructural de la célula y juega un papel esencial en los fenómenos de transporte intracelular, posicionamiento de orgánulos, movimiento, señalización y división celular (Kollman, Greenberg et al. 2015). La regulación de la red de microtúbulos resulta esencial para el funcionamiento normal de la célula y su supervivencia. En determinadas patologías, como puede ser el caso de algunos tipos de cáncer se producen anomalías de la red de microtúbulos.

El grupo de proteínas más pequeño de los clasificados es el correspondiente al del citoesqueleto celular (2 proteínas identificadas; 4,8% del total). Sin embargo, ninguna de esas proteínas fueron identificadas como consecuencia de la sobreexpresión de NOS3.

A continuación, se enunciaron las funciones biológicas de las proteínas identificadas según las diferentes bases de datos:

- *Gamma-actina o Actina citoplásmica 2 (P63261)*: Las actinas son proteínas altamente conservadas que están implicadas en diversos tipos de la motilidad celular y que se expresan de forma ubicua en todas las células eucariotas.
- *Factor 1 de entrecruzamiento microtúbulos-actina, isoformas 1/2/3/5 (F5GZL7)*: Esta proteína participa en la formación de puentes entre diferentes elementos del citoesqueleto y facilita las interacciones actina-microtúbulos en la periferia celular. Entre las funciones en las que participa, destacan las siguientes: 1) Regulador positivo de la vía de señalización del receptor Wnt; 2) Translocación de Axin-1 y su complejo asociado desde el citoplasma a la membrana celular; 3) Actividad ATPasa regulada por actina, esencial para el control del ensamblado y dinámica de las uniones focales; 4) Regulador del suministro de vesículas de transporte que contienen proteínas vinculadas a GPI desde la red trans-Golgi; 5) Migración celular.

5.8. La expresión de Catepsina D está asociada con la muerte celular

La CATD es una proteasa ácida activa en la degradación de proteínas intracelulares. Debido a la relación que guarda con la muerte celular y el cáncer, y al hecho de que fue identificada como una proteína sobreexpresada en tres diferentes manchas (Figura 56) durante el análisis del perfil proteómico de la línea celular 4TO-NOS, a continuación decidimos investigar el papel que CATD juega durante la sobreexpresión de NOS3. La

Resultados

determinación de la actividad CATD y la valoración de la muerte celular fue realizada en lisados celulares siguiendo los protocolos descritos en material y métodos (apartado 4.8.4).

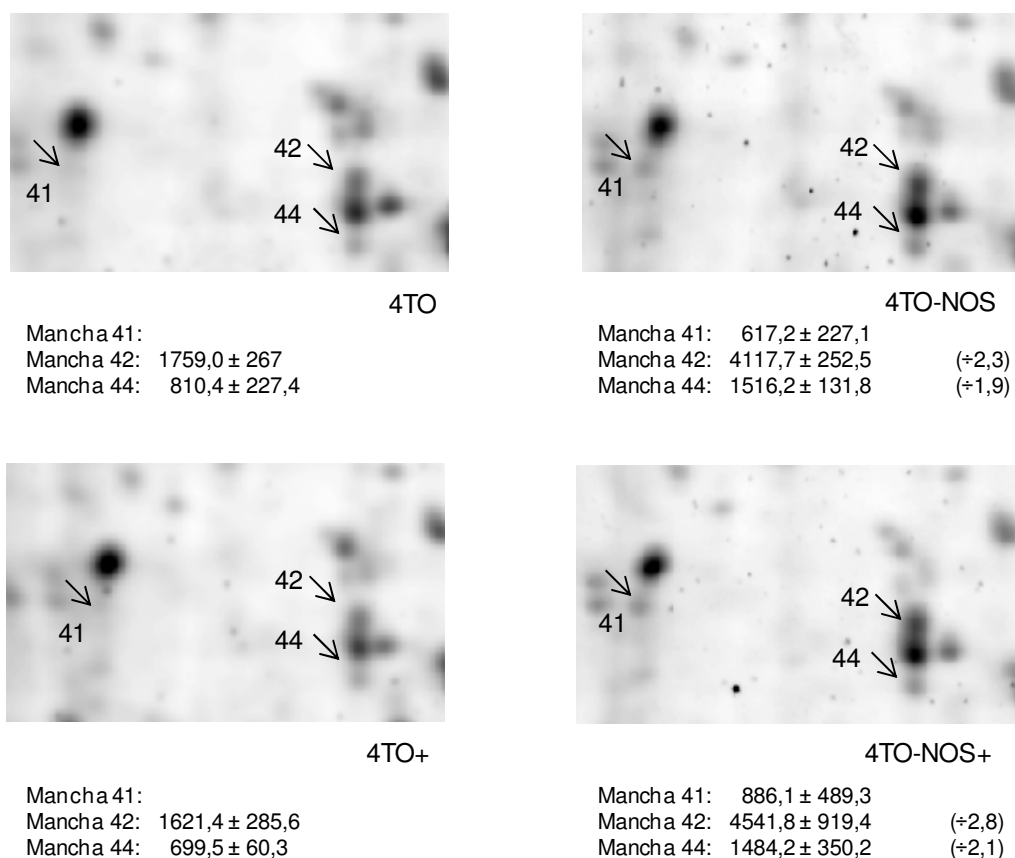


Figura 56. Expresión de catepsina D en la línea celular 4TO-NOS. Detalle de las manchas de proteína identificadas como CATD. Comparación entre las líneas celulares 4TO y 4TO-NOS en ausencia y presencia (+) de anti-Fas. Entre paréntesis se indica el n° de veces que incrementa la intensidad de la mancha en la línea celular 4TO-NOS respecto a la línea control. Se expresa la intensidad media ± SEM (n=3).

Como se muestra en la figura 57A, la sobreexpresión de CATD en 4TO-NOS coincidió con el aumento de su actividad enzimática (176%, $p=0,020$). Es decir, la proteasa, cuya expresión había sido inducida por sobreexpresión de NOS3, era funcional. Con objeto de dilucidar si la expresión de CATD afectaba a la supervivencia celular a través del incremento de su expresión y, por tanto, de su actividad, ensayamos distintas dosis del inhibidor pepstatina A (PA). PA es un hexapéptido formado por la secuencia isovaleril-valina-valina-estatina-alanina-estatina, que fue originalmente aislado a partir de diferentes especies de Actinobacterias y que actúa como un potente inhibidor altamente selectivo de aspartil proteasas tales como pepsina y catepsina D y E. La figura 57B muestra

que la concentración de 20 μ M PA fue suficiente para reducir la actividad CATD en la línea 4TO-NOS. Este nivel de actividad era muy inferior al registrado para la línea celular control 4TO en condiciones basales. Sin embargo, la inhibición de la actividad CATD con 20 μ M PA no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento celular (Figura 57C). Es más, su inhibición se asoció con el aumento de la actividad caspasa-3 (1,23 veces, $p=0,050$) y caspasa-9 (1,22 veces, $p=0,037$) en la línea celular 4TO-NOS (Figura 57D y 57E). Cuando la concentración de PA se incrementó hasta 50 μ M, la línea celular con sobreexpresión de NOS3 aumentó de manera significativa el tiempo de duplicación celular (66,2 vs 47,5, $p=0,021$) (Figura 57F) y la actividad caspasa-3 (1,73 veces, $p=0,047$) (Figura 57G). Esto coincidió con la inhibición total de la actividad CATD (Figura 57A).

La adición de anti-Fas al medio de cultivo celular no afectó a la actividad CATD en las líneas celulares 4TO ni 4TO-NOS (Figura 57A). Por el contrario, la administración simultánea de anti-Fas y 20 μ M PA resultó en un aumento de la actividad caspasa-3 ($p=0,050$) en la línea celular 4TO-NOS cuando fue comparada con la condición de anti-Fas (Figura 57D).

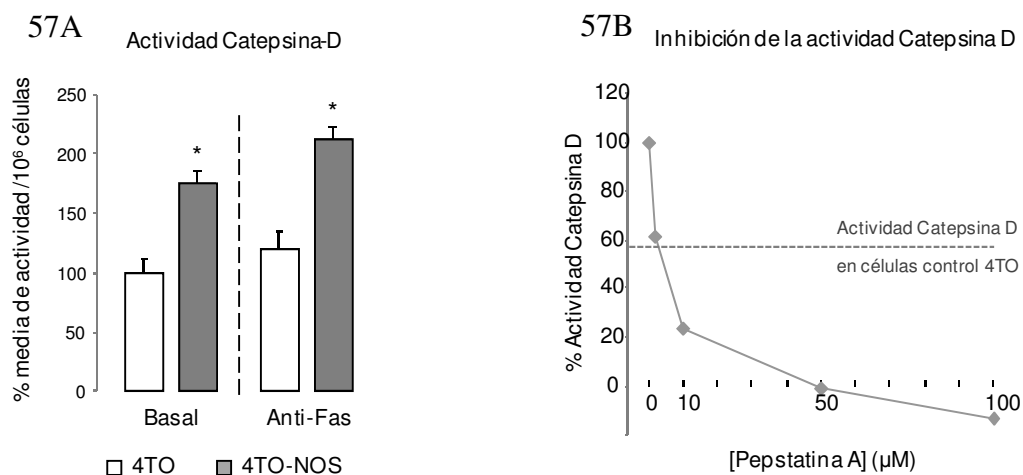


Figura 57. Actividad catepsina D y muerte celular. (A) Actividad catepsina D (CATD) en lisados celulares ($n=4$). (B) Curva de inhibición de la actividad CATD mediante pepstatina A (PA). La actividad normal de CATD en las células control 4TO se señala con una línea discontinua. Los datos muestran la media \pm SEM. (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre las dos líneas celulares para una misma condición; (#) indica diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Anti-Fas o PA vs. Basal; +PA vs. Anti-Fas) en la misma línea celular.

Resultados

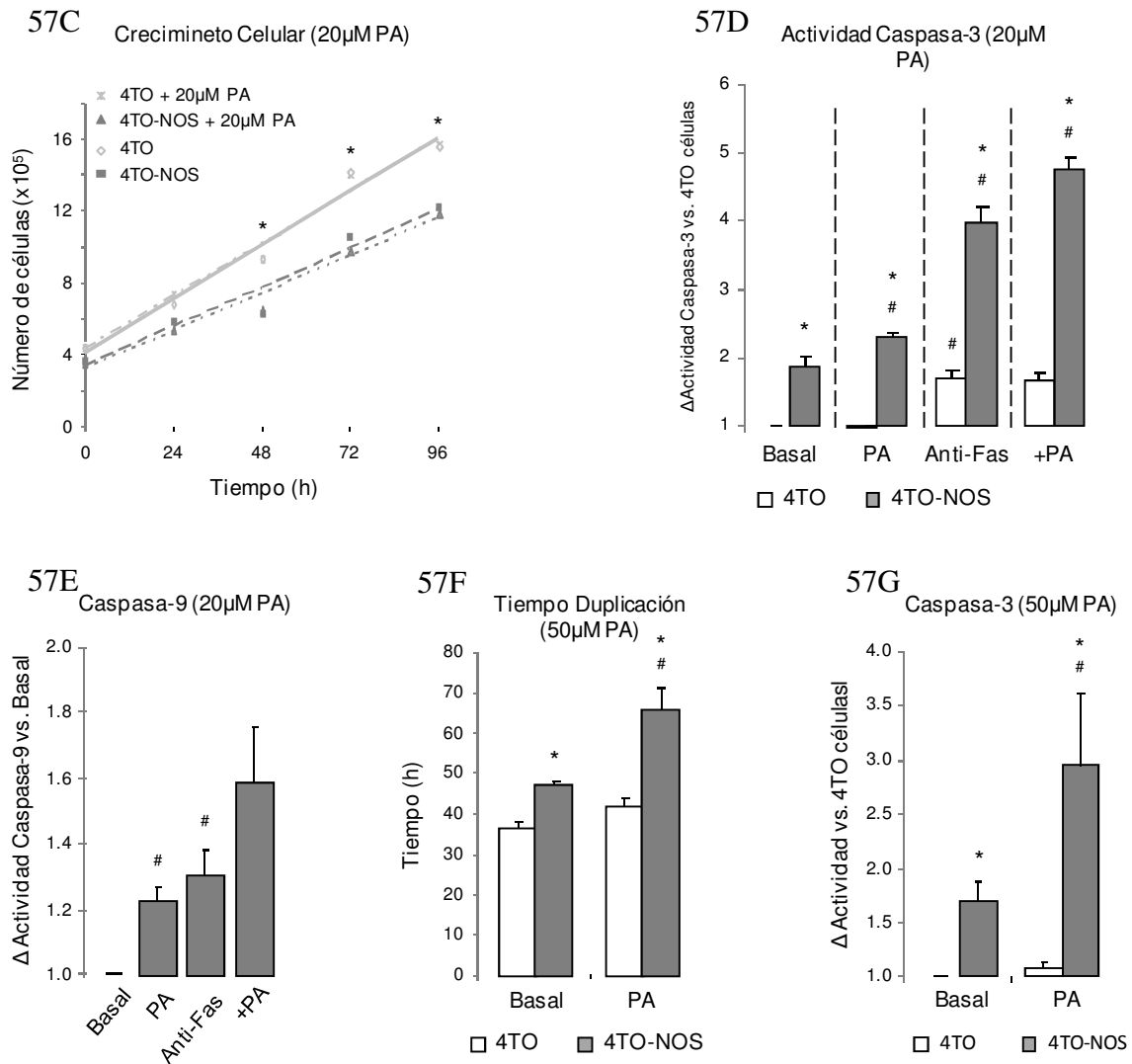


Figura 57. Actividad catépsina D y muerte celular. Efecto de la adición de 20 μ M PA sobre (C) el crecimiento celular (n=3), (D) la actividad caspasa-3 (n=3) y (E) la actividad caspasa-9 (n=3). Efecto de la adición de 50 μ M PA sobre (F) el crecimiento celular (n=4) y (G) la actividad caspasa-3 (n=5). +PA, indica tratamiento con PA más anti-Fas. Los datos muestran la media \pm SEM. Se indican las diferencias estadísticamente significativas entre las dos líneas celulares para una misma condición (*) y entre tratamientos (Anti-Fas o PA vs. Basal; +PA vs. Anti-Fas) en la misma línea celular (#).

6. DISCUSIÓN

El CHC representa más del 90% de los tumores hepáticos primarios, los cuales ocupan el sexto lugar entre los tipos de cáncer más prevalentes en el mundo y suponen la tercera causa de mortalidad relacionada con el cáncer (2012). La incidencia del CHC en España alcanza los 5 a 10 nuevos casos por cada 100.000 habitantes al año (nivel intermedio) y es actualmente la primera causa de muerte del paciente cirrótico. A pesar de los nuevos tratamientos antivirales, la infección por el virus C de la hepatitis (VHC) sigue constituyendo actualmente el principal factor de riesgo en Occidente. Así, la alta incidencia de infección por VHC entre los años 1960 y 1990 hace prever un aumento de la incidencia del CHC en los próximos años, sobre todo si tenemos en cuenta el periodo de 20 a 30 años que transcurre entre la infección por virus y el desarrollo de cirrosis y cáncer (Bilbao Aguirre I 2010). Además, debido a su relación probada con la diabetes y obesidad (ambos parámetros en creciente prevalencia mundial), se espera un incremento importante en la incidencia del CHC en los próximos años.

En lo que respecta al tratamiento del CHC, es necesaria una selección precisa de los pacientes para la elección de la mejor opción terapéutica. La clasificación del CHC más extendida es la "*Barcelona-Clínic Liver Cancer*" (BCLC), que es adoptada por la mayoría de las sociedades científicas (EASLD, AASLD, APASL) y posee valor pronóstico y terapéutico validado en la mayoría de centros (Llovet, Di Bisceglie et al. 2008). La BCLC combina el tamaño tumoral, la función hepática y el estado general del paciente, a la vez que relaciona el estadio tumoral con el tratamiento y pronóstico, clasificando a los enfermos con CHC en 5 estadios: 0 (muy inicial), A (inicial), B (intermedio), C (avanzado) y D (terminal) (2012). Así, dependiendo del estadio tumoral, se opta por tratamientos curativos, paliativos o sintomáticos. En la mayoría de los casos, sólo la cirugía de resección y de trasplante hepático, junto con la ablación percutánea de tumores pequeños, menores a 2cm, son terapias capaces de curar el CHC. Desgraciadamente, la resección hepática y la ablación percutánea son solamente posibles en un 10-15% de los pacientes, dado que el desarrollo del CHC es asintomático en sus primeras etapas (cuando los tratamientos curativos pueden ser efectivos) y su diagnóstico se suele realizar en estadios avanzados de la enfermedad (Abou-Alfa 2006; Bruix, Reig et al. 2016).

Los tests de vigilancia para la detección del CHC incluyen el examen serológico y la exploración mediante imagen. En los últimos años, gracias a la extensión del cribado mediante la realización de ecografía semestral en los pacientes cirróticos, el diagnóstico del CHC en estadios tempranos subsidiarios de un tratamiento curativo se sitúa entre el 40

Discusión

y 60 % de los casos (Bruix, Reig et al. 2016). Así pues, es importante el esfuerzo dedicado a la identificación de nuevos marcadores de diagnóstico temprano de la enfermedad y de proteínas asociadas de forma específica con el tumor y su estadio, de forma que puedan utilizarse no solo como herramientas de vigilancia, sino como dianas terapéuticas para combatir la enfermedad (Nissom, Lo et al. 2006).

El ON ejerce una amplia variedad de funciones biológicas, las cuales van desde la señalización fisiológica y el mantenimiento de la homeostasis celular hasta la participación como molécula efectora del sistema inmunológico. Dependiendo de factores tales como su concentración y restricción temporal, el ON y sus ERNs asociadas pueden relacionarse con un efecto beneficioso o perjudicial, a través de la interacción con diferentes dianas celulares. Así, conforme aumenta su concentración, el ON puede estimular diferentes vías de señalización a través de la interacción con diferentes moléculas, pasando de una situación de regulación fisiológica normal (relacionada con la regulación de la guanilato ciclasa y asociada a concentraciones nanomolares de ON) a una situación de estrés celular (Thomas, Heinecke et al. 2015). En las células de mamíferos, el ON puede ser generado a partir de las tres isoformas conocidas de la enzima NOS. Mientras que la expresión de NOS1 y NOS3 se considera constitutiva y se asocia a una baja producción de ON, relacionada con el mantenimiento de la homeostasis normal de la célula, la expresión de NOS2 es inducible bajo determinadas circunstancias y ha sido asociada a la producción sostenida de ON en el rango micromolar y la generación de estrés celular.

Respecto al papel que juega en la apoptosis, cabe destacar que, a través del mismo mecanismo de señalización, el ON puede actuar como pro- o anti-apoptótico dependiendo también de su concentración y tiempo de exposición. En enfermedades crónicas en las que existe un persistente proceso de reparación de heridas, como pueden ser las enfermedades hepáticas, el ON puede actuar como prooncogénico favoreciendo la fibrosis hepática, la cirrosis y el CHC. En lo que respecta a la isoforma NOS3, nuestro grupo de investigación ha demostrado que su sobreexpresión en la línea de CHC humano HepG2 reduce la supervivencia celular e induce la apoptosis a través del incremento del estrés nitro-oxidativo celular (Aguilar-Melero, Ferrin et al. 2012) y de la expresión de la oncoproteína p53 y el receptor de muerte FasR (Gonzalez, Ferrin et al. 2013). En el presente proyecto de tesis doctoral hemos investigado los mecanismos moleculares implicados en la muerte celular promovida por la sobreexpresión de NOS3 en la línea HepG2, relacionando dichas observaciones con la susceptibilidad celular a la muerte inducida por anti-Fas.

Teniendo en cuenta que la NOS3 ha sido identificada por algunos investigadores como una isoforma asociada a la mitocondria (Gao, Chen et al. 2004), la capacidad del ON para regular el sistema de fosforilación oxidativa a través de la inhibición de los complejos respiratorios CIV y CI (Moncada 2015; Tengan and Moraes 2017), y el papel que dicho orgánulo desempeña en el proceso apoptótico (Birkinshaw and Czabotar 2017), en primer lugar analizamos la localización mitocondrial de NOS3 en la línea celular 4TO-NOS. El estudio de microscopía confocal confirmó la presencia de la NOS en la membrana plasmática y el citoplasma celular, en regiones no coincidentes con estructuras mitocondriales. Nuestros resultados concuerdan con estudios previos donde NOS3 se localiza asociada al aparato de Golgi y en zonas de contacto célula-célula de cultivos celulares con elevada confluencia (Govers, van der Sluijs et al. 2002). No obstante, la digestión enzimática de la fracción mitocondrial purificada mediante ultracentrifugación demostró que NOS3 colocaliza con proteínas de la membrana externa mitocondrial. Así, el tratamiento de mitocondrias intactas con las proteasas tripsina y proteinasa-K eliminó a la NOS3 y a la proteína TOM40 de membrana mitocondrial externa, sin afectar a la subunidad MTCO2 del complejo respiratorio CIV, el cual se encuentra embebido en la membrana mitocondrial interna donde las proteasas no tienen acceso. Por tanto, nuestros resultados sugieren que NOS3 se localiza, entre otros, en la membrana externa mitocondrial. Este hecho coincidió con un incremento del nivel de nitración en tirosina detectado en la fracción mitocondrial de la línea celular con sobreexpresión de NOS3, lo cual concuerda con resultados previos del grupo (Aguilar-Melero, Ferrin et al. 2012).

A continuación, analizamos el efecto de la sobreexpresión de NOS3 sobre la CTE. Además de la demostrada localización mitocondrial de NOS3, se sabe que el ON es capaz de difundir a través de las membranas celulares hasta alcanzar sus dianas. Inesperadamente, y pese a la ya mencionada capacidad del ON para inhibir la CTE, la sobreexpresión de NOS3 no tuvo ningún efecto relevante en la respiración celular. A pesar de esto, las células 4TO-NOS presentaron una tasa significativamente elevada de estrés oxidativo, que se vio acompañado por una regulación positiva del sistema antioxidante celular y un incremento del número de copias de ADNmt respecto a la línea celular control. En este sentido, estudios previos han demostrado que la biogénesis del ADNmt puede ser regulada por estrés oxidativo bajo diferentes condiciones (Lee and Wei 2005), siendo el ON capaz de promover la biogénesis mitocondrial en células en cultivo (Nisoli, Clementi et al. 2003). El aumento del número de copias de ADNmt estuvo acompañado de

Discusión

una mayor expresión de la proteína estructural del CIV MTCO₂, la cual se encuentra codificada en el ADNmt. Considerando que el CIV es el blanco más sensible de la CTE para el ON, pudiera ser que la sobreexpresión de la proteína MTCO₂ fuese un intento de las células 4TO-NOS para adaptarse a las condiciones de sobreproducción de ON. De este modo, las células 4TO-NOS podrían estar “ocultando” o compensando un efecto inhibitorio del ON sobre la CTE.

El L-NG-NitroArginine Methyl Ester, más conocido como L-NAME, es un análogo de la arginina (sustrato de la reacción catalizada por la NOS para la síntesis de ON) que se utiliza como precursor del L-NNA, un inhibidor inespecífico de la actividad NOS. El uso de L-NAME en nuestro sistema de estudio permitió atribuir a la sobreexpresión de NOS3 (es decir, a la sobreproducción de ON derivado de NOS3) las observaciones previas relativas a la acumulación de los productos finales del ON en el medio de cultivo y el contenido de proteínas mitocondriales nitradas. Sin embargo, la adición de L-NAME no logró reducir el estrés oxidativo inducido por la sobreexpresión de NOS3. Al estudiar el efecto que este inhibidor pudiera tener sobre la CTE, observamos que L-NAME incrementaba la actividad asociada a los complejos mitocondriales CI+CIII+CIV y CII+CIII+CIV. Este efecto soportaría el papel inhibitorio del ON sobre la CTE (Riobo, Clementi et al. 2001). Además, debido a que la mayor actividad de la CTE se encuentra estrechamente ligada a la producción de EROs (Murphy 2009), resulta lógico que el uso de L-NAME se mostrara incapaz de reducir el estrés oxidativo en la línea celular 4TO-NOS. Sin embargo, L-NAME causó un efecto similar en ambas líneas celulares 4TO y 4TO-NOS, sugiriendo que la sobreexpresión de NOS-3 no tiene un papel relevante en la respiración mitocondrial. Este resultado fue confirmado cuando medimos la respiración celular en células intactas, no permeabilizadas. Por lo tanto, a pesar del efecto inhibitorio de ON en la respiración, la inducción de apoptosis por sobreexpresión de NOS3 parecía no producirse a través de la disfunción del sistema OXPHOS.

La proteína p53 es un factor de transcripción que desempeña un papel importante en la apoptosis y el control del ciclo celular, manteniendo la estabilidad genética y celular. La actividad de esta proteína supresora de tumores resulta esencial para inducir la respuesta de la célula frente a prácticamente cualquier señal de estrés, como el estrés oxidativo o el daño al ADN (Han, Muller et al. 2008). Así, cuando se produce su activación (fosforilación), se suceden una serie de eventos que conducen a la detención del ciclo celular y, en caso necesario, la apoptosis. Por tanto, no resulta extraño que el gen p53

se encuentre mutado en aproximadamente el 50 % de todos los tumores humanos. Pese a ello, la línea HepG2 expresa una versión "wild-type", no mutada, de la proteína. En cuanto al papel del ON en relación a p53, es sabido que altas dosis de ON pueden activar y estabilizar a p53, siendo este uno de los mecanismos a través de los cuales el ON participa en la regulación del ciclo celular. En este sentido, nuestro grupo ha demostrado que la sobreexpresión estable de NOS3 se asocia con un incremento significativo de la expresión de p53 en la línea HepG2 (Gonzalez, Ferrin et al. 2013). En el presente trabajo, la sobreexpresión de NOS3 se asoció con la regulación positiva de los genes proapoptóticos BAX, BIK y APAF-1, el aumento del potencial de membrana mitocondrial, la liberación de cit c al citoplasma celular y el incremento de la actividad caspasa-9 y caspasa-3. Estos resultados confirman observaciones previas en las que la actividad de p53 se relaciona con la regulación de la expresión de varios genes apoptóticos (Haupt, Berger et al. 2003) y aportan un mecanismo a través del cual podríamos explicar la inducción de apoptosis en la línea celular 4TO-NOS en condiciones basales.

Al analizar el efecto de anti-Fas en la línea celular 4TO-NOS (la cual se caracterizaba por expresar altos niveles del receptor de muerte FasR), observamos que su administración coincidía con una menor localización de NOS3 en la fracción mitocondrial, la disminución del contenido de proteínas mitocondriales nitradas y una reducción no significativa de la capacidad respiratoria y del consumo de oxígeno dependiente del CI. Como esperábamos, las células que sobreexpresan NOS3 mostraron una mayor sensibilidad a anti-Fas, a través del incremento de la actividad caspasa-9 y caspasa-3. Por el contrario, la inducción de apoptosis por anti-Fas en la línea celular control 4TO solamente se relacionó con el aumento de la actividad caspasa-3. Por tanto, podemos decir que, mientras que en la línea 4TO anti-Fas indujo apoptosis a través de la vía extrínseca, en la línea celular 4TO-NOS se observó la activación adicional de la vía mitocondrial. Además, dicha activación fue mayor que la inducida por la sobreexpresión de NOS3 exclusivamente.

Con el fin de identificar intermediarios involucrados en la generación de estrés oxidativo y en el proceso de muerte celular en la línea 4TO-NOS, se analizó su perfil proteómico y se comparó con el de la línea celular control 4TO. De esta manera, se identificaron proteínas con diferentes funciones biológicas cuya expresión diferencial ha sido previamente relacionada con la reducción del crecimiento celular. En cuanto al grupo de proteínas metabólicas, el cual incluye el mayor número de proteínas identificadas, nos

Discusión

resultó particularmente interesante la sobreexpresión de GAPDH en la línea 4TO-NOS (incremento de 2,3 veces). Esta enzima cataliza uno de los pasos más importantes de la glucólisis y su actividad puede ser regulada por nitrosilación. De hecho, la nitrosilación es una modificación postraduccional a través de la cual el ON puede regular de forma reversible procesos metabólicos tales como la glucólisis (Zaffagnini, Morisse et al. 2013) o la β -oxidación (Doulias, Tenopoulou et al. 2013). En particular, la hiperactivación de la GAPDH es considerada una adaptación a favor de la respuesta de supervivencia en condiciones pro-oxidantes (Cerella, D'Alessio et al. 2009). Por el contrario, la GAPDH nitrosilada puede ser transferida al núcleo y activar a p53, iniciando el proceso de muerte celular (Sen, Hara et al. 2008). En este sentido, y como hemos apuntado anteriormente, la sobreexpresión de NOS3 aumenta el perfil de proteínas S-nitrosiladas (Aguilar-Melero, Ferrin et al. 2012), induce la expresión de p53 (Gonzalez, Ferrin et al. 2013) y reduce la supervivencia de la línea celular HepG2. A pesar de ello, en este trabajo no hemos estudiado las modificaciones post-traduccionales de las proteínas identificadas. De manera similar a lo observado durante la sobreexpresión de NOS3, la inducción de muerte celular mediante la adición de anti-Fas al medio de cultivo celular indujo la expresión de GAPDH en la línea celular control, reduciéndose así la diferencia observada entre las líneas celulares 4TO y 4TO-NOS, en condiciones basales. Por lo tanto, se requiere una investigación adicional para determinar si el 'spot' identificado como GAPDH en el análisis proteómico corresponde a la forma nitrosilada de la enzima, la cual pudiera estar participando en el proceso de muerte celular asociado a la sobreexpresión de NOS3 y a la vía Fas/FasL.

En el segundo grupo más numeroso identificado en el análisis proteómico, es decir, aquel relacionado con el mantenimiento de la homeostasis redox, encontramos sobreexpresión de proteínas implicadas en el sistema antioxidante celular, como TXN, PRDX2, PRDX3 ó SOD2. Este resultado coincide con el perfil de expresión génica de la línea 4TO-NOS, el cual incluye a los genes SOD1, SOD2, CAT, GPX1, GPX4 y GSS, y concuerda con el sistema establecido de sobrerregulación de enzimas antioxidantes a través de la activación de las vías de señalización sensibles a EROs. En el caso de las peroxirredoxinas (PRDX), cabe señalar que, además de participar en la atenuación de EROs, ERNs y del propio ON (Reinartz, Ding et al. 2008; Sun, Kim et al. 2010), pueden ser reguladas por nitrosilación (Fang, Nakamura et al. 2007). Mención aparte merece la proteína NADPH:adrenodoxina oxidoreductasa mitocondrial (adrenodoxina reductasa o

AR), cuya expresión también se encontraba incrementada en la línea celular 4TO-NOS. Esta enzima participa en el primer paso de transferencia electrónica del sistema P450 mitocondrial a través de la oxidación del NADPH, pudiendo funcionar como una NADPH oxidasa fútil al oxidar NADPH en ausencia de sustrato. Este proceso se encuentra asociado a la generación de EROs (Hanukoglu 2006). Íntimamente relacionado con nuestro modelo de sobreexpresión de NOS3, se ha observado que AR participa en la producción de estrés oxidativo durante la inducción de apoptosis mediada por p53 (Hwang, Bunz et al. 2001). Así, el aumento de la expresión de AR inducido por la sobreexpresión de NOS3 coincidió con la producción de EROs, la acumulación de p53 (Gonzalez, Ferrin et al. 2013) y la inducción de apoptosis a través de la expresión de genes pro-apoptóticos regulados por p53. De acuerdo con el estado oxidativo de ambas líneas celulares, la administración de anti-Fas no cambió el perfil de expresión de AR en 4TO ni en 4TO-NOS.

Entre las proteínas expresadas diferencialmente entre ambas líneas celulares, llamó poderosamente la atención una aspartil-proteasa lisosomal: la catepsina D (CATD). El motivo de ello fue que, además de ser identificada en dos manchas o “spots” como una proteína sobreexpresada en 4TO-NOS (manchas nº42 y nº44), CATD fue identificada en una tercera mancha adicional (nº41) solamente expresada en esta línea celular. La CATD se sintetiza en el retículo endoplasmático rugoso como pre-proCATD, la cual es transformada en proCATD (52kDa) tras ser removido el péptido señal que posee durante su transporte hacia el aparato de Golgi. En este camino, la proCATD es glicosilada y dirigida hacia compartimentos vesiculares intracelulares (lisosomas, endosomas), cuyo pH interno ácido propicia la pérdida de su secuencia N-terminal, transformándose en un intermediario enzimáticamente activo de 48kDa. Este intermediario es capaz de sufrir cierto procesamiento proteolítico adicional, dando lugar a la CATD madura, la cual está compuesta de las cadenas pesada (34kDa) y ligera (14kDa) unidas por interacciones no-covalentes (Benes, Vetvicka et al. 2008; Pranjol, Gutowski et al. 2015). Pese a que en condiciones fisiológicas normales, y a diferencia de otros miembros de la familia, proCATD se localiza dentro de la célula, en los lisosomas, bajo determinadas condiciones patológicas (incluyendo el cáncer) proCATD/CATD puede ser secretada al exterior celular. Tradicionalmente, se ha pensado que la actividad CATD está relacionada con la degradación inespecífica de proteínas en el medio fuertemente ácido de los lisosomas. Sin embargo, actualmente se conoce que su actividad no está restringida a este medio y que, de acuerdo a su habilidad para procesar proteínas funcionales y estructurales, CATD participa

Discusión

en diversos procesos biológicos y vías de señalización celulares, incluyendo la degradación metabólica de proteínas intracelulares, la activación de factores de crecimiento, hormonas y precursores enzimáticos, el procesamiento de antígenos y de inhibidores/activadores enzimáticos o la regulación de la apoptosis (Benes, Vetvicka et al. 2008; Dubey and Luqman 2017). Así, tras la inducción de apoptosis, la permeabilización selectiva de la membrana lisosomal puede causar la liberación de CATD al citosol, provocando disfunción mitocondrial de forma directa (Zhao, Antunes et al. 2003) o indirecta, a través de su interacción con miembros de la familia de BCL-2 (BID, BAX) (Zhao, Antunes et al. 2003; Heinrich, Neumeyer et al. 2004). Alternativamente, CATD puede inducir apoptosis independiente de la actividad caspasa, mediante la liberación del factor AIF mitocondrial (Bidere, Lorenzo et al. 2003). En relación al cáncer, parece ser que la secreción de proCATD por las células tumorales estimula las propiedades pro-invasivas y pro-metastásicas tanto de las propias células tumorales como de las células del estroma.

De acuerdo con el patrón de expresión en el gel 2D, las manchas n°41 y n°42 serían las que, por tamaño (movilidad relativa igual a 35,4kDa y 34,8kDa, respectivamente), podrían corresponderse a la cadena pesada de la CATD. Debido a su diferente pI, la separación entre ambas manchas en el gel podría ser consecuencia de una modificación química de la proteína. De hecho, la modificación post-traducciona de CATD ha sido implicada en la remodelación tisular que ocurre después de la lactancia (Zaragoza, Torres et al. 2009). Como hemos destacado anteriormente, la mancha n°41 únicamente fue detectada en la línea celular 4TO-NOS. Por otro lado, y en relación a la existencia de diferentes formas de CATD dentro de la célula de manera simultánea, encontramos la mancha n°44 (movilidad relativa de 32,3kDa), cuyo peso molecular no parece corresponder con ninguna de las formas de CATD descritas.

El análisis de la actividad enzimática asociada a CATD confirmó los resultados obtenidos en el análisis de expresión diferencial. Así, la sobreexpresión estable de NOS3 aumentó la actividad enzimática de CATD en las células 4TO-NOS. Considerando estos resultados, y teniendo en cuenta que CATD ha sido implicada en la vía de muerte celular dependiente de p53 (Wu, Saftig et al. 1998; Gonzalez, Ferrin et al. 2013) y en la inducción de apoptosis por ON (Pilane and LaBelle 2004), la sobreexpresión de la proteasa podría estar induciendo la apoptosis en la línea celular 4TO-NOS, donde la sobreexpresión de NOS-3 se asocia al incremento de la producción de ON y de la expresión de p53 (Gonzalez, Ferrin et al. 2013). De acuerdo con este papel proapoptótico de CATD, se ha

demostrado que su inhibición genética y farmacológica resulta útil en el bloqueo de la apoptosis en diferentes situaciones, incluyendo la muerte celular inducida por anti-Fas (Deiss, Galinka et al. 1996). A pesar de ello, en nuestro modelo celular, la inducción de apoptosis por anti-Fas no tuvo ningún efecto sobre la expresión o actividad de CATD en la línea celular control 4TO. Es decir, CATD no parecía participar en el proceso apoptótico promovido por anti-Fas en la línea celular HepG2.

Para entender mejor el papel de CATD en nuestro modelo, se analizaron parámetros relacionados con la muerte celular en presencia de pepstatina A, un conocido inhibidor de CATD. A la concentración de 20 μ M, la pepstatina A fue capaz de inhibir la actividad CATD en 4TO-NOS por debajo del nivel observado en la línea celular control 4TO. Sin embargo, la inhibición de la actividad CATD no afectó al crecimiento de las células 4TO ó 4TO-NOS. Además, a esta misma concentración, la pepstatina A no pudo suprimir la actividad caspasa-3 inducida por anti-Fas en las células 4TO. Así pues, la actividad CATD no resulta esencial durante el proceso de muerte celular inducido por Fas en las células HepG2. Estos resultados difieren de los publicados acerca de la participación de la proteasa en los sistemas de apoptosis desencadenados por la activación de receptores de superficie celular (Deiss, Galinka et al. 1996; Malhi, Guicciardi et al. 2010). No obstante, y contrariamente a lo esperado, la inhibición de la actividad CATD en 4TO-NOS causó un aumento significativo de la actividad caspasa, tanto en condiciones basales como tras la adición de anti-Fas. Este resultado implica un efecto antiapoptótico para CATD en lugar de proapoptótico. Dicho efecto antitumoral de CATD encajaría con el hecho de que su sobreexpresión ha sido relatada en muchos tumores malignos y su presencia se ha asociado a la propagación del cáncer y el desenlace clínico (Fan, Lin et al. 2012). Además, la proteasa puede promover la supervivencia celular en condiciones de estrés oxidativo (Hah, Noh et al. 2012). A pesar de esto, Beaujoui y col. han demostrado que la sobreexpresión de CATD en células cancerosas ejerce un efecto proapoptótico que es independiente de su actividad catalítica (Beaujoui, Baghdiguan et al. 2006). De este modo, la CATD citosólica estimularía la apoptosis mediante su interacción con la maquinaria apoptótica, y no mediante el procesamiento de sustratos específicos. De ser así, no podríamos descartar un papel proapoptótico para CATD en nuestro modelo celular de sobreexpresión de NOS3, ya que la pepstatina A estimula la liberación lisosomal de la proteasa a la dosis comúnmente utilizada de 50 μ M (Emert-Sedlak, Shangary et al. 2005). En tal escenario, el incremento de la actividad caspasa-3 observado en la línea celular

Discusión

4TO-NOS tras la administración de pepstatina A podría ser consecuencia de una mayor localización citoplasmática de CATD, y no un efecto causado por la inhibición de su actividad. Esto es consistente con el aumento de la actividad caspasa-9 inducido por pepstatina A en células que sobreexpresan NOS3, ya que la procaspasa-9 inactiva es activada a través de la vía de muerte mitocondrial. De hecho, a 50 μ M, la pepstatina A causó una disminución significativa del crecimiento de la línea celular 4TO-NOS.

En definitiva, la sobreexpresión de NOS3 promovió la sobreregulación de AR y CATD en un proceso relacionado con la generación de estrés oxidativo y la inducción de apoptosis. Estas observaciones están de acuerdo con estudios previos donde ambas enzimas fueron asociadas con la apoptosis y su regulación por p53. Por tanto, AR y CATD emergen como nuevas dianas que podrían estar involucradas en la reducción de la supervivencia celular en la línea celular 4TO-NOS, y se unen a la lista de proteínas identificadas anteriormente (Aguilar-Melero, Ferrin et al. 2012). Además, la sobreexpresión de NOS3 causó una mayor sensibilidad a la muerte celular inducida por anti-Fas a través de la regulación positiva de genes pro-apoptóticos y el aumento de la actividad caspasa-9 y caspasa-3, sin afectar a la actividad y/o expresión de AR y CATD. Dado que el efecto proapoptótico de la sobreexpresión de CATD puede no estar relacionado con su actividad enzimática, no podemos excluir un papel significativo para esta proteína en la inducción de apoptosis por sobreexpresión de NOS3. El papel potencial del incremento de GAPDH en la regulación de la actividad de p53 en las células 4TO-NOS queda aún por establecer. Del mismo modo, falta por determinar la modificación postraduccional que pudiera estar regulando la actividad CATD durante la sobreexpresión de NOS3, así como la forma de la proteína solamente detectada en la línea celular 4TO-NOS.

En la siguiente figura se muestra un esquema representativo de las principales conclusiones del este estudio sobre los mecanismos de muerte celular inducida por la sobreexpresión de NOS-3.

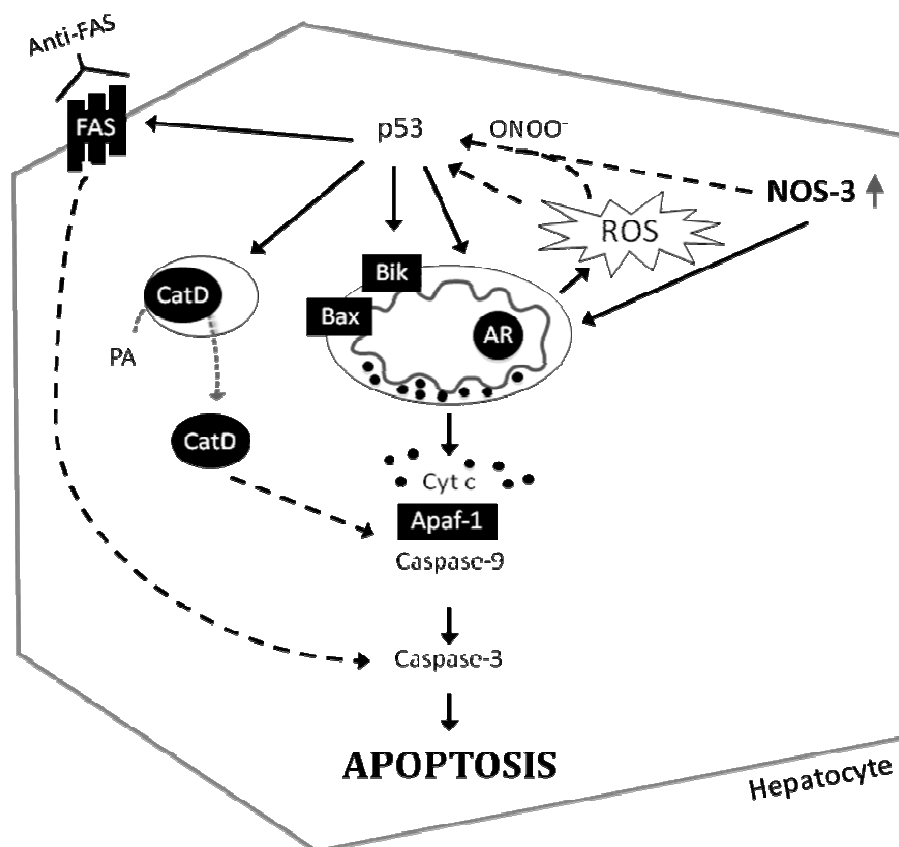


Figura 58. Mecanismos de muerte celular durante sobreexpresión de NOS-3. El estrés nitro-oxidativo inducido por sobreexpresión de NOS-3 en las células HepG2 fue asociado con: 1) la activación de la vía de las caspasas asociada a mitocondria a través del incremento de la expresión de genes proapoptóticos y la liberación de citocromo c al citoplasma; 2) el incremento de expresión de la proteína adrenodoxina oxidorreductasa mitocondrial (AR) y catepsina D (CatD); 3) una mayor susceptibilidad a la muerte celular inducida por anti-Fas a través de la activación de la vía extrínseca de la apoptosis. La regulación de la expresión de los diferentes factores Bax, Bik, Apaf-1, AR, CatD y Fas, ha sido previamente relacionado con p53, el cual está sobreexpresado en las células 4TO-NOS. Tanto la producción de EROs como la nitración en tirosina ha sido asociada con la regulación de p53 y la apoptosis. AR puede contribuir al estrés oxidativo. Pepstatina A (PA) induce apoptosis probablemente a través de la liberación de CatD desde los lisosomas.

7. CLONCLUSIONES



1. NOS3 se localiza en la membrana externa mitocondrial de células de la línea de hepatocarcinoma humano HepG2 y su expresión correlaciona positivamente con el nivel de nitración de las proteínas mitocondriales.
2. El estrés oxidativo causado por la sobreexpresión de NOS3 no se asocia a la disfunción de la cadena de transporte electrónico, aunque sí al incremento del número de copias de ADNmt y de la expresión de la proteína MTCO2.
3. La sobreexpresión de NOS3 se relaciona con el aumento de la expresión de los genes proapoptóticos BAX, BIK y APAF-1 y con la activación de la ruta intrínseca de la apoptosis.
4. La sobreexpresión de NOS3 causa una mayor susceptibilidad a la muerte celular en presencia de anti-Fas, a través de la activación de ambas vías, extrínseca e intrínseca, de la apoptosis. Este efecto coincide con una reducción de la localización mitocondrial de NOS3, del contenido de proteínas mitocondriales nitradas y del consumo de oxígeno dependiente del complejo I.
5. Entre otras proteínas relacionadas con diversas funciones celulares tales como el metabolismo, el estado redox o el procesamiento y degradación de proteínas, la sobreexpresión de NOS3 promovió la expresión de AR y CATD. Ambas proteínas están relacionadas con la generación de estrés oxidativo y la inducción de apoptosis, respectivamente. Una variante postraducciona de CATD fue identificada exclusivamente en la línea celular 4TO-NOS.
6. La sobreexpresión de CATD en la línea celular 4TO-NOS coincidió con el incremento de su actividad enzimática asociada. Pese a que dicho incremento demostró capacidad antiapoptótica, no podemos descartar un posible papel proapoptótico para CATD independiente de su actividad catalítica.

8. BIBLIOGRAFÍA



- (2012). "EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma." J Hepatol **56**(4): 908-943.
- Abdelmegeed, M. A. and B. J. Song (2014). "Functional roles of protein nitration in acute and chronic liver diseases." Oxid Med Cell Longev **2014**: 149627.
- Abelev, G. I. (1971). "Alpha-fetoprotein in ontogenesis and its association with malignant tumors." Adv Cancer Res **14**: 295-358.
- Abou-Alfa, G. K. (2006). "Hepatocellular carcinoma: molecular biology and therapy." Semin Oncol **33**(6 Suppl 11): S79-83.
- Abrahams, J. P., A. G. Leslie, et al. (1994). "Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria." Nature **370**(6491): 621-628.
- Abu-Amara, M., S. Y. Yang, et al. (2012). "The nitric oxide pathway--evidence and mechanisms for protection against liver ischaemia reperfusion injury." Liver Int **32**(4): 531-543.
- Aguilar-Melero, P., G. Ferrin, et al. (2012). "Effects of nitric oxide synthase-3 overexpression on post-translational modifications and cell survival in HepG2 cells." J Proteomics **75**(3): 740-755.
- Alderton, W. K., C. E. Cooper, et al. (2001). "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." Biochem J **357**(Pt 3): 593-615.
- Algeciras-Schimmich, A., E. M. Pietras, et al. (2003). "Two CD95 tumor classes with different sensitivities to antitumor drugs." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(20): 11445-11450.
- Amarante-Mendes, G. P. and D. R. Green (1999). "The regulation of apoptotic cell death." Braz J Med Biol Res **32**(9): 1053-1061.
- Ambs, S., W. G. Merriam, et al. (1998). "p53 and vascular endothelial growth factor regulate tumor growth of NOS2-expressing human carcinoma cells." Nat Med **4**(12): 1371-1376.
- Ames, B. N., M. K. Shigenaga, et al. (1993). "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(17): 7915-7922.
- Anderson, S., A. T. Bankier, et al. (1981). "Sequence and organization of the human mitochondrial genome." Nature **290**(5806): 457-465.
- Annik Werner, F. K., and Henkjan J Verkade (2009). "Madame Curie Bioscience Database. Fat Absorption and Lipid Metabolism in Cholestasis."
- Aota, M., K. Matsuda, et al. (1996). "Protection against reperfusion-induced arrhythmias by human thioredoxin." J Cardiovasc Pharmacol **27**(5): 727-732.
- Armstrong, L., O. Hughes, et al. (2006). "The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NFkappabeta signalling in the maintenance of human embryonic stem cell pluripotency and viability highlighted by transcriptional profiling and functional analysis." Hum Mol Genet **15**(11): 1894-1913.
- Arner, E. S. and A. Holmgren (2000). "Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase." Eur J Biochem **267**(20): 6102-6109.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." Science **281**(5381): 1305-1308.
- Attardi, G. and G. Schatz (1988). "Biogenesis of mitochondria." Annu Rev Cell Biol **4**: 289-333.
- Balaban, R. S., S. Nemoto, et al. (2005). "Mitochondria, oxidants, and aging." Cell **120**(4): 483-495.
- Ballatori, N., S. M. Krance, et al. (2009). "Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases." Biol Chem **390**(3): 191-214.
- Barone, F., S. D. McCulloch, et al. (2007). "Replication of 2-hydroxyadenine-containing DNA and recognition by human MutSalphalpha." DNA Repair (Amst) **6**(3): 355-366.
- Beaujouin, M., S. Baghdiguiian, et al. (2006). "Overexpression of both catalytically active and -inactive cathepsin D by cancer cells enhances apoptosis-dependent chemo-sensitivity." Oncogene **25**(13): 1967-1973.
- Beckman, J. S., T. W. Beckman, et al. (1990). "Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(4): 1620-1624.
- Benes, P., V. Vetvicka, et al. (2008). "Cathepsin D--many functions of one aspartic protease." Crit Rev Oncol Hematol **68**(1): 12-28.
- Berg, T., et al (2002). "Biochemistry."

Bibliografía

- Bergamini, E., G. Cavallini, et al. (2007). "The role of autophagy in aging: its essential part in the anti-aging mechanism of caloric restriction." Ann N Y Acad Sci **1114**: 69-78.
- Bidere, N., H. K. Lorenzo, et al. (2003). "Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis." J Biol Chem **278**(33): 31401-31411.
- Bilbao Aguirre I, L. F. J., Castells Fuste L, Charco Torras R (2010). "Estado actual del hepatocarcinoma y perspectivas futura."
- Bing, R. J., M. Miyataka, et al. (2001). "Nitric oxide, prostanoids, cyclooxygenase, and angiogenesis in colon and breast cancer." Clin Cancer Res **7**(11): 3385-3392.
- Bird, T. G., S. Lorenzini, et al. (2008). "Activation of stem cells in hepatic diseases." Cell Tissue Res **331**(1): 283-300.
- Birkinshaw, R. W. and P. E. Czabotar (2017). "The BCL-2 family of proteins and mitochondrial outer membrane permeabilisation." Semin Cell Dev Biol.
- Boatright, K. M. and G. S. Salvesen (2003). "Mechanisms of caspase activation." Curr Opin Cell Biol **15**(6): 725-731.
- Boveris, A. and B. Chance (1973). "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen." Biochem J **134**(3): 707-716.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Bruix, J., M. Reig, et al. (2016). "Evidence-Based Diagnosis, Staging, and Treatment of Patients With Hepatocellular Carcinoma." Gastroenterology **150**(4): 835-853.
- Butterfield, D. A., M. L. Bader Lange, et al. (2010). "Involvements of the lipid peroxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease." Biochim Biophys Acta **1801**(8): 924-929.
- Butterfield, D. A. and J. Kanski (2001). "Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins." Mech Ageing Dev **122**(9): 945-962.
- Cabezón, E., M. G. Montgomery, et al. (2003). "The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1." Nat Struct Biol **10**(9): 744-750.
- Cadenas, E. and K. J. Davies (2000). "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging." Free Radic Biol Med **29**(3-4): 222-230.
- Cantor, J. R. and D. M. Sabatini (2012). "Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces." Cancer Discov **2**(10): 881-898.
- Carnovale, C. E. and M. T. Ronco (2012). "Role of nitric oxide in liver regeneration." Ann Hepatol **11**(5): 636-647.
- Cecchini, G. (2003). "Function and structure of complex II of the respiratory chain." Annu Rev Biochem **72**: 77-109.
- Cerella, C., M. D'Alessio, et al. (2009). "Subapoptogenic oxidative stress strongly increases the activity of the glycolytic key enzyme glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase." Ann N Y Acad Sci **1171**: 583-590.
- Clayton, D. A. (1982). "Replication of animal mitochondrial DNA." Cell **28**(4): 693-705.
- Clayton, D. A. (1991). "Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA." Annu Rev Cell Biol **7**: 453-478.
- Cohen, J. J. (1993). "Apoptosis." Immunol Today **14**(3): 126-130.
- Collinson, I. R., M. J. Runswick, et al. (1994). "Fo membrane domain of ATP synthase from bovine heart mitochondria: purification, subunit composition, and reconstitution with F1-ATPase." Biochemistry **33**(25): 7971-7978.
- Cremesti, A., F. Paris, et al. (2001). "Ceramide enables fas to cap and kill." J Biol Chem **276**(26): 23954-23961.
- Crichton, R. R., S. Wilmet, et al. (2002). "Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells." J Inorg Biochem **91**(1): 9-18.
- Culotta, E. and D. E. Koshland, Jr. (1992). "NO news is good news." Science **258**(5090): 1862-1865.

- Curtin, J. F. and T. G. Cotter (2003). "Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis." *Cell Signal* **15**(11): 983-992.
- Chae, I. H., K. W. Park, et al. (2004). "Nitric oxide-induced apoptosis is mediated by Bax/Bcl-2 gene expression, transition of cytochrome c, and activation of caspase-3 in rat vascular smooth muscle cells." *Clin Chim Acta* **341**(1-2): 83-91.
- Chen, H. and D. C. Chan (2009). "Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases." *Hum Mol Genet* **18**(R2): R169-176.
- Cheng, H., L. Wang, et al. (2014). "Nitric oxide in cancer metastasis." *Cancer Lett* **353**(1): 1-7.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162**(1): 156-159.
- Damdimopoulos, A. E., A. Miranda-Vizuete, et al. (2002). "Human mitochondrial thioredoxin. Involvement in mitochondrial membrane potential and cell death." *J Biol Chem* **277**(36): 33249-33257.
- Danial, N. N. and S. J. Korsmeyer (2004). "Cell death: critical control points." *Cell* **116**(2): 205-219.
- Davies, M. J. (2005). "The oxidative environment and protein damage." *Biochim Biophys Acta* **1703**(2): 93-109.
- Dedon, P. C. (2008). "The chemical toxicology of 2-deoxyribose oxidation in DNA." *Chem Res Toxicol* **21**(1): 206-219.
- Deiss, L. P., H. Galinka, et al. (1996). "Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha." *EMBO J* **15**(15): 3861-3870.
- DeLeo, F. R. and M. T. Quinn (1996). "Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins." *J Leukoc Biol* **60**(6): 677-691.
- Desbarats, J., R. B. Birge, et al. (2003). "Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation." *Nat Cell Biol* **5**(2): 118-125.
- Deveraux, Q. L. and J. C. Reed (1999). "IAP family proteins--suppressors of apoptosis." *Genes Dev* **13**(3): 239-252.
- Diaz-Troya, S., S. Najib, et al. (2005). "eNOS, nNOS, cGMP and protein kinase G mediate the inhibitory effect of pancreastatin, a chromogranin A-derived peptide, on growth and proliferation of hepatoma cells." *Regul Pept* **125**(1-3): 41-46.
- Dong, Z., A. H. Staroselsky, et al. (1994). "Inverse correlation between expression of inducible nitric oxide synthase activity and production of metastasis in K-1735 murine melanoma cells." *Cancer Res* **54**(3): 789-793.
- Doulias, P. T., M. Tenopoulou, et al. (2013). "Nitric oxide regulates mitochondrial fatty acid metabolism through reversible protein S-nitrosylation." *Sci Signal* **6**(256): rs1.
- Dragin, N., M. Smani, et al. (2006). "Acute oxidative stress is associated with cell proliferation in the mouse liver." *FEBS Lett* **580**(16): 3845-3852.
- Du, C., M. Fang, et al. (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." *Cell* **102**(1): 33-42.
- Dubey, V. and S. Luqman (2017). "Cathepsin D as a Promising Target for the Discovery of Novel Anticancer Agents." *Curr Cancer Drug Targets* **17**(5): 404-422.
- Elfering, S. L., T. M. Sarkela, et al. (2002). "Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase." *J Biol Chem* **277**(41): 38079-38086.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicol Pathol* **35**(4): 495-516.
- Ellis, R. E., J. Y. Yuan, et al. (1991). "Mechanisms and functions of cell death." *Annu Rev Cell Biol* **7**: 663-698.
- Emert-Sedlak, L., S. Shangary, et al. (2005). "Involvement of cathepsin D in chemotherapy-induced cytochrome c release, caspase activation, and cell death." *Mol Cancer Ther* **4**(5): 733-742.
- Enriquez, J. A. and G. Lenaz (2014). "Coenzyme q and the respiratory chain: coenzyme q pool and mitochondrial supercomplexes." *Mol Syndromol* **5**(3-4): 119-140.
- Facciorusso, A., R. Villani, et al. (2016). "Mitochondrial Signaling and Hepatocellular Carcinoma: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications." *Curr Pharm Des* **22**(18): 2689-2696.

Bibliografía

- Fan, C., X. Lin, et al. (2012). "Clinicopathological significance of cathepsin D expression in non-small cell lung cancer is conditional on apoptosis-associated protein phenotype: an immunohistochemistry study." *Tumour Biol* **33**(4): 1045-1052.
- Fang, J., T. Nakamura, et al. (2007). "S-nitrosylation of peroxiredoxin 2 promotes oxidative stress-induced neuronal cell death in Parkinson's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(47): 18742-18747.
- Feig, C., V. Tchikov, et al. (2007). "Palmitoylation of CD95 facilitates formation of SDS-stable receptor aggregates that initiate apoptosis signaling." *EMBO J* **26**(1): 221-231.
- Felley-Bosco, E. (1998). "Role of nitric oxide in genotoxicity: implication for carcinogenesis." *Cancer Metastasis Rev* **17**(1): 25-37.
- Festjens, N., T. Vanden Berghe, et al. (2006). "Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response." *Biochim Biophys Acta* **1757**(9-10): 1371-1387.
- Fiers, W., R. Beyaert, et al. (1999). "More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage." *Oncogene* **18**(54): 7719-7730.
- Figueira, T. R., M. H. Barros, et al. (2013). "Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health." *Antioxid Redox Signal* **18**(16): 2029-2074.
- Forner, A., M. Reig, et al. (2009). "Alpha-fetoprotein for hepatocellular carcinoma diagnosis: the demise of a brilliant star." *Gastroenterology* **137**(1): 26-29.
- Freshney, I. (2001). "Application of cell cultures to toxicology." *Cell Biol Toxicol* **17**(4-5): 213-230.
- Frey, T. G. and M. G. Sun (2008). "Correlated light and electron microscopy illuminates the role of mitochondrial inner membrane remodeling during apoptosis." *Biochim Biophys Acta* **1777**(7-8): 847-852.
- Fridovich, I. (1978). "The biology of oxygen radicals." *Science* **201**(4359): 875-880.
- Friedrich, T. and B. Bottcher (2004). "The gross structure of the respiratory complex I: a Lego System." *Biochim Biophys Acta* **1608**(1): 1-9.
- Fuentes-Prior, P. and G. S. Salvesen (2004). "The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition." *Biochem J* **384**(Pt 2): 201-232.
- Fujimoto, H., J. Sasaki, et al. (1998). "Significant correlation of nitric oxide synthase activity and p53 gene mutation in stage I lung adenocarcinoma." *Jpn J Cancer Res* **89**(7): 696-702.
- Fujinaga, H., T. Tsutsumi, et al. (2011). "Hepatocarcinogenesis in hepatitis C: HCV shrewdly exacerbates oxidative stress by modulating both production and scavenging of reactive oxygen species." *Oncology* **81 Suppl 1**: 11-17.
- Gao, S., J. Chen, et al. (2004). "Docking of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) to the mitochondrial outer membrane: a pentabasic amino acid sequence in the autoinhibitory domain of eNOS targets a proteinase K-cleavable peptide on the cytoplasmic face of mitochondria." *J Biol Chem* **279**(16): 15968-15974.
- Garber, K. (2006). "Energy deregulation: licensing tumors to grow." *Science* **312**(5777): 1158-1159.
- Garrido, C., L. Galluzzi, et al. (2006). "Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria." *Cell Death Differ* **13**(9): 1423-1433.
- Giachin, G., R. Bouverot, et al. (2016). "Dynamics of Human Mitochondrial Complex I Assembly: Implications for Neurodegenerative Diseases." *Front Mol Biosci* **3**: 43.
- Gilkerson, R. W., J. M. Selker, et al. (2003). "The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation." *FEBS Lett* **546**(2-3): 355-358.
- Giorgi, C., D. De Stefani, et al. (2009). "Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum." *Int J Biochem Cell Biol* **41**(10): 1817-1827.
- Goffart, S. and R. J. Wiesner (2003). "Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis." *Exp Physiol* **88**(1): 33-40.
- Golstein, P. (2000). "Signal transduction. FasL binds preassembled Fas." *Science* **288**(5475): 2328-2329.
- Gonin, S., C. Diaz-Latoud, et al. (1999). "p53/T-antigen complex disruption in T-antigen transformed NIH3T3 fibroblasts exposed to oxidative stress: correlation with the

- appearance of a Fas/APO-1/CD95 dependent, caspase independent, necrotic pathway." *Oncogene* **18**(56): 8011-8023.
- Gonzalez, R., J. A. Collado, et al. (2007). "Cytoprotective properties of alpha-tocopherol are related to gene regulation in cultured D-galactosamine-treated human hepatocytes." *Free Radic Biol Med* **43**(10): 1439-1452.
- Gonzalez, R., G. Ferrin, et al. (2013). "Targeting hepatoma using nitric oxide donor strategies." *Antioxid Redox Signal* **18**(5): 491-506.
- Govers, R., P. van der Sluijs, et al. (2002). "Endothelial nitric oxide synthase and its negative regulator caveolin-1 localize to distinct perinuclear organelles." *J Histochem Cytochem* **50**(6): 779-788.
- Grattagliano, I., S. Russmann, et al. (2011). "Mitochondria in chronic liver disease." *Curr Drug Targets* **12**(6): 879-893.
- Gray, M. W., G. Burger, et al. (1999). "Mitochondrial evolution." *Science* **283**(5407): 1476-1481.
- Green, L. C., D. A. Wagner, et al. (1982). "Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids." *Anal Biochem* **126**(1): 131-138.
- Grigorieff, N. (1998). "Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 2.2 Å in ice." *J Mol Biol* **277**(5): 1033-1046.
- Groeger, G., C. Quiney, et al. (2009). "Hydrogen peroxide as a cell-survival signaling molecule." *Antioxid Redox Signal* **11**(11): 2655-2671.
- Gross, S. S. and M. S. Wolin (1995). "Nitric oxide: pathophysiological mechanisms." *Annu Rev Physiol* **57**: 737-769.
- Gutierrez, J., S. W. Ballinger, et al. (2006). "Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: the emerging role in signal transduction in vascular cells." *Circ Res* **99**(9): 924-932.
- Hagerhall, C. (1997). "Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme." *Biochim Biophys Acta* **1320**(2): 107-141.
- Hah, Y. S., H. S. Noh, et al. (2012). "Cathepsin D inhibits oxidative stress-induced cell death via activation of autophagy in cancer cells." *Cancer Lett* **323**(2): 208-214.
- Halliwell, B., R. Aeschbach, et al. (1995). "The characterization of antioxidants." *Food Chem Toxicol* **33**(7): 601-617.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1984). "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease." *Biochem J* **219**(1): 1-14.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1990). "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview." *Methods Enzymol* **186**: 1-85.
- Han, E. S., F. L. Muller, et al. (2008). "The in vivo gene expression signature of oxidative stress." *Physiol Genomics* **34**(1): 112-126.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.
- Hanukoglu, I. (2006). "Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells." *Drug Metab Rev* **38**(1-2): 171-196.
- Hassanein, T. and T. Frederick (2004). "Mitochondrial dysfunction in liver disease and organ transplantation." *Mitochondrion* **4**(5-6): 609-620.
- Haupt, S., M. Berger, et al. (2003). "Apoptosis - the p53 network." *J Cell Sci* **116**(Pt 20): 4077-4085.
- Hayashi, T., R. Rizzuto, et al. (2009). "MAM: more than just a housekeeper." *Trends Cell Biol* **19**(2): 81-88.
- Hayden, M. A., P. A. Lange, et al. (2001). "Nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate stimulate apoptosis via activation of the Fas-FasL pathway." *J Surg Res* **101**(2): 183-189.
- Heinrich, M., J. Neumeyer, et al. (2004). "Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation." *Cell Death Differ* **11**(5): 550-563.
- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." *Nature* **407**(6805): 770-776.
- Higaki, K., H. Yano, et al. (1996). "Fas antigen expression and its relationship with apoptosis in human hepatocellular carcinoma and noncancerous tissues." *Am J Pathol* **149**(2): 429-437.

Bibliografía

- Higuchi, R., C. Fockler, et al. (1993). "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions." *Biotechnology (N Y)* **11**(9): 1026-1030.
- Holmgren, A. (1985). "Thioredoxin." *Annu Rev Biochem* **54**: 237-271.
- Holler, N., A. Tardivel, et al. (2003). "Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex." *Mol Cell Biol* **23**(4): 1428-1440.
- Huang, D. C., M. Hahne, et al. (1999). "Activation of Fas by FasL induces apoptosis by a mechanism that cannot be blocked by Bcl-2 or Bcl-x(L)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(26): 14871-14876.
- Hussain, S. P. and C. C. Harris (1998). "Molecular epidemiology of human cancer." *Recent Results Cancer Res* **154**: 22-36.
- Hwang, P. M., F. Bunz, et al. (2001). "Ferrodoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells." *Nat Med* **7**(10): 1111-1117.
- Igney, F. H. and P. H. Krammer (2002). "Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis." *Nat Rev Cancer* **2**(4): 277-288.
- Imamura, R., K. Konaka, et al. (2004). "Fas ligand induces cell-autonomous NF-kappaB activation and interleukin-8 production by a mechanism distinct from that of tumor necrosis factor-alpha." *J Biol Chem* **279**(45): 46415-46423.
- Inoue, Y., T. Tomiya, et al. (2002). "p53 May positively regulate hepatocyte proliferation in rats." *Hepatology* **36**(2): 336-344.
- Irmeler, M., M. Thome, et al. (1997). "Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP." *Nature* **388**(6638): 190-195.
- Ishikawa, T., N. Yoshida, et al. (2003). "Different effects of constitutive nitric oxide synthase and heme oxygenase on pulmonary or liver metastasis of colon cancer in mice." *Clin Exp Metastasis* **20**(5): 445-450.
- Ishimura, N., S. F. Bronk, et al. (2005). "Inducible nitric oxide synthase up-regulates Notch-1 in mouse cholangiocytes: implications for carcinogenesis." *Gastroenterology* **128**(5): 1354-1368.
- Ivanov, V. N., P. Lopez Bergami, et al. (2003). "FAP-1 association with Fas (Apo-1) inhibits Fas expression on the cell surface." *Mol Cell Biol* **23**(10): 3623-3635.
- Ivanov, V. N., Z. Ronai, et al. (2006). "Opposite roles of FAP-1 and dynamin in the regulation of Fas (CD95) translocation to the cell surface and susceptibility to Fas ligand-mediated apoptosis." *J Biol Chem* **281**(3): 1840-1852.
- Iwakiri, Y. and M. Y. Kim (2015). "Nitric oxide in liver diseases." *Trends Pharmacol Sci*.
- Jagannath, C., D. R. Lindsey, et al. (2009). "Autophagy enhances the efficacy of BCG vaccine by increasing peptide presentation in mouse dendritic cells." *Nat Med* **15**(3): 267-276.
- Javitt, N. B. (1990). "Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids." *FASEB J* **4**(2): 161-168.
- Jeschke, M. G. (2009). "The hepatic response to thermal injury: is the liver important for postburn outcomes?" *Mol Med* **15**(9-10): 337-351.
- Jin, X., Q. Li, et al. (2011). "Radiosensitization by inhibiting survivin in human hepatoma HepG2 cells to high-LET radiation." *J Radiat Res* **52**(3): 335-341.
- Jones, D. P. (2010). "Redox sensing: orthogonal control in cell cycle and apoptosis signalling." *J Intern Med* **268**(5): 432-448.
- Jones, R. G. and C. B. Thompson (2009). "Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth." *Genes Dev* **23**(5): 537-548.
- Kanai, A. J., L. L. Pearce, et al. (2001). "Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24): 14126-14131.
- Kelly, D. P. and R. C. Scarpulla (2004). "Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function." *Genes Dev* **18**(4): 357-368.
- Kemp, K., E. Gray, et al. (2010). "Inflammatory cytokine induced regulation of superoxide dismutase 3 expression by human mesenchymal stem cells." *Stem Cell Rev* **6**(4): 548-559.
- Kennett, E. C. and M. J. Davies (2009). "Glycosaminoglycans are fragmented by hydroxyl, carbonate, and nitrogen dioxide radicals in a site-selective manner: implications for

- peroxynitrite-mediated damage at sites of inflammation." *Free Radic Biol Med* **47**(4): 389-400.
- Kennett, E. C., M. D. Rees, et al. (2010). "Peroxynitrite modifies the structure and function of the extracellular matrix proteoglycan perlecan by reaction with both the protein core and the heparan sulfate chains." *Free Radic Biol Med* **49**(2): 282-293.
- Kitamura, T., S. Watanabe, et al. (1998). "Liver regeneration, liver cancers and cyclins." *J Gastroenterol Hepatol* **13 Suppl**: S96-99.
- Knowles, R. G. and S. Moncada (1994). "Nitric oxide synthases in mammals." *Biochem J* **298** (Pt 2): 249-258.
- Knowles, R. G., M. Palacios, et al. (1989). "Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(13): 5159-5162.
- Kollman, J. M., C. H. Greenberg, et al. (2015). "Ring closure activates yeast gammaTuRC for species-specific microtubule nucleation." *Nat Struct Mol Biol* **22**(2): 132-137.
- Koopman, W. J., S. Verkaart, et al. (2005). "Inhibition of complex I of the electron transport chain causes O₂⁻-mediated mitochondrial outgrowth." *Am J Physiol Cell Physiol* **288**(6): C1440-1450.
- Kreuz, S., D. Siegmund, et al. (2004). "NFkappaB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP." *J Cell Biol* **166**(3): 369-380.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, et al. (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." *Cell Death Differ* **16**(1): 3-11.
- Krueger, A., S. Baumann, et al. (2001). "FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis." *Mol Cell Biol* **21**(24): 8247-8254.
- Lavrik, I., A. Golks, et al. (2005). "Death receptor signaling." *J Cell Sci* **118**(Pt 2): 265-267.
- Lawenda, B. D., K. M. Kelly, et al. (2008). "Should supplemental antioxidant administration be avoided during chemotherapy and radiation therapy?" *J Natl Cancer Inst* **100**(11): 773-783.
- Le, X., D. Wei, et al. (2005). "Nitric oxide synthase II suppresses the growth and metastasis of human cancer regardless of its up-regulation of protumor factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(24): 8758-8763.
- Lee, H. C. and Y. H. Wei (2005). "Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress." *Int J Biochem Cell Biol* **37**(4): 822-834.
- Lee, S. H., M. S. Shin, et al. (2001). "Expression of Fas and Fas-related molecules in human hepatocellular carcinoma." *Hum Pathol* **32**(3): 250-256.
- Levine, B. and G. Kroemer (2008). "Autophagy in the pathogenesis of disease." *Cell* **132**(1): 27-42.
- Li, J. and T. R. Billiar (1999). "Nitric Oxide. IV. Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver." *Am J Physiol* **276**(5 Pt 1): G1069-1073.
- Liu, Y., G. Fiskum, et al. (2002). "Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain." *J Neurochem* **80**(5): 780-787.
- Locksley, R. M., N. Killeen, et al. (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." *Cell* **104**(4): 487-501.
- Luo, X., S. Pitkanen, et al. (1997). "Excessive formation of hydroxyl radicals and aldehydic lipid peroxidation products in cultured skin fibroblasts from patients with complex I deficiency." *J Clin Invest* **99**(12): 2877-2882.
- Llovet, J. M., A. M. Di Bisceglie, et al. (2008). "Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma." *J Natl Cancer Inst* **100**(10): 698-711.
- Maiorino, M., J. P. Thomas, et al. (1991). "Reactivity of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase with membrane and lipoprotein lipid hydroperoxides." *Free Radic Res Commun* **12-13 Pt 1**: 131-135.
- Malhi, H., M. E. Guicciardi, et al. (2010). "Hepatocyte death: a clear and present danger." *Physiol Rev* **90**(3): 1165-1194.
- Marletta, M. A. (1994). "Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis." *Cell* **78**(6): 927-930.
- Marnett, L. J. (2000). "Oxyradicals and DNA damage." *Carcinogenesis* **21**(3): 361-370.
- Martin-Sanz, P., S. Hortelano, et al. (2002). "Nitric oxide in liver inflammation and regeneration." *Metab Brain Dis* **17**(4): 325-334.

Bibliografía

- Martin, L. J., K. Chen, et al. (2005). "Adult motor neuron apoptosis is mediated by nitric oxide and Fas death receptor linked by DNA damage and p53 activation." *J Neurosci* **25**(27): 6449-6459.
- Martindale, J. L. and N. J. Holbrook (2002). "Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival." *J Cell Physiol* **192**(1): 1-15.
- Martinez-Ruiz, A. and S. Lamas (2004). "Detection and proteomic identification of S-nitrosylated proteins in endothelial cells." *Arch Biochem Biophys* **423**(1): 192-199.
- Martinez-Ruiz, A. and S. Lamas (2004). "S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction." *Cardiovasc Res* **62**(1): 43-52.
- Martinou, J. C. and D. R. Green (2001). "Breaking the mitochondrial barrier." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(1): 63-67.
- Marzo, I., C. Brenner, et al. (1998). "Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis." *Science* **281**(5385): 2027-2031.
- Mates, J. M., C. Perez-Gomez, et al. (1999). "Antioxidant enzymes and human diseases." *Clin Biochem* **32**(8): 595-603.
- Mazzolini, G., J. P. Sowa, et al. (2016). "Cell death mechanisms in human chronic liver diseases: a far cry from clinical applicability." *Clin Sci (Lond)* **130**(23): 2121-2138.
- McCall, M. R. and B. Frei (1999). "Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans?" *Free Radic Biol Med* **26**(7-8): 1034-1053.
- Meguro, M., T. Katsuramaki, et al. (2003). "Apoptosis and necrosis after warm ischemia-reperfusion injury of the pig liver and their inhibition by ONO-1714." *Transplantation* **75**(5): 703-710.
- Michalopoulos, G. K. and M. C. DeFrances (1997). "Liver regeneration." *Science* **276**(5309): 60-66.
- Mieyal, J. J., M. M. Gallogly, et al. (2008). "Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation." *Antioxid Redox Signal* **10**(11): 1941-1988.
- Minana, J. B., L. Gomez-Cambronero, et al. (2002). "Mitochondrial oxidative stress and CD95 ligand: a dual mechanism for hepatocyte apoptosis in chronic alcoholism." *Hepatology* **35**(5): 1205-1214.
- Mitchell, P. (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism." *Nature* **191**: 144-148.
- Mitchell, P. and J. Moyle (1967). "Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation." *Nature* **213**(5072): 137-139.
- Moncada, P. S. (2015). "Nitric Oxide And Oxygen: Actions And Interactions In Health And Disease." *Redox Biol* **5**: 421.
- Moncada, S., D. D. Rees, et al. (1991). "Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(6): 2166-2170.
- Moreno-Loshuertos, R., R. Acin-Perez, et al. (2006). "Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants." *Nat Genet* **38**(11): 1261-1268.
- Moreno-Loshuertos, R. and J. A. Enriquez (2016). "Respiratory supercomplexes and the functional segmentation of the CoQ pool." *Free Radic Biol Med* **100**: 5-13.
- Moseley, R., R. J. Waddington, et al. (1997). "Degradation of glycosaminoglycans by reactive oxygen species derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes." *Biochim Biophys Acta* **1362**(2-3): 221-231.
- Muntane, J., A. J. De la Rosa, et al. (2013). "Nitric oxide and cell death in liver cancer cells." *Mitochondrion* **13**(3): 257-262.
- Muntane, J. and M. D. la Mata (2010). "Nitric oxide and cancer." *World J Hepatol* **2**(9): 337-344.
- Muntane, J., F. J. Rodriguez, et al. (2000). "TNF-alpha dependent production of inducible nitric oxide is involved in PGE(1) protection against acute liver injury." *Gut* **47**(4): 553-562.
- Murata, J., M. Tada, et al. (1997). "Nitric oxide as a carcinogen: analysis by yeast functional assay of inactivating p53 mutations induced by nitric oxide." *Mutat Res* **379**(2): 211-218.
- Murphy, M. P. (2009). "How mitochondria produce reactive oxygen species." *Biochem J* **417**(1): 1-13.

- Nagata, S. (1997). "Apoptosis by death factor." *Cell* **88**(3): 355-365.
- Navarro, A. and A. Boveris (2008). "Mitochondrial nitric oxide synthase, mitochondrial brain dysfunction in aging, and mitochondria-targeted antioxidants." *Adv Drug Deliv Rev* **60**(13-14): 1534-1544.
- Nelson, D. a. C., MM (2005). "Lehninger. Principles of Biochemistry." *New York*.
- Newmeyer, D. D. and S. Ferguson-Miller (2003). "Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death." *Cell* **112**(4): 481-490.
- Nicotera, P., F. Bernassola, et al. (1999). "Nitric oxide (NO), a signaling molecule with a killer soul." *Cell Death Differ* **6**(10): 931-933.
- Nicotera, P. and G. Melino (2004). "Regulation of the apoptosis-necrosis switch." *Oncogene* **23**(16): 2757-2765.
- Nielsen, F., B. B. Mikkelsen, et al. (1997). "Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors." *Clin Chem* **43**(7): 1209-1214.
- Nikoletopoulou, V., M. Markaki, et al. (2013). "Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy." *Biochim Biophys Acta* **1833**(12): 3448-3459.
- Nisoli, E., E. Clementi, et al. (2003). "Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide." *Science* **299**(5608): 896-899.
- Nissom, P. M., S. L. Lo, et al. (2006). "Hcc-2, a novel mammalian ER thioredoxin that is differentially expressed in hepatocellular carcinoma." *FEBS Lett* **580**(9): 2216-2226.
- Nordberg, J. and E. S. Arner (2001). "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system." *Free Radic Biol Med* **31**(11): 1287-1312.
- Novo, E. and M. Parola (2008). "Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis." *Fibrogenesis Tissue Repair* **1**(1): 5.
- Ogasawara, J., R. Watanabe-Fukunaga, et al. (1993). "Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice." *Nature* **364**(6440): 806-809.
- Oren, M. (1999). "Regulation of the p53 tumor suppressor protein." *J Biol Chem* **274**(51): 36031-36034.
- Pacher, P., J. S. Beckman, et al. (2007). "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease." *Physiol Rev* **87**(1): 315-424.
- Palade, G. E. (1953). "An electron microscope study of the mitochondrial structure." *J Histochem Cytochem* **1**(4): 188-211.
- Palmer, C. S., L. D. Osellame, et al. (2011). "The regulation of mitochondrial morphology: intricate mechanisms and dynamic machinery." *Cell Signal* **23**(10): 1534-1545.
- Peter, M. E., A. Hadji, et al. (2015). "The role of CD95 and CD95 ligand in cancer." *Cell Death Differ* **22**(5): 885-886.
- Peter, M. E. and P. H. Krammer (2003). "The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond." *Cell Death Differ* **10**(1): 26-35.
- Pilane, C. M. and E. F. LaBelle (2004). "NO induced apoptosis of vascular smooth muscle cells accompanied by ceramide increase." *J Cell Physiol* **199**(2): 310-315.
- Pitkanen, S. and B. H. Robinson (1996). "Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase." *J Clin Invest* **98**(2): 345-351.
- Polikov, V., M. Block, et al. (2008). "In Vitro Models for Neuroelectrodes: A Paradigm for Studying Tissue-Materials Interactions in the Brain Environment."
- Poole, B. D., J. Zhou, et al. (2006). "Apoptosis of liver-derived cells induced by parvovirus B19 nonstructural protein." *J Virol* **80**(8): 4114-4121.
- Powis, G. and D. L. Kirkpatrick (2007). "Thioredoxin signaling as a target for cancer therapy." *Curr Opin Pharmacol* **7**(4): 392-397.
- Pranjol, M. Z., N. Gutowski, et al. (2015). "The Potential Role of the Proteases Cathepsin D and Cathepsin L in the Progression and Metastasis of Epithelial Ovarian Cancer." *Biomolecules* **5**(4): 3260-3279.
- Qi, X. S., X. Z. Guo, et al. (2015). "MET inhibitors for treatment of advanced hepatocellular carcinoma: A review." *World J Gastroenterol* **21**(18): 5445-5453.
- Rathmell, J. C. and C. B. Thompson (1999). "The central effectors of cell death in the immune system." *Annu Rev Immunol* **17**: 781-828.

Bibliografía

- Rees, D. D., R. M. Palmer, et al. (1989). "Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(9): 3375-3378.
- Reinartz, M., Z. Ding, et al. (2008). "Nitrosative stress leads to protein glutathiolation, increased S-nitrosation, and up-regulation of peroxiredoxins in the heart." *J Biol Chem* **283**(25): 17440-17449.
- Reinehr, R. and D. Haussinger (2007). "CD95 activation in the liver: ion fluxes and oxidative signaling." *Arch Biochem Biophys* **462**(2): 124-131.
- Rhee, S. G., H. Z. Chae, et al. (2005). "Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling." *Free Radic Biol Med* **38**(12): 1543-1552.
- Rigas, B. and J. L. Williams (2008). "NO-donating NSAIDs and cancer: an overview with a note on whether NO is required for their action." *Nitric Oxide* **19**(2): 199-204.
- Rinalducci, S., L. Murgiano, et al. (2008). "Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants." *J Exp Bot* **59**(14): 3781-3801.
- Riobo, N. A., E. Clementi, et al. (2001). "Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH:ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation." *Biochem J* **359**(Pt 1): 139-145.
- Ristow, M. (2006). "Oxidative metabolism in cancer growth." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **9**(4): 339-345.
- Romero-Ruiz, A., M. Carrascal, et al. (2006). "Utility of proteomics to assess pollutant response of clams from the Donana bank of Guadalquivir Estuary (SW Spain)." *Proteomics* **6 Suppl 1**: S245-255.
- Ronco, M. T., L. Alvarez Mde, et al. (2004). "Role of nitric oxide increase on induced programmed cell death during early stages of rat liver regeneration." *Biochim Biophys Acta* **1690**(1): 70-76.
- Rutter, J., D. R. Winge, et al. (2010). "Succinate dehydrogenase - Assembly, regulation and role in human disease." *Mitochondrion* **10**(4): 393-401.
- Saelens, X., N. Festjens, et al. (2004). "Toxic proteins released from mitochondria in cell death." *Oncogene* **23**(16): 2861-2874.
- Salazar, M., A. Carracedo, et al. (2009). "Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells." *J Clin Invest* **119**(5): 1359-1372.
- Sarti, P., E. Forte, et al. (2012). "Cytochrome c oxidase and nitric oxide in action: molecular mechanisms and pathophysiological implications." *Biochim Biophys Acta* **1817**(4): 610-619.
- Satoh, M. and T. Kuroiwa (1991). "Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell." *Exp Cell Res* **196**(1): 137-140.
- Sazanov, L. A., S. Y. Peak-Chew, et al. (2000). "Resolution of the membrane domain of bovine complex I into subcomplexes: implications for the structural organization of the enzyme." *Biochemistry* **39**(24): 7229-7235.
- Scaduto, R. C., Jr. and L. W. Grotyohann (1999). "Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives." *Biophys J* **76**(1 Pt 1): 469-477.
- Scaffidi, C., S. Fulda, et al. (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." *EMBO J* **17**(6): 1675-1687.
- Schreiber, E., P. Matthias, et al. (1989). "Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells." *Nucleic Acids Res* **17**(15): 6419.
- Schwartz, R. E. and C. Verfaillie (2010). "Hepatic stem cells." *Methods Mol Biol* **640**: 167-179.
- Schwartzman, R. A. and J. A. Cidlowski (1993). "Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death." *Endocr Rev* **14**(2): 133-151.
- Sellinger, M., C. Barrett, et al. (1990). "Cryptic Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat liver canalicular plasma membranes: evidence for its basolateral origin." *Hepatology* **11**(2): 223-229.
- Sen, N., M. R. Hara, et al. (2008). "Nitric oxide-induced nuclear GAPDH activates p300/CBP and mediates apoptosis." *Nat Cell Biol* **10**(7): 866-873.
- Shimizu, S., M. Narita, et al. (1999). "Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC." *Nature* **399**(6735): 483-487.

- Siegel, R. M., J. K. Frederiksen, et al. (2000). "Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations." *Science* **288**(5475): 2354-2357.
- Siegel, R. M., J. R. Muppidi, et al. (2004). "SPOTS: signaling protein oligomeric transduction structures are early mediators of death receptor-induced apoptosis at the plasma membrane." *J Cell Biol* **167**(4): 735-744.
- Siendones, E., D. Fouad, et al. (2004). "PGE1-induced NO reduces apoptosis by D-galactosamine through attenuation of NF-kappaB and NOS-2 expression in rat hepatocytes." *Hepatology* **40**(6): 1295-1303.
- Simpson, D. A., S. Feeney, et al. (2000). "Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR." *Mol Vis* **6**: 178-183.
- Smeitink, J. A., M. Zeviani, et al. (2006). "Mitochondrial medicine: a metabolic perspective on the pathology of oxidative phosphorylation disorders." *Cell Metab* **3**(1): 9-13.
- Smith, C. A., T. Farrah, et al. (1994). "The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death." *Cell* **76**(6): 959-962.
- Song, M. O., J. Li, et al. (2009). "Physiological and toxicological transcriptome changes in HepG2 cells exposed to copper." *Physiol Genomics* **38**(3): 386-401.
- Sprick, M. R., E. Rieser, et al. (2002). "Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8." *EMBO J* **21**(17): 4520-4530.
- Stier, H., H. D. Fahimi, et al. (1998). "Maturation of peroxisomes in differentiating human hepatoblastoma cells (HepG2): possible involvement of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha)." *Differentiation* **64**(1): 55-66.
- Stock, D., A. G. Leslie, et al. (1999). "Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase." *Science* **286**(5445): 1700-1705.
- Stone, J. R. and M. A. Marletta (1994). "Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states." *Biochemistry* **33**(18): 5636-5640.
- Stuehr, D. J., S. S. Gross, et al. (1989). "Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide." *J Exp Med* **169**(3): 1011-1020.
- Sun, F., X. Huo, et al. (2005). "Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II." *Cell* **121**(7): 1043-1057.
- Sun, H. N., S. U. Kim, et al. (2010). "Microglial peroxiredoxin V acts as an inducible anti-inflammatory antioxidant through cooperation with redox signaling cascades." *J Neurochem* **114**(1): 39-50.
- Taysi, S., C. Uslu, et al. (2003). "Malondialdehyde and nitric oxide levels in the plasma of patients with advanced laryngeal cancer." *Surg Today* **33**(9): 651-654.
- Tengan, C. H. and C. T. Moraes (2017). "NO control of mitochondrial function in normal and transformed cells." *Biochim Biophys Acta*.
- Thannickal, V. J. and B. L. Fanburg (2000). "Reactive oxygen species in cell signaling." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**(6): L1005-1028.
- Thomas, D. D., J. L. Heinecke, et al. (2015). "Signaling and stress: The redox landscape in NOS2 biology." *Free Radic Biol Med* **87**: 204-225.
- Timmer, T., E. G. de Vries, et al. (2002). "Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application?" *J Pathol* **196**(2): 125-134.
- Tozer, G. M., V. E. Prise, et al. (1997). "Inhibition of nitric oxide synthase induces a selective reduction in tumor blood flow that is reversible with L-arginine." *Cancer Res* **57**(5): 948-955.
- Tran, S. E., T. H. Holmstrom, et al. (2001). "MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors." *J Biol Chem* **276**(19): 16484-16490.
- Trauth, B. C., C. Klas, et al. (1989). "Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis." *Science* **245**(4915): 301-305.
- Turrens, J. F. (2003). "Mitochondrial formation of reactive oxygen species." *J Physiol* **552**(Pt 2): 335-344.

Bibliografía

- Valko, M., K. Jomova, et al. (2016). "Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease." *Arch Toxicol* **90**(1): 1-37.
- Valko, M., C. J. Rhodes, et al. (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." *Chem Biol Interact* **160**(1): 1-40.
- Vaux, D. L. and A. Strasser (1996). "The molecular biology of apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(6): 2239-2244.
- Verhagen, A. M., P. G. Ekert, et al. (2000). "Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins." *Cell* **102**(1): 43-53.
- Vogt, M., M. K. Bauer, et al. (1998). "Oxidative stress and hypoxia/reoxygenation trigger CD95 (APO-1/Fas) ligand expression in microglial cells." *FEBS Lett* **429**(1): 67-72.
- Wiley, J. W. (2007). "The many faces of nitric oxide: cytotoxic, cytoprotective or both." *Neurogastroenterol Motil* **19**(7): 541-544.
- Williams, E. L. and M. B. Djamgoz (2005). "Nitric oxide and metastatic cell behaviour." *Bioessays* **27**(12): 1228-1238.
- Wink, D. A., Y. Vodovotz, et al. (1998). "The multifaceted roles of nitric oxide in cancer." *Carcinogenesis* **19**(5): 711-721.
- Wong-Ekkabut, J., Z. Xu, et al. (2007). "Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study." *Biophys J* **93**(12): 4225-4236.
- Wong, I. H., W. Y. Lau, et al. (2000). "Quantitative comparison of alpha-fetoprotein and albumin mRNA levels in hepatocellular carcinoma/adenoma, non-tumor liver and blood: implications in cancer detection and monitoring." *Cancer Lett* **156**(2): 141-149.
- Wood, Z. A., E. Schroder, et al. (2003). "Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins." *Trends Biochem Sci* **28**(1): 32-40.
- Wooten, M. W., X. Hu, et al. (2006). "Signaling, polyubiquitination, trafficking, and inclusions: sequestosome 1/p62's role in neurodegenerative disease." *J Biomed Biotechnol* **2006**(3): 62079.
- Wu, G. S., P. Saftig, et al. (1998). "Potential role for cathepsin D in p53-dependent tumor suppression and chemosensitivity." *Oncogene* **16**(17): 2177-2183.
- Wurm, C. A. and S. Jakobs (2006). "Differential protein distributions define two sub-compartments of the mitochondrial inner membrane in yeast." *FEBS Lett* **580**(24): 5628-5634.
- Xie, K., Z. Dong, et al. (1996). "Activation of nitric oxide synthase gene for inhibition of cancer metastasis." *J Leukoc Biol* **59**(6): 797-803.
- Xie, K., S. Huang, et al. (1995). "Transfection with the inducible nitric oxide synthase gene suppresses tumorigenicity and abrogates metastasis by K-1735 murine melanoma cells." *J Exp Med* **181**(4): 1333-1343.
- Xu, W., L. Liu, et al. (2002). "Microencapsulated iNOS-expressing cells cause tumor suppression in mice." *FASEB J* **16**(2): 213-215.
- Yonehara, S., A. Ishii, et al. (1989). "A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor." *J Exp Med* **169**(5): 1747-1756.
- Zaffagnini, M., S. Morisse, et al. (2013). "Mechanisms of nitrosylation and denitrosylation of cytoplasmic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*." *J Biol Chem* **288**(31): 22777-22789.
- Zamzami, N. and G. Kroemer (2001). "The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(1): 67-71.
- Zaobornyj, T. and P. Ghafourifar (2012). "Strategic localization of heart mitochondrial NOS: a review of the evidence." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **303**(11): H1283-1293.
- Zaragoza, R., L. Torres, et al. (2009). "Nitration of cathepsin D enhances its proteolytic activity during mammary gland remodelling after lactation." *Biochem J* **419**(2): 279-288.
- Zhao, M., F. Antunes, et al. (2003). "Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis." *Eur J Biochem* **270**(18): 3778-3786.
- Zick, M., R. Rabl, et al. (2009). "Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria." *Biochim Biophys Acta* **1793**(1): 5-19.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamcr

Sensitivity to anti-Fas is independent of increased cathepsin D activity and adrenodoxin reductase expression occurring in NOS-3 overexpressing HepG2 cells



Clara I. Linares^a, Gustavo Ferrín^{a,*}, Patricia Aguilar-Melero^a, Sandra González-Rubio^a, Manuel Rodríguez-Perálvarez^a, María Sánchez-Aragó^b, Eduardo Chicano-Gálvez^a, José M. Cuezva^b, José L. Montero-Álvarez^a, Jordi Muntané^{a,2}, Manuel de la Mata^{a,1}

^a Unidad de Gestión Clínica de Aparato Digestivo, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC)/Hospital Universitario Reina Sofía/Universidad de Córdoba, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Córdoba, Spain

^b Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Centro de Investigación Hospital 12 de Octubre, ISCIII, Universidad Autónoma, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 December 2014

Received in revised form 13 February 2015

Accepted 15 February 2015

Available online 21 February 2015

Keywords:

Endothelial nitric oxide synthase

Hepatocarcinoma

Adrenodoxin reductase

Cathepsin D

Nitro-oxidative stress

Fas-mediated apoptosis

ABSTRACT

Stable overexpression of endothelial nitric oxide synthase (NOS-3) in HepG2 cells (4TO-NOS) leads to increased nitro-oxidative stress and upregulation of the cell death mediators p53 and Fas. Thus, NOS-3 overexpression has been suggested as a useful antiproliferative mechanism in hepatocarcinoma cells. We aimed to identify the underlying mechanism of cell death induced by NOS-3 overexpression at basal conditions and with anti-Fas treatment. The intracellular localization of NOS-3, the nitro-oxidative stress and the mitochondrial activity were analysed. In addition, the protein expression profile in 4TO-NOS was screened for differentially expressed proteins potentially involved in the induction of apoptosis. NOS-3 localization in the mitochondrial outer membrane was not associated with changes in the respiratory cellular capacity, but was related to the mitochondrial biogenesis increase and with a higher protein expression of mitochondrial complex IV. Nitro-oxidative stress and cell death in NOS-3 overexpressing cells occurred with the expression increase of pro-apoptotic genes and a higher expression/activity of the enzymes adrenodoxin reductase mitochondrial (AR) and cathepsin D (CatD). CatD overexpression in 4TO-NOS was related to the apoptosis induction independently of its catalytic activity. In addition, CatD activity inhibition by pepstatin A was not effective in blocking apoptosis induced by anti-Fas. In summary, NOS-3 overexpression resulted in an increased sensitivity to anti-Fas induced cell death, independently of AR expression and CatD activity.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nitric oxide (NO) is a lipophilic, highly diffusible and short-lived physiological messenger, which regulates a variety of important biological processes such as vasodilation, respiration, cell migration, immune response and apoptosis. NO is produced within cells by nitric oxide synthase (NOS) using L-arginine as substrate, resulting in the formation of L-citrulline and the end products of NO oxidation, nitrite and nitrate [1]. There are three isoforms of NOS: neuronal (nNOS or NOS-1), inducible (iNOS or NOS-2) and endothelial (eNOS or NOS-3). All of them share similar structures and catalytic modes, but they show different mechanisms regulating their expression and activities [2]. In addition, a new NOS isoform was found in the mitochondria, but whether it corresponds to one of the known isoforms is a matter of discussion [3–5].

The expression of NOS isoforms, including those constitutively expressed, may be triggered by different stimuli and in a tissue-dependent manner. In the liver, NO can be synthesized by the activity of any of the NOS isoforms [6], but its role is an issue of debate. NO is

Abbreviations: NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; NOS-3, endothelial NOS or type 3; 4TO-NOS, cell line with stable overexpression of NOS-3; 4TO, control cell line; L-NAME, No-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride; MTCO2, cytochrome c oxidase subunit II; TOM40, translocase of outer mitochondrial membrane 40 homolog; MMP, mitochondrial membrane potential; TMR, tetramethyl-rhodamine methyl ester; RNS, reactive nitrogen species; ROS, reactive oxygen species; DCFDA, 2,7-dichlorofluorescein diacetate; DHE, dihydroethidium; mtDNA, mitochondrial DNA; cyt c, cytochrome c; IEF, isoelectrofocusing; 2-DE, two dimensional electrophoresis; SOD, superoxide dismutase; GPX, glutathione peroxidase; GSS, glutathione synthetase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; PRDX, thioredoxin-dependent peroxide reductase; AR, adrenodoxin reductase; NADPH, adrenodoxin oxidoreductase mitochondrial; CatD, cathepsin D; HSP60, heat shock protein 60; PDI, protein disulfide isomerase; OXPHOS, oxidative phosphorylation

* Corresponding author at: Instituto Maimónides de Investigación Biomédica en Córdoba (IMIBIC), Hospital Universitario Reina Sofía, Avda. Menéndez Pidal s/n. 14004, Córdoba, Spain. Tel.: +34 957213808; fax: +34 957010452.

E-mail address: gusfesa@gmail.com (G. Ferrín).

¹ These two authors have contributed equally to the study.

² Present address: Department of General Surgery, Hospital Universitario Virgen del Rocío-Virgen Macarena/IBIS/CSIC/Universidad de Sevilla, Seville, Spain.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.02.015>

0167-4889/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

a mediator of liver injury, but also able to protect against hepatocellular damage, depending on factors such as its concentration or the generating source. Furthermore, the liver expression of NOS isoforms and the NO production have been related to cancer development through pro-/anti-apoptotic activities. NOS-3 may be overexpressed in different types of tumours, and may modulate several cancer-related events such as angiogenesis, apoptosis, cell cycle, invasion or metastasis [1]. By contrast, NOS-3 activation has also been associated with the inhibition of growth and proliferation of hepatoma cells [7]. The molecular mechanism by which NO exerts this antitumoural activity has been related to the inhibition of the mitochondrial electron transport chain and to the induction of nitro-oxidative stress [8,9].

We have previously reported that the NOS-3 overexpression in a hepatocarcinoma cell line is related to apoptosis induced by nitro-oxidative stress and up-regulation of p53 oncoprotein and cell death receptor Fas (or CD95) [10]. Furthermore, the pharmacological modulation of the Fas/Fas ligand (FasL or CD95L) signalling machinery has been suggested as a useful therapeutic strategy, but caution is warranted because administration of agonistic Fas-specific antibodies [11] or FasL [12] causes extensive hepatocyte apoptosis and fatal hepatitis in mice. The increase of Fas-mediated apoptosis may be a promising anticancer therapy in liver disease [10]. In addition, NO-donor molecules have shown antitumoural properties *in vitro* and *in vivo* [10,13].

In this study, we aimed to investigate the mechanism by which the stable overexpression of NOS-3 induces cell death in the hepatocarcinoma cell line HepG2, both in basal conditions and with anti-Fas treatment.

2. Material and methods

2.1. NOS-3 overexpression and culture conditions

The cell line with stable overexpression of NOS-3 (4TO-NOS) and its corresponding control cell line (4TO) were obtained and maintained as described elsewhere [14,10]. The cell culture medium was supplemented with 2.5 mM L-arginine to ensure the NOS substrate availability. Cells were seeded to a confluence of 150,000 cells/cm², and the measurements were carried out after 48 h. The cell death-inducing agent anti-Fas (Anti-Human Fas or CD95; 0.5 µg/ml, MBL, Nagoya, Japan) was administered 48 h after seeding the cells. Cells were collected 2 h later. The cell-permeable NOS inhibitor N^ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME; 5 mM, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) and the cathepsin D inhibitor pepstatin A (20 µM or 50 µM; Santa Cruz Biotechnology, California, USA) were added to the culture medium 24 h after seeding the cells.

2.2. NOS-3 subcellular distribution

For western blot localization analysis, the mitochondrial fraction was isolated by ultracentrifugation in a discontinuous sucrose gradient performed with 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 and 1.6 M sucrose concentrations in 2 mM HEPES buffer pH 7.4. This method allows for an efficient purification of the mitochondrial fraction and minor contamination with endoplasmic reticulum [15]. Then, mitochondria were subjected to enzymatic digestion with trypsin (6 or 20 µg/100 µg protein) or proteinase-K (10 or 40 µg/100 µg protein). 10 µg of protein was separated by SDS-PAGE, electroblotted onto nitrocellulose membrane, and sequentially probed with specific antibodies against MTCO2 (a protein from the inner mitochondrial membrane) (Life Technologies), translocase of outer mitochondrial membrane 40 homolog (TOM40) and NOS-3 (Santa Cruz Biotechnology). The cellular localization of the NOS-3 protein was additionally assessed by using a confocal microscope (LSM 5 Exciter) and a confocal imaging system (ZEN 2008, Carl Zeiss, Jena, Germany). Cells were fixed and incubated with the primary antibodies anti-NOS-3 (Santa Cruz Biotechnology) and anti-MTCO2 (Abcam, Cambridge, UK). Secondary conjugated antibodies were Alexa

Fluor 488 and 594 (Life Technologies, California, USA). The specificity of the immunoreactivity was verified by incubating cells without the primary antibodies. ImageJ software was used to assess the mitochondrial localization of NOS-3 (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

2.3. Oxygen consumption

O₂ consumption determinations in intact cells or in digitonin-permeabilized cells were carried out in an oxygraph with a Clark electrode (Hansatech Instruments, Norfolk, UK) [16]. Briefly, 5 × 10⁶ cells were trypsinized, counted and resuspended in culture medium or respiration buffer (10 mM MgCl₂, 250 mM Sucrose, 20 mM HEPES pH 7.4, 1 mM ADP, 2 mM KH₂PO₄), respectively. Oxygen consumption was measured at 37 °C with stirring. 6.25 µM FCCP was used to uncouple respiration in intact cells. For polarographic measurements, cells were permeabilized with 1% digitonin (1.2 µl/10⁶ cells) and the oxygen consumption was recorded after the addition of substrates and inhibitors for complex I (5 mM Glutamate plus Malate, 2 µM Rotenone), complex II + III (5 mM Succinate plus Glyceraldehyde-3-P, 0.1 µM Antimycin A) and complex IV (1.2 mM TMPD, 6 mM KCN).

2.4. Mitochondrial membrane potential

The mitochondrial membrane potential (MMP) was monitored by using the potential-sensitive fluorescent probe tetramethylrhodamine methyl ester (TMR) (Life Technologies). Briefly, cells were washed with PBS and further incubated with 10 µM TMR for 20 min. The registration of the measurement was started with the addition of 5 mM glucose. The fluorescence emitted by TMR (λ_{ex} = 550 nm, λ_{em} = 570 nm) was detected *in situ* using a GENios Microplate Reader (TECAN, Männedorf, Switzerland).

2.5. Quantitative analysis of protein nitration

The quantification of protein nitration as a measurement of reactive nitrogen species (RNS) was determined in the mitochondrial fraction by western blot. The post-translational modification 3-nitrotyrosine was used for this purpose. The protein samples were separated by SDS-PAGE in non-reducing conditions, transferred to nitrocellulose membrane, and probed with an anti-3-nitrotyrosine primary antibody (Sigma-Aldrich) [10]. The data from the densitometry analysis of the 55 kDa protein band were normalized to a total protein value of 10 µg.

2.6. Nitric oxide production

NO production was determined by the Griess reaction as we previously described [14]. NO-related end products nitrates and nitrites were quantified in the cell culture medium 2 h after anti-Fas administration. Nitrite concentrations were accurately determined by a nitrite calibration curve.

2.7. Determination of mitochondrial reactive oxygen species

Cellular reactive oxygen species (ROS) were detected by using the fluorescent probes 2,7-dichlorofluorescein-diacetate (DCFDA) and dihydroethidium (DHE) (Life Technologies). The cells were washed and then incubated with 10 µM DCFDA or 5 µM DHE for 20 min or 10 min, respectively. Measurements were initiated by the addition of 5 mM glucose. The fluorescence emitted by DHE (λ_{ex} = 510 nm, λ_{em} = 590 nm) and DCFDA (λ_{ex} = 500 nm, λ_{em} = 520 nm) was assessed *in situ* using a microplate reader. DHE was not used with L-NAME because the NOS inhibitor appeared to interact with the probe (data not shown).

2.8. Gene expression analysis and mitochondrial DNA copy number quantification

The expression analysis of the antioxidant and pro-apoptotic genes was determined by RT-qPCR using a LightCycler 480 System (Roche, Basel, Switzerland) and the One-Step QuantiTect SYBR-Green Kit (Qiagen, Limburg, Netherlands). Total cellular RNA was extracted by using TRIreagent (Biolin, London, UK), treated with RNase-Free DNase (Promega, Wisconsin, USA), and used as template for mRNA amplification with specific human oligodeoxynucleotides designed by Primer3 software (v.0.4.0). The expression of ribosomal protein L13A (RPL13A) was used as a reference gene. The primer sequences and positions into the cDNA are summarized in Table 1. The RNA concentration and its integrity were confirmed by standard procedures. The PCR reaction was performed in duplicate, by adjusting the annealing temperature to 60 °C and in a final volume of 10 µl.

The mitochondrial DNA (mtDNA) quantification was also performed by RT-qPCR with the ThermOne™ RT-PCR Premix (RBC, Taipei, Taiwan). The total cellular DNA extracted using standard procedures was used as template and was amplified with specific oligodeoxynucleotides for MTCO2 and succinate dehydrogenase subunit A (SDHA), as previously reported [17]. MtDNA copy number per cell was calculated using SDHA amplification as a reference for nuclear DNA content.

2.9. Mitochondrial protein expression analysis

Expression analysis for mitochondrial proteins from respiratory complexes was assessed by western blot. 40 µg from the total cellular proteins was separated by SDS-PAGE, then transferred to nitrocellulose membrane, and finally probed with primary antibodies anti-NDUFB6 (complex I), anti-SDHB (complex II), anti-UQCRC2 (complex III) and anti-MTCO2 (complex IV), respectively (Life Technologies). The densitometry analysis of the lines after Ponceau S staining was used as protein-loading control.

Table 1
List of human primers used for RT-qPCR.

Primer	Gene	Position	Sequence (5' to 3')
GPx1-qF	GPX1	301–320	TGGCTTCCCGTGAACACG
GPx1-qR	NM_000581.2	420–440	CGCACCGTTCACCTCGACIT
GPx4-qF	GPX4	403–422	CCTTCCCGTGAACACGATTC
GPx4-qR	NM_002085.3	587–609	ACTTGGTGAAGTTCACCTTGATG
Cat-qF	CAT	1028–1053	TGGTAACTGGTCTTAAACCGGAATC
Cat-qR	NM_001752.3	1159–1179	GGCGGTGAGTGTGAGGATAGG
Sod1-qF	SOD1	430–451	TGTGGCGATGTGTCTATTGAA
Sod1-qR	NM_000454.4	519–539	CACCTTTGCCCAAGTCATCTG
Sod2-qF	SOD2	708–728	GGGAGCAGCTTACTACTCTC
Sod2-qR	NM_001024465.1	845–867	TCTTGTGGGATCATTAGGGTAT
GSS-qF	GSS	286–308	AGATGGACTCAACCTGCTAGTG
GSS-qR	NM_000178.2	374–395	GTCAAAGAGACGAGCGGTAAG
ApaF1-qF	APAF-1	3105–3128	TGGCAGTGGTGTCTTGTCCCACT
ApaF1-qR	NM_013229.2	3190–3219	GGAGAAAACATCACACCATGAACC CAACTT
Bax-qF	BAX	229–251	GCGTCCACCAAGAAGCTGAGCGA
Bax-qR	NM_138764.4	401–424	TGCTGGCAAAGTAGAAAAGGGCGA
Biik-qF	BIK	96–118	CTTGATGAGACCTCTGTATG
Biik-qR	NM_001197.4	166–186	AGGGTCCAGCTCTCTCAGA
Rpl13A-qF	RPL13A	541–563	CCTGGAGGAGAGAGGAAAAGAGA
Rpl13A-qR	NM_012423.3	642–666	TTGAGCACCTCTGTATTGTCAA

GPX1, Glutathione peroxidase-1; GPX4, Glutathione peroxidase-4; Cat, Catalase; SOD-1, Cu/Zn-Superoxide dismutase; SOD-2, Mn-Superoxide dismutase; GSS, Glutathione synthetase; APAF-1, Apoptotic peptidase activating factor 1; BAX, BCL2-associated X protein; BIK, Bcl-2-interacting killer; RPL13A, Ribosomal protein L13A. Primers were designed using Primer3 software (v.0.4.0).

2.10. Cell death analysis

Cell death was assessed in cell lysates by the release of cytochrome c (cyt c) from the mitochondria, and by the caspase-9 and caspase-3 enzyme activity. The cytoplasmic cyt c release was determined by western blot analysis by using the anti-cyt c primary antibody (Santa Cruz Biotechnology) and anti-β-actin (Abcam) as protein-loading control. Caspase-9/-3 activities were spectrophotometrically measured as previously reported [10].

2.11. Protein expression profiling by two dimensional electrophoresis

Protein samples were obtained in 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.5 M Sucrose, 0.15 M KCl, 10 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotinin, 10 mg/ml PMSF and 20 mM DTT supplemented with the commercial Mini EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche). Proteins were quantified by the Bradford assay and 300 µg of total cellular proteins was used in each isoelectrofocusing (IEF) strip (18 cm ReadyStrip™ IPG Strips pH 3–10 nonlinear). The IEF program and the two dimensional electrophoresis (2-DE) conditions were performed as detailed in [14]. Gels from 2-DE were stained with SYPRO Ruby and further digitalized with the FX ProPlus Multiimager. The analysis of the differential intensity spot and the spot volume, normalized by the total density in gels, was quantified by using the PDQuest software (v.8.0.1) (Bio-Rad Laboratories, California, USA). Protein samples from four independent experiments were run in triplicate.

2.12. Identification of differentially expressed proteins

Differentially expressed protein spots were excised from the preparative 2-D gel by using a ProPic workstation (Genomic Solutions Inc., Michigan, USA), digested with trypsin, and subjected to MALDI-TOF analysis in the UCO-SCAI proteomics facility (Córdoba, Spain). Carlos III Networked Proteomics Platform, ProteoRed-ISCI [14]. The confirmation of the results was performed by western blot, using 5 µg of total cellular proteins and the primary antibodies anti-HSP60, anti-PDI, anti-ADX Reductase and anti-PRDX3 (Santa Cruz Biotechnology).

2.13. Cathepsin D activity assay

Cathepsin D activity was measured in cell lysates with the use of a commercial assay kit (Abcam) following the manufacturer recommendations. Data were normalised by the cell number, which was assessed immediately before the enzyme activity measurement.

2.14. Statistical analysis

Results were expressed as mean ± standard error. Data were compared using the non-parametric method Kruskal–Wallis and the Mann–Whitney's U test, searching for differences between groups (n < 30). All tests and calculations were done with the statistical package SPSS 15.0 for Windows (IBM). Statistical difference was set at p ≤ 0.05. * Indicates statistically significant differences between cell lines for a same condition. # Indicates statistically significant differences between conditions (anti-Fas or L-NAME vs. basal; + L-NAME vs. anti-Fas) for a same cell line.

3. Results

3.1. NOS-3 localizes in the mitochondrion outer membrane

The western blot analysis of NOS-3 in different subcellular fractions showed an expression of the protein in membranes, cytoplasm and mitochondria from 4TO-NOS cells (Fig. 1A). In addition, enzymatic treatment of intact mitochondria with trypsin and proteinase-K efficiently removed NOS-3 and TOM40 from mitochondria, but not

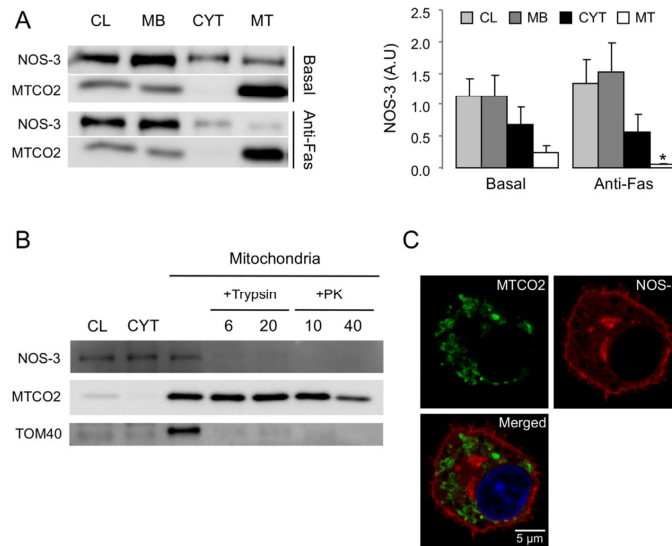


Fig. 1. NOS-3 localization in 4TO-NOS cells. (A) Subcellular localization of NOS-3 in 4TO-NOS. Effect of anti-Fas administration on the mitochondrial localization of NOS-3 ($n = 3$). Densitometry of the lines corresponding to mitochondrial NOS-3 is shown. MTCO2 signal was used as loading control for cell lysate (CL), membrane fraction (MB) and mitochondrial fraction (MT). NOS-3 signal in cytoplasm (CYT) was referred to the protein load. (B) Mitochondrial localization of NOS-3 assessed by western blot. Mitochondrial fraction was subjected to enzymatic digestion with trypsin (6 or 20 $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ protein) or proteinase-K (PK, 10 or 40 $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ protein). (C) NOS-3 cellular localization by confocal microscopy. Green: MTCO2 protein. Red: NOS-3 protein. Blue: DAPI. Statistically significant differences between cell lines* or between treatments* are marked.

MTCOII since the proteases cannot access inner membrane proteins (Fig. 1B). The confocal immunofluorescence study showed that NOS-3 was primarily localized in the plasma membrane and in the cellular cytoplasm of the NOS-3-overexpressing cells (Fig. 1C). The mitochondrial localization of NOS-3 was not confirmed by this approach.

In order to assess the effect of anti-Fas on the subcellular distribution of NOS-3 and cell death susceptibility, we studied the mitochondrial localization of the protein in the presence of the apoptosis inducer. As shown in Fig. 1A, anti-Fas had a trend to an increased expression in 4TO-NOS, which coincided with a reduced localization of the protein in the mitochondrial fraction (0.24 vs. 0.06, $p = 0.021$).

3.2. Stable overexpression of NOS-3 does not affect the cell respiratory capacity

In order to evaluate the role of NOS-3 overexpression on cellular respiration, we analysed oxygen consumption associated with mitochondrial complexes I (CI), II + III (CII + III) and IV (CIV) in the 4TO-NOS cell line. As shown in Fig. 2, NOS-3 overexpression was related to a subtle increase in respiratory activity of CII + III (119%, $p = 0.024$), without affecting oxygen consumption dependent of CI and CIV (Fig. 2A). This resulted in a non-significant increase of the endogenous cellular respiratory capacity (Fig. 2B) and in a higher MMP (129%, $p = 0.004$) (Fig. 2C). When the cell-permeable NOS inhibitor L-NAME was added to the cell culture medium, an increase in oxygen consumption dependent on CI and CII + III, in both 4TO (166% $p = 0.014$ and 118% $p = 0.033$, respectively) and 4TO-NOS cell line (154% $p = 0.025$ and 138% $p = 0.052$, respectively) was observed (Fig. 2A). The induction of apoptosis by anti-Fas led to a statistically significant decrease in oxygen consumption mostly due to 30% loss of CI activity ($p = 0.011$), and reduced the endogenous respiratory capacity (5.4 vs. 6.3, $p = 0.050$) and maximum respiratory capacity (10.1 vs. 12.9, $p = 0.050$) in

4TO-NOS when compared to 4TO cells (Fig. 2A and B). The simultaneous administration of anti-Fas and L-NAME had a similar effect on oxygen consumption as that caused by the sole addition of L-NAME on 4TO cells. By contrast, in 4TO-NOS, L-NAME inhibited the effect of anti-Fas on the mitochondrial CI ($p = 0.053$). The oxygen consumption increase induced by L-NAME in the presence of anti-FAS was paralleled by MMP increase in the two cell lines.

3.3. Nitro-oxidative stress and mtDNA copy number are enhanced in 4TO-NOS

The mitochondrial localization of NOS-3 in 4TO-NOS cells was associated with increased levels of tyrosine nitration of mitochondrial proteins (85.48 vs. 35.81, $p = 0.050$), which translates the production of RNS (Fig. 3A). In addition, NOS-3 overexpressing cells accumulated a higher concentration of nitric oxide end products in the cell culture medium (Fig. 3B), and showed a general ROS production increase (168%, $p < 0.001$ for DCF; 149%, $p = 0.048$ for DHE) (Fig. 3C) and an up-regulation of antioxidant genes encoding for proteins superoxide dismutase (SOD)-1 (154%, $p = 0.032$), SOD-2 (210%, $p = 0.019$), catalase (149%, $p = 0.021$), glutathione peroxidase (GPX)-1 (235%, $p = 0.032$), GPX-4 (155%, $p = 0.032$) and glutathione synthetase (GSS) (167%, $p = 0.034$) (Fig. 3D). The administration of L-NAME did not reduce oxidative stress in 4TO-NOS (Fig. 3C), but caused a reduction of mitochondrial protein nitration (Fig. 3A) and a lower accumulation of nitrates and nitrites in the cell culture medium (Fig. 3B), which balanced the observed differences between 4TO-NOS and the control cell line 4TO. The nitro-oxidative stress related to NOS-3 overexpression was associated with an increased mtDNA copy number (148%, $p < 0.001$) (Fig. 3E) and with a higher protein expression of mitochondrial CIV (163%, $p = 0.019$) (Fig. 3F).

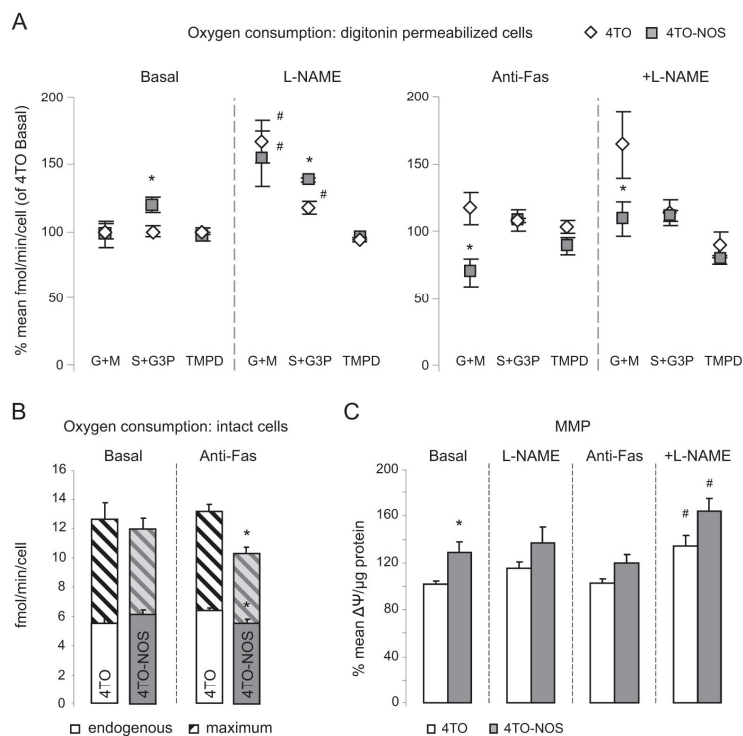


Fig. 2. Oxidative phosphorylation system performance in 4TO-NOS cells. (A) Oxygen consumption of digitonin permeabilized cells in the presence of electron donors for complex I (Glutamate + Malate, G + M), complex II + III (Succinate + G3P, S + G3P) and complex IV (TMPD) (at basal condition: n = 9; with anti-Fas: n = 6 and n = 8 for 4TO and 4TO-NOS cells, respectively; with L-NAME: n = 3; with anti-Fas plus L-NAME: n = 3). (B) Oxygen consumption rate in intact cells (at basal condition: n = 5 and n = 4 for 4TO and 4TO-NOS, respectively; with anti-Fas: n = 3). (C) Mitochondrial membrane potential (n = 7). +L-NAME indicates treatment with anti-Fas plus L-NAME. Data are mean \pm SEM. Statistically significant differences between cell lines* or between treatments# are marked.

Anti-Fas led to the accumulation of nitrates and nitrites in the cell culture medium of 4TO-NOS cells (1.25 vs. 4.12, $p = 0.034$) (Fig. 3B). In addition, anti-Fas induced the antioxidant gene expression in 4TO cells, but it had no additional effect on gene expression and oxidative stress in the 4TO-NOS cell line (Fig. 3C and D).

3.4. NOS-3 overexpression increases susceptibility to anti-Fas-induced cell death

As shown in Fig. 4A, NOS-3 overexpression was associated with an increased expression of pro-apoptotic genes Bax (164%, $p = 0.003$), Bik (354%, $p = 0.002$) and Apaf-1 (168%, $p = 0.002$) at basal conditions. This coincided with a higher localization of cyt c in the cytoplasm (168%, $p = 0.019$), and the increase of caspase-9 (124%, $p = 0.047$) and caspase-3 (166%, $p = 0.011$) associated activities (Fig. 4B and C). The administration of anti-Fas stimulated Bik expression in 4TO (146%, $p = 0.010$) and 4TO-NOS cells (563%, $p = 0.007$), without affecting Bax or Apaf-1. In addition, anti-Fas caused an increase in the caspase-3 activity in both cell lines (153% and 318%, respectively; $p < 0.050$), as well as a higher caspase-9 activity only in 4TO-NOS (229%, $p = 0.034$). There were no significant differences in the release of cyt c after incubation with anti-Fas.

3.5. Comparative proteomic profile of the 4TO-NOS cell line

The proteomic profile of 4TO-NOS cells was analysed and further compared to that of the control cell line 4TO, searching for differentially expressed proteins that could be involved in the process of ROS production and cell death observed at basal condition. The quantitative analysis of the gels yielded 110 spots with significantly altered expression. 56 of these spots were identified by mass spectrometry as 42 different proteins. The location of these spots in the master gel is shown in Fig. 5A. Supplementary Fig. 1 shows a representative 2-D gel for each condition. Differentially expressed proteins have been classified according to their main biological functions (Table 2). Differences in proteins involved in metabolism (11), cytoskeleton (2), RNA processing (5), protein processing (8), protein degradation (6) and redox homeostasis (10) were found. NOS-3 overexpression mainly affected the expression of proteins involved in metabolism (8) and redox system (8). Among the metabolic proteins, three were up-regulated proteins (+) involved in the β -oxidation and glycolysis processes: medium and short-chain-specific acyl-CoA dehydrogenases (+5.4/+2.8, respectively) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; +2.3). In the second largest group of proteins deregulated by NOS-3 overexpression, we found over-expression of proteins in both the cell anti-oxidant system and the pro-oxidant system: thioredoxin-dependent peroxide

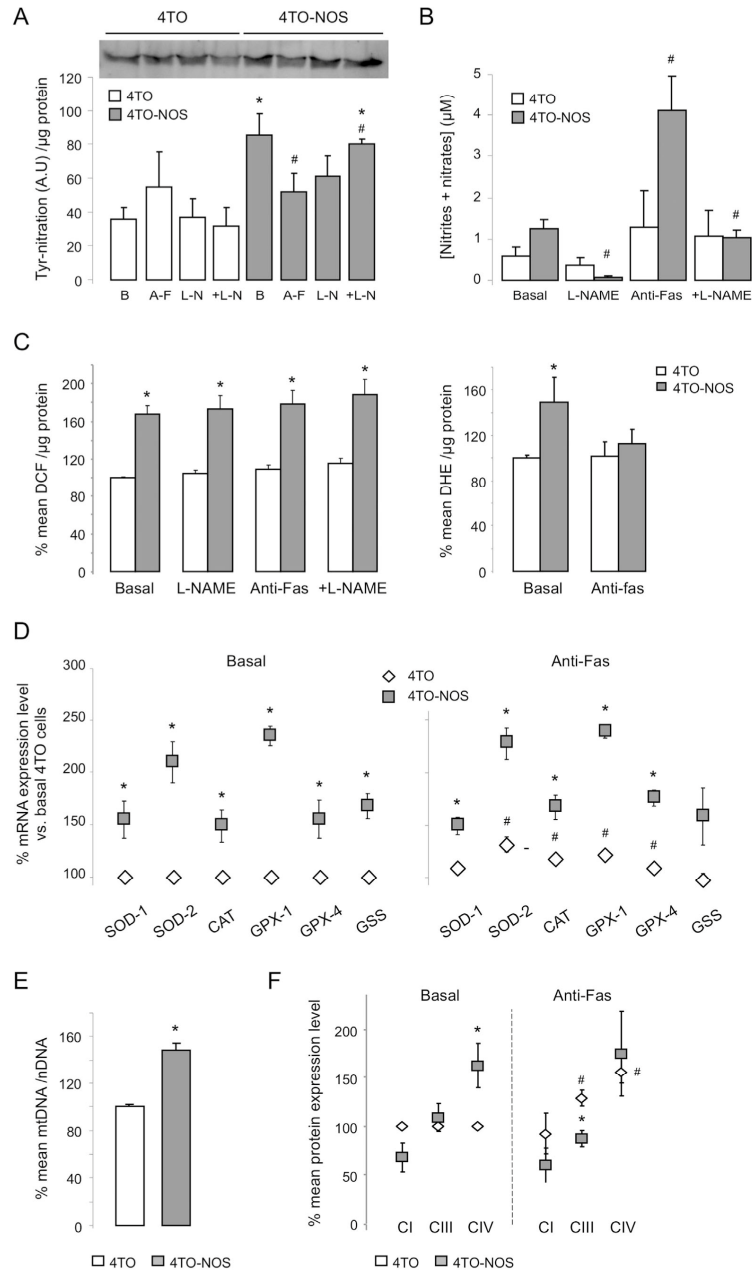


Fig. 3. Effect of NOS-3 overexpression on the cellular nitro-oxidative status and mitochondrial biogenesis. (A) Quantification of protein nitration in the mitochondrial fraction by western blot (n = 3). (B) Accumulation of nitric oxide end products, nitrates and nitrites, in the cell culture medium (n = 3). (C) General ROS production was assessed by using probes DCF (n = 11 for basal and anti-Fas; n = 4 for L-NAME and +L-NAME) and DHE (n = 8). (D) Gene expression analysis of antioxidant proteins GPX-1, GPX-4, Catalase, SOD-1, SOD-2 and GSS (n = 4). (E) MtDNA copy number quantification (n = 9). (F) Expression analysis of proteins from the mitochondrial respiratory complexes (n = 3 or 4). B indicates basal conditions. +L-NAME (+L-N) indicates treatment with anti-Fas (A-F) plus L-NAME (L-N). Data are mean ± SEM. Statistically significant differences between cell lines* or between treatments# are marked.

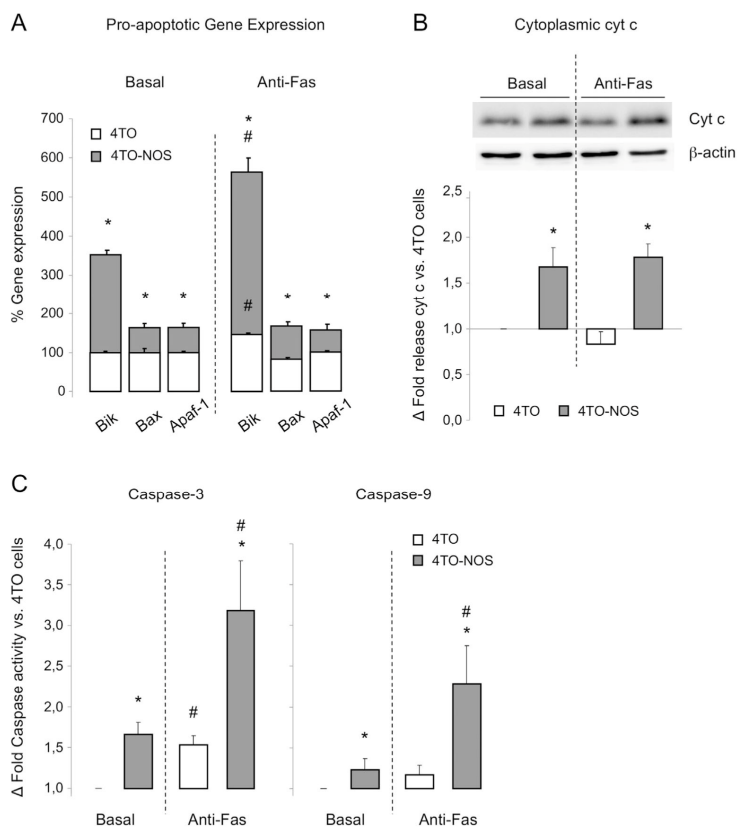


Fig. 4. Effect of anti-Fas administration on cell death. (A) Gene expression analysis of pro-apoptotic proteins APAF-1, BAX and BIK ($n = 4$). (B) Cytoplasmic expression of cyt c. It is represented the cyt c/ β -actin ratio versus the control cell line 4TO at basal condition ($n = 3$). (C) Caspase-9 and caspase-3-associated activities ($n = 4$). Data are mean \pm SEM. Statistically significant differences between cell lines* or between treatments# are marked.

reductase mitochondrial (PRDX3; +3.2), peroxiredoxin-2 (PRDX2; +2.1), superoxide dismutase [Mn] mitochondrial (SOD2; +3.2) and NADPH:adenodoxin oxidoreductase mitochondrial (ADX reductase or AR; +3.7). Cathepsin D (CatD) was identified in two different spots as a protease upregulated by NOS-3 overexpression (+2.3 and +1.9), and in a third additional spot that was only detected in 4TO-NOS cells.

In the presence of anti-Fas, the cell lines 4TO and 4TO-NOS showed differences in the protein expression profile as a consequence of NOS-3 overexpression. The differentially expressed proteins were mainly involved in protein processing (6), protein degradation (6) and redox homeostasis (5). The apoptosis inducer did not modify the expression pattern of CatD in 4TO-NOS.

In order to verify 2-D PAGE/MS results, we randomly chose four proteins from those previously identified by MS, and confirmed their relative expression deregulation by western blot analysis. These proteins were heat shock protein 60 (HSP60), protein disulfide isomerase (PDI), PRDX3 and AR (Fig. 5B).

3.6. Cathepsin D expression, but not its activity, is associated with cell death

Next, we investigated the role of CatD in NOS-3 overexpressing cells. As shown in Fig. 6, the overexpression of CatD in 4TO-NOS cells was

accompanied by the increase of its enzymatic activity (176%, $p = 0.020$) (Fig. 6A). The inhibition of CatD activity by 20 μ M pepstatin A (Fig. 6B) had no effect on cell growth (Fig. 6C) but it was associated with the activity increase of caspase-3 (1.23 fold, $p = 0.050$) and caspase-9 (1.22 fold, $p = 0.037$) in 4TO-NOS when compared to basal condition (Fig. 6D and E). At 50 μ M, pepstatin A caused a significant increase in cell doubling time in the 4TO-NOS cell line (66.2 vs. 47.5, $p = 0.021$) (Fig. 6F), which was paralleled by a higher caspase-3 activity (1.73 fold increase, $p = 0.047$) (Fig. 6G). The addition of anti-Fas to the cell culture medium did not affect CatD activity in the cell lines 4TO or 4TO-NOS (Fig. 6A). By contrast, the simultaneous administration of anti-Fas and pepstatin A resulted in the activity increase of caspase-3 ($p = 0.050$) in the cell line 4TO-NOS when compared to the condition of anti-Fas addition (Fig. 6D).

4. Discussion

We have previously shown that stable NOS-3 overexpression induces the oncoprotein p53 and the cell death receptor Fas, in HepG2 cells as well as in tumours subcutaneously developed in a xenograft mouse model [10]. Indeed NOS-3 up-regulation has been suggested as a candidate antiproliferative mechanism in hepatocarcinoma cells.

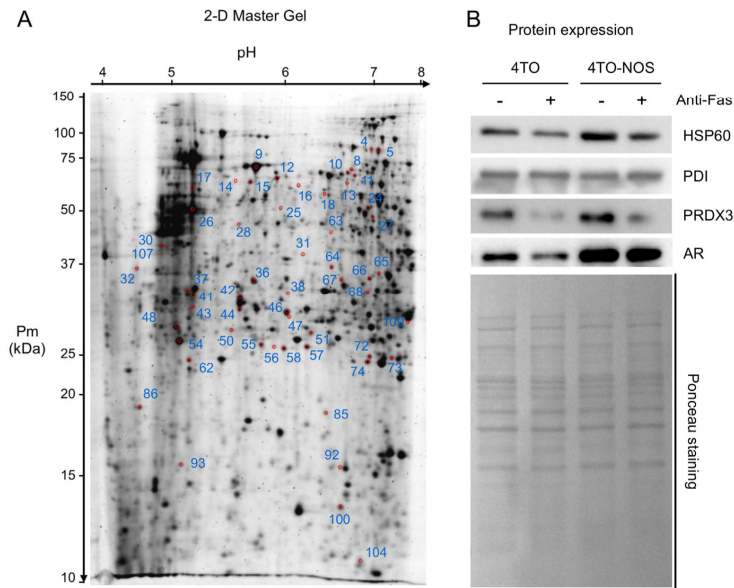


Fig. 5. Differentially expressed proteins in 4TO-NOS cells. (A) 2-D Master gel. Deregulated protein spots in 4TO-NOS are marked and numbered. (B) Western blot analysis of proteins 60 kDa heat shock protein mitochondrial (HSP60), protein disulfide-isomerase (PDI), thioredoxin-dependent peroxide reductase mitochondrial (PRDX3) and NADPH:adenodoxin oxidoreductase mitochondrial (AR). A representative image of a Ponceau-stained membrane used in the western blot analysis is shown. Data are mean \pm SEM. Statistically significant differences between cell lines* or between treatments* are marked.

In the present study, we have investigated the mechanisms involved in cell death promoted by NOS-3 overexpression. In addition, we have explored the susceptibility to anti-Fas-induced cell death in the 4TO-NOS cell line. Fig. 7 summarizes the main findings of this study about cell death mechanisms induced by NOS-3 overexpression in a representative scheme.

As NOS-3 is expressed in mitochondria [3], and it is well known the key role of this organelle in apoptotic cell-death, we analysed the expression pattern of the protein in 4TO-NOS cells. We found that NOS-3 is mainly localized in the plasma membrane and cytoplasm, which agrees with earlier studies in which NOS-3 was present in the Golgi complex and in cell–cell contacts of confluent cells [18]. In addition, we observed that NOS-3 colocalized with mitochondrial proteins, and that NOS-3 was cleaved from the mitochondria by a protease treatment, suggesting its association with the outer mitochondrial membrane. This was consistent with the high levels of tyrosine nitration of mitochondrial proteins observed in NOS-3 overexpressing cells. Due to the inhibitory effect that NO has on the oxidative phosphorylation (OXPHOS) system, its ability to diffuse through cell membranes, and the finding that NOS-3 is localized in the mitochondria, we next investigated the respiratory capacity of the 4TO-NOS cell line. Unexpectedly, NOS-3 overexpression did not cause any relevant effect on the mitochondrial respiration. Despite this, 4TO-NOS cells showed increased levels of oxidative stress that coincided with the expression increase of genes involved in ROS detoxification and with a high mtDNA copy number, compared to the control cell line 4TO. In this regard, previous studies have shown that mtDNA biogenesis may be regulated by oxidative stress under different conditions [19], and that NO is able to trigger mitochondrial biogenesis in culture cells [20]. The increase in mtDNA copy number was paralleled by a higher expression of the mtDNA-encoded protein MTCO2, which may be an attempt by 4TO-NOS cells to adapt to the conditions of NO overproduction.

With the aim to link these previous observations to NOS-3 overexpression, we additionally used L-NAME. This commonly used NOS inhibitor effectively suppressed the effects of NOS-3 overexpression relating to the accumulation of NO end products and the nitration of mitochondrial proteins. However, L-NAME was not effective in suppressing oxidative stress induced by NOS-3 overexpression. Conversely, L-NAME caused an increased activity of the OXPHOS system, which is closely related to ROS production [21] and may be a consequence of the inhibitory effect of NO on the respiration [8]. Nevertheless, L-NAME caused a similar effect in both cell lines 4TO and 4TO-NOS, thus indicating that NOS-3 overexpression has no relevant role in mitochondrial respiration. This result was confirmed when we measured cellular respiration in non-permeabilized cells. Thus, despite the inhibitory effect of NO in respiration, the apoptosis induction by NOS-3 overexpression did not occur through dysfunction of the OXPHOS system.

We have previously shown that 4TO-NOS cell line has increased levels of p53 protein [10], which is an important cell cycle regulator able to initiate apoptosis in response to oxidative stress [22]. Indeed, p53 activity has been related to the expression regulation of several apoptotic genes [23]. In the present study, NOS-3 overexpression was associated with the expression increase of pro-apoptotic genes such as Bax, Bik and Apaf-1, and with a consequent release of cyt c into the cytoplasm and the activity increase of caspase-9 and caspase-3. These results would explain the spontaneous apoptosis showed by 4TO-NOS at basal condition. In addition, NOS-3 overexpression was related to MMP increase, consistent with the induction of apoptosis through the mitochondrial membrane hyperpolarization.

When we analysed the effect of anti-Fas in the 4TO-NOS cell line, we found that the apoptosis inducer caused a lower localization of NOS-3 in the mitochondria. This observation coincided not only with a decrease in the cellular content of nitrated mitochondrial proteins, but also with a non-relevant reduction in respiratory capacity

Table 2

Differentially expressed protein spots between cell lines 4TO and 4TO-NOS (NOS) identified by mass spectrometry. Differential expression ratio in bold indicates statistically significant expression with $p < 0.01$. The rest with $p < 0.05$. In the fold change box 'NOS' indicates 'only expressed in 4TO-NOS'; + indicates anti-Fas treatment.

Biological Classification	Protein name (Accession number)	Molecular function	Spot N°	MS	IS	NOS vs. 4TO	NOS+ vs. 4TO+	4TO+ vs. 4TO	NOS+ vs. NOS
Metabolism	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial (P30084)	β -oxidation	46	589	470	1.3	1.7		
	Medium-chain-specific acyl-CoA dehydrogenase mitochondrial (B7Z911)		27	379	290	5.4			–1.5
	Short/branched chain-specific acyl-CoA dehydrogenase mitochondrial (B4DQ51)		28	215	155	2.8		1.4	
	GAPDH (P04406)	Glycolysis	65	124	77	2.3		3.0	
	Alpha-enolase (P06733)		18	136	97				1.5
	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (O43175)	Amino acids	8	269	157	– 2.1	–1.8		
	Retinal dehydrogenase 1 (P00352)	Retinol	10	651	543	– 3.0	–2.0		1.7
	Abhydrolase domain-containing protein 14B (B4DQ4)	Hydrolase	56	72	39	– 2.5			2.0
	Sulfurtransferase (J3KPV7)	Transferase	64	264	195	1.5			–1.5
	AMP deaminase 2 (Fragment) (HOY360)	IMP	104	48					5.2
RNA processing	Adenylate kinase 2, mitochondrial (F8VY04)	Energy	109	141	121				1.5
	hnRNPL (P14866)	hnRNP/28S component	4	132	111		– 2.8		
			5	206	173		– 1.9		
	hnRNPH (P31943)		12	674	569	– 1.6			
	hnRNPD (HOYA96)		24	273	229		– 1.4		
	hnRNPK (P61978)		50	360	314		– 2.1		
	28S RNP522, mitochondrial (P82650)		63	278	185	2.6			
	Cytosol aminopeptidase (P28838)	Proteolysis/Protein stability	11	573	417	– 2.1	– 2.0		
	Aminoacylase-1 (Q03154)		25	135	79			–1.9	
	Serine protease HTRA2, mitochondrial (O43464)		31	249	189		2.6		
Protein degradation	Isochorismatase domain-containing protein 2, mitochondrial (Q96AB3)		73	264	217	3.7	2.3		
	Cathepsin B (P07858)		37	288	204		1.4	1.8	
			54	407	332		– 1.5	1.3	
	Cathepsin D (P07339)		41	498	389	NOS	NOS+		
			42	598	475	2.3	2.8		
			44	268	223	1.9	2.1		
	60 kDa heat shock protein, mitochondrial (P10809)	Chaperone/Protein assembly	14	130	114		– 4.1		–3.7
			15	415	350			–1.2	– 1.5
			16	136		2.0	3.9		
			17	287	210		– 1.9		
Protein processing	78 kDa glucose-regulated protein (P11021)		32	98	78		2.1		
			48	513	434		–1.2		– 1.3
			66	610	463		– 1.8		
			86	157	140	1.8			–1.4
			93	131	113		– 1.5		– 1.6
			47	300	255				1.8
	Heat shock protein beta-1 (P04792)		57	183	102		1.3		
	Protein DJ-1 (Q99497)		58	313	271		2.5		
	GrpE protein homolog 1, mitochondrial (Q9HAV7)		68	441	386	1.8			
	Stress-70 protein, mitochondrial (P38646)		38	70			8.4		3.1
Skeleton	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1 (HOYD21)		100	133	107		– 1.5		
	Calreticulin (P27797)		26	761	614			1.7	
	Actin, cytoplasmic 2 (P63261)		43	119	103		1.7		
			92	48	11		– 2.6		
	Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5 (F5GZL7)								
	Thioredoxin (Fragment) (H7BZJ3)	Oxido-reductase/Isomerase	36	148	128	1.4			–1.2
	Thioredoxin-dependent peroxide (E9PH29)		51	353	313	3.2	3.6		
	NADPH:adenodoxin oxidoreductase, mitochondrial (P22570)		55	582	506	3.7	3.1		
	Peroxioredoxin-2 (P32119)		62	800	323	2.1	1.4		1.7
	Peroxioredoxin-1 (Q06830)		72	407	279				2.0
Redox Homeostasis	SOD [Mn] mitochondrial (P04179)		74	450	375	3.2			
	Aldo-keto reductase family 1 member C1 (Q04828)		85	328	258	6.9	2.0		2.8
	Protein disulfide isomerase family A, member 3, isoform CRA_b (G5EA52)		9	943	636		– 5.1		3.7
			13	350	266		– 2.1		–1.7
			67	406	299				1.9
	Protein disulfide-isomerase (H7BZ94)		30	196	149	– 2.4			
	Protein disulfide-isomerase (I3L2P8)		107		91	– 2.4			

and the complex I-dependent oxygen consumption. As expected, NOS-3 overexpressing cells showed increased susceptibility to anti-Fas-induced cell death, which was mediated by the activity increase of caspase-9 and caspase-3. By contrast, apoptosis induction in the control cell line 4TO was only related to the increase of caspase-3 activity. Therefore, while in the control cell line anti-Fas induced apoptosis through the extrinsic pathway, an additional activation

of both the extrinsic and the mitochondrial apoptotic pathways was observed in 4TO-NOS, which was higher than that induced by NOS-3 overexpression alone.

In order to identify intermediates that could be involved in the process of cell death in 4TO-NOS, we analysed the protein expression profile compared to the control cell line 4TO. We identified proteins with different biological functions, whose differential expression is

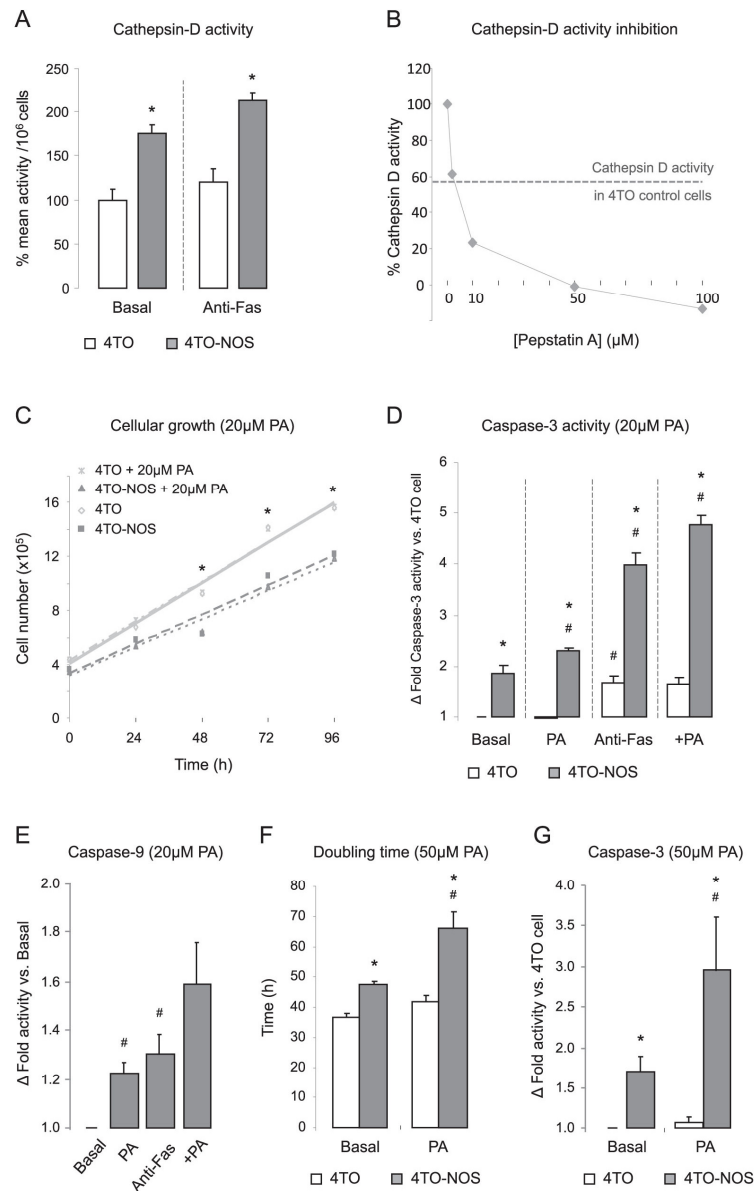


Fig. 6. Cathepsin D activity and cell death. (A) CatD activity in cell lysates (n = 4). (B) CatD activity inhibition curve by pepstatin A. Normal CatD activity in control cell line 4TO is marked. (C) Effect of 20 μM pepstatin A on cell growth (n = 3) and (D) caspase-3 (n = 3) and (E) caspase-9 (n = 3) activities. (F) Effect of 50 μM pepstatin A on cell growth (n = 4) and (G) caspase-3 activity (n = 5) at 48 h. +PA indicates treatment with pepstatin A (PA) plus anti-Fas. Data are mean ± SEM. Statistically significant differences between cell lines* or between treatments# are marked.

associated with the reduction of cell growth. Regarding the group of metabolic proteins, it should be noted that nitrosylation is a posttranslational modification by which NO can reversibly regulate β-oxidation

[24] and glycolysis [25]. In particular, GAPDH activity may be regulated by nitrosylation, being its hyperactivation an adaptive pro-survival response under pro-oxidant conditions [26]. By contrast, nitrosylated

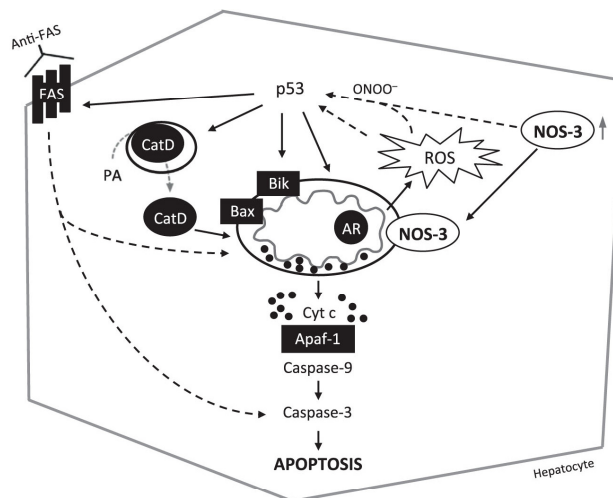


Fig. 7. Cell death mechanisms in 4TO-NOS cells. NOS-3 overexpression was associated with cellular nitro-oxidative stress through the respiratory capacity increase of mitochondrial complex II + III and the tyrosine nitration of mitochondrial proteins. Nitro-oxidative stress induced by NOS-3 overexpression in HepG2 cells was related to 1) the activation of the mitochondrial-associated caspase pathway through the expression increase of pro-apoptotic genes and the release of cyt c into the cytoplasm; 2) the expression increase of proteins adrenodoxin reductase mitochondrial (AR) and cathepsin D (CatD); and 3) higher susceptibility to anti-FAS induced cell death through activation of the apoptosis pathways. The expression regulation of these factors including Bax, Bik, Apaf-1, AR, CatD and FAS, has been previously related to p53, which is upregulated in 4TO-NOS cells. Both, ROS production and protein tyrosine-nitration have been associated with p53 regulation and apoptosis. AR may contribute to oxidative stress. Pepstatin A (PA) induces apoptosis likely through the release of CatD from lysosomes.

GAPDH is able to be transferred to the nucleus and to activate p53, leading to cell death [27]. In this regard, we have previously reported that NOS-3 overexpression increases the profile of S-nitrosylated proteins [14], and induces p53 expression in HepG2 [10], reducing cell survival. Adding anti-Fas to the cell culture induced GAPDH expression in the control cell line, thus abolishing the difference induced by NOS-3 overexpression.

In the second largest group of identified proteins, we found overexpression of proteins involved in the cellular antioxidant system. This agreed with the gene expression profile of 4TO-NOS. Thus, the up-regulation of antioxidant enzymes through activation of the ROS-sensitive signalling pathway is well established. Peroxiredoxins are involved in the attenuation of the generation of reactive oxygen/nitrogen species and NO [28,29], and may be regulated by nitrosylation [30]. Moreover, we detected a significant increase of AR in the 4TO-NOS cell line. AR is a mitochondrial oxidoreductase that catalyses the oxidation of NADPH, acting as the first electron transfer protein of mitochondrial P450 systems. This system can work as a futile NADPH oxidase, oxidizing NADPH in the absence of substrate, leaking electrons to O₂ and generating ROS [31]. AR was particularly interesting because it participates in the p53-mediated apoptosis by oxidative stress [32]. Here, increase of AR expression induced by NOS-3 overexpression coincided with ROS production, p53 accumulation [10], and apoptosis induction through the expression of pro-apoptotic genes that are regulated by p53. In agreement with the oxidative status of the cell lines, anti-Fas did not change the expression profile of AR in 4TO and 4TO-NOS.

The protease CatD was identified in two up-regulated spots, as well as in a third additional spot only detected in 4TO-NOS, which probably belongs to a chemical modification of the protein. Indeed the posttranslational modification of CatD has been implicated in tissue remodelling occurring after lactation [33]. In accordance with the protein expression analysis, the stable overexpression of NOS-3 increased the CatD activity in HepG2 cells. These results were also related to p53 expression [10,34]

and agree with previous observations in which CatD participated in the apoptosis induction by NO [35]. Furthermore, it has been reported that the genetic and pharmacological inhibition of CatD is effective in blocking apoptosis in several different models, including anti-Fas induced cell death [36]. Despite this, anti-Fas did not induce CatD activity in the control cell line 4TO. To better understand the role of CatD in our cell model of NOS-3 overexpression, we analysed cell death-related parameters in the presence of pepstatin A. At 20 μM, pepstatin A was able to inhibit CatD activity in 4TO-NOS below the observed level in the control cell line 4TO. However, it did not affect the growth of 4TO or 4TO-NOS cells. As expected, 20 μM pepstatin A failed to suppress the caspase-3 activity induced by anti-Fas in 4TO control cells, thus indicating that CatD activity is not essential for Fas-induced cell death in HepG2. These results differ from those previously published about the participation of the protease in apoptotic systems triggered by the activation of cell surface receptors [36,37]. On the other hand, CatD activity inhibition in 4TO-NOS caused a significant increase in the caspase-3 activity, which was significantly higher to that caused by the NOS-3 overexpression at both in basal conditions and after anti-Fas addition. Thus, CatD activity induced by NOS-3 overexpression seemed to be associated with an anti-apoptotic effect rather than pro-apoptotic. In this regard, an anti-apoptotic role for CatD cannot be excluded since it is overexpressed in many malignant tumours and it is associated with cancer spreading and clinical outcome, and its expression is conditional on apoptosis-associated protein phenotype [38]. Furthermore, the protease may promote cell survival under oxidative stress [39]. Despite of this, Beaujouin et al. reported that CatD overexpression by cancer cells exerts a pro-apoptotic effect that is independent on its catalytic activity. Thus, cytosolic CatD would stimulate apoptosis by interacting with the apoptotic machinery rather than by cleaving specific substrates [40]. If so, we could not rule out a pro-apoptotic role for CatD in our cell model of NOS-3 overexpression since the CatD inhibitor pepstatin A stimulates the protease release from lysosomes at the commonly used dose of 50 μM [41]. In such a scenario, the

caspase-3 activity increase that we observed in 4TO-NOS after pepstatin A administration could be a consequence of a higher cytoplasmic localization of CatD, and not an effect caused by the CatD activity inhibition. This is consistent with the increased caspase-9 activity induced by pepstatin A in NOS-3 overexpressing cells, since inactive pro-caspase-9 is activated through the mitochondrial death pathway. Indeed, 50 μ M pepstatin A caused a significant slowing down of cell growth in 4TO-NOS.

In conclusion, NOS-3 overexpression promoted AR and CatD up-regulation in a process related to oxidative stress generation and apoptosis induction. These observations agree with previous studies where both enzymes were associated with apoptosis, and were regulated by p53. Thus, AR and CatD emerge as new targets that could be involved in the reduction of cell survival in NOS-3 overexpressing cells, and join the list of proteins that we previously identified [14]. Overall, NOS-3 overexpression caused a higher sensitivity to anti-Fas-induced cell death through the upregulation of pro-apoptotic genes and the increase in caspase-9 and caspase-3 activities, without affecting AR and CatD activity and/or expression. Since the pro-apoptotic effect of CatD overexpression may not be related to its enzymatic activity, we cannot exclude a significant role for this protein in the apoptosis induction by NOS-3 overexpression. The potential role of the GAPDH increase in the regulation of p53 activity in 4TO-NOS cells remains to be determined. Similarly, it remains to be established the posttranslational modification affecting CatD activity during the NOS-3 overexpression.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.02.015>.

Acknowledgments

We acknowledge the technical support provided by Dr. Esther Peralbo-Santaella in performing the studies with the confocal microscope (Cytomics & Imaging Facility. IMIBIC). This study was supported by the Instituto de Salud Carlos III (FIS 09/00185). G. Ferrin was supported by the Networked Biomedical Research Center Hepatic and Digestive Diseases (CIBEREHD).

References

- [1] J. Muntane, M. de la Mata, Nitric oxide and cancer, *World J. Hepatol.* 2 (9) (2010) 337–344. <http://dx.doi.org/10.4254/wjh.v2.i9.337>.
- [2] W.K. Alderton, C.E. Cooper, R.G. Knowles, Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition, *Biochem. J.* 357 (Pt 3) (2001) 593–615. <http://dx.doi.org/10.1042/0264-6021:3570593>.
- [3] S. Gao, J. Chen, S.V. Brodsky, H. Huang, S. Adler, J.H. Lee, N. Dhadwal, L. Cohen-Gould, S.S. Gross, M.S. Goligorsky, Docking of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) to the mitochondrial outer membrane: a pentabasic amino acid sequence in the autoinhibitory domain of eNOS targets a proteinase K-cleavable peptide on the cytoplasmic face of mitochondria, *J. Biol. Chem.* 279 (16) (2004) 15968–15974. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M308504200>.
- [4] A.J. Kanai, L.L. Pearce, P.R. Clemens, L.A. Birder, M.M. VanBibber, S.Y. Choi, W.C. de Groat, J. Peterson, Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (24) (2001) 14126–14131. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.241380298>.
- [5] S.L. Elfering, T.M. Sarkela, C. Giulivi, Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase, *J. Biol. Chem.* 277 (41) (2002) 38079–38086. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M205256200>.
- [6] C. Villanueva, C. Giulivi, Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease, *Free Radic. Biol. Med.* 49 (3) (2010) 307–316. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.004>.
- [7] S. Diaz-Troya, S. Najib, V. Sanchez-Margalet, eNOS, nNOS, cGMP and protein kinase G mediate the inhibitory effect of pancreastatin, a chromogranin A-derived peptide, on growth and proliferation of hepatoma cells, *Regul. Pept.* 125 (1–3) (2005) 41–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.regpep.2004.07.031>.
- [8] N.A. Riobo, E. Clementi, M. Melani, A. Boveris, E. Cadenas, J.J. Poderoso, Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH:ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation, *Biochem. J.* 359 (Pt 1) (2001) 139–145. <http://dx.doi.org/10.1042/0264-6021:3590139>.
- [9] P. Sarti, E. Forte, D. Mastronicola, A. Giuffrè, M. Aresè, Cytochrome c oxidase and nitric oxide in action: molecular mechanisms and pathophysiological implications, *Biochim. Biophys. Acta* 1817 (4) (2012) 610–619. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.09.002>.
- [10] R. Gonzalez, G. Ferrin, P. Aguilar-Melero, I. Ranchal, C.I. Linares, R.I. Bello, M. de la Mata, V. Gogvadze, J.A. Barceña, J.M. Alamo, S. Orrenius, F.J. Padillo, B. Zhivotovskiy, J. Muntane, Targeting of hepatoma using nitric oxide donor strategies, *Antioxid. Redox Signal.* 18 (5) (2013) 491–506. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2011.4476>.
- [11] J. Ogasawara, R. Watanabe-Fukunaga, M. Adachi, A. Matsuzawa, T. Kasugai, Y. Kitamura, N. Itoh, T. Suda, S. Nagata, Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice, *Nature* 364 (6440) (1993) 806–809. <http://dx.doi.org/10.1038/364806a0>.
- [12] D.C. Huang, M. Hahne, M. Schroeter, K. Frei, A. Fontana, A. Villunger, K. Newton, J. Tschopp, A. Strasser, Activation of Fas by FasL induces apoptosis by a mechanism that cannot be blocked by Bcl-2 or Bcl-x(L), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (26) (1999) 14871–14876. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.26.14871>.
- [13] B. Rigas, J.L. Williams, NO-donating NSAIDs and cancer: an overview with a note on whether NO is required for their action, *Nitric Oxide* 19 (2) (2008) 199–204. <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2008.04.022>.
- [14] P. Aguilar-Melero, G. Ferrin, J. Muntane, Effects of nitric oxide synthase-3 overexpression on post-translational modifications and cell survival in HepG2 cells, *J. Proteome* 75 (3) (2012) 740–755. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpropt.2011.09.010>.
- [15] R. Gonzalez, G. Ferrin, A.B. Hidalgo, I. Ranchal, P. Lopez-Cillero, M. Santos-Gonzalez, G. Lopez-Lluch, J. Briceno, M.A. Gomez, A. Poyato, J.M. Villalba, P. Navas, M. de la Mata, J. Muntane, N-acetylcysteine, coenzyme Q10 and superoxide dismutase mimetic prevent mitochondrial cell dysfunction and cell death induced by d-galactosamine in primary culture of human hepatocytes, *Chem. Biol. Interact.* 181 (1) (2009) 95–106. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2009.06.003>.
- [16] R. Acin-Perez, M.P. Bayona-Bafaluy, M. Bueno, C. Machicado, P. Fernandez-Silva, A. Perez-Martos, J. Montoya, M.J. Lopez-Perez, J. Sancho, J.A. Enriquez, An intragenic suppressor in the cytochrome c oxidase I gene of mouse mitochondrial DNA, *Hum. Mol. Genet.* 12 (3) (2003) 329–339. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddg021>.
- [17] R. Moreno-Loshuertos, G. Ferrin, R. Acin-Perez, M.E. Gallardo, C. Viscomi, A. Perez-Martos, M. Zeviani, P. Fernandez-Silva, J.A. Enriquez, Evolution meets disease: penetrance and functional epistasis of mitochondrial tRNA mutations, *PLoS Genet.* 7 (4) (2011) e1001379. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1001379>.
- [18] R. Govers, L. Bevers, P. de Bree, T.J. Rabelink, Endothelial nitric oxide synthase activity is linked to its presence at cell–cell contacts, *Biochem. J.* 361 (Pt 2) (2002) 193–201. <http://dx.doi.org/10.1042/0264-6021:3610193>.
- [19] H.C. Lee, Y.H. Wei, Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37 (4) (2005) 822–834. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2004.09.010>.
- [20] E. Nisoli, E. Clementi, C. Paolucci, V. Cozzi, C. Tonello, C. Sciorati, R. Bracale, A. Valerio, M. Francolini, S. Moncada, M.O. Carruba, Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide, *Science* 299 (5608) (2003) 896–899. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1079368>.
- [21] M.P. Murphy, How mitochondria produce reactive oxygen species, *Biochem. J.* 417 (1) (2009) 1–13. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20081386>.
- [22] E.S. Han, F.L. Muller, V.I. Perez, W. Qi, H. Liang, L. Xi, C. Fu, E. Doyle, M. Hickey, J. Cornell, C.J. Epstein, L.J. Roberts, H. Van Remmen, A. Richardson, The in vivo gene expression signature of oxidative stress, *Physiol. Genomics* 34 (1) (2008) 112–126. <http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00239.2007>.
- [23] S. Haupt, M. Berger, Z. Goldberg, Y. Haupt, Apoptosis – the p53 network, *J. Cell Sci.* 116 (Pt 20) (2003) 4077–4085. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.00739>.
- [24] P.T. Doulias, M. Tenopoulou, J.L. Greene, K. Raju, H. Ischiropoulos, Nitric oxide regulates mitochondrial fatty acid metabolism through reversible protein S-nitrosylation, *Sci. Signal.* 6 (256) (2013) rs1. <http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.2003252>.
- [25] M. Zaffagnini, S. Morisse, M. Bedhomme, C.H. Marchand, M. Festa, N. Roulhier, S.D. Lemaire, P. Trost, Mechanisms of nitrosylation and denitrosylation of cytoplasmic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*, *J. Biol. Chem.* 288 (31) (2013) 22777–22789. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.475467>.
- [26] C. Cerella, M. D'Alessio, S. Cristofanon, M. De Nicola, F. Radogna, M. Dicato, M. Diederich, L. Ghibelli, Subapoptogenic oxidative stress strongly increases the activity of the glycolytic key enzyme glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1171 (2009) 583–590. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04723.x>.
- [27] N. Sen, M.R. Hara, M.D. Kornberg, M.B. Cascio, B.I. Bae, N. Shahani, B. Thomas, T.M. Dawson, V.L. Dawson, S.H. Snyder, A. Sawa, Nitric oxide-induced nuclear GAPDH activates p300/CBP and mediates apoptosis, *Nat. Cell Biol.* 10 (7) (2008) 866–873. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1747>.
- [28] M. Reinartz, Z. Ding, U. Fogel, A. Godecke, J. Schrader, Nitrosative stress leads to protein glutathiolation, increased S-nitrosation, and up-regulation of peroxiredoxins in the heart, *J. Biol. Chem.* 283 (25) (2008) 17440–17449. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M800126200>.
- [29] H.N. Sun, S.U. Kim, S.M. Huang, J.M. Kim, Y.H. Park, S.H. Kim, H.Y. Yang, K.J. Chung, T.H. Lee, H.S. Choi, J.S. Min, M.K. Park, S.K. Kim, S.R. Lee, K.T. Chang, S.H. Lee, D.Y. Yu, D.S. Lee, Microglial peroxiredoxin V acts as an inducible anti-inflammatory antioxidant through cooperation with redox signaling cascades, *J. Neurochem.* 114 (1) (2010) 39–50. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06691.x>.
- [30] J. Fang, T. Nakamura, D.H. Cho, Z. Gu, S.A. Lipton, S-nitrosylation of peroxiredoxin 2 promotes oxidative stress-induced neuronal cell death in Parkinson's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (47) (2007) 18742–18747. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0705904104>.
- [31] I. Hanukoglu, Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells, *Drug Metab. Rev.* 38 (1–2) (2006) 171–196. <http://dx.doi.org/10.1080/03602530600570040>.

- [32] P.M. Hwang, F. Bunz, J. Yu, C. Rago, T.A. Chan, M.P. Murphy, G.F. Kelso, R.A. Smith, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, Ferredoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells, *Nat. Med.* 7 (10) (2001) 1111–1117. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1001-1111>.
- [33] R. Zaragoza, L. Torres, C. Garcia, P. Eroles, F. Corrales, A. Bosch, A. Lluch, E.R. Garcia-Trevijano, J.R. Vina, Nitration of cathepsin D enhances its proteolytic activity during mammary gland remodelling after lactation, *Biochem. J.* 419 (2) (2009) 279–288. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20081746>.
- [34] G.S. Wu, P. Saftig, C. Peters, W.S. El-Deiry, Potential role for cathepsin D in p53-dependent tumor suppression and chemosensitivity, *Oncogene* 16 (17) (1998) 2177–2183. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1201755>.
- [35] C.M. Pilane, E.F. LaBelle, NO induced apoptosis of vascular smooth muscle cells accompanied by ceramide increase, *J. Cell. Physiol.* 199 (2) (2004) 310–315. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.10464>.
- [36] L.P. Deiss, H. Galinka, H. Berissi, O. Cohen, A. Kimchi, Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha, *EMBO J.* 15 (15) (1996) 3861–3870.
- [37] H. Malhi, M.E. Guicciardi, G.J. Gores, Hepatocyte death: a clear and present danger, *Physiol. Rev.* 90 (3) (2010) 1165–1194. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00061.2009>.
- [38] C. Fan, X. Lin, E. Wang, Clinicopathological significance of cathepsin D expression in non-small cell lung cancer is conditional on apoptosis-associated protein phenotype: an immunohistochemistry study, *Tumour Biol.* 33 (4) (2012) 1045–1052. <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-012-0338-y>.
- [39] Y.S. Hah, H.S. Noh, J.H. Ha, J.S. Ahn, J.R. Hahm, H.Y. Cho, D.R. Kim, Cathepsin D inhibits oxidative stress-induced cell death via activation of autophagy in cancer cells, *Cancer Lett.* 323 (2) (2012) 208–214. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.04.012>.
- [40] M. Beaujouin, S. Baghdiguian, M. Glondu-Lassis, G. Berchem, E. Liaudet-Coopman, Overexpression of both catalytically active and -inactive cathepsin D by cancer cells enhances apoptosis-dependent chemo-sensitivity, *Oncogene* 25 (13) (2006) 1967–1973. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1209221>.
- [41] L. Emert-Sedlak, S. Shangary, A. Rabinovitz, M.B. Miranda, S.M. Delach, D.E. Johnson, Involvement of cathepsin D in chemotherapy-induced cytochrome c release, caspase activation, and cell death, *Mol. Cancer Ther.* 4 (5) (2005) 733–742. <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-04-0301>.