

**LABORATORIO DE METABOLISMO DEL
OXIGENO**
Hospital de Clínicas "José de San Martín"



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Óxido nítrico sintasa mitocondrial, regulación del ciclo celular y tumorigénesis

Autora: Lic. Soledad Galli

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires

Director: *Prof. Dr. Juan José Poderoso*

Departamento de Química Biológica

2005

Resumen

La expresión y actividad diferencial de la mtNOS en el compartimiento mitocondrial es seguida por variaciones significativas de la concentración de NO en la matriz, en el estado estacionario. La utilización mitocondrial del NO termina en la producción de anión superóxido y H_2O_2 , éste último con capacidad para difundir libremente hacia el citosol, en donde participa en la modulación de la proliferación celular y la apoptosis y en la transformación celular y el cáncer. Sobre estas bases, analizamos la modulación de la mtNOS en el marco del estado redox celular en los tumores murinos M3, MM3 y P07, y sus respectivas líneas celulares, y se comparó con tejidos normales tanto proliferantes como quiescentes. Los resultados mostraron que a) las mitocondrias tumorales y de tejidos proliferantes solo retienen entre el 10- 50% de la actividad de los complejos I, II-III y IV de la cadena respiratoria y de actividad de Mn-SOD con respecto a los tejidos quiescentes; b) los tejidos normales proliferantes, como el hígado embrionario o la glándula mamaria durante la preñez, presentan 10- 20% de actividad y expresión de mtNOS y producción mitocondrial de H_2O_2 en comparación con los tejidos no proliferantes; c) del mismo modo, pero independientemente de la expresión de mtNOS, las mitocondrias tumorales exhiben no más del 5% de actividad de mtNOS y producción de H_2O_2 con respecto a tejidos maduros y, d) en contraste con tejidos estables, tanto el tejido tumoral como las células normales proliferantes exhiben altos niveles de expresión de ciclina D1 y bajos niveles de actividad de p38, kinasa normalmente asociada a apoptosis. El H_2O_2 promueve la proliferación en células tumorales ($<10 \mu M$) o marcadamente la inhibe ($>10 \mu M$) con variaciones paralelas de la expresión de ciclina D1, y de la actividad de ERK1/ 2 y p38. En base a estos resultados, se propone que la disminución en la fosforilación oxidativa y la existencia de mtNOS tumoral no funcional con bajo nivel de H_2O_2 dependiente de NO mitocondrial, son una plataforma para relacionar el crecimiento tumoral persistente con el comportamiento embrionario. Asimismo, estudiamos la modulación que ejerce H_2O_2 a través de MAPKs sobre la progresión del ciclo celular en la línea tumoral LP07. Se observó que $1 \mu M$ H_2O_2 promueve proliferación y $50 \mu M$ arresto celular, con alta y baja expresión de ciclina D1, respectivamente; y fosforilación diferencial de ERK1/ 2, p38 y JNK. A $1 \mu M$ H_2O_2 , la activación y translocación de ERK1/ 2 al núcleo fueron persistentes,

mientras que con 50 μM H_2O_2 ERK era retenido en mitocondria. La inhibición de MEK1/ 2 limitó la expresión de ciclina D1 a 1 μM H_2O_2 . 50 μM H_2O_2 indujo la activación y translocación persistente de JNK1/ 2 y p38 al núcleo, con arresto del ciclo celular, sin señales de apoptosis. La inhibición de JNK y p38 revirtieron la disminución en la expresión de ciclina D1 a 50 μM H_2O_2 . Los efectos redox se asociaron a la translocación de MAPKs a la mitocondria. *In vitro*, la oxidación suave (0.1- 1 μM H_2O_2) favorece la fosforilación de ERK por su kinasa específica, mientras que p38 y JNK favorecen su fosforilación tras la oxidación fuerte (10 μM H_2O_2). Del mismo modo la formación del dímero MEK- ERK se vio favorecida con oxidación suave, mientras que los dímeros MKK3- p38 y MKK4- JNK se favorecieron con oxidación fuerte. Este comportamiento diferente se observó también *in vivo*. Esta respuesta diferencial de las kinasas al H_2O_2 se debe probablemente a la disposición de los residuos cisteína en las cercanías de los sitios de interacción proteína- proteína de las MAPKs: ERK tiene dos residuos cisteína, p38 y JNK solo uno. En este sentido, la proliferación tumoral persistente podría depender de la activación y tráfico diferencial de MAPKs en conexión con la baja $[\text{H}_2\text{O}_2]_{ss}$ en células transformadas.

Abstract

Differential expression and activity of constitutive mtNOS in the mitochondrial compartment is followed by significant variations in matrix NO steady-state concentration. The mitochondrial utilization of NO involves the production of superoxide anion and H₂O₂, a species freely diffusible outside the mitochondria that participates in the modulation of cell proliferation and apoptosis, and in cell transformation and cancer. On these bases, we analyzed the modulation of mtNOS in the frame of cellular redox state in M3, MM3 and P07 murine tumors and their respective cell lines, as compared to normal proliferating and quiescent tissues. The results showed that a) tumoral and proliferating mitochondria only retain 20- 50% of the activity of complexes I, II- III and IV and Mn- SOD of quiescent tissues; b) normal proliferating tissues, like embryonic liver or pregnant mammary gland, have 10- 20% of mtNOS expression and activity and mitochondrial H₂O₂ yield than quiescent non-proliferating tissues; c) similarly but irrespective of mtNOS expression, tumoral mitochondria have no more than 5% of mtNOS activity and H₂O₂ yield of mature tissues and, d) in opposition to stable tissues, both tumoral and normal proliferating cells exhibit high cyclin D1 expression and low pro-apoptotic p38 activity. Dually, H₂O₂ stimulated tumor cell proliferation (< 10 μM) or markedly inhibited it (> 10 μM) with parallel variations of cyclin D1, phospho- ERK1/2 and phospho-p38. It is surmised that decreased oxidative phosphorylation, defective tumoral mtNOS and low mitochondrial NO-dependent H₂O₂ may be a platform to link persistent tumoral growth to embryonic behavior. We also attempted to study H₂O₂ modulation of MAPK traffic in connection with cell cycle progression in the tumoral cell line, LP07. 1 μM H₂O₂ promoted proliferation and 50 μM H₂O₂ cell cycle arrest, with parallel high and low cyclin D1 expression, respectively; and differential set up of MAPKs pathways. At 1 μM H₂O₂, ERK1/ 2 activation and translocation to nuclei were persistent, while 50 μM H₂O₂ caused ERK1/ 2 retention in mitochondria. Inhibition of MEK1/ 2 limited cyclin D1 expression at 1 μM H₂O₂, indicating that the proliferative signal was driven by ERK1/ 2. In contrast, 50 μM H₂O₂ induced p38 and JNK1/ 2 persistent activation and translocation to the nuclei; cells became arrested with no signs of apoptosis. Both JNK and p38 inhibitors reverted cyclin D1 downregulation at 50 μM H₂O₂. Redox effects

were associated to MAPK specific mitochondrial translocation and activation. *In vitro*, ERK phosphorylation by its upstream kinase was favoured upon soft oxidation (0.1- 1 μM H_2O_2), while p38 and JNK favoured its phosphorylation after strong H_2O_2 oxidation (10 μM). In the same way, MEK- ERK complex formation was enhanced upon soft oxidation, while the contrary occurred to MKK3- p38 and MKK4- JNK dimer formation. The same behaviour was observed *in vivo*. This differential pattern of activation was probably a consequence of cysteine residues disposition on the boundaries of the docking sites of MAPKs. Thus, persistent tumoral proliferation may depend on differential activation and traffic of MAPKs in connection with low $[\text{H}_2\text{O}_2]$ ss in transformed cells.

***A mi mamá, mi papá y Nicolás,
por su apoyo incondicional
ayer, hoy y siempre...***

Agradecimientos

A veces podemos pasarnos años sin vivir en absoluto, y de pronto toda nuestra vida se concentra en un solo instante.

Oscar Wilde

A mi Director de Tesis, Juan José Poderoso, quien me mostró que pensar no es huir a la irrealidad, sino creación y osadía; que se es libre si teniendo fuerza y talento para hacer una cosa, no se encuentran trabas a la voluntad. Le agradezco por marcar mis pasos al principio, y por acompañarme cuando aprendí a caminar. Por su confianza en mi persona y mi trabajo. Y por dejar escapar que en el fondo los científicos somos gente con suerte; podemos jugar a lo que queramos durante toda la vida.

A Cecilia Carreras, por mostrarme que un científico debe tomarse la libertad de plantear cualquier cuestión, de dudar de cualquier afirmación y de corregir errores. Por su infaltable y prácticamente infalible mirada crítica. Por ser ese nexo fundamental entre el vuelo impulsivo de un pensador que nace, y la racionalidad y orden que se necesitan para desarrollar las ideas.

A la Dra. Elisa Bal, primero por brindarme la posibilidad de trabajar con el Dr. Poderoso, y darme su apoyo y referencia en este emprendimiento. Le agradezco también haber acompañado mis primeros pasos en investigación. Le agradezco su crítica certera, su mirada amplia, y su comprensión extensiva. También el hecho que si bien es una investigadora profesional, con una trayectoria intachable, está siempre dispuesta a escuchar inquietudes, temores y propuestas de jóvenes investigadores, y aconsejar desde su experiencia.

A las chicas del laboratorio, Vale, Ro, Mary, Ana, Pao y Dani, porque saben mucho de mí, y a pesar de ello me quieren. Las admiro por esto. Les agradezco haber compartido tantas horas de nuestras vidas juntas en estos cuatro años. Les agradezco su apoyo tanto en el momento de discutir y realizar un experimento, como en el día a día.

A los chicos del laboratorio; a Fer por mostrarme que las cosas se pueden tomar de otra manera, por su exceso de paz interior, por estar siempre dispuesto a escuchar y dar un consejo; a Damián por sus escasas aunque más que amenas conversaciones, y por tender siempre su mano en colaboración.

A las chicas de Podestá, en particular Ceci Poderoso, Paula Maloberti, y Lau Brion por compartir horas de arduo trabajo, y horas de ardua recreación. Por la discusión científica y su participación a veces como maestras, a veces como colegas en mi formación como investigadora y como persona. Y principalmente a Ale Gorosti, quien además de esto, se convirtió en *mi* amiga personal.

A las chicas y chicos de Fainboim y asociados, en particular Adri, Marianela, Nati y Diego, con quienes compartí mañanas y tardes de esterilidad en el laboratorio de cultivo celular, ratos más que agradables y alguna que otra salida extracurricular.

A mis amigas personales Alina y Lorena, por brindarse a mí, por depositar su confianza en mi persona y por dejarme un lugar de privilegio: el de compartir sus vidas con la mía. Les agradezco que hayan estado en cada momento bueno y malo del camino, y porque me quieren, y porque dejan que las quiera. Y por supuesto a Manuel y Darío que ofician de novio y marido respectivamente, y son unos capos.

A mis amigos de la vida: Lau, Ricardo, Giselle y Melina. Y otros que aunque no los nombre los tengo presentes.

A mis colegas docentes del Departamento de Química Biológica, por hacer de mis horas de docencia un placer interminable, y por ser muchos de ellos, sin saberlo, modelos en mi formación académica.

A Ceci Vázquez; por tener sueños tan grandes y no perderlos de vista mientras se persiguen. Por aceptar el reto, por su entrega, por su paciencia. Por enseñarme a compartir.

A mi familia.

Índice

INTRODUCCIÓN

<i>Óxido nítrico y óxido nítrico sintasas</i>	1
<i>La mitocondria</i>	18
<i>MAPKs</i>	39

OBJETIVOS	56
------------------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS	58
-----------------------------------	----

RESULTADOS

<i>Primera parte</i>	67
<i>Segunda parte</i>	78

DISCUSIÓN	96
------------------------	----

FIGURAS ADICIONALES	108
----------------------------------	-----

REFERENCIAS	109
--------------------------	-----

Introducción

***Óxido nítrico y óxido
nítrico sintasas***

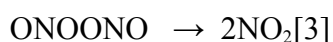
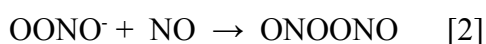
El óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es una molécula diatómica simple que posee una química única y fascinante. Es un gas incoloro a temperatura y presión ambiente, y su solubilidad en agua es similar a la del O₂ (2 mM). Es relativamente lipofílico (6-8 veces más soluble que en agua) (Shaw *et al*, 1977), por lo cual sus reacciones se ven dramáticamente incrementadas en membranas biológicas con respecto a ambientes acuosos. Tiene naturaleza de radical libre; posee un electrón desapareado que es compartido por el nitrógeno y el oxígeno, con predominancia sobre el nitrógeno, por lo que el NO reacciona con otras moléculas a través de este átomo (Fukuto *et al*, 2000).

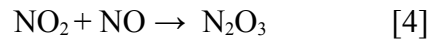
El NO es un óxido de nitrógeno que puede ser extensamente reducido u oxidado en sistemas biológicos, originando una familia de especies secundarias. Para analizar los efectos del NO y sus derivados, debemos considerar la química biológica del NO, que comprende un número pequeño de reacciones con componentes normalmente presentes en las células.

La reacción del NO con O₂ y especies derivadas del O₂ en soluciones acuosas

El O₂ posee dos electrones desapareados en su estado basal de triplete, por lo que es estrictamente un diradical. Por ello, el O₂ reacciona con dos moléculas de NO, generando dos moléculas de dióxido de nitrógeno (NO₂), a través de las reacciones [1-3].

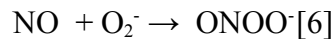


El NO₂ es otro radical, mucho más oxidante que el NO (E = +1.04 V para la cupla NO₂/ NO₂⁻) (Stanbury, 1989). La reacción del NO₂ con NO en soluciones acuosas genera nitrito como producto estable (reacciones [4- 5]).



La reacción [5] es una nitrosación del agua (adición de NO^+). La nitrosación es una reacción muy favorable del N_2O_3 , que ocurre con nucleófilos en general, como por ejemplo, los tioles (Challis *et al*, 1978).

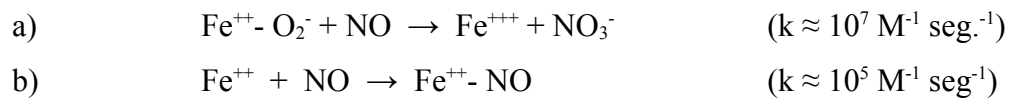
La reducción del O_2 por un electrón resulta en la formación del anión superóxido (O_2^-). Su reacción con NO es muy favorable (Blough *et al*, 1985) y su velocidad de reacción está limitada por la difusión de las especies (Huie *et al*, 1993) (reacciones [6-7]).



La protonación del peroxinitrito (ONOO^-) es seguida por la rápida lisis del ácido, que genera dos radicales de vida media muy corta, el NO_2 y el OH. Estos radicales son responsables de gran parte del espectro de las reacciones del ONOO^- , en su mayoría de oxidación, con constituyentes biológicos (Pryor *et al*, 1999). La altísima reactividad del ONOO^- se ve limitada en parte por su corta vida media (0.67 seg.) que asegura una baja difusión (Denicola *et al*, 1998). Esta particularidad determina que el ONOO^- actúe solamente en el sitio donde es formado.

El NO reacciona también con determinadas proteínas que contienen centros de hierro- azufre (Fe- S). Específicamente, se une al Fe^{++} formando un nitrosil- Fe (NO-Fe) que modifica las propiedades químicas del grupo prostético, inhibiendo o estimulando la actividad biológica de la enzima.

Una de las reacciones más afines del NO con componentes celulares es su unión a grupos hemo reducidos, libres u ocupados por una molécula de O_2 (Ej. oxihemoglobina, oximioglobina, citocromo oxidasa, catalasa, lipoperoxidasa, entre otras). Dependiendo del estado del hemo, la reacción da lugar a diferentes productos, principalmente de dos clases:



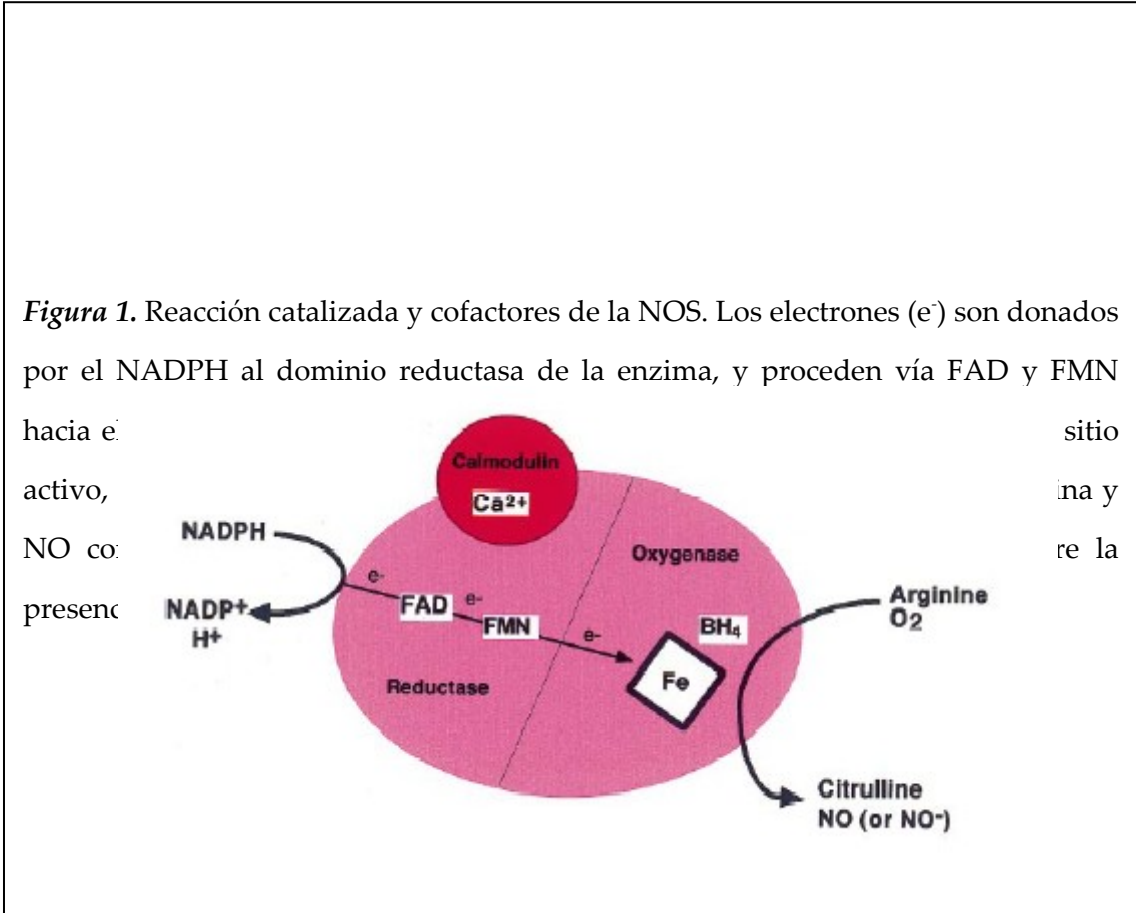
Las dos reacciones resultan en la inactivación del NO. La reacción *a* se utiliza como herramienta para medir los niveles de NO producidos por células o tejidos: se determina la velocidad y la cantidad de oxihemoglobina u oximioglobina que se oxida a la forma meta, como índice de la formación estequiométrica de NO.

Las óxido nítrico sintasas

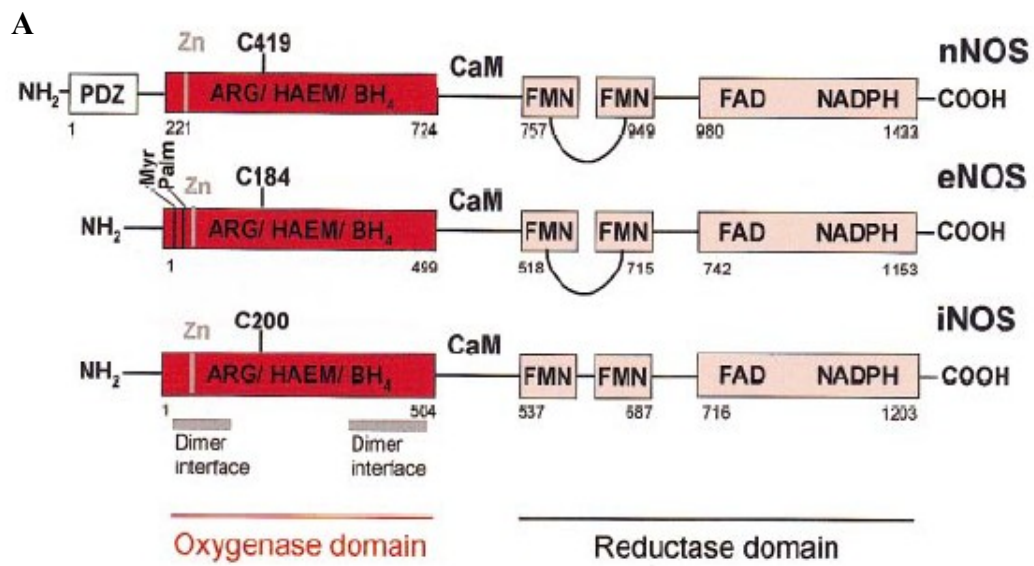
El NO es generado por una familia de enzimas, conocidas como óxido nítrico sintasas (NOS). Se identificaron tres isoformas distintas de NOS producto de diferentes genes, con diferente localización cromosómica, y diferentes regulación, propiedades catalíticas y sensibilidad a inhibidores. Estas isoformas presentan entre un 51 y 57 % de homología en humanos, y cada una de ellas presenta diferentes variantes de splicing (Alderton *et al*, 2001; Newton *et al*, 2003). Enzimas similares a la NOS son también codificadas en los genomas de la mayoría de las formas de vida, incluyendo bacterias.

Las isoformas clásicas de la NOS comprenden a la NOS neuronal (nNOS), hallada por primera vez en tejido nervioso, y siendo la variante predominante en este tejido; la NOS inducible (iNOS), que es la isoforma capaz de ser inducida en una gran variedad de tejidos y por una gran cantidad de estímulos; y la isoforma endotelial (eNOS), que se encontró por primera vez en tejido endotelial. Estas isoenzimas han sido normalmente diferenciadas en base al carácter de su expresión, siendo eNOS y nNOS enzimas típicamente constitutivas, mientras que la iNOS era claramente la enzima cuya expresión podía estar sujeta a modulación. Asimismo, las primeras dependen de calcio para su actividad, mientras que la iNOS parece independiente del mismo (Alderton *et al*, 2001). Los tres genes que codifican la nNOS, iNOS y eNOS humanas existen en copia única en el genoma haploide (Nakane *et al*, 1993; Hall *et al*, 1994; Geller *et al*, 1993; Sherman *et al*, 1993; Charles *et al*, 1993, Janssens *et al*, 1992, Marsden *et al*, 1992). Tienen estructura genómica similar, lo que sugiere un origen ancestral en común. Las NOS presentan dos dominios, mostrados en la figura 1: un dominio N- terminal o dominio oxidasa, que contiene sitios de unión para el grupo hemo, tetrahidrobiopterina (BH₄), y L- arginina. Este dominio está unido por un sitio que reconoce calmodulina (CaM) al dominio C- terminal o dominio reductasa, el cual contiene sitios de unión para FAD, FMN y NADPH (McMillan *et al*, 1995; Richards *et al*, 1994; Ghosh y Stuehr, 1995).

Figura 1. Reacción catalizada y cofactores de la NOS. Los electrones (e^-) son donados por el NADPH al dominio reductasa de la enzima, y proceden vía FAD y FMN hacia el sitio activo, donde se encuentra el hierro (Fe) y el tetrahidrobiopterina (BH_4). En presencia de Arginina y O_2 , se produce Citrulina y NO (o NO^-).

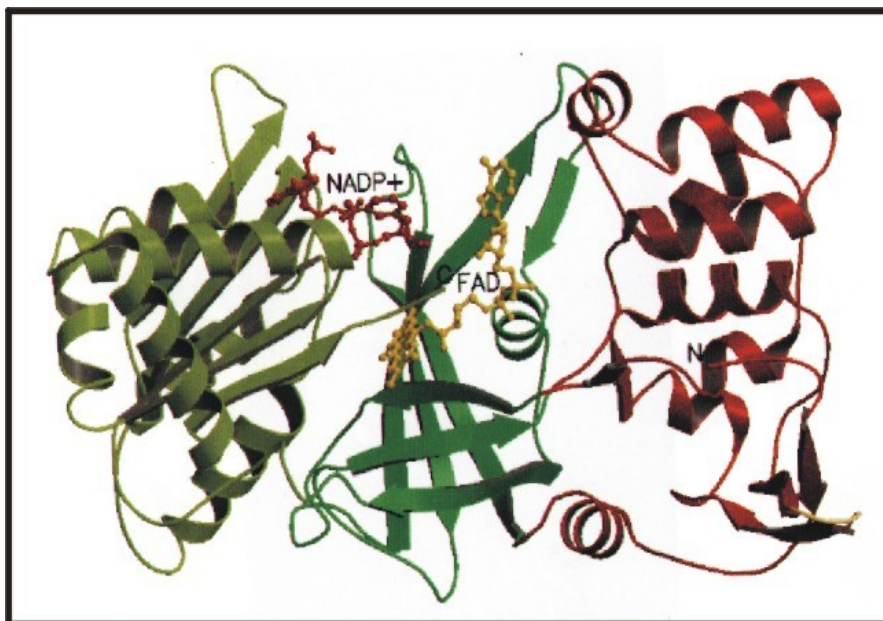


Los dominios reductasa y oxidasa, han sido caracterizados por proteólisis parcial (Sheta *et al*, 1994; Lowe *et al*, 1996, Chen *et al*, 1996), fueron expresados en una variedad de sistemas de expresión, y estudiados por cristalografía de rayos X. Esto permitió determinar sus propiedades estructurales y biofísicas. Ambos dominios, por separado, son catalíticamente activos; la producción de NO se reconstituía al juntarlos *in vitro*, tanto para la eNOS humana como para la iNOS murina (Ghosh *et al*, 1995). Se vio asimismo, que el dominio C- terminal es muy similar a la citocromo P- 450 reductasa, mientras que la porción N- terminal no tenía homología con otras proteínas conocidas (Bredt *et al*, 1991) (Fig. 2).

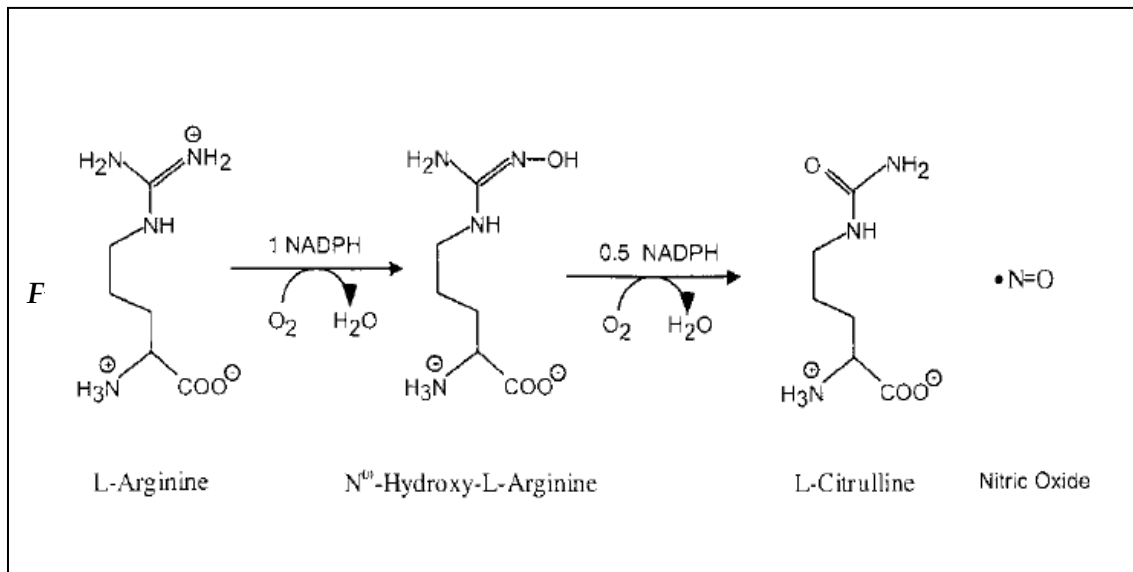


Courtesy of Dr. Peter M. H. Birbaumer (2007)

4



La reacción de formación del NO procede en dos pasos: primero, la NOS hidroxila uno de los nitrógenos guanidínicos de la L- arginina para dar N- hydroxi- L- arginina (NOHA), un intermediario de reacción que permanece unido a la enzima. La NOHA luego se oxida para generar NO y L- citrulina (Fig. 3). Los electrones son donados por el NADPH y el O₂ es utilizado como co- sustrato; un átomo se adiciona a la L- arginina para dar L- citrulina, y el otro forma parte del NO (Nathan, 1992). La transferencia de electrones a través de los grupos prostéticos de las NOS es compleja y los mecanismos propuestos son controvertidos. Todas las NOS requieren la presencia de BH₄ para estabilizar la formación del homodímero. Además, todas requieren la unión de CaM para permitir el flujo de electrones hasta L- Arg. La afinidad con que se une la CaM es una de las principales diferencias entre las isoformas de NOS; siendo muy afin la iNOS, y esta característica, es lo que la hace aparentemente independiente de calcio.



Como se menciona en párrafos anteriores, la NOS se asocia en dímeros para dar la isoforma fisiológicamente activa. Esta asociación involucra una gran interfase en el dominio oxidasa, que incluye el sitio de unión para BH₄, y ayuda a estructurar el bolsillo que contiene al sitio activo, que a la vez contiene al hemo y a la L- arginina.

La óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS)

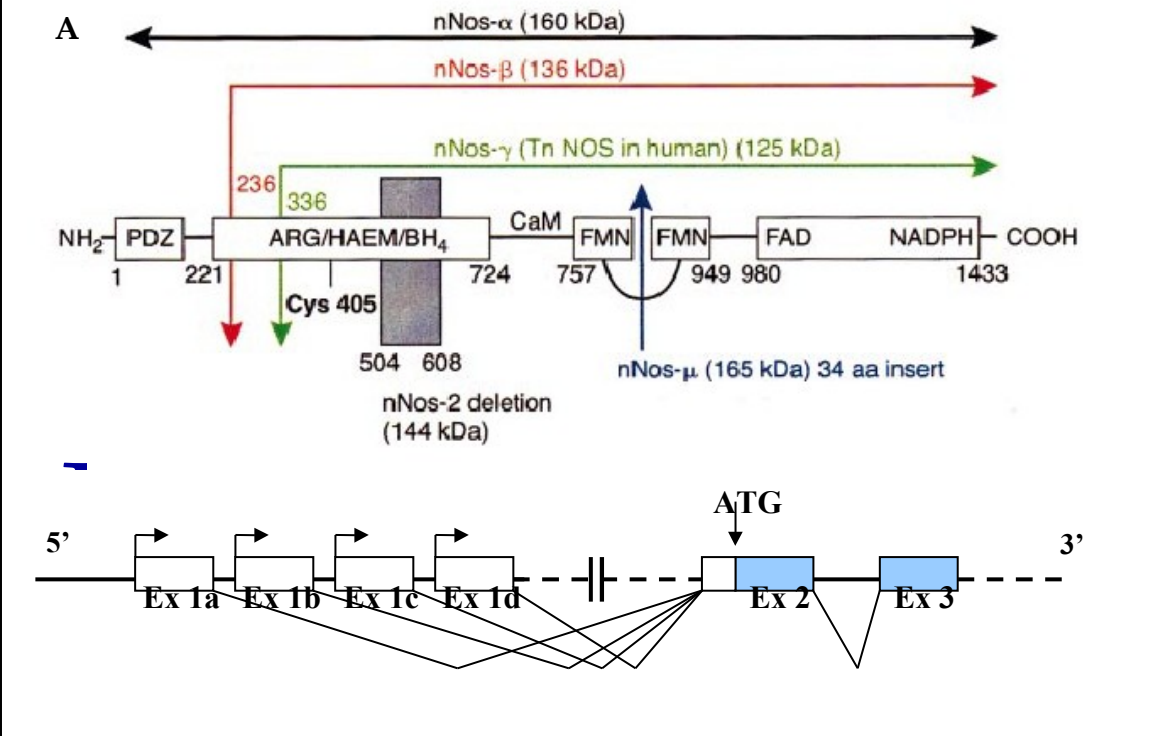
La nNOS fue la primera isoforma en ser purificada y clonada, a partir de cerebelo de rata, y es también conocida como NOS-1 (Bredt *et al*, 1990). La nNOS se expresa constitutivamente, pero su nivel de expresión puede ser modificado en proporciones importantes por diferentes estímulos. Su actividad está regulada por la concentración de Ca^{2+} intracelular; al unirse Ca^{2+} , la CaM adquiere una conformación muy afín por la nNOS, activándola. Por lo tanto, estímulos que impliquen la activación de la fosfolipasa C (PLC), con ulterior producción de inositol- trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG), induciendo la apertura de los canales de Ca^{2+} del retículo endoplásmico, o que activen canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática, activan transitoriamente a la nNOS.

El gen que codifica a la nNOS se localiza en el cromosoma 12 humano, y es uno de los más complejos que se conoce (Brenman *et al*, 1997), en particular en términos de uso del promotor (Wang *et al*, 1999). Consta de 29 exones y ocupa una región de ~200 kbp en el genoma. Cuando todos los exones son incluidos en el mRNA, la proteína monomérica resultante tiene un peso aproximado de 160 kDa y una extensión de 1429 aminoácidos (Ignarro, 1999), y se la conoce como la variante nNOS α . Entre sus características está la de poseer un dominio PDZ de unión a proteínas, a través del cual se asocia con proteínas estructurales de la membrana post- sináptica y con la distrofina en fibras musculares (Brenman *et al*, 1995 y 1996). La nNOS no se expresa exclusivamente en el sistema nervioso, sino que se encuentra en otros tipos celulares como el neutrófilo (Greenberg *et al*, 1998; Gatto *et al*, 1999), ciertos linfocitos, testículo y músculo esquelético.

El gen de la nNOS posee una amplísima variedad a nivel transcripcional (Brenman *et al*, 1997). Se conocen al menos 5 promotores y 3 exones 1 alternativos, que se utilizan en distintos tipos celulares, en distintos estadios del desarrollo (Fig. 4). Por ejemplo, en neuronas, además de la isoforma full- length de 157 kDa (nNOS α), se observó mediante el uso de ratones knock- out para el exón 2 de nNOS, la expresión de variantes más pequeñas; una de 144 kDa (nNOS β) y otra de 136 kDa (nNOS γ), dependiendo de cual exón 1 se incorpora al mRNA (Eliasson *et al*, 1997, Huang *et al*, 1993). Estas variantes, al carecer del exón 2, no tienen el dominio PDZ, y no pueden

unirse por lo tanto a membranas sinápticas. El splicing alternativo del exón 2 está regulado durante el desarrollo en cerebro de ratón (Eliasson *et al*, 1997), pero su funcionalidad aún se desconoce. La actividad catalítica de estas variantes se reportan como un 80% (nNOS β) y un 3% (nNOS γ) de la actividad de la isoforma full-length (nNOS α). En el músculo se encuentra una variante de splicing de mayor peso molecular (168 kDa), denominada nNOS μ (Silvagno *et al*, 1996), que tiene un inserto de 34 aminoácidos entre los dominios de unión a CaM y a FAD. Presenta asimismo, una disminución en la velocidad de consumo de NADPH y de reducción de citocromo *c*, con respecto a la variante α , que se ve reflejado en una menor velocidad de producción de H₂O₂. Por lo tanto, el espectro de variantes de nNOS y sus diferentes grados de actividad contribuyen en gran medida a la regulación de la producción de NO.

Figura 4. A) Variantes de splicing de la nNOS de rata. Los productos proteicos de splicing se denotan como flechas: nNOS α : aa 1- 1433, nNOS β : aa 236- 1433, nNOS γ : aa 336- 1433, nNOS μ : aa 1- 1433 más inserto de 34 aa en el dominio de unión a FMN. En caja gris se denotan los aa faltantes en una variante murina de nNOS (nNOS- 2). **B)** Esquema del uso de promotores alternativos en la transcripción del gen de la nNOS. Diferentes exones 1 (Ex1), cada uno regulado por un promotor propio, son usados alternativamente de manera tejido v estadio específica.

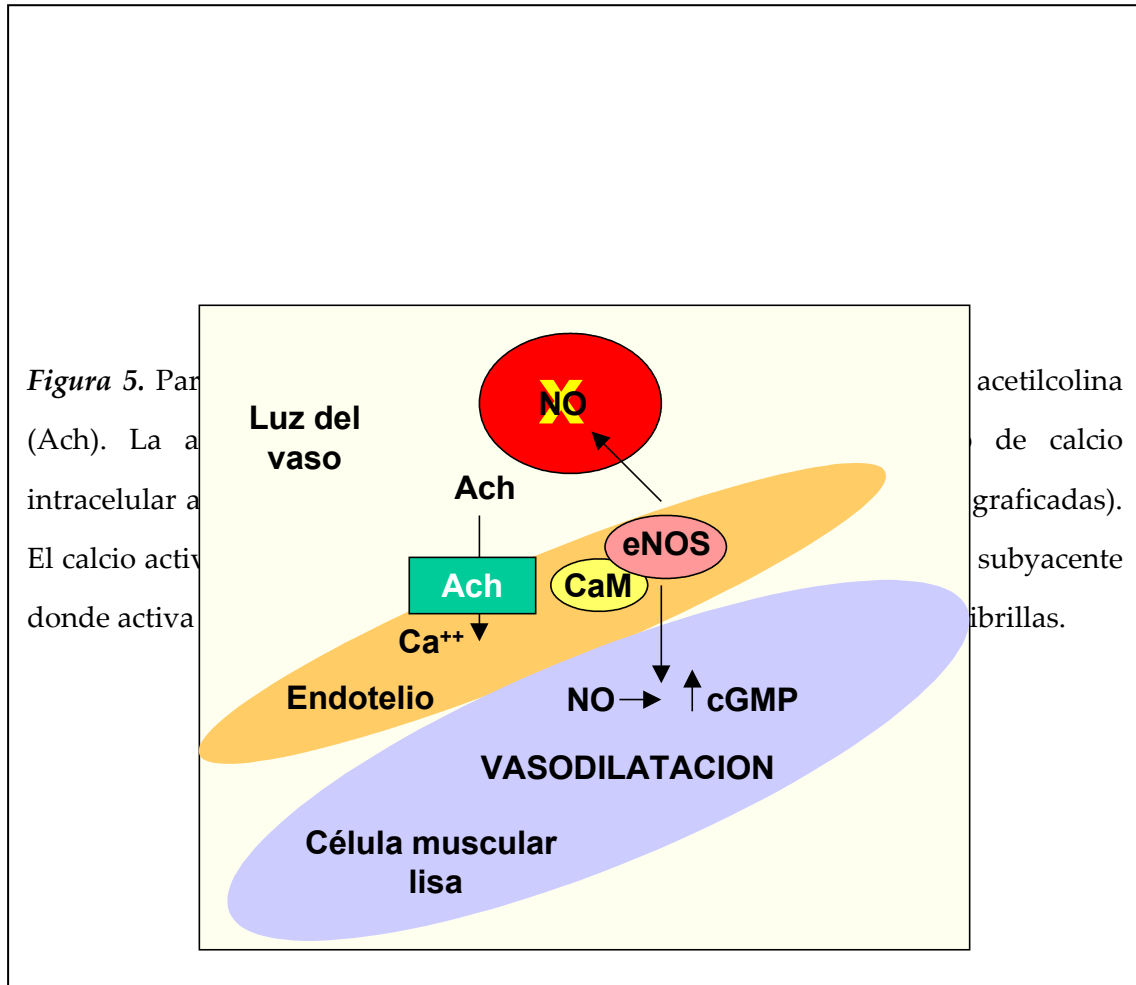


El NO sintetizado por la nNOS participa en procesos tan diferentes como la neurotransmisión en nervios no adrenérgicos- no colinérgicos (NANC) del tracto digestivo y urogenital, la transducción de señales desencadenada por glutamato, el estallido respiratorio de células fagocíticas y la apoptosis de algunos linfocitos (Nathan, 1992).

La óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS)

La eNOS fue purificada inicialmente de células endoteliales, de ahí su nombre (Lamas *et al*, 1992); también es llamada NOS- 3. Junto con la nNOS pertenece al subgrupo de NOS de expresión constitutiva. Su peso molecular deducido de la secuencia de 1205 aminoácidos, es de 133 kDa (Ignarro, 1999). Presenta un 60 % de homología con la nNOS, y se caracteriza por poseer una extensión en la región N-terminal con un sitio consenso para miristoilación (Pollock *et al*, 1992). Una vez que la enzima es modificada por el agregado del ácido graso, se favorece su asociación con la membrana plasmática en unas estructuras subcelulares denominadas caveolae, en fuerte asociación con la caveolina (Harrison, 1997). La eNOS es activada por la unión del complejo Ca^{2+}/CaM , luego de la exposición de las células a estímulos liberadores de Ca^{2+} , como la acetilcolina y bradiquinina, entre otros. La eNOS se expresa también en cardiomiocitos, linfocitos B, plaquetas y, curiosamente, en las neuronas piramidales del hipocampo, donde participa en procesos de memoria y aprendizaje (Ignarro, 1999). En las células endoteliales, el NO generado por la eNOS produce vaso- relajación del músculo liso subyacente y anti- agregación plaquetaria en el lumen de los vasos (Fig. 5) (Ignarro *et al*, 1987). El gen que codifica para esta isoforma posee 28 exones y una complejidad similar al gen de la nNOS, aunque ha sido estudiado en menor medida.

En respuesta a agonistas, eNOS es capaz de fosforilarse, y ésta acumulación de fosfatos torna a la enzima soluble (Michel y Busconi, 1993), disociándose de la membrana plasmática. Recientemente se ha reportado que la fosforilación, en particular de la Ser 1177 y Thr 495, regula la actividad de la eNOS (Chen *et al*, 1999; Dimmeler *et al*, 1999) a través de un signaling coordinado que involucra varias kinasas y fosfatasas.

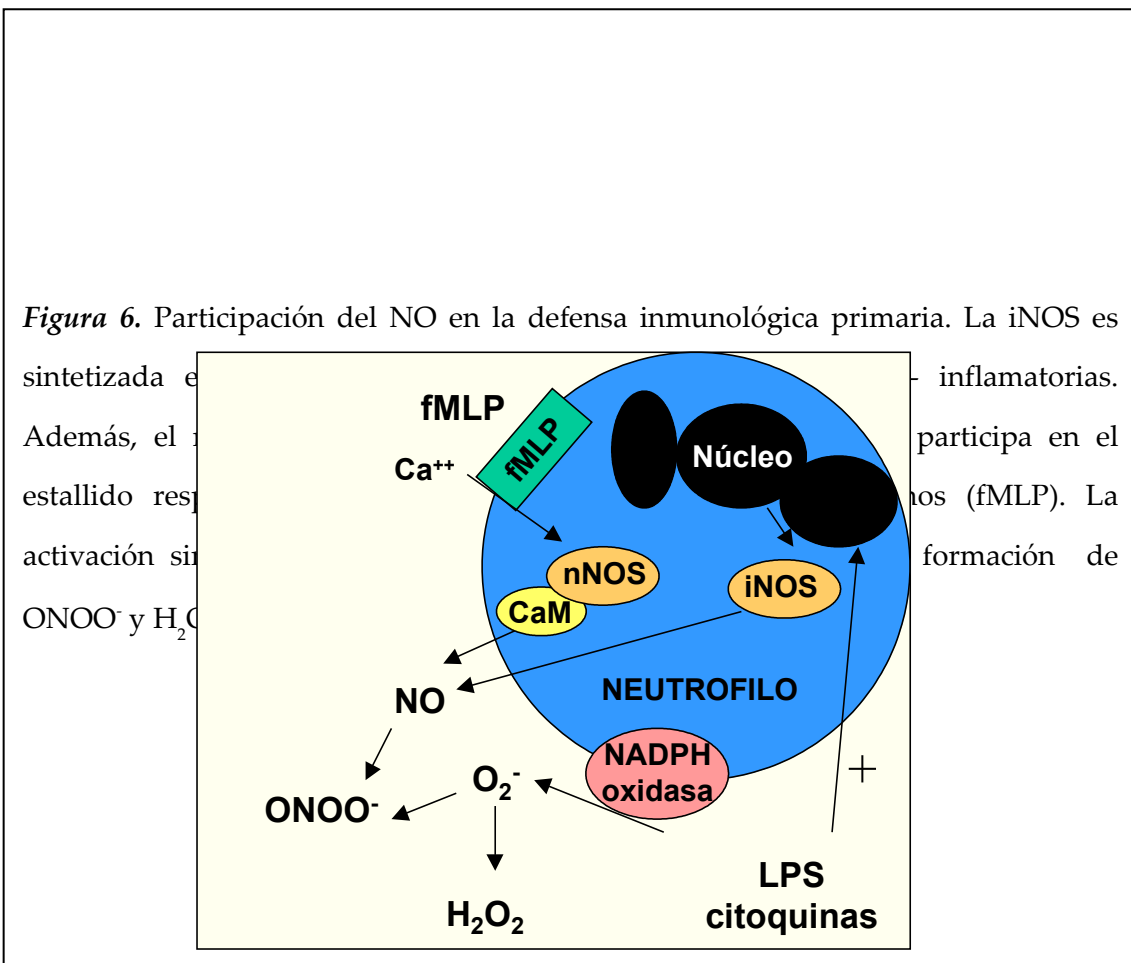


La óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)

La iNOS se diferencia de las isoformas anteriores, en el sentido que no depende estrictamente de Ca^{2+} para su actividad (tiene una altísima afinidad por la CaM, aún en ausencia de Ca^{2+}), y su velocidad máxima de producción de NO es del orden micromolar comparado con el orden nanomolar de las formas constitutivas. La enzima está normalmente activada hasta que es degradada proteolíticamente. El gen de la iNOS tiene un nivel de expresión basal muy bajo, siendo estimulado por citoquinas pro-inflamatorias, “shear stress”, hipoxia y otros estímulos de estrés en general. La iNOS puede expresarse entonces en casi todos los tipos celulares, donde cumple diferentes funciones (Fig. 6). Por ejemplo, participa en la defensa oxidativa contra

microorganismos en macrófagos, permite el mejor aprovechamiento del O_2 en situaciones de hipoxia, y permite una mayor vaso- dilatación, aumentando el flujo de sangre a los tejidos durante el “shear stress”. Sin embargo, su participación en procesos patológicos también ha sido ampliamente documentada, como mediador de la disfunción celular en situaciones tan diversas como el “distress” respiratorio del adulto, el shock séptico, la diabetes auto- inmune, y la esclerosis lateral amiotrófica, entre otros.

El NO generado por la iNOS ha demostrado tener efectos beneficiosos, entre ellos, antivirales, antimicrobianos, antiparasitarios, antitumorales e inmunomodulatorios. Sin embargo, la inducción aberrante de iNOS en el lugar y momento inadecuados, tiene consecuencias desastrosas, y parece estar involucrado en la patofisiología de varias enfermedades humanas. iNOS es principalmente regulada a nivel de expresión de la proteína, por mecanismos transcripcionales y post-traduccionales. Su expresión puede ser inducida por agentes como lipopolisacárido bacteriano, citoquinas y otros factores. Se ha demostrado que el promotor de iNOS responde a los factores de transcripción NFκB y STAT- 1, aumentando su expresión (Revisado en Kleinert *et al*, 2005).



Óxido nítrico sintasa mitocondrial

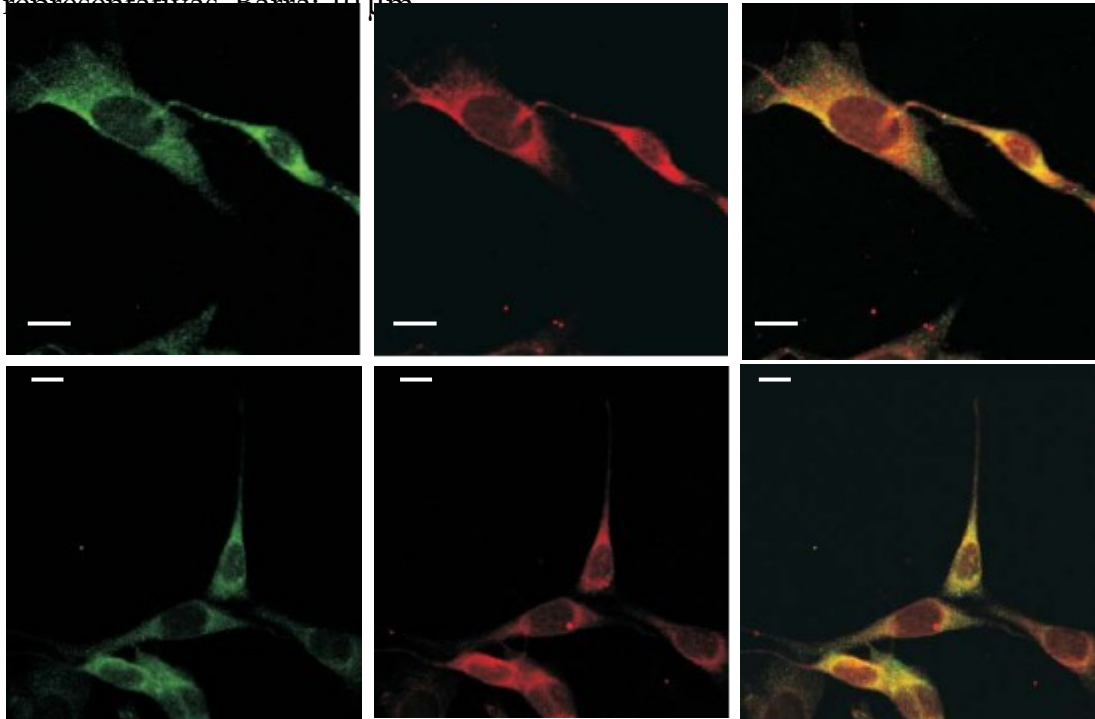
La existencia de una NOS mitocondrial (mtNOS) ha sido demostrada en una variedad de sistemas biológicos y mediante diferentes acercamientos experimentales. La producción de óxido nítrico en la mitocondria fue demostrado de forma directa (conversión de L- arginina a L- citrulina; método radioactivo) e indirecta (generación de NO, evaluado por resonancia electrónica paramagnética por atrapamiento de spin u oxidación de oxihemoglobina dependiente de NO). La expresión y actividad de una mtNOS constitutiva fueron demostradas por primera vez en mitocondrias de hígado de rata (Giulivi *et al*, 1998; Ghafourifar y Ritcher, 1997). Ghafourifar y Ritcher (1997) siguieron la producción de NO por oxidación de oxihemoglobina, y observaron producción de NO tanto en mitocondrias intactas como en mitoplastos (membrana mitocondrial interna que encierra matriz). Asimismo, vieron que las partículas sub-mitocondriales (la membrana interna inside- out), pero no la matriz mitocondrial, producían NO y eran sensibles a los inhibidores de las NOS convencionales, indicando que la mtNOS estaría asociada con la cara matricial de la membrana interna mitocondrial; y que produciría NO enzimáticamente. Otros laboratorios demostraron la existencia de la mtNOS en fracciones mitocondriales menos purificadas o en células aisladas, utilizando diferentes métodos como la colocalización de la producción de NO en la mitocondria, y la detección de NO con un electrodo específico, entre otros (Lopez-Figueroa *et al*, 2000; Kobzik *et al*, 1995, Kanai *et al*, 2001).

Dado que las isoformas constitutivas de la NOS, nNOS y eNOS, dependen de calcio para la producción de NO (Bredt y Snyder, 1990; Mayer *et al* 1989 y 1990), era de esperar que incrementos en el calcio mitocondrial se requiriesen para activar a la mtNOS. De acuerdo con esto, Ghafourifar y Ritcher (1997) observaron una estimulación en la producción de NO por mtNOS tras el agregado de Ca^{2+} a la mitocondria, lo cual disminuía tanto el consumo de O_2 mitocondrial como el potencial de membrana en la mitocondria ($\Delta\psi$). Los autores propusieron que un aumento en la incorporación de calcio por las mitocondrias que respiran puede llevar a un incremento en la formación de peroxinitrito dentro de la mitocondria, lo cual a su vez deviene en la liberación de calcio (Shweizer y Ritcher, 1996) por la vía dependiente del nucleótido piridina (Lötscher *et al*, 1979), seguido de la inactivación de la mtNOS. Estas observaciones fueron integradas en el marco de un feedback negativo, el cual

prevendría la sobrecarga de calcio, permitiendo su liberación y preservando por lo tanto el potencial de membrana (Ghafourifar y Ritcher, 1997).

A pesar que la existencia y las funciones mitocondriales de la mtNOS han sido confirmadas en muchos tejidos, órganos y células, aún se debate cual de las isoformas de las NOS clásicas sería la mtNOS. Siguiendo la producción de NO mitocondrial con electrodos para NO, se vio que ratones KO para nNOS no producían NO (Kanai *et al*, 2001). Independientemente, Elfering *et al* (2002) llegaron a la conclusión que mtNOS correspondería a la variante α de la nNOS. Brevemente, purificaron mtNOS y la separaron en electroforesis en 2D, seguida por digestión con tripsina o endoproteinasa V8 y analizaron los fragmentos por MALDIToF. Los resultados se correspondían con parte de la secuencia de nNOS. Como la nNOS murina tiene 5 isoformas (nNOS α , nNOS-2, nNOS β , nNOS γ , nNOS μ), se preguntaron entonces si mtNOS sería alguna de estas variantes o en cambio, un producto nuevo de splicing alternativo. Algunos de los fragmentos de splicing excluyeron a las variantes nNOS γ y nNOS-2. Además, las variantes nNOS γ y nNOS β , parecían no corresponder por peso molecular. Esto sugería que debía tratarse de la nNOS α o nNOS μ . Por RT-PCR sobre mensajeros de hígado de rata, con primers generados a partir de los fragmentos obtenidos por MALDIToF, identificaron a la isoforma nNOS α . Según estos autores, los resultados de MALDI, el peso molecular y el punto isoeléctrico obtenidos para esta enzima, indicarían que la mtNOS sería nNOS, excluyendo la posibilidad de un nuevo producto de splicing. Sin embargo, el peso molecular de la mtNOS es alrededor de 144-147 kDa (Riobo *et al*, 2002; Lores-Arnais *et al*, 2004), mientras el de la nNOS citosólica es de 157 kDa. Elfering *et al* (2002) atribuyen este cambio en la corrida electroforética a modificaciones post-traduccionales que ocurren en la enzima. Sin embargo, este hecho sumado a la reactividad cruzada que existe en la detección de mtNOS con los anticuerpos anti nNOS y anti iNOS, hace que aún no se haya logrado un consenso acerca de la secuencia aminoacídica de la mtNOS. En nuestro laboratorio, detectamos por microscopía confocal, utilizando un marcador específico de la mitocondria, el MitoTracker Red 580, y un anticuerpo anti nNOS, la co-localización de nNOS en la mitocondria, pero no la de iNOS (Fig. 7) (Galli *et al*, datos no publicados). Asimismo, Carreras *et al* vieron que en condiciones de sepsis, la isoforma inducible de la NOS también es capaz de translocar a la mitocondria (datos no publicados).

Figura 7. Co-localización de nNOS en mitocondrias de células NIH. Las células en cultivo se marcaron con un fluorocromo específico para mitocondrias, el MitoTracker Red 580 (panel central), y luego se fijaron, permeabilizaron y se marcaron específicamente con un anticuerpo anti-nNOS (panel izq.), y se observaron en microscopio confocal. A la derecha se muestra la co-localización de nNOS en mitocondrias. Dos fotos representativas. Barra: 10 μ m



Regulación de la mtNOS

Como mencionamos anteriormente, el NO interactúa de manera específica con diferentes componentes en la mitocondria; así puede competir con O_2 por la citocromo oxidasa y por lo tanto inhibir la respiración. Asimismo, el NO puede reaccionar con O_2^- y formar $ONOO^-$, el cual activa PKC, abre el canal de K^+ dependiente de ATP, y se inicia la liberación de citocromo *c*. Por esto, la producción de NO mitocondrial es una herramienta poderosa de control de la función mitocondrial, y es de esperar entonces que la actividad de la mtNOS sea modulable. En este contexto, en nuestro laboratorio hemos visto la modulación de la mtNOS 1) por hormonas (Carreras *et al*, 2001; Franco *et al*, en prensa), 2) en respuesta a la aclimatación al frío (Peralta *et al*, 2003), y 3) durante el desarrollo embrionario en hígado (Carreras *et al*, 2004) y cerebro (Riobo *et*

al, 2002) de ratas. Carreras y col. (2001) y Franco, demostraron que en el hipotiroidismo, adquirido por diferentes métodos experimentales, hay un aumento en la expresión y actividad de la mtNOS, que se revierte con el agregado de la hormona T3. En particular, Franco y col. (en prensa) vieron que la falta de T3 se traduce en un aumento del 100% en la expresión del mensajero y de la proteína nNOS, y que la mayor parte de nNOS translocaba a la mitocondria. Este aumento de la actividad mtNOS deviene en una disminución en el consumo de oxígeno mitocondrial, característico del hipotiroidismo. Peralta y col. (2003), vieron por su parte la respuesta de la mtNOS en la aclimatación la frío. Durante la aclimatación, observaron dos períodos bien delimitados: inicialmente las ratas perdían peso y aumentaban el consumo de O₂; posteriormente se regulaba la pérdida de peso, había deposición lipídica y disminuía el consumo de O₂. En este contexto, mtNOS se vio disminuida en el período inicial, y aumentaba en el segundo período, consecuente con la disminución en el consumo de O₂, y el aumento de la masa lipídica hacia el final de la aclimatación. Finalmente, Carreras y col. (2004) y Riobo y col. (2002), observaron que durante el desarrollo embrionario, había un progresivo aumento en la expresión de mtNOS en hígado y cerebro de ratas en desarrollo, respectivamente. mtNOS era prácticamente indetectable en los primeros estadios del desarrollo embrionario, y aumentaba paulatinamente hasta adquirir la máxima expresión en el estado adulto. El aumento de mtNOS deviene en un aumento de NO mitocondrial, y consecuentemente un aumento del H₂O₂. Este aumento en el H₂O₂ ocasionaría el arresto de las células en el estado adulto, quiescente, mientras que bajo H₂O₂ durante el desarrollo embrionario, sería el promotor de la activa división celular en estos tejidos.

Modificaciones post- traduccionales de la mtNOS

La mtNOS se encontró unida fuertemente a la membrana interna mitocondrial. Se llevaron a cabo entonces estudios para demostrar una posible acilación de la enzima, y se vio que ésta tenía unido un ácido mirístico a través de una unión oxi o tio- éster. El ácido mirístico se uniría probablemente en forma posterior a la transcripción, en una reacción reversible, catalizada por acil- transferasas. El patrón de acilación de la mtNOS es diferente al que presenta la eNOS, en la cual se observa una miristoilación o palmitoilación sobre los residuos cisteína, hacia el extremo N- terminal. No hay datos

de acilación sobre las otras isoformas de la NOS (nNOS e iNOS), y este fenómeno se condice probablemente con la localización de estas últimas en la fracción soluble (Haynes *et al*, 2004). La ocurrencia de uniones de lípidos sobre la mtNOS, indicaría un rol modulador alternativo, basado en la acilación- desacilación de la enzima. La función exacta de la miristoilación de mtNOS aún se desconoce, pero se especula que la unión de mtNOS a membrana a través del grupo lipídico sería ventajosa, puesto que el NO sería producido cerca de su lugar de acción, minimizando las reacciones secundarias, y aumentaría la vida media de este radical, puesto que estaría protegido de las reacciones rápidas que lo consumen en solución acuosa (Haynes *et al*, 2004).

Asimismo, estudios en el laboratorio de la Dra. Giulivi, indican que la mtNOS estaría fosforilada en un fragmento entre los aminoácidos 1408 y 1421 (Elfering *et al*, 2002). Se han reportado estudios de fosforilación sobre las otras isoformas de las NOS. En particular, la fosforilación de eNOS en la Ser 1177 humana o 1179 bovina, presentan un rol modulador sobre esta enzima. Estas serinas son homólogas a la Ser 1413 de la nNOS de ratón, lo que sugiere que ésta sería la Ser fosforilada en la mtNOS. Una vez más, esta modificación podría tener un rol en la regulación de la actividad de la mtNOS. Haynes y *col.* (2004) piensan que esta modificación podría aumentar la actividad de la mtNOS, del mismo modo que sucede con la eNOS. En este contexto, en nuestro laboratorio, Antico Arciuch y Finocchietto, en trabajos independientes, demuestran un aumento en la actividad de la mtNOS que correlaciona con un aumento de la forma activada de Akt en la mitocondria. Este aumento en la actividad de mtNOS puede ser revertido con los inhibidores de Akt, lo que sugiere que Akt es capaz de fosforilar a mtNOS, y que esta fosforilación sería la causa del aumento en la actividad de la enzima (datos no publicados).

La mitocondria

La mitocondria

La mitocondria es la organela en la cual se produce el proceso de fosforilación oxidativa, a través del cual se provee energía para el metabolismo celular. Esta organela esta presente en todas las células eucariotas. La mitocondria está compuesta por dos membranas, una interna y otra externa, que encierran una densa matriz que incluye enzimas que median el metabolismo mencionado, así como otras reacciones de la célula, y múltiples copias de un genoma que codifica para unas pocas proteínas de la membrana interna y los RNA de transferencia que van a ser utilizados para su traducción. Los varios cientos de otras proteínas presentes en la mitocondria son codificados por el DNA nuclear, y son sintetizados e importados, desde el citosol hacia la mitocondria. El mecanismo fundamental de transducción de energía en la mitocondria es la quimio- osmosis (Mitchell, 1979), en el cual la energía libre de la oxidación de los ácidos carboxílicos es usada para bombear protones fuera de la matriz, estableciendo un gradiente electro- químico. La ATP sintasa acopla el transporte de estos protones a favor de su gradiente a través de la membrana interna, y hacia la matriz, con la fosforilación de ADP para producir ATP. El entendimiento básico de la función mitocondrial se ha incrementado enormemente en los últimos años, debido a avances en el conocimiento de la estructura de la mitocondria, con metodologías cada vez más resolutivas (Frey y Mannella, 2000). Así, la imagen tradicional de los libros de texto que muestran a la mitocondria como una colección de organelas oblongas de tamaño similar con crestas que se extienden hacia el interior de la matriz, ha quedado invalidado. Ahora se comprende a la mitocondria como una red dinámica en constante fusión y fisión, formando un complejo retículo que interactúa con otros componentes celulares, en particular el citoesqueleto y el retículo endoplásmico (Rizzuto *et al*, 1998; Rutter y Rizzuto, 2000; Mannella, 2000). En los próximos párrafos se describirá en mayor detalle la estructura mitocondrial, así como el proceso de fosforilación oxidativa, y el rol de la organela en la regulación de la progresión del ciclo celular.

Estructura de la mitocondria

Sjöstrand y Palade encabezaron los trabajos pioneros acerca de la ultraestructura de la mitocondria. Ambos reconocieron dos membranas en la organela, pero sus interpretaciones llevaron a modelos diferentes. Sjöstrand (1956) definía a la mitocondria como un compartimiento encerrado por dos membranas, en cuyo interior se extendían prolongaciones como septos que separaban a la matriz en varios compartimentos. Palade (1952) también observó que desde la membrana interna se extendían prolongaciones a las que llamó crestas mitocondriales, pero en su modelo, no eran septos, sino de forma irregular. El modelo de Palade evolucionó en lo que luego sería la imagen corriente en los libros de texto acerca de la mitocondria, en la cual la membrana interna es una superficie continua y compleja de la cual se extienden las crestas mitocondriales hacia la matriz, de manera irregular y confusa, casi de un lado a otro (Fig. 8).

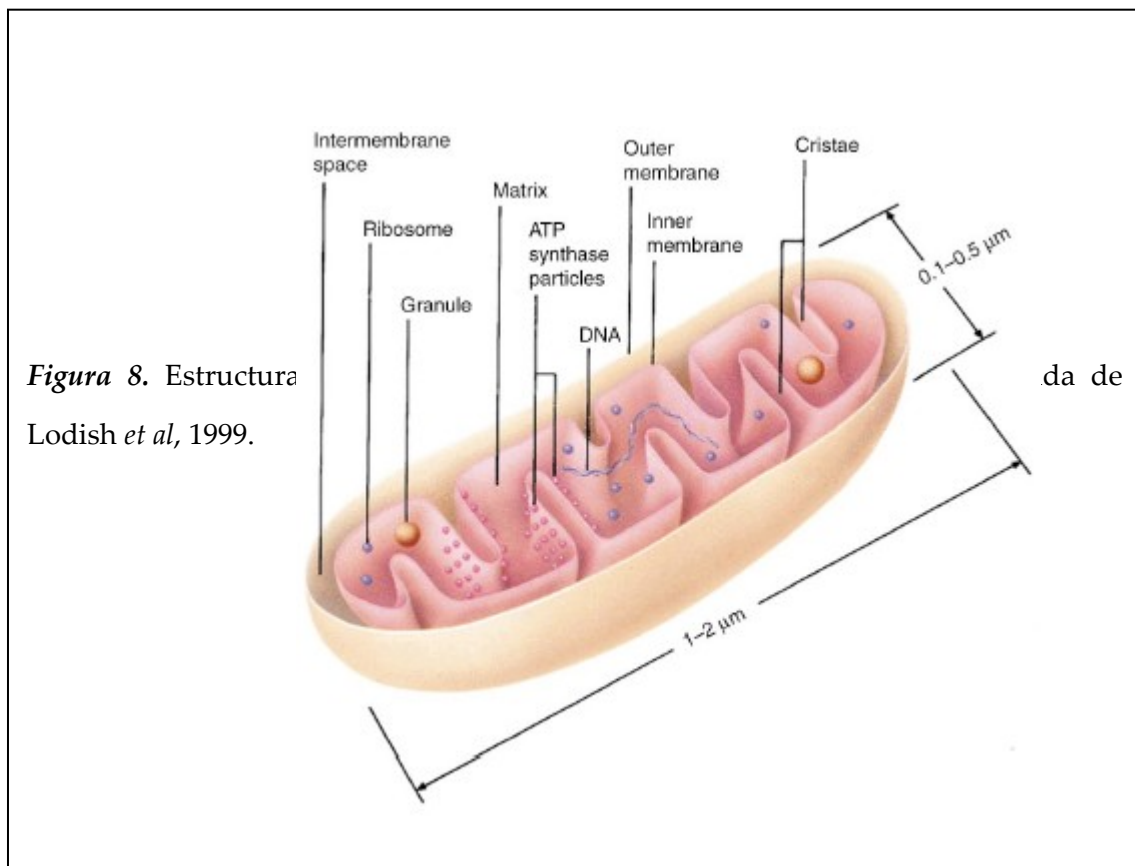


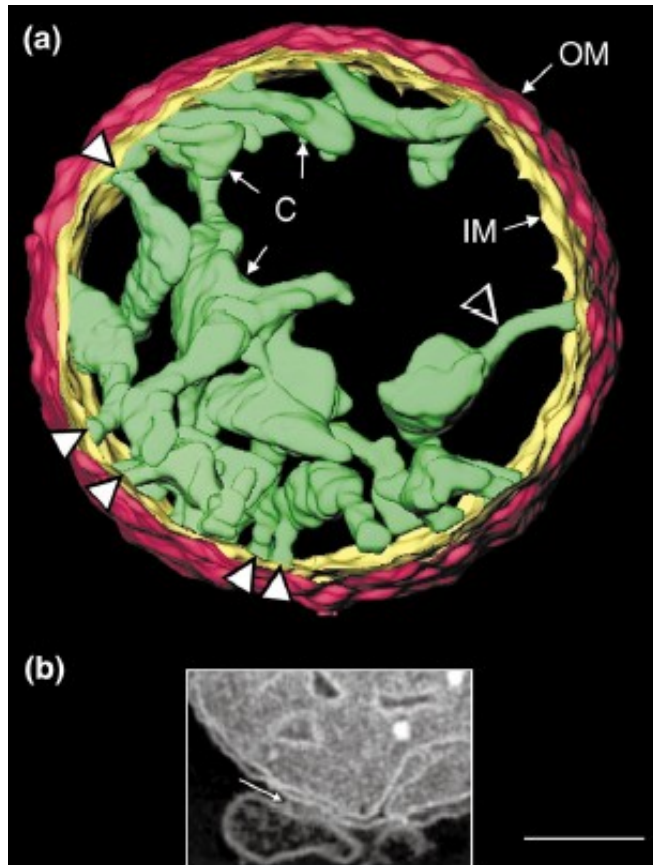
Figura 8. Estructura
Lodish *et al*, 1999.

Posteriormente, Hackenbrock (1966) demostró que la membrana interna se fusiona con la externa en puntos determinados, llamados sitios de contacto.

Con el advenimiento de tomografía por microscopía electrónica, se mostró por primera vez que el modelo tradicional era en realidad erróneo, ya que las imágenes en 3D mostraban de manera clara que las crestas mitocondriales no eran estructuras confusas que se abrían en la matriz, sino más bien tenían una naturaleza tubular (Fig. 9A), y se conectaban entre sí, y con la membrana interna.

Figura 9. Tomografía de una mitocondria aislada de rata. A) imagen 3D: C, crestas; OM, membrana externa; IM, membrana interna. Se observa que las crestas son cisternas saculares que se pueden unir entre ellas (\blacktriangle) y con la IM (\triangle). B) región de 5 nm del mismo tomograma que muestra numerosos sitios de contacto entre la IM y la OM. La flecha señala un puente entre la OM y una vesícula de posible retículo endoplásmico.

Tomada de Frey y Manella, 2000. Barra 0.4 μm .



Luego de aplicar esta tecnología a mitocondrias de varios tejidos, y con la ayuda de programas que reconstruyen imágenes en 3D, se llegó al modelo definitivo de la mitocondria (Fig. 10): en este modelo, la membrana interna y las crestas son una superficie continua en la cual las crestas se unen a la membrana interna, y entre sí, a través de una estructura tubular que llamaron “junciones de las crestas”. Las crestas en su mayoría son tubulares, aunque puede haber algunas aplanadas. En algunos casos,

como las mitocondrias del sistema nervioso, las crestas pueden ser tan aplanadas que forman “láminas” (lamellae). En la figura 10 B se muestran 4 morfologías diferentes de crestas, mostradas en amarillo, verde, rojo o gris, dependiendo de cuantas crestas se fusionen para formarlas.

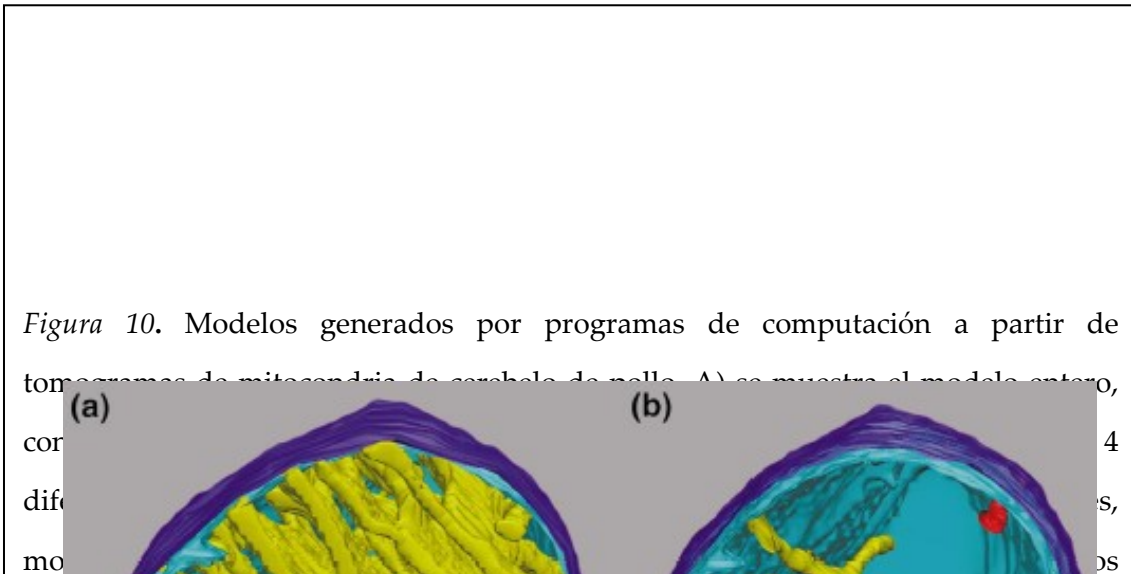


Figura 10. Modelos generados por programas de computación a partir de tomogramas de mitocondria de cerebro de ratón. A) se muestra el modelo entero, B) se muestran 4 morfologías diferentes de crestas, mostradas en amarillo, verde, rojo o gris, dependiendo de cuantas crestas se fusionen para formarlas.

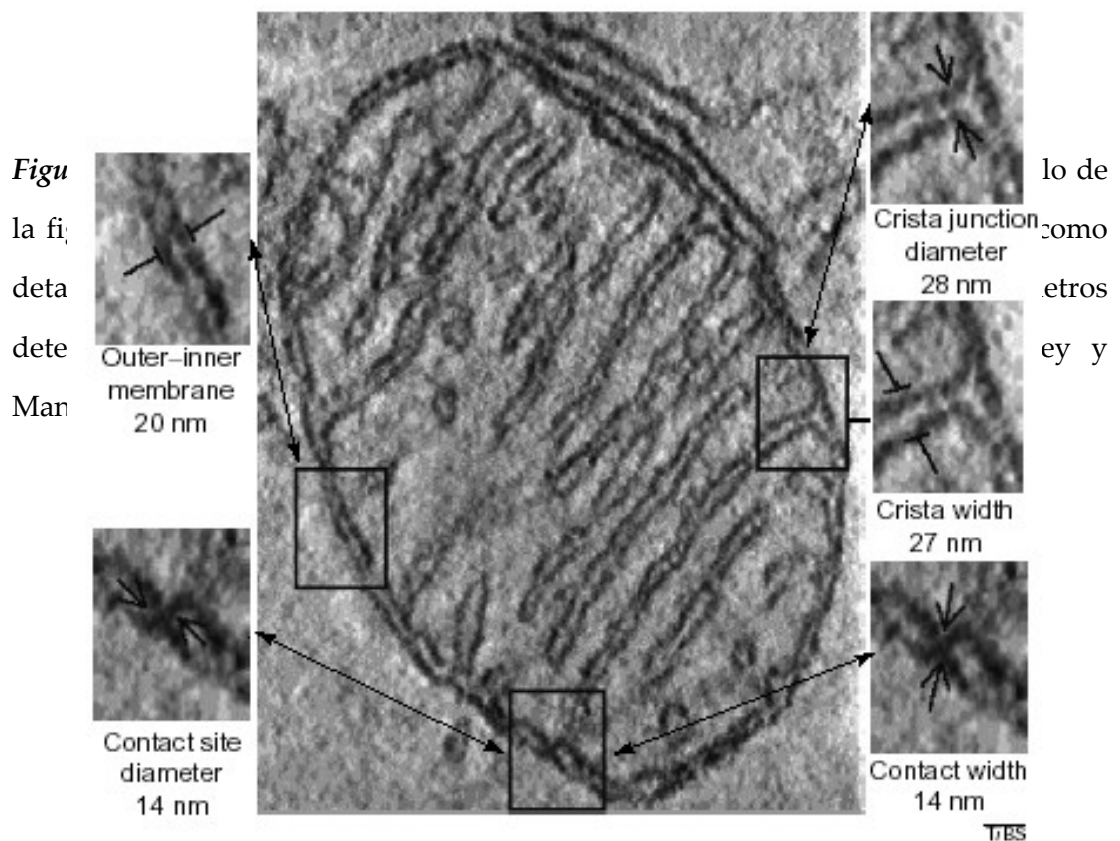


Figura 10. Modelos generados por programas de computación a partir de tomogramas de mitocondria de cerebro de ratón. A) se muestra el modelo entero, B) se muestran 4 morfologías diferentes de crestas, mostradas en amarillo, verde, rojo o gris, dependiendo de cuantas crestas se fusionen para formarlas.

En contraste con el modelo estándar de mitocondria, los modelos provistos por reconstrucción de imagen, sugieren que la difusión lateral en los compartimentos internos de la mitocondria estaría severamente restringida, y esto tendría serias implicancias funcionales, dado que la fosforilación oxidativa depende del rápido flujo de iones y proteínas desde y hacia sitios de reacción y/ o transporte. En este contexto, el número y tamaño de las crestas podría regular la síntesis de ATP. De la misma manera, el volumen y la forma de las crestas, podría afectar la difusión del citocromo *c*, así como la fracción del mismo unido a membrana. Por lo tanto, la morfología de la membrana interna podría regular la velocidad de las reacciones redox que involucran al citocromo *c*, y la accesibilidad de dicha molécula a la membrana externa (Frey y Mannella, 2000), y por ende afectar al signaling celular.

Asimismo, y como se mencionó en el párrafo introductorio, ya no se entiende a la mitocondria como una subpoblación discreta de organelas, sino que están unidas entre sí, conformando una especie de retículo. Este retículo mitocondrial puede ser visualizado con marcadores fluorescentes y presenta ventajas en cuanto al metabolismo

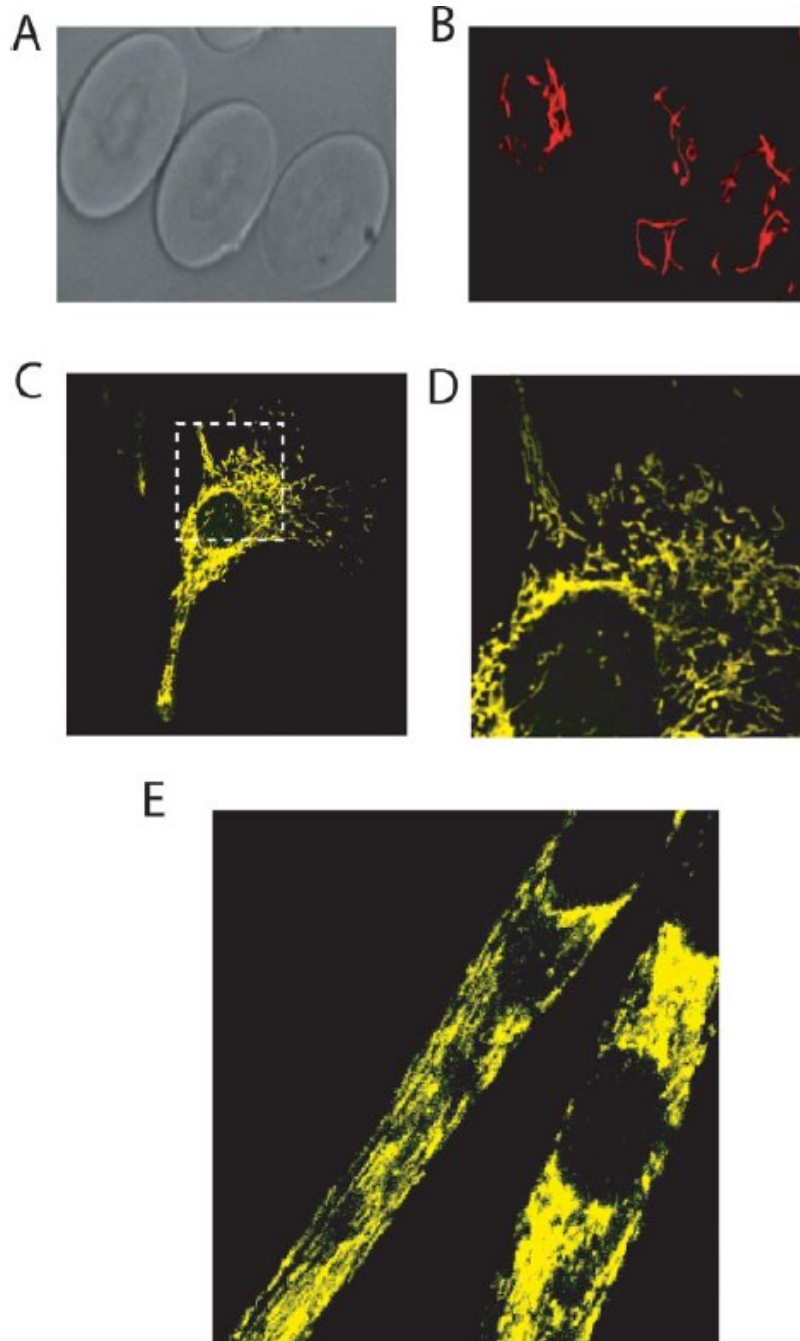


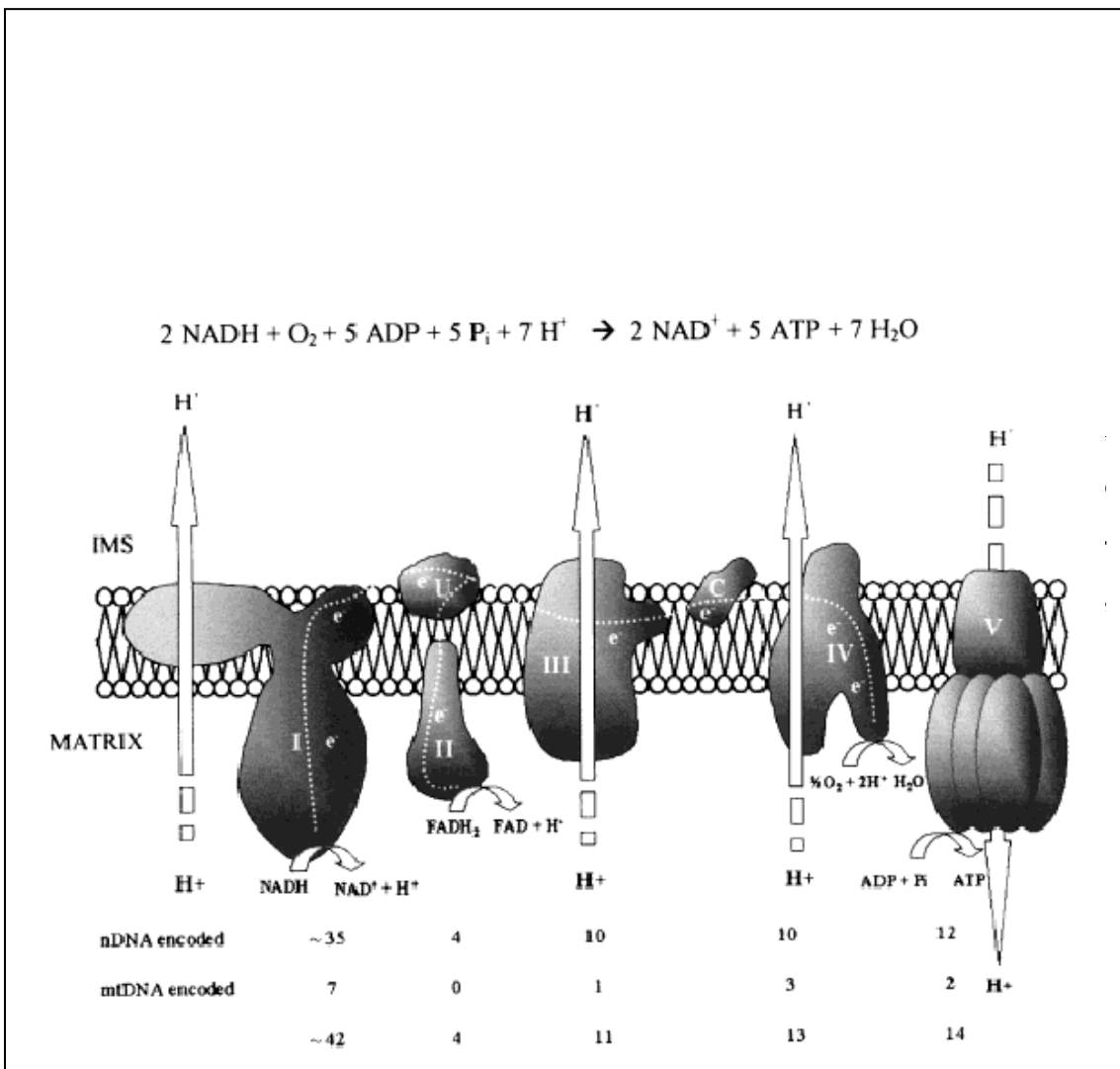
Figura 12
 organelas
 fluoresce
 la mitoco
 TMRM. (C
 fluoresce
 una secue

lección de
 marcadores
 cumula en
 gados con
 proteína
 ndria por
 13).

La fosforilación oxidativa

La fosforilación oxidativa (OXPHOS) es el corazón del metabolismo energético en animales, plantas y en la mayoría, sino en todas, las formas de vida microbianas. Se define como la oxidación de moléculas por oxígeno, y la consecuente transformación de esta energía en ATP. Está compuesta por un sistema de moléculas, que en animales y plantas se halla embebido en la bicapa lipídica de la membrana interna mitocondrial, y consiste en aceptores de electrones, coenzima Q, citocromo *c*, y cinco complejos con múltiples subunidades (Complejos I- V). Comprende acerca de 70 productos de genes codificados por el genoma nuclear, y 13 productos del genoma mitocondrial (van de Heuvel y Smeitink, 2001).

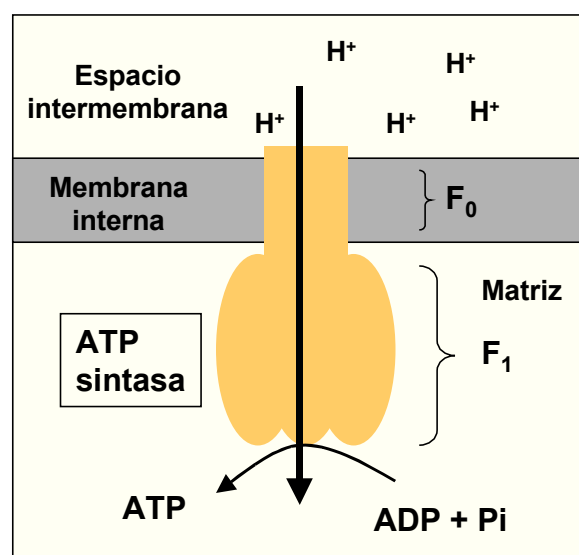
Entonces, la generación de energía en la mitocondria ocurre principalmente a través de la OXPHOS, en un proceso en el cual los electrones son transportados a lo largo de una serie de proteínas que se conocen conjuntamente con el nombre de cadena de transporte de electrones. Estos electrones son generados a partir del NADH y FADH₂, los cuales se producen a su vez por la oxidación de nutrientes, y son transferidos en última instancia al oxígeno molecular. La cadena de transporte de electrones consiste en 4 complejos enzimáticos integrados por varias subunidades cada uno, que se despliegan en la membrana interna mitocondrial, en una orientación



El complejo I o NADH- ubiquinona óxido- reductasa, tiene como función la deshidrogenación del NADH y el transporte de electrones a la coenzima Q. Esta transferencia de electrones está acoplada al paso de protones a través de la membrana interna mitocondrial, generando la fuerza protón motriz requerida para la síntesis de ATP. El complejo I en humanos consta de 43 subunidades proteicas y muchos cofactores no proteicos que incluyen flavinas mononucleótido, centros hierro- azufre y fosfolípidos, entre otros. El complejo II o succinato- ubiquinona óxido- reductasa, cataliza la oxidación de succinato a fumarato, proceso durante el cual los electrones del FADH₂ son transportados hasta la ubiquinona. Este complejo no contribuye al gradiente de protones. Está compuesto por la enzima succinato deshidrogenasa, soluble, anclada a la membrana por dos subunidades menores, que llevan el citocromo *b558* y el sitio de unión a ubiquinona. El complejo III o ubiquinol- citocromo *c* óxido- reductasa

(citocromo *bcl*) comprende 11 componentes, y cataliza la transferencia de electrones desde el ubiquinol al citocromo *c*, y la subsiguiente translocación de protones hacia el espacio intermembrana. El complejo IV o citocromo *c* oxidasa, forma la porción terminal de la cadena de transporte de electrones, y muestra un patrón complejo de expresión de isoformas enzimáticas, incluso específico para cada tejido, y sujeto a modulación durante el desarrollo. Cataliza la oxidación del oxígeno molecular, formando H_2O . Funciona como dímero y está compuesto por 13 subunidades cada monómero. Se ha propuesto que la diversidad de subunidades observada sería responsable de la regulación tejido específica de la eficiencia en la formación de energía en mitocondrias de músculo y corazón, y podría tener un rol en el mantenimiento de la temperatura corporal en reposo (Frank y Kadenbach, 1996). El complejo V o ATP sintasa cataliza la reacción de formación de ATP a partir de ADP y fósforo inorgánico, utilizando la energía provista por el gradiente de protones. El consenso actual es que la translocación de tres protones promueven la síntesis de una molécula de ATP, a pesar que algunas veces se afirma que con solo dos protones es suficiente (Brand, 1994). El complejo V contiene dos partes (Fig. 14): la fracción F_0 de 160 kDa, se encuentra embebida en la membrana interna mitocondrial, y está constituida por subunidades δ , ϵ y γ ; la fracción F_1 de 370 kDa, está en la matriz y se conecta a la F_0 por un puente corto, posee subunidades α y β y tiene el sitio activo con función ATPásica o de ATP sintasa, de acuerdo a la relación ATP: ADP. La F_0 sirve como canal conductor de protones. El cambio conformacional en F_0 que ocurre durante el paso de protones por el canal, se transfiere a la F_1 a través del puente, y ocurre entonces la reacción de formación de ATP (van de Heuvel y Smeitink, 2001).

Figura 14. Estructura de la ATP sintasa y localización en la membrana mitocondrial interna: utiliza la energía potencial generada durante el transporte de electrones para la síntesis de ATP



Para que la energía sea eficientemente utilizada, los protones deben regresar a la matriz a través de la ATP sintasa. Si esto ocurre, se dice que la mitocondria está acoplada. En efecto, la eficiencia de la OXPHOS se define como la relación entre la cantidad de fósforo inorgánico incorporado a ATP por mol de oxígeno consumidos (P/O). Los procesos que llevan a una disminución en P/O, debidos en su mayoría a la falta o disminución en el gradiente de protones generado por la cadena de transporte de electrones, lleva a un desperdicio de energía redox y a un incremento de la termogénesis, sin formación de ATP. Se dice que la mitocondria está desacoplada. Muchos compuestos pueden disipar el gradiente de protones a través de la membrana interna y por lo tanto disminuir P/O. Estos incluyen, *a*) los clásicos desacoplantes químicos de la OXPHOS (Heytler, 1980; Terada, 1990) como el 2, 4- dinitrofenol y la tri- fluoro- metoxi- fenilhidrazona- carbamil- cianuro (FCCP), los cuales son ácidos débiles lipofílicos, que se protonan en el espacio intermembrana y atraviesan libremente la membrana interna, liberando los protones en la matriz; *b*) los ácidos grasos (Köhnke *et al*, 1993); *c*) la pérdida inespecífica de protones (proton leak) (Terada, 1990); y *d*) las proteínas desacoplantes del tejido adiposo pardo (UCPs) (Rolfé *et al*, 1997; Nicholls y Loke, 1984; Cannon y Nedergaard, 1992). Asimismo, la ATP sintasa puede ser inhibida farmacológicamente a distintos niveles: el sitio activo es bloqueado por la oligomicina, y el canal de protones por la valinomicina (Stryer, 1988).

La cadena respiratoria puede ser inhibida en distintos segmentos (Rickwood *et al*, 1987) (Fig. 15). El complejo I es sensible a rotenona y a la toxina parkinsoniana metilfenilpiridina (MPP⁺). El complejo II es sensible al ácido 3- nitropropiónico. El

complejo III es bloqueado entre los citocromos b_{558} y b_{564} por la antimicina A. La inhibición de este sitio hace que se acumule el radical semiquinona, lo cual aumenta notablemente la velocidad de producción de anión superóxido al auto-oxidarse este último a ubiquinol (Boveris *et al*, 1975). También puede bloquearse la transferencia de electrones entre los citocromos b y c_1 con mixotiazol, sin la consecuente estimulación de la producción de radicales libres. El complejo IV se inhibe, a nivel del grupo hemo, por cianuro, azida y NO, todos inhibidores competitivos del O_2 , pero con diferente afinidad por la enzima.

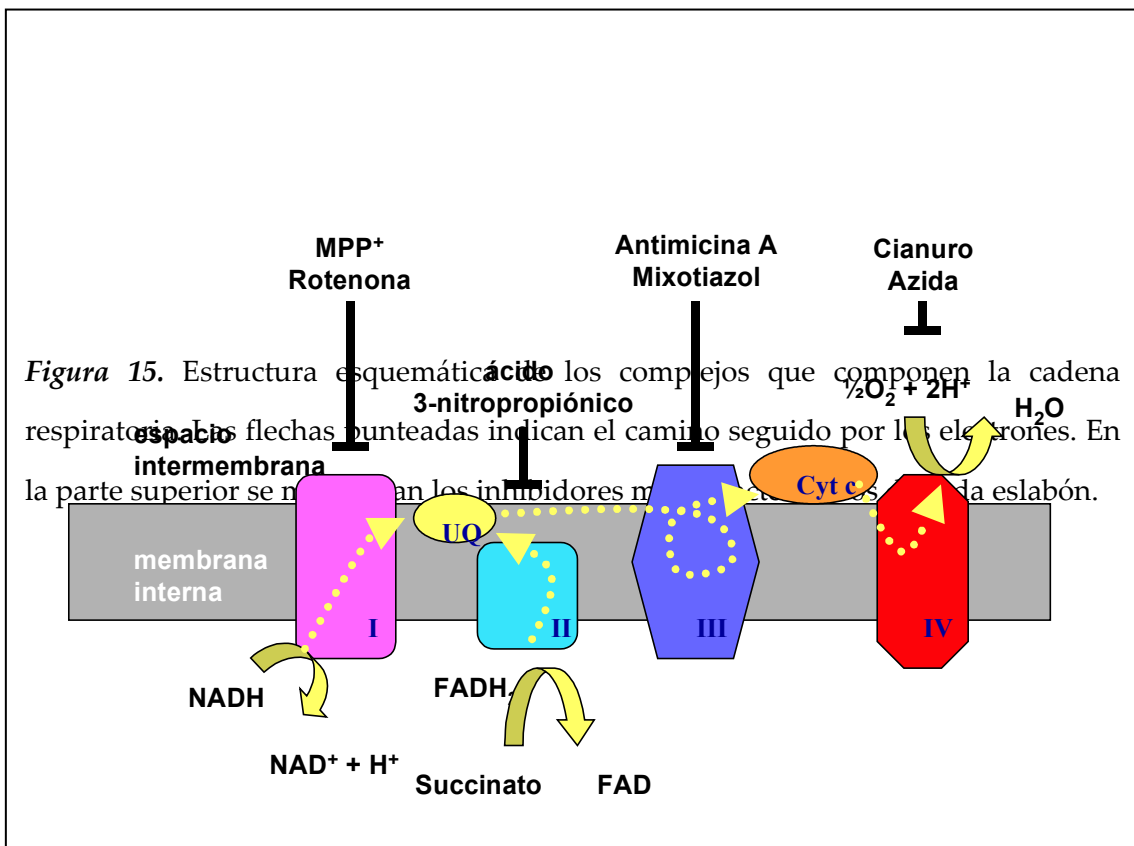


Figura 15. Estructura esquemática de los complejos que componen la cadena respiratoria. Las flechas punteadas indican el camino seguido por los electrones. En la parte superior se muestran los inhibidores más comunes.

Efectos del óxido nítrico sobre la mitocondria

El NO actúa sobre varios sitios de la cadena de transporte de electrones, teniendo el efecto más importante sobre la citocromo oxidasa. El NO es un inhibidor con alta afinidad por el complejo IV ($IC_{50} = 0.1 \mu M$), que compite con el O_2 por el sitio de unión a la enzima, el centro B- Cu^{2+} y el ferricitocromo a_3 (Torres *et al*, 1995). La inactivación es reversible y dependiente de la dosis (Tabla 3) (Fig. 16) (Cleeter *et al*, 1994; Poderoso *et al*, 1996). Este efecto del NO se alcanza en concentraciones bajas fisiológicas (50- 100 nM NO inhiben el 50% de la actividad de la citocromo oxidasa). Asimismo, al ser el NO un inhibidor competitivo del O_2 , el efecto del NO es dependiente de la concentración de este último: cuando disminuye pO_2 , aumenta el efecto del NO, y disminuye así el consumo de oxígeno. Cuando la relación O_2 : NO es 1:150, el consumo de oxígeno se reduce al 50 % del máximo (Poderoso *et al*, 2000).

Los complejos succinato- citocromo *c* reductasa (complejo II- III) y NADH- citocromo *c* reductasa (complejo I- III) realizan el pasaje de electrones a través de citocromos *b*, ubiquinol y centros hierro- azufre. En presencia de NO, ambas actividades se inhiben, de forma reversible, lo cual sugiere que el sitio de inhibición está sobre esta región en común (Tabla 1). De hecho, el sitio de unión se localiza en los citocromos bc_1 . La inhibición en este sitio en la cadena respiratoria lleva a la producción de O_2^- y su producto de dismutación, H_2O_2 (Trumpower, 1990). Con lo cual, el NO estimula la producción de ambas especies, con un $ED_{50} = 0.3 \mu M$, el mismo con el cual inhibe el citocromo bc_1 (Tabla 2).

Figura 16. Inhibición de la actividad de la citocromo oxidasa (complejo IV) por NO.

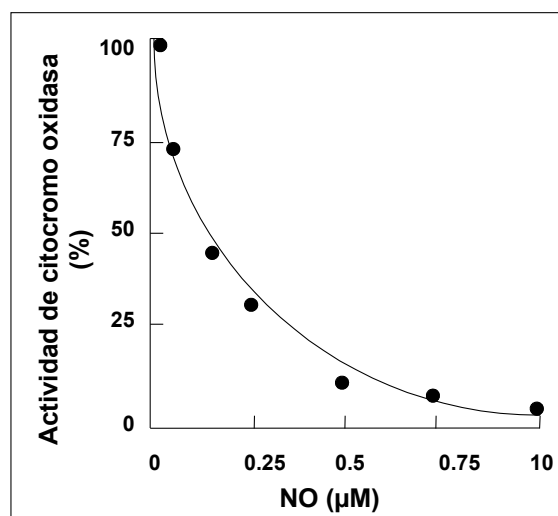


Tabla 1. Reversibilidad de la inhibición de la citocromo oxidasa por NO. * $P < 0.05$

	$[k' \text{ (min}^{-1}) \text{ mg proteína}^{-1}]$
Control	20 ± 1
50 nM NO	$12 \pm 1^*$
50 nM NO + succinato	15 ± 1
Id + antimicina A	18 ± 2
Id + 1 μM SOD	$8 \pm 1^*$
50 μM peroxinitrito	16 ± 3

La inhibición de la cadena respiratoria por NO estimula la producción de O₂⁻, el cual, al reaccionar con NO para formar peroxinitrito (ONOO⁻), restaura la respiración al desbloquear a la citocromo oxidasa (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto del NO sobre los complejos de la cadena respiratoria. * P < 0.05, ND: no detectable

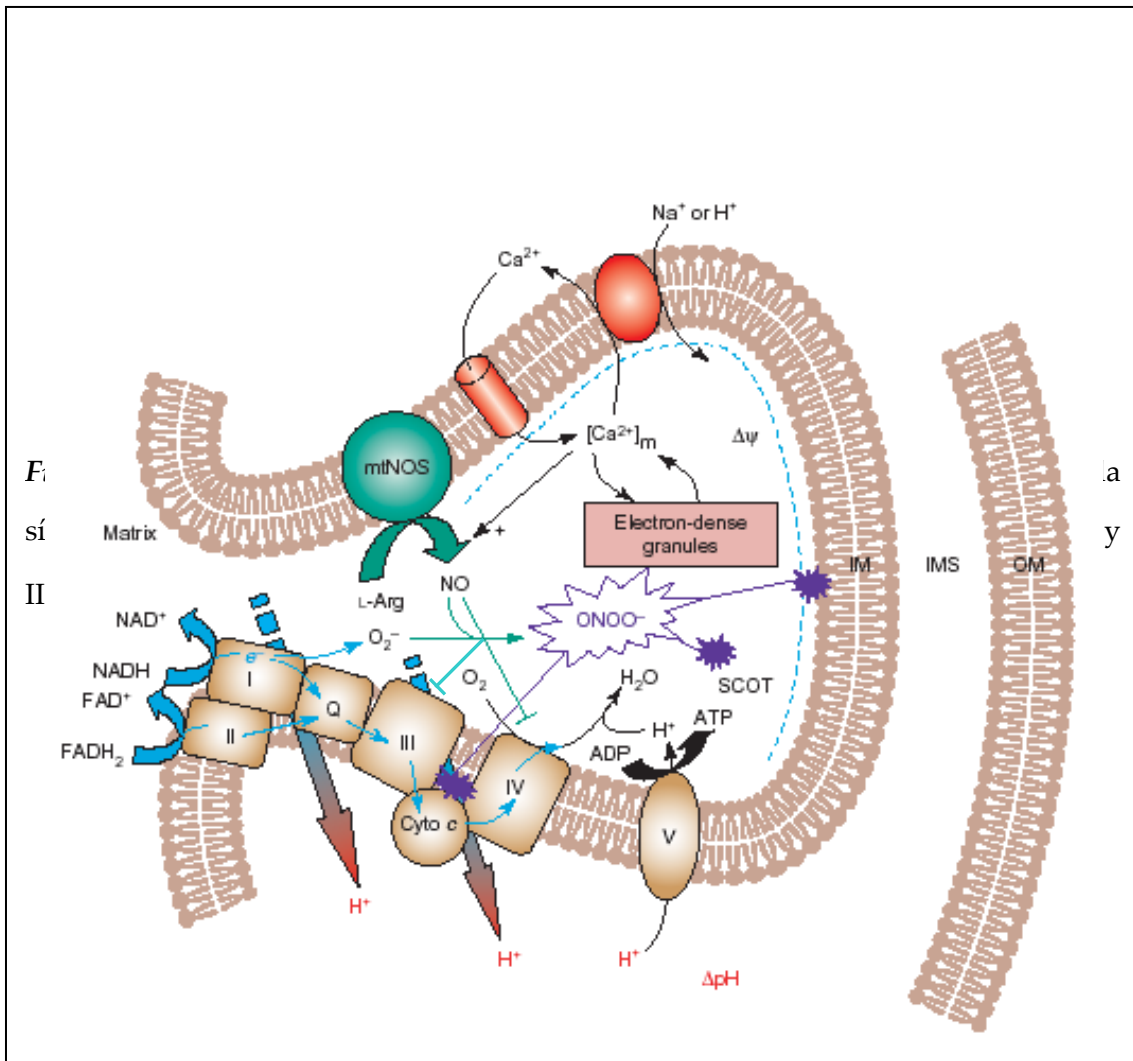
	Control	+ 1.2 μM NO
Actividad enzimática		
<i>Citocromo oxidasa</i>	19 ± 1	1 ± 0* (17± 1)
<i>NADH-citocromo c reductasa</i>	112 ± 6	41 ± 9* (88± 5)
<i>Succinato- citocromo c reductasa</i>	199 ± 11	36 ± 8* (134± 5)
Producción de O₂⁻		
+ <i>succinato</i>	ND	0.58 ± 0.01
<i>Id</i> + <i>antimicina A</i>	0.46 ± 0.07	0.55 ± 0.05
Producción de H₂O₂		
+ <i>succinato</i>	ND	0.20 ± 0.03
+ <i>antimicina A</i>	0.52 ± 0.06	0.45 ± 0.05

Posteriormente, se demostró que el mecanismo a través del cual el NO estimula la producción de radicales libres no sería solamente a través del bloqueo del citocromo *bc₁*, sino a través de una reacción directa con el ubiquinol (Poderoso *et al*, 1999a). El ubiquinol (coenzima Q oxidada) participa en el transporte de electrones en la mitocondria y actúa como pro o antioxidante, dependiendo del contexto. Los efectos antioxidantes son ejercidos por el ubiquinol, mientras que los pro-oxidantes por el radical ubisemiquinona, el cual es un intermediario en la reacción de óxido- reducción del lípido, y se oxida a ubiquinona generando O₂⁻. Esta última vía es la fuente más importante de formación de O₂⁻ en la mitocondria (Boveris *et al*, 1975 y Boveris *et al*, 1976).

La reacción entre el NO y el ubiquinol ($k = 2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$, Poderoso *et al*, 1999a), favorecida por el estado reducido de la cadena respiratoria en presencia de NO, lleva a la formación de la semiquinona y O₂⁻, y en consecuencia ONOO⁻ [reacciones 8-10]

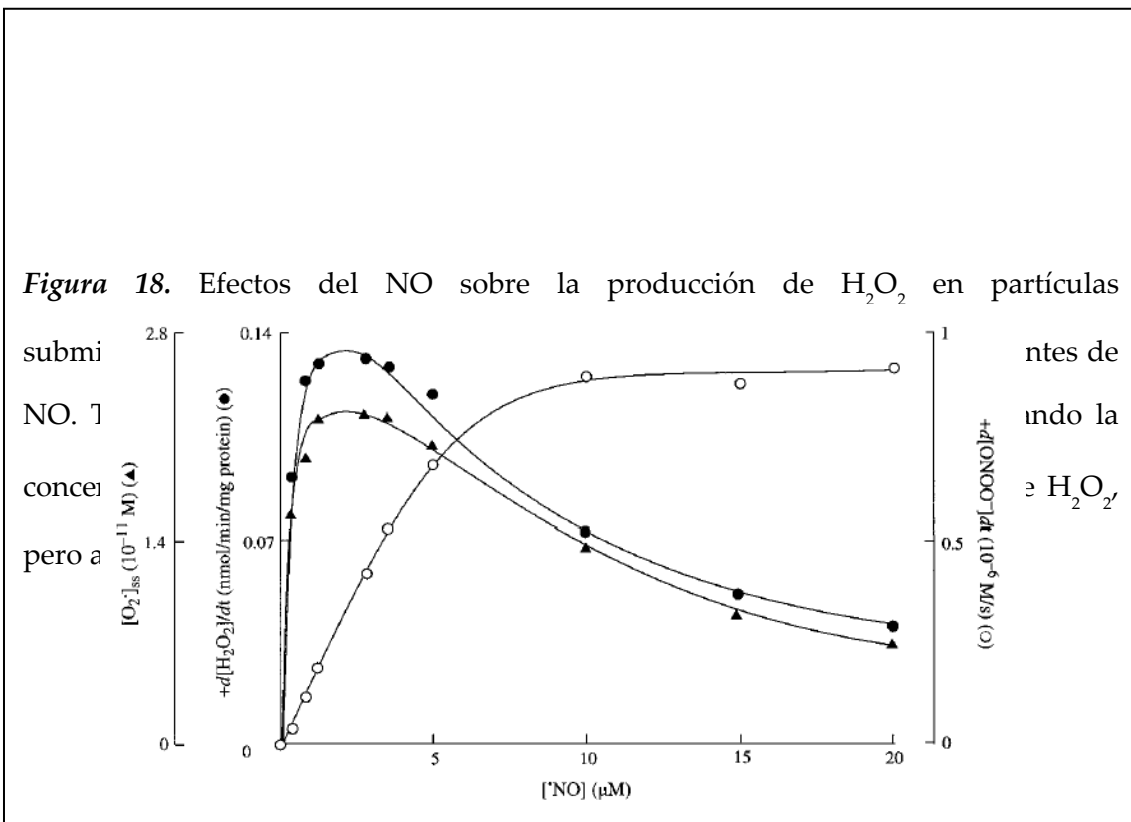


Dependiendo del tiempo y de la concentración de NO a la que se halla expuesta la mitocondria, y la concentración de superóxido dismutasa (Mn- SOD) en la matriz mitocondrial, se favorece la formación de ONOO⁻ o de H₂O₂. Este concepto es importante cuando se pretende entender los efectos fisiológicos reguladores del NO y los efectos patológicos (Fig. 17).

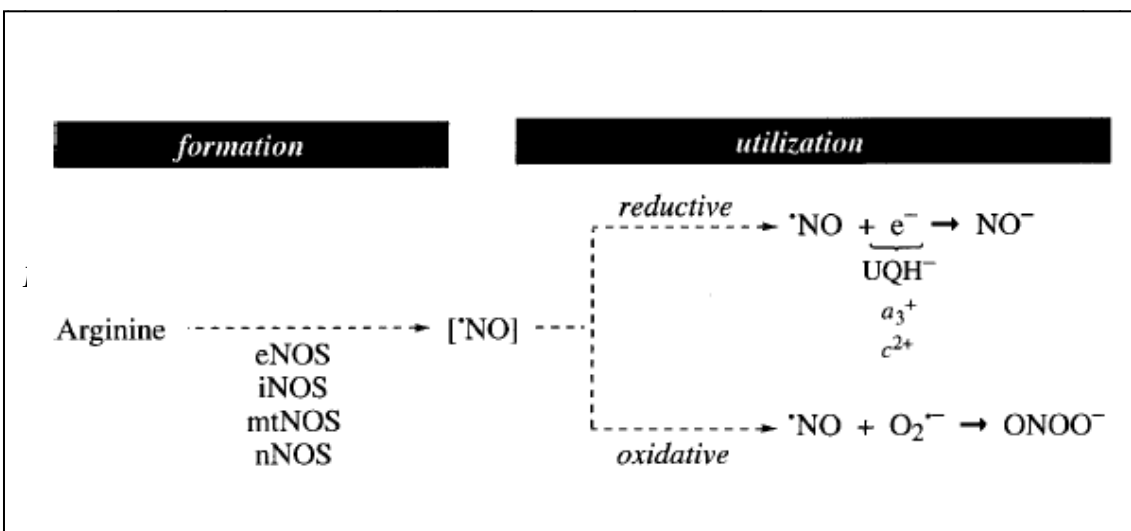


De manera análoga a la reacción del NO con el ubiquinol, el $ONOO^-$ es capaz de abstraer un electrón del ubiquinol para generar radicales libres del oxígeno. Las

evidencias experimentales sugieren que el radical NO_2 , producto de la descomposición del ONOO^- es un iniciador de las mismas series de reacciones que el NO (Schöpfer *et al*, 2000). Sin embargo, es importante considerar que para que tenga lugar esta reacción, deben alcanzarse en primer lugar altas concentraciones de ONOO^- en estado estacionario. Esto implica una alta producción de NO , como la que ocurre tras la inducción de la iNOS en condiciones patológicas, o una disminución en la actividad de la Mn-SOD. De esta manera, una serie de reacciones centradas en los radicales del nitrógeno modula la producción de radicales libres del oxígeno por la mitocondria y la respiración celular (Fig. 18).

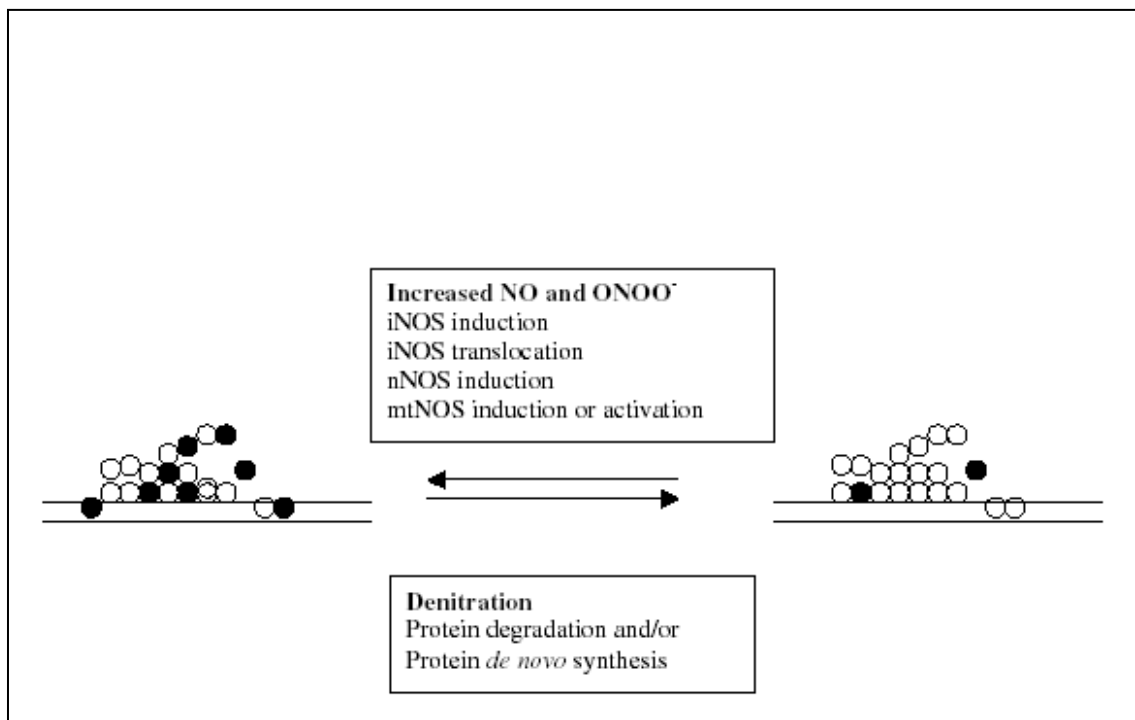


A muy bajas $p\text{O}_2$, la utilización de NO por las mitocondrias se produciría por dos vías: una es la reducción del NO a NO^- (nitroxilo) por la citocromo oxidasa, la cual es



Por el contrario, en condiciones aeróbicas, la oxidación del NO a ONOO⁻ parece ser la vía principal de utilización del NO en la mitocondria. En estas condiciones, las concentraciones relativas de todas las especies involucradas (NO, O₂, UQ y Mn- SOD) determinan que se genere ONOO⁻ o H₂O₂ (Poderoso *et al*, 1999b).

En los últimos años se han reportado efectos específicos del NO sobre el complejo I. Clementi y colaboradores (1998), observaron que el NO en concentración micromolar por períodos prolongados inhibe la respiración y la actividad del complejo I. De acuerdo con esto, nuestro grupo ha reportado que la producción de ONOO⁻ dependiente de NO en mitocondrias de hígado y corazón induce la inhibición persistente de la actividad NADH- citocromo *c* reductasa., mientras que los complejos II y III no se ven afectados (Riobo *et al*, 2001). Asimismo, estudios recientes sugieren que las proteínas mitocondriales son nitradas y des- nitradas en la mitocondria en respiración activa (Aulak *et al*, 2004), con lo cual, la nitración proteica, generalmente entendida como la acumulación de daños proteicos irreversibles, podría ser dinámica y reversible siendo fundamental para la regulación de las funciones celulares (Fig. 20).



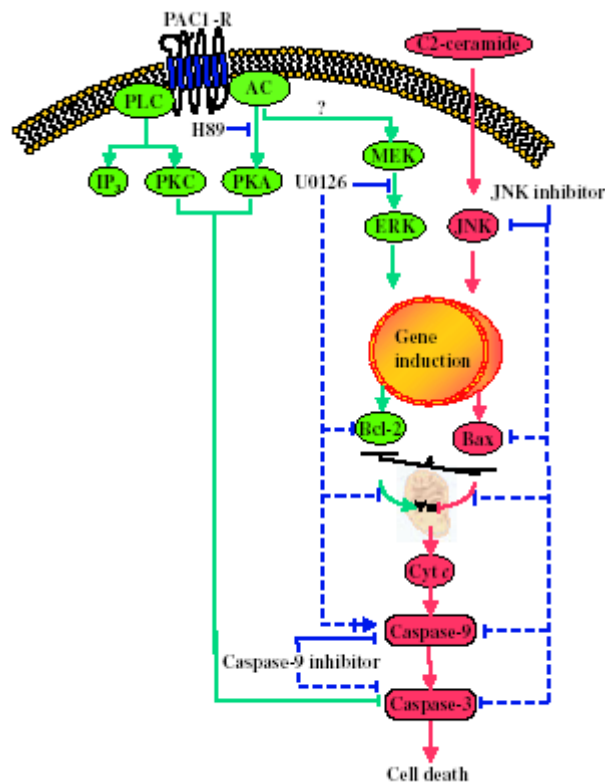
Mitocondrias y signaling

En los últimos años, se ha propuesto a la mitocondria como un sitio central de regulación de la progresión del ciclo celular, debido a la capacidad que tiene de regular diferencialmente el tráfico de factores pro y anti- apoptóticos, como por ejemplo las proteínas de la familia de Bcl- 2 (Liu *et al*, 1997; Kluck *et al*, 1997). Asimismo, se ha estudiado el rol mitocondrial en la apoptosis a través de la liberación de citocromo *c*. Se observó que cambios en el potencial de membrana de la organela, llevan a la apertura del poro de transición mitocondrial (MPT), que se encuentra en la membrana, y la sucesiva liberación de citocromo *c* al citosol. Allí, esta enzima activa la caspasa 9, y ésta a su vez activa la caspasa 3 con la consecuente entrada de la célula en apoptosis (Cao *et al*, 2002; Zhong *et al*, 2003). Muchos estudios mencionan un rol apoptótico de la mitocondria a través de la expresión de Bax, una proteína de la familia de Bcl- 2. Al respecto, Fallulel- Morel y colaboradores (2004) proponen que la relación entre la expresión de Bax y Bcl- 2 modulan el potencial de membrana mitocondrial, y esto lleva a la liberación de citocromo *c* (Fig. 21). Estos autores vieron que en células de cerebelo, el tratamiento con C2- ceramida inducía la expresión de Bax, una disminución en el $\Delta\psi$ mitocondrial, con la consecuente liberación de citocromo *c*. Por el contrario, cuando trataban con el polipéptido activador de la adenilato ciclasa (PACAP), había una inducción de Bcl- 2 y un aumento de $\Delta\psi$, que protegía a las células de la entrada en apoptosis. También, este aumento en la expresión de Bcl- 2 estaba mediado por la vía de MEK/ ERK, ya que al tratar con el inhibidor de MEK se inhibían todos estos fenómenos, y el rol protector contra la apoptosis se veía interrumpido. Por el contrario, los efectos de la ceramida estaban mediados por la vía de JNK/ SAPK, ya que al preincubar las células con un inhibidor de JNK, no se observaba aumento de Bax, ni alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial, y la célula no entraba en

apoptosis. Con este mismo lineamiento, Ito y colaboradores (2001) estudiaron la inducción de la apoptosis en células de leucemia mieloide en humanos (U-937) por 12-*o*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), y vieron que también estaba mediado por la vía de JNK. Estos autores demostraron que había una translocación de JNK a la mitocondria tras la inducción con TPA, que esta translocación estaba mediada por PKC, y que la entrada de JNK a la mitocondria inducía la liberación de citocromo *c* y la consecuente entrada en apoptosis. La sobre-expresión de Bcl-XL, otra proteína de la familia de Bcl-2, atenuaba la respuesta apoptótica del TPA. Otros estudios demuestran asimismo la presencia de todas las variantes de PKC en la mitocondria: PKC α , δ , γ , ζ (Ruvolo *et al*, 1998; Majumder *et al*, 2000) y ϵ (Baines *et al*, 2002). La actividad de PKC potencia la apertura del canal mitocondrial de potasio dependiente de ATP (K_{ATP}). Por estudios farmacológicos, se observó un rol del K_{ATP} en la protección contra el daño por isquemia (O'Rourke, 2000). Como PKC tiene un rol crucial como elemento regulador en el acondicionamiento isquémico y la protección del miocardio contra el daño isquémico, esto sugería que la mitocondria en sí, tendría un rol importante en la protección del miocardio contra la isquemia, y asimismo, habría una conexión entre PKC y la mitocondria. Baines y colaboradores (2001) demostraron no solo la presencia de PKC ϵ en la mitocondria, sino que la enzima estaba activa y formaba complejos dentro de la mitocondria con las MAPKs -ERK, JNK y p38- siendo capaz de activar a ERK de manera directa, y a p38 de manera indirecta. Estos autores, no explicaron cual sería la funcionalidad de dichos complejos ensamblados en la mitocondria, pero pensaron que tendrían un rol importante en la regulación de la transducción de señales, y por lo tanto, la mitocondria sería un lugar central en el signaling celular. En nuestro laboratorio, Alonso y colaboradores (2004) también demostraron la presencia de ERK y MEK en mitocondrias durante el desarrollo del cerebro de la rata. En este trabajo se mostró la presencia de ERK en la membrana externa de la organela, así como una modulación de la expresión y tráfico a mitocondria de la kinasa durante el desarrollo. Si bien estos autores deducen que esta regulación en la expresión y el tráfico de ERK estaría finamente regulada durante el desarrollo, no definen un rol determinado de la kinasa en la mitocondria. Sin embargo, sugieren que dado que la concentración máxima de ATP está en las cercanías de la membrana externa de la mitocondria, en el sitio de la ADP/ATP translocasa, hipotetizan que la kinasa

requeriría el pasaje por la mitocondria para fosforilarse y activarse, y luego seguir su paso hacia el núcleo de la célula. Otros autores demostraron la presencia de Akt en la mitocondria (Bijur y Jope, 2003), quienes no solo vieron que esta enzima era capaz de translocar hacia la organela, sino que tenía sustratos dentro de la mitocondria, entre ellos, la proteína GSK3 β , y la subunidad β de la ATPasa.

Figura 21. Representación esquemática de los probables mecanismos de signaling involucrados en los efectos opuestos de la ceramida y PACAP en la apoptosis de la granulosa cerebelar. Para explicación ver en el texto. Tomada de Falluel- Morel y colaboradores (2004)



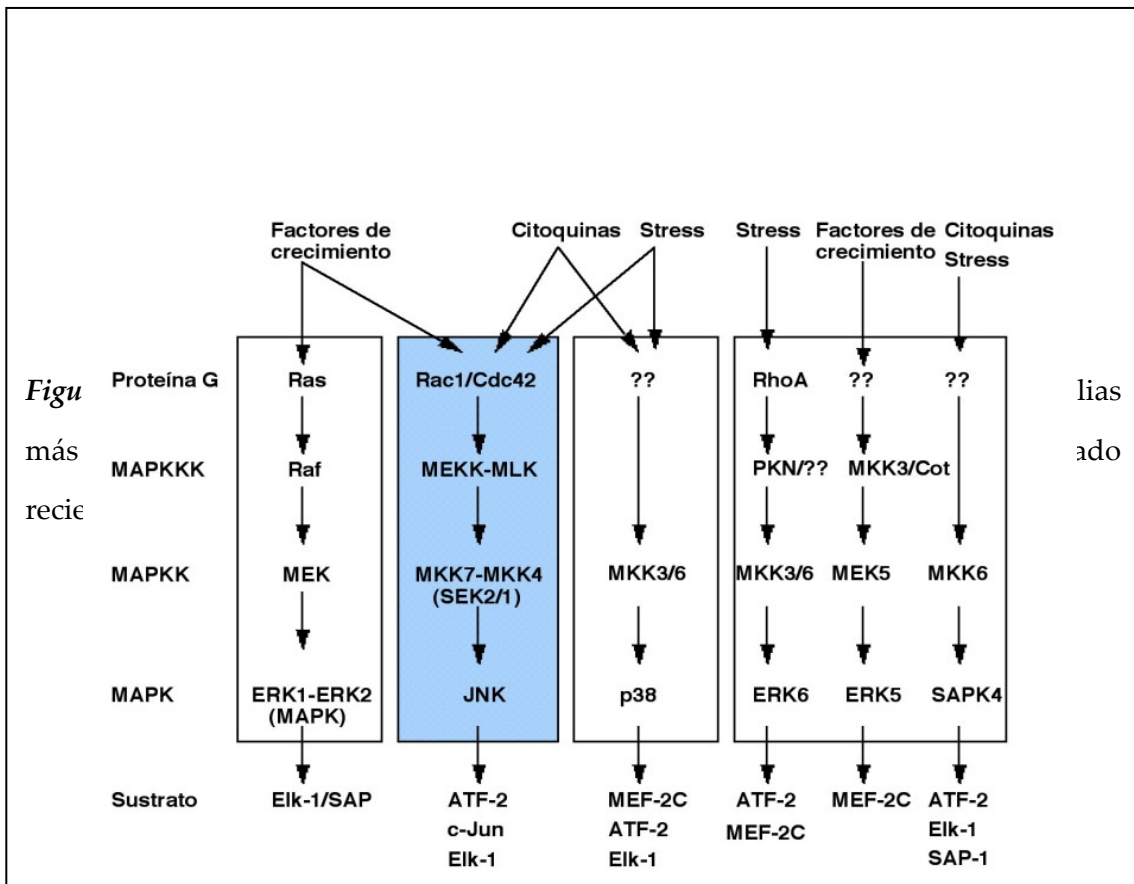
MAPKs

MAPKs

Las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPKs) constituyen una familia de proteínas ampliamente caracterizada, se expresan en todas las células de mamíferos, y su principal función es transformar las señales extracelulares en respuestas intracelulares, a través de cascadas secuenciales de fosforilación. Los efectos últimos de la activación de las MAPKs dependen de su habilidad para inducir la expresión de los genes apropiados, algunos de los cuales son responsables de la defensa celular, de la muerte celular programada, de la proliferación, o de la diferenciación celular, entre otros. Se han descrito y estudiado proteínas homólogas a las MAPKs en cuanto a secuencia y función, en otras células eucariotas, como levaduras, *Drosophila* y el gusano nematode *Caenorhabditis elegans*.

Las MAPKs se han clasificado en al menos 6 familias, de las cuales 3 se han estudiado extensivamente; las kinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), las kinasas del extremo N- terminal del factor de transcripción c- jun (JNK), y p38. ERK5, (también conocido como Big MAPK o BMK), y los recientemente identificados ERK7 y ERK8, así como también SAPK4, entre otros, completan el escenario de MAPKs hasta ahora identificadas (Fig. 22). A pesar que cada MAPK tiene características únicas, los mecanismos de activación y acción estudiados hasta hoy, comparten un número de cualidades similares. Cada familia de MAPK se compone de un módulo de tres kinasas que actúan secuencialmente y han sido conservadas evolutivamente: una MAPK, una MAPK kinasa (MAPKK) y una kinasa de MAPKK (MAPKKK). Las MAPKKKs son, serina/ treonina kinasas, que se activan por fosforilación, en muchos casos como resultado de la interacción con una pequeña proteína que une GTP, de la familia Ras o Rho (ver Takai *et al*, 2001 para revisión de proteínas que unen GTP), en respuesta a una señal extracelular. Tras la activación, MAPKKK fosforila y activa a MAPKK, la cual luego activa a MAPK a través de la fosforilación dual en los residuos treonina y

tirosina. Una vez activadas, las MAPKs fosforilan y activan un número de sustratos en residuos serina o treonina seguidos por una prolina. Sin embargo, la especificidad es un fenómeno usual más que casual, y se da por dominios de interacción específicos localizados tanto en los sustratos como en las kinasas. Esta especificidad es conferida asimismo, a través de la interacción con proteínas andamio, que organizan los caminos de señalización uniendo en simultáneo varios de los componentes (revisado en Roux y Blenis, 2004; Zarubin y Han, 2005; Liu y Lin, 2005; Arbabi y Maier, 2002; Davis, 2000; Kolch *et al*, 2005).



Las tres familias clásicas de MAPKs (ERK1/ 2, JNK1/ 2 y p38) son activadas por fosforilación dual en residuos treonina y tirosina adyacentes separados por un único aminoácido. En las ERKs, el aminoácido intermedio es glutamato (Thr- Glu- Tyr), para la familia de p38 es glicina (Thr- Gly- Tyr), mientras que para JNK es prolina (Thr- Pro- Tyr) (Fig. 23). La activación de las MAPKs es el último paso en la cascada intracelular de fosforilación (Revisado en Arbabi y Maier, 2002; Davis, 2000).

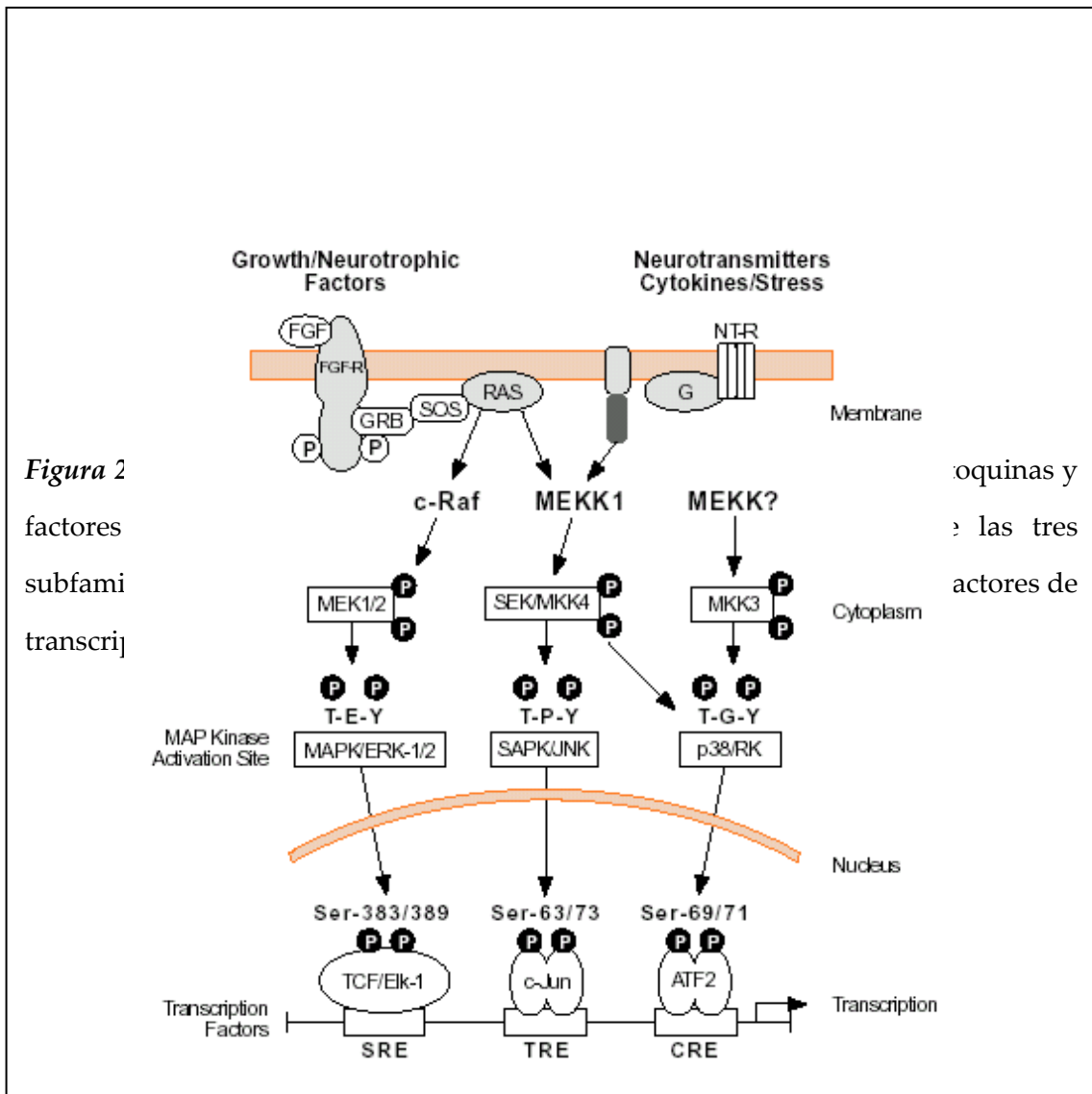
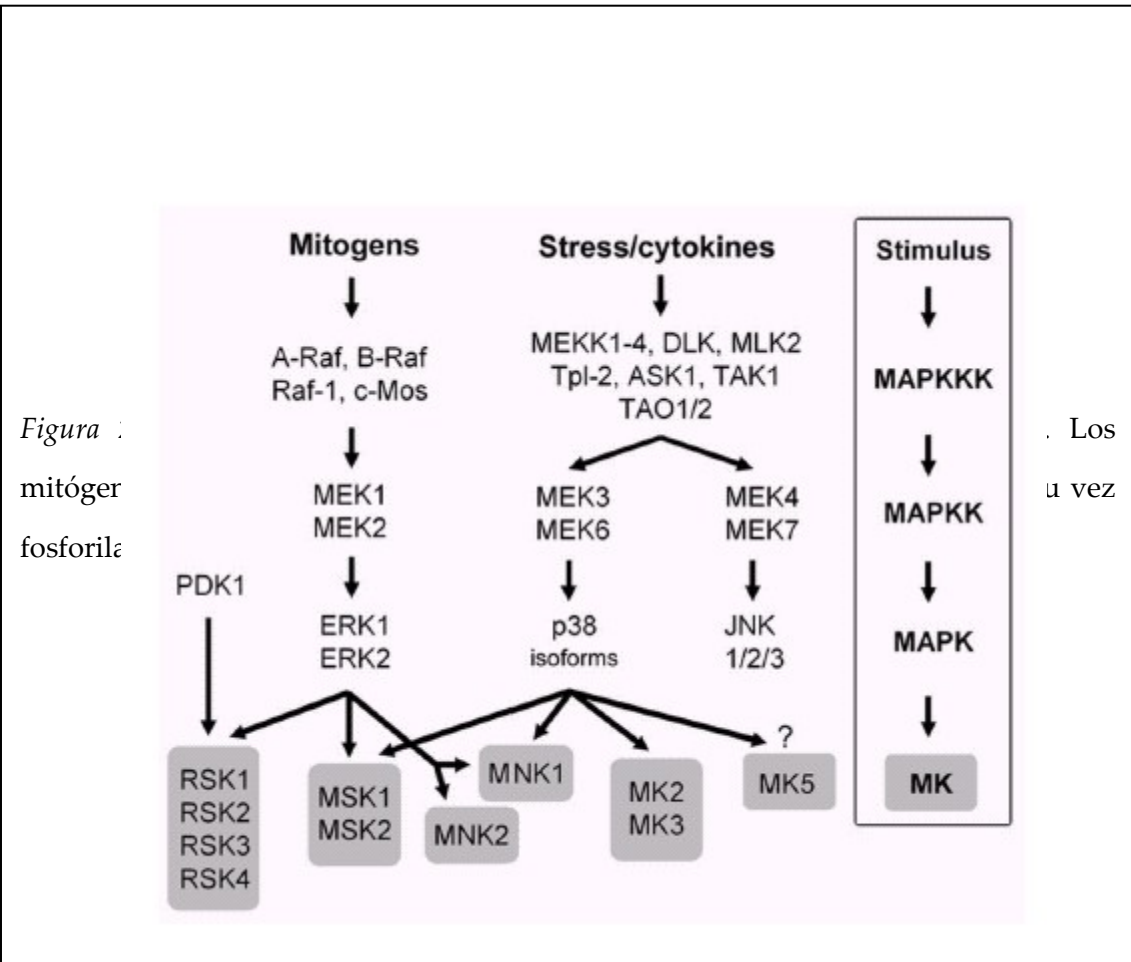


Figura 2
factores
subfami
transcrip

oquinas y
e las tres
actores de

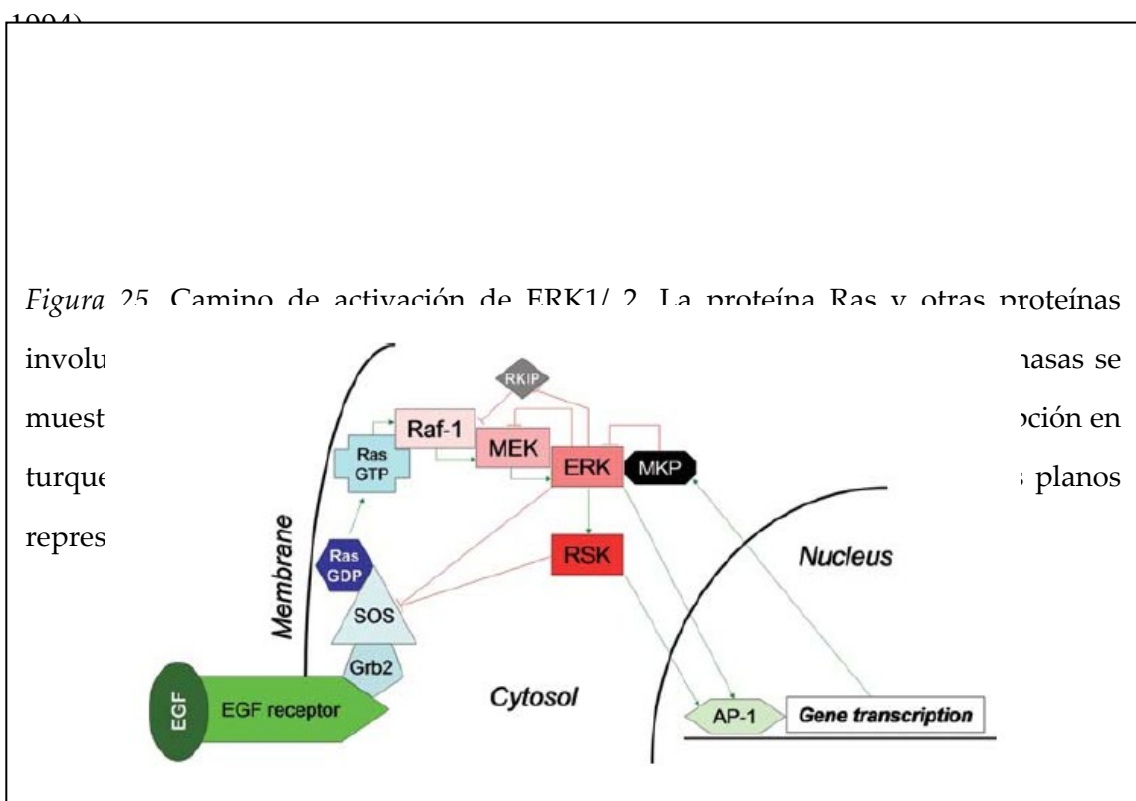
El amplio rango de funciones de las MAPKs es el resultado de la fosforilación y activación de un número de sustratos, que incluyen fosfolipasas, factores de transcripción, proteínas del citoesqueleto y muchas proteínas kinasas, llamadas proteínas kinasas activadas por MAPKs (MKs) y que conforman un paso más de amplificación en la cascada. Estas proteínas comprenden a las kinasas ribosomales S6,

(RSKs), a las kinasas activadas por mitógenos y stress (MSKs), las kinasas que interactúan con MAPKs (MNKs), las kinasas activadas por MAPK 2, 3 y 5 (MAPKAPK 2, 3 y 5) (Fig. 24) (Roux y Blenis, 2004). La falta de inhibidores específicos de las MKs ha hecho difícil la tarea de identificar los mecanismos de acción de estas enzimas, y distinguirlos de aquellos de las MAPKs propiamente dichas.



Como se mencionó en párrafos anteriores, en general, para que se dispare una cascada de señalización un estímulo inicial es reconocido por una proteína o receptor en membrana plasmática, que se encuentra acoplado a una proteína G, y ésta fosforila y activa a la MAPKKK. El mecanismo de acción de la familia de ERK es el más estudiado, y su bioquímica es simple. La activación de receptores de superficie lleva a la activación de una GTPasa que reside en la membrana, Ras, la cual a su vez recluta a la kinasa Raf (MAPKKK) desde el citosol hacia la membrana. Hay varios miembros de la familia de Raf; Raf- 1, B- Raf y A- Raf, C- Raf, que son activados por Ras con algunas

diferencias en el requerimiento de co- factores para la activación y en el modo de fosforilación. Sin embargo, todas las isoenzimas de Raf fosforilan y activan a MEK (MAPKK), el cual a su vez fosforila y activa a ERK (MAPK) (Fig. 25) (Kolch *et al*, 2005). El mecanismo de acción es el siguiente: la activación de receptores de membrana, lleva a la fosforilación y auto- fosforilación de los residuos tirosina del receptor. Estos residuos fosforilados, constituyen un sitio de anclaje para proteínas adaptadoras, como por ejemplo Grb2, las cuales luego reclutan a otra proteína, llamada intercambiadora de nucleótidos de guanidina (GEP), siendo Son of Sevenless (SOS), la GEP más caracterizada. Se forma entonces un complejo receptor- proteína adaptadora- GEP. SOS interactúa entonces con la proteína Ras unida a la membrana del lado citoplasmático y estimula el cambio de GDP por GTP. Esta conformación de la proteína G tiene mayor afinidad por Raf; lo recluta y lo activa. Ras tiene asimismo un dominio GTPasa que hidroliza el GTP a GDP, otorgándole nuevamente su conformación inactiva (Takai *et al*, 2001). El mecanismo exacto de fosforilación y activación de Ras aún no se conoce con certeza (Roux y Blenis, 2004). Es posible que la activación del módulo Raf/ MAPK fosforile a SOS y favorezca su disociación del complejo con Grb2, contribuyendo a la finalización de la señal mitogénica. Los receptores que no están asociados directamente a tirosina kinasas, pueden activar Ras en forma indirecta, a través de la activación de tirosina kinasas del tipo src o de receptores tirosina kinasas independientes de ligando (revisado en Takai *et al*, 2001). La amplificación a través de este camino de signaling es tan eficiente, que solamente estimulando el 5% de las moléculas de Ras, es suficiente para la activación completa de ERK (Hallberg *et al*,



Para la activación de JNK se han descrito dos MAPKK; MKK4 y MKK7. Ambas kinasas son de fosforilación dual, pero difieren en su preferencia por el sitio de fosforilación, teniendo la primera mayor afinidad por el residuo Thr, mientras que la segunda lo es por el residuo Tyr, presentes en JNK. El significado biológico de esta diferencia no es claro aún (Liu y Lin, 2005). En cuanto a la activación de p38, se describieron dos principales MAPKK; MKK3 y MKK6, y se propuso que estas kinasas regularían de forma diferente las diferentes variantes de splicing de p38 (Parker *et al*, 1998). También se ha demostrado que MKK4, la kinasa de JNK es capaz de activar a las variantes γ y α de p38 en ciertos tipos celulares (Jiang *et al*, 1997).

Con respecto a las MAPKKK pertenecientes al módulo de JNK y p38, se han descrito diferentes proteínas, pero éstas no serían exclusivas; entre ellas MLK3, PAK, y ASK1. Las proteínas kinasas del grupo MLK comparten dominios estructurales similares, incluyendo los dominios SH3 y Crib que interaccionan con las GTPasas Cdc42 y Rac (Brancho *et al*, 2005). De ellas, MLK3 se expresa en prácticamente todos los tejidos, y es capaz de fosforilar a MKK7, y mediar entonces la activación de JNK (Brancho *et al*, 2005). Otros estudios realizados con RNAi contra MLK3 muestran que esta kinasa es capaz de activar también otras vías de MAPKs entre ellas la de ERK. PAK son proteínas kinasas activadas por p21, que se describieron originalmente como participantes en la remodelación del citoesqueleto. Actúan río abajo de las proteínas GTPasas de la familia Rho. También contienen un dominio de unión a Cdc42 y Rac. Mucho es lo que se puede decir acerca de esta familia de kinasas, pero excede el alcance de esta tesis; se puede revisar en Hoffmann *et al*, 2004. Simplemente mencionar que en células de mamífero se demostró que PAK activa la vía de MEK/ ERK actuando directamente sobre estos sustratos, y que también ejerce su efecto sobre JNK y p38, pero sus efectos sobre estas kinasas serían modestos en casi todos los tipos celulares (Frost *et al*, 1997; King *et al*, 1998). La kinasa que regula la señal de apoptosis, ASK1/ MKKK5, es una enzima que se expresa en casi todos los tejidos y es capaz de activar las vías de p38 y JNK a través de la fosforilación específica de sus MAPKKs (MKK4/ 7

para JNK; MKK3/ 6 para p38) (Sumbayev y Yasinka, 2005). Esta enzima estaría unida a la Tiorredoxina, enzima que tras la oxidación se desprendería de ASK1 permitiéndole activarse y activar a las MAPKK (Sumbayev y Yasinka, 2005). Este sería entonces un camino potencial, por el cual los ROS conducirían a la activación de las vías de JNK y p38.

ERK

ERK 1 y ERK 2 fueron las primeras MAPKs reconocidas. Presentan entre sí un 83% de homología en la secuencia aminoacídica, y se expresan en todos los tejidos (Chen *et al*, 2001). Tras la estimulación, una proporción significativa de la población de ERK se acumula en el núcleo (Chen *et al*, 1992; González *et al*, 1993; Lenormand *et al*, 1993). La localización nuclear de ERK es necesaria para que esta molécula ejerza su efecto; en un experimento elegante, Brunet y colaboradores (1999) observaron que al impedir la entrada de ERK al núcleo a través de la sobre- expresión de una fosfatasa citoplasmática específica (MKP3) inactiva, no se iniciaba la transcripción de genes específicos, y las células no replicaban el DNA en respuesta a factores de crecimiento. Esto se debería a la inhabilidad de ERK de translocar hacia el núcleo y no a la pérdida de su actividad kinasa, pues era capaz de activar una forma citoplásmica de Elk1, sustrato clásico de ERK. Los mecanismos de translocación y retención nuclear, han sido ampliamente estudiados. Se propuso que una prolongada activación de ERK, llevaba a una prolongada permanencia de la kinasa en el núcleo, y esto era necesario para que se vean los efectos de la MAPK (Khokhlatchev *et al*, 1998). Al respecto, se vio una correlación entre la activación y la retención nuclear de ERK, con el crecimiento de neuritas inducido por el factor de crecimiento nervioso (NGF) en células PC12 (Traverse *et al*, 1992; Lenormand *et al*, 1993; Nguyen *et al*, 1993). Posteriormente, se vio que la permanencia en el tiempo del estado fosforilado de la kinasa era condición necesaria para la retención nuclear; en un experimento elegante, Khokhlatchev y colaboradores (1998) crearon un ERK con el fosfato unido por una unión tioéster, el cual no era sustrato de las fosfatasas, y vieron que esta molécula era capaz de permanecer en el núcleo por muchísimo más tiempo que la kinasa salvaje, que era rápidamente desfosforilada por las fosfatasas endógenas. Estos autores observaron asimismo que la fosforilación de ERK promueve su homodimerización y subsiguiente

entrada al núcleo. Para esto, sometieron a la kinasa fosforilada o no, a una columna de exclusión por tamaño molecular, y vieron que cuando estaba fosforilada, la kinasa eluía en dos picos, uno lento correspondiente al monómero, y otro más veloz al dímero. Cuando este pico era tratado con serina o treonina fosfatasas, se obtenía en el mismo tamiz solo el pico de elusión lento, lo que sugería que la formación de los dímeros estaba regulada por la fosforilación/ des- fosforilación de la kinasa (Khokhlatchev *et al*, 1998). Para la entrada al núcleo era necesaria tanto la fosforilación como la dimerización de la molécula, pues las mutantes de ERK, que presentaban la tiofosforilación pero que eran incapaces de formar dímeros, permanecían en el citoplasma (Khokhlatchev *et al*, 1998). Posteriormente se describieron dos mecanismos de entrada de ERK al núcleo: la entrada de la kinasa monomérica ocurriría de forma pasiva a través del poro nuclear, mientras que el dímero era bombeado activamente hacia el interior (Adachi *et al*, 1999). Horgan y Stork (2003) demostraron que si bien era necesaria la presencia de manera sostenida de un ERK fosforilado para la retención nuclear, no lo era para la entrada de la MAPK al núcleo. Al respecto observaron que tanto al estimular células PC12 con EGF (que produce activación transitoria de ERK), como con NGF (que produce activación sostenida de ERK) se inducía la entrada al núcleo de la quimera GFP- ERK, fabricada por estos mismos autores. También concluyeron que la actividad kinasa de ERK no era necesaria para la translocación, pues una mutante de la quimera sin actividad kinasa, entraba lo mismo al núcleo. Pouysségur y Lenormand (2003) propusieron al núcleo celular como lugar de acumulación, acción y terminación de la actividad de ERK. En el núcleo hay fosfatasas específicas que terminan con la actividad de la MAPK. A su vez, estas fosfatasas, junto con MEK, tienen en su secuencia aminoacídica una señal de exclusión nuclear (NES), que favorece tras la unión, el retorno de la MAPK al citoplasma (Pouysségur y Lenormand, 2003).

En cuanto al rol fisiológico de ERK 1 y 2, en general, se ha trabajado con inhibidores farmacológicos que actúan sobre MEK, bloqueando en simultáneo la activación de ERK 1 y 2, con lo cual es difícil acertar el rol específico de cada uno. En mamíferos, ambas isoformas se expresan simultáneamente en todos los tejidos, aunque con pequeñas variaciones en su nivel. Son altamente homólogas, e *in vitro*, parecen tener la misma especificidad de sustrato. Sin embargo, las diferencias aparecen cuando se trabaja con ratones knock- out. Los ratones ERK1 \neg eran viables, de tamaño normal y

fértiles. Solo tenían algunas deficiencias en la diferenciación terminal del timocito, con lo cual ERK 2 sería capaz de compensar prácticamente todas las funciones fisiológicas de ERK 1. Por el contrario, la eliminación del locus de ERK 2 en estos ratones lleva a la muerte temprana del embrión, tras el implante. En estos ratones la actividad de ERK 2 en la formación del cono ecto- placentario no pudo ser compensada por su isoforma de mayor peso molecular (Pouysségur y Lenormand, 2003). Queda aún mucho por estudiar acerca de las funciones específicas de estas kinasas.

p38

La MAPK p38 se aisló por primera vez como una proteína de 38 kDa, que se fosforilaba rápidamente en respuesta a lipopolisacárido bacteriano (LPS) (Han *et al*, 1993 y 1994). Hoy en día se conocen 4 variantes de splicing para esta enzima: p38 α , p38 β , p38 γ y p38 δ (revisado en Zarubin y Han, 2005). De éstas, las isoformas α y β se expresan en prácticamente todos los tejidos, mientras que las formas γ y δ son tejido específicas. Las isoenzimas presentan un 60% de homología entre sí, y un 40% con el resto de las MAPKs.

La activación de p38 se observó en respuesta a varios estímulos, entre ellos, radiación UV, calor, shock osmótico, citoquinas inflamatorias (TNF y IL- 1) y factores de crecimiento (CSF- 1) (revisado en Zarubin y Han, 2005). Este conjunto de activadores le confiere una complejidad al mecanismo de activación de p38, que no sólo depende del estímulo, sino también del tipo celular.

Se han descrito varios sustratos que son activados por p38. Entre estos, ciertas proteínas kinasas como la proteína kinasa 2 activada por MAPK (MAPKKPK2), ATF- 2, CREB; ciertos factores de transcripción como GADD153 y C/ EBP, y otros tipos de sustrato como el intercambiador de Na⁺/ H⁺ (NHE- 1). Se ha establecido un fuerte nexo entre la activación de p38 y la respuesta inflamatoria. La activación de p38 juega un rol esencial en la producción de citoquinas pro- inflamatorias como IL- 1 β , TNF- α y IL- 6 (Johnson *et al*, 2003; Hollenbach *et al*, 2004; Perregaux *et al*, 1995); en la inducción de enzimas como la COX- 2, que regula la remodelación del tejido conectivo en situaciones patológicas; y la inducción de la iNOS, que regula la oxidación (Da Silva *et*

al, 1997; Craxton *et al*, 1998). Muchos estudios involucran a p38 en la apoptosis, basados en la activación paralela de p38 y la inducción de apoptosis inducida por una variedad de agentes como la supresión del factor de crecimiento nervioso (NGF) y la ligación de Fas (Xia *et al*, 1995; Juo *et al*, 1997; Henkart, 1996). Se observó la participación de p38 en la regulación del ciclo celular; la sobre- expresión de p38 en células de levadura, llevó a una significativa disminución en la proliferación. Sin embargo el mismo fenómeno se observó al tratar células de mamífero con un inhibidor farmacológico de p38 (Takenaka *et al*, 1998). La micro- inyección de Cdc42 en células NIH, ocasionó un arresto del ciclo celular dependiente de p38 (Wang *et al*, 2000). Asimismo, se logró controlar la progresión del ciclo celular a través de sus sustratos p21 y HBP1 (Yee *et al*, 2004). Los ratones deficientes en p38 no fueron viables, lo que denota un rol de la MAPK en el desarrollo embrionario. Se lo ha atribuido a un rol en la angiogénesis placentaria (Mudgett *et al*, 2000). Asimismo, las isoformas α y β de p38 se han visto involucradas en los procesos de diferenciación celular; diferenciación de células 3T3- L1 en adipositos y de células PC12 en neuronas (Engelman *et al*, 1998; Nagata *et al*, 1998). Asimismo se le atribuye un rol a p38 en la senescencia en respuesta al acortamiento telomérico, y exposición a H₂O₂ entre otros (Wang *et al*, 2002; Haq *et al*, 2002).

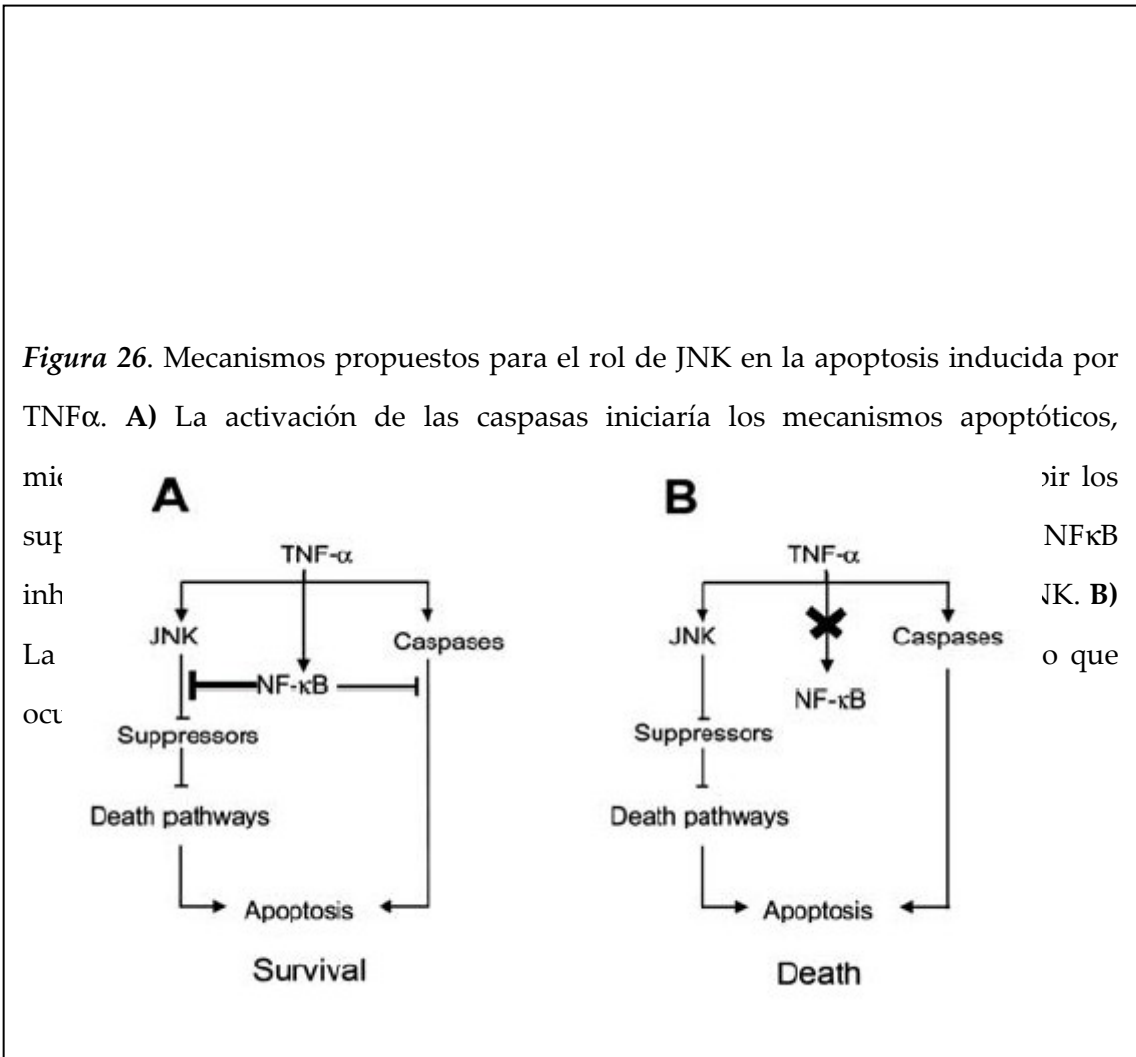
En resumen, se pueden sacar algunas conclusiones en cuanto a la operación de p38 como transductor de señales. La familia de p38 se activa en respuesta tanto a stress como a factores mitogénicos, dependiendo del tipo celular; y sus isoformas pueden interaccionar de manera directa o indirecta con otras proteínas para controlar la transcripción de ciertos genes. Asimismo, p38 puede activar otras kinasas y consecuentemente regular numerosas respuestas celulares que incluyen la inflamación, el ciclo celular, la diferenciación, el desarrollo, la muerte celular, y la senescencia.

JNK

JNK tiene tres isoformas, JNK 1, 2 y 3, con pequeñas diferencias. De estos, JNK 1 y 2 se expresan en prácticamente todos los tejidos, mientras que JNK3 se expresa principalmente en los tejidos neuronal y cardíaco (Liu y Lin, 2005; Davis, 2000; Chang y Karim, 2001; Shaulian y Karim, 2002; Lin, 2003). Se identificó originalmente por su

habilidad para fosforilar el factor de transcripción c- jun en su dominio N- terminal de trans- activación, en dos residuos serina (Hibi *et al*, 1993). Sin embargo, hoy en día se conocen otros sustratos de esta kinasa, entre ellos los factores de transcripción ATF- 2, Elk1, p53 y c- Myc (Davis, 2000; Chang y Karim, 2001; Lin, 2003; Karim, 1995); y otras proteínas que no funcionan como factores de transcripción, como miembros de la familia de Bcl- 2 (Bcl- 2, Bcl- xL, Bim y BAD) (Yamamoto *et al*, 1999; Maundrell *et al*, 1997; Yu *et al*, 2004). Muchos estudios conectan a JNK con un rol pro- apoptótico (Davis, 2000; Chang y Karim, 2001; Shaulian y Karim, 2002; Lin, 2003). Al respecto, la apoptosis inducida por privación de NGF en células PC12 se revierte al inhibir la activación de JNK, mientras que la expresión de un dominante constitutivamente activo de MEKK1, una kinasa del módulo de JNK, induce la apoptosis en estas mismas células (Xia *et al*, 1995; Le-Niculescu *et al*, 1999). Por experimentos de disrupción génica, se mostró que JNK tiene un rol importante en la inducción de apoptosis en células del sistema nervioso central. Ratones knock- out para JNK3 muestran una disminución en la apoptosis de células del hipocampo inducida por privación de NGF, mientras que ratones knock- out para JNK 1 y 2 presentan el mismo fenotipo en células del neuroepitelio de la corteza anterior (Yang *et al*, 1997; Bruckner *et al*, 2001). En estas células, es posible que la señal sea llevada a través de la fosforilación de c- jun, ya que la expresión de formas truncadas de esta proteína torna a las células resistentes a la apoptosis, mientras que la sobre- expresión de la proteína funcional resulta en el fenotipo contrario (Ham *et al*, 1995). Los mecanismos por los cuales c- jun media la apoptosis en las células del sistema nervioso, aún no se conocen. JNK también está involucrado en la apoptosis de células no neuronales (Davis, 2000; Chang y Karim, 2001; Lin, 2003). Por ejemplo, fibroblastos de embrión de ratón (MEFs) deficientes en JNK 1 y 2, se muestran resistentes a la apoptosis inducida por radiación UV (Tournier *et al*, 2000), aunque estudios recientes muestran que JNK1 sería suficiente para hacer a los MEFs resistentes a UV, según se observó con células que eran deficientes solo para esta proteína (Liu *et al*, 2004). El rol de c- jun en la apoptosis inducida por UV es controversial. Ciertos estudios demuestran que la apoptosis no dependería de la expresión de c- jun, ya que no logró suprimirse mediante inhibidores de la traducción (cicloheximida) o de la transcripción (Actinomicina D) (Behrens *et al*, 1999). Sin embargo, otros estudios muestran que MEFs que carecen de c- jun son insensibles a la

muerte inducida por UV (Behrens *et al*, 1999), lo que sugiere que la fosforilación y activación de c-jun son necesarias para la muerte por radiación UV. Mas aún, se reportó que c-jun inhibe el arresto del ciclo mediado por p53, promoviendo entonces la apoptosis mediada por esta proteína (Shaulian y Karim, 2002). Otro ejemplo de participación de JNK en apoptosis es tras un estímulo con TNF α , una citoquina pro-inflamatoria que activa diferentes cascadas, entre ellas la de NF κ B. Al respecto se sugiere que hay un cross-talk entre estas vías de señalización, en el cual NF κ B inhibiría la activación de JNK, predominando entonces el efecto proliferativo desencadenado por esta molécula, pero cuando la activación de NF κ B no ocurre, entonces tiene prevalencia el efecto apoptótico de la activación de JNK (Tang *et al*, 2001) (Fig. 26).



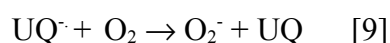
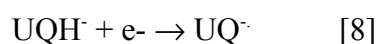
No está del todo claro aún, cómo es que JNK contribuye a la apoptosis, pues no se conocen completamente los mecanismos moleculares. Se han propuesto al respecto dos hipótesis, que difieren principalmente en si la activación de JNK es suficiente o no para que haya apoptosis. Ciertos estudios muestran que JNK podría inducir apoptosis, ya que ratones knock out para JNK 1 y 2 se muestran resistentes a la muerte por radiación UV. En estos mismos ratones, los rayos UV no llevaron a la liberación de citocromo *c* de la mitocondria, ni a un cambio en el potencial de membrana, lo que sugiere a JNK como participante intrínseco del mecanismo apoptótico mitocondrial (Davis, 2000). Más aun, hay estudios recientes que dicen que JNK podría inducir apoptosis a través de la modulación de la proteína BIM, de la familia de Bcl- 2 (Lei y Davis, 2003). Por otro lado, y en apoyo de la hipótesis que sugiere a JNK como promotor más que iniciador de la apoptosis, hay estudios que muestran que la activación persistente de esta molécula no es suficiente para inducir la apoptosis, pero sin embargo si puede promoverla tras la inducción de TNF α cuando no hay activación de NF κ B (Fig. 26) (Lin, 2003; Karim y Lin, 2002; Tang *et al*, 2002).

Asimismo, hay algunos estudios que muestran un rol anti- apoptótico de JNK. Entre ellos, se ha visto una inhibición del crecimiento en tumores tratados con oligonucleotidos anti- sentido para JNK (Bost *et al*, 1999; Potapova *et al*, 2002). Ciertas regiones de la corteza cerebral mostraron una apoptosis exacerbada en ratones nulos para JNK 1 y 2 (Sabapathy *et al*, 1999; Kuan *et al*, 1999). Sin embargo, el mecanismo por el cual JNK mediaría este fenómeno se desconoce por completo. Los casos más estudiados proponen que JNK fosforilaría e inactivaría proteínas de la familia de Bcl- 2, que son pro- apoptóticos, entre ellos BAD (Yu *et al*, 2004).

En resumen, la función de JNK en la apoptosis es compleja, habiéndose sugerido para esta molécula un rol pro o anti- apoptótico, o ningún rol en el proceso. Asimismo, es cuestión de debate si JNK es un componente intrínseco de la maquinaria de apoptosis o si sólo la modula, siendo lo más probable que la activación de JNK module el proceso de apoptosis de manera dependiente del estímulo y el tipo celular (Liu y Lin, 2005).

H₂O₂ y MAPKs

La principal fuente de producción de especies reactivas del oxígeno es, como se mencionó en el capítulo anterior, la mitocondria. Esto ocurre a través de la auto-oxidación del intermediario ubisemiquinona (UQ^{•-}), un estado redox transicional del ubiquinol (UQH^{•-}), presente en la cadena de transporte de electrones. Alrededor del 1- 2 % del oxígeno utilizado por la organela, sigue una reducción en un electrón por la ubisemiquinona, formando anión superóxido (O₂^{•-}). En presencia de la superóxido dismutasa mitocondrial (Mn- SOD), la mayoría del O₂^{•-} es dismutado a H₂O₂, el cual difunde libremente al citosol, a través de la membrana mitocondrial (Boveris *et al*, 1972).



El pool de ubisemiquinona, así como la tasa de producción mitocondrial de O₂^{•-} pueden ser modulados experimentalmente utilizando compuestos específicos como la antimicina, el cual bloquea el flujo de electrones a través de los citocromos *b* y *c* (Boveris *et al*, 1972). Asimismo, el NO induce una inhibición similar en la región *b-c*1 del complejo III, además de la inhibición reversible que presenta sobre la citocromo oxidasa. Este efecto favorece la oxidación directa de ubiquinol y finalmente, aumenta fuertemente la velocidad de producción de O₂^{•-} y H₂O₂ (Poderoso *et al*, 1996 y 1999), en la mitocondria. Dado entonces que el metabolismo del NO regula el consumo de O₂ y la velocidad de producción de O₂^{•-} y H₂O₂ en mitocondrias, y que estudios recientes muestran efectos del H₂O₂ sobre la expresión génica y los mecanismos de señalización celular (se detalla a continuación), se deduce que estas reacciones químicas tienen un rol fundamental en la modulación mitocondrial de la progresión del ciclo celular.

El H₂O₂ difunde fuera de la mitocondria y contribuye a la concentración de H₂O₂ en el citosol. El equilibrio entre la velocidad de producción y la velocidad de degradación de esta molécula por las enzimas citosólicas catalasa y glutatión

peroxidasa, lleva a la concentración de H_2O_2 en el estado estacionario ($[H_2O_2]_{ss}$) (Allen y Tresini, 2000); que está definida por la siguiente ecuación:

$$[H_2O_2]_{ss} = +d[H_2O_2]/dt / (k_3 I [\text{catalasa}] + k_4 [\text{glutathion peroxidasa}]) \quad [Ec.1]$$

donde $+d[H_2O_2]/dt$ es la tasa de producción de H_2O_2 dependiente de L- arginina, k_3 es la constante de reacción de segundo orden para el metabolismo del H_2O_2 por la catalasa, y k_4 la constante para la reacción catalizada por la glutathion peroxidasa (Allen y Tresini, 2000).

Durante mucho tiempo se pensó que el estrés oxidativo en las células vivas, resultado de una acumulación de especies reactivas del oxígeno, o de una disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes, conducía a apoptosis o necrosis, dependiendo de la severidad del daño (Halliwell y Cross, 1994; Slater *et al.*, 1996). En la necrosis, las ROS serían las moléculas efectoras, actuando directamente sobre lípidos, ácidos nucleicos y proteínas, ocasionándoles un daño oxidativo, mientras que en la apoptosis, ROS actuarían activando vías de señalización (Sarafian y Bredesen, 1994). Sin embargo, en los últimos años ha habido una masiva aparición de evidencia que muestra un rol del H_2O_2 en la regulación de mecanismos fisiológicos de señalización que conducen tanto a apoptosis, como a diferenciación o a proliferación celular. Por ejemplo, la exposición de células de la glía central- 4 (CG4) a H_2O_2 resultó en un incremento de la fosforilación en tirosina de las proteínas en general, incluyendo el factor de crecimiento plaquetario (PDGF), y los tres grupos clásicos de MAPKs (ERK, p38 y JNK) (Bhat y Zhang, 1999). Este mismo efecto de aumento generalizado en la fosforilación de proteínas, fue también observado por nuestro grupo (Galli *et al.*, datos no publicados). Varios grupos de trabajo observaron la activación de MAPK en respuesta a H_2O_2 en diferentes modelos: Ruffels y *col.* (2003) observaron la activación de ERK1/ 2, JNK y PKB en células de neuroblastoma humano SH- SY5Y, y atribuyeron un rol a ERK en la apoptosis iniciada por H_2O_2 en sus condiciones de trabajo. Este mismo fenómeno fue detectado por Lee y *col.* (2003) en los fibroblastos de ratón L929. Otros autores observaron que JNK era el mediador en la apoptosis inducida por H_2O_2 , en cardiomiocitos de rata (Mizukami *et al.*, 2001); mientras que por su parte, Liu y *col.* (2002) vieron que H_2O_2 inducía proliferación celular en células 7721 de hepatoma humano, y esto era debido a la estimulación de JNK. Asimismo, estudios más

detallados, muestran una activación diferencial de MAPKs y otros factores de transcripción como CREB, de acuerdo con la concentración de H₂O₂ utilizado para estimular las células y el tiempo de exposición al mismo (Zhang y Jope, 1999; Gaitanaki *et al*, 2003). En un estudio elegante, Kwon y *col.* mostraron que H₂O₂ regulaba el fenotipo de los cardiomiocitos a través de la activación diferencial de MAPKs, y esto era dependiente de la concentración de la molécula oxidante: bajas concentraciones de H₂O₂ (10- 30 μM) ocasionaban un aumento en la síntesis proteica sin efecto sobre la supervivencia, y un aumento a su vez en la activación de ERK1/ 2; concentraciones mayores (100- 200 μM) llevaban a apoptosis, con aumento en la activación de JNK y p38; y concentraciones aún más altas (300- 1000 μM) ocasionaban tanto apoptosis como necrosis. En este mismo contexto, en nuestro grupo de trabajo se observó en diferentes modelos, una correlación entre la [H₂O₂]_{ss} y el estado proliferativo de la célula, y la activación de ERK o p38 y JNK: Carreras y *col.* (2004) observaron un aumento gradual en la [H₂O₂]_{ss} en hepatocitos de rata durante el desarrollo, con baja concentración en los estadios embrionarios y elevada activación de ERK1/2, y alta concentración en el hígado adulto quiescente, con concomitante activación de p38, sin activación de ERK. Asimismo, en dos trabajos continuos, Riobo y *col.* (2002), y Alonso y *col.* (2004), mostraron que el estado redox estaba finamente regulado durante el desarrollo del cerebro en ratas, lo mismo que la activación de ERK1/ 2 y su translocación a mitocondria, siendo máxima en los estadios proliferativos E19- P2. ERK mitocondrial era capaz de ser activado cuando se trataba a las mitocondrias aisladas con H₂O₂ en baja dosis (1 μM), mientras que disminuía su fosforilación tras la estimulación con dosis más altas (50- 100 μM).

En base a los resultados observados, nuestro grupo (Carreras *et al*, 2005), junto con otros autores (Cadenas *et al*, 2000; Allen y Tresini, 2000), proponemos una acción gradual del H₂O₂ en la célula: a baja concentración (3- 15 μM), se observa una respuesta mitogénica significativa, sin embargo a concentraciones 10 veces mayores, hay inducción de arresto del ciclo celular de forma temporal, seguido por la expresión de genes que codifican para enzimas detoxificantes. A concentraciones aún más altas, el H₂O₂ induce un arresto permanente del ciclo, sin daño sobre la célula. Este estado le permite a la célula funcionar normalmente, pero no se dividirá.

Los mecanismos por los cuales H_2O_2 ocasiona la activación de MAPKs y otras proteínas se desconocen hasta el momento. Se ha propuesto que es la inhibición de MAPK fosfatasas la que promueve la activación de MAPKs. Las ROS, y en particular el H_2O_2 , modifican el residuo cisteína ubicado en el sitio catalítico de las fosfatasas inactivándolas de manera reversible (Lee y Esselman, 2002), de manera que MAPKs ya no son sustrato de las mismas y por lo tanto permanecen activadas por más tiempo. Por otra parte nosotros proponemos que la capacidad oxidante del H_2O_2 es en sí misma la causa de su efecto sobre las MAPKs, y probablemente las demás proteínas, actuando directamente sobre cisteínas ubicadas en estas moléculas, alterándoles la conformación espacial de manera de facilitar o impedir su interacción con sus proteínas activadoras o proteínas blanco.

Objetivos

Como se mencionó en la introducción, el metabolismo del NO regula el consumo de O_2 y la velocidad de producción de O_2^- y H_2O_2 en mitocondrias. El NO mitocondrial está finamente regulado por la expresión y actividad de la mtNOS. Asimismo, estudios recientes muestran efectos del H_2O_2 sobre la expresión génica y los mecanismos de señalización celular, así como la participación de la mitocondria en algunos caminos de señalización que conducen tanto a división celular, como a arresto del ciclo y/ o apoptosis. De acuerdo a lo expuesto, el grado de expresión y actividad de la mtNOS, la producción asociada de H_2O_2 y $ONOO^-$ y la actividad de SOD pueden intervenir en el proceso de transformación neoplásica y en la inmortalización de líneas tumorales.

Hipótesis

La hipótesis general del laboratorio es que la actividad de la mtNOS y su modulación son finamente reguladas en el ciclo celular, el crecimiento y la senescencia. En este contexto, la hipótesis específica del trabajo es que los tumores tienen como los tejidos normales, mtNOS y una producción de H_2O_2 dependiente de NO. De acuerdo con los niveles esperados de H_2O_2 en las distintas etapas del ciclo celular, es esperable una reducción en la expresión o inactivación de la mtNOS, una menor producción de NO y H_2O_2 , y la consecuente activación de cascadas proliferantes. Asimismo, la disminución de los niveles bioenergéticos por daño mitocondrial (disminución “funcional” de la masa mitocondrial) pueden contribuir al estado proliferativo persistente.

Objetivos

1. Estudiar la expresión y actividad de mtNOS en tejidos y líneas celulares tumorales.

2. Estudiar la actividad de los complejos de la cadena respiratoria y la integridad funcional y estructural de las mitocondrias en tumores.
3. Estudiar la producción de NO y H₂O₂ en estas muestras.
4. Determinar la actividad de enzimas antioxidantes como Mn- SOD, catalasa y glutatión peroxidasa.
5. En las líneas celulares, modificar el estado redox y analizar las condiciones del ciclo celular en términos de proliferación y apoptosis.
6. Medir la activación de las cascadas de MAPK y la modulación en la expresión de ciclina D1 en las condiciones antedichas y de acuerdo a los cambios en el estado redox.
7. Comparar las actividades descritas con las de tejidos normales como hígado y cerebro.
8. Identificar los mecanismos de activación de MAPK por H₂O₂.

***Materiales y
métodos***

Animales. Se usaron ratones BALB/ c portadores de tumor de 8 a 12 semanas de edad, provenientes de la División de Cuidado Animal del Instituto Universitario Ángel H. Roffo. Como control se utilizaron pulmones e hígados de ratones BALB/ c sanos. En algunos experimentos, se incluyeron ratas Wistar E19- P2 y P90 para obtener hígados en diferentes estadios del desarrollo embrionario, con respectivas alta tasa de proliferación o no proliferantes. Con este mismo propósito, se obtuvieron mitocondrias de glándula mamaria de ratas luego del parto, y hepatocitos aislados de P2- P90. Los animales fueron mantenidos de acuerdo a las normas de ética y regulaciones del National Institute of Health.

Tumores. Se utilizaron dos adenocarcinomas mamarios murinos (M3, MM3) y un adenocarcinoma murino de pulmón (P07). P07 y M3 aparecieron espontáneamente en pulmón y mama de hembras de ratones BALB/ c, respectivamente (Bal de Kier Joffé *et al*, 1983; Diament *et al*, 1998). La variante MM3 se obtuvo por sucesivos implantes subcutáneos (s.c.) a partir de las metástasis pulmonares originadas por M3 en ratones singeneicos (Colombo *et al*, 1980). Los tres tumores, fueron mantenidos por transplante s.c., y están bien caracterizados: el tumor M3 presenta 40% de incidencia de metástasis pulmonares, mientras que MM3, que presenta mayor periodo de latencia tumoral que M3 (11 ± 2 vs 6 ± 2 días), desarrolla metástasis en el 95 % de los ratones inoculados. P07 desarrolla metástasis pulmonares en el 100% de los casos (Bal de Kier Joffé *et al*, 1983; Diament *et al*, 1998; Colombo *et al*, 1980).

Líneas celulares y condiciones de cultivo. Las líneas celulares LM3, LMM3 y LP07 fueron obtenidas de los tumores M3, MM3 y P07, respectivamente (Urtreger *et al*, 1997 y 2001). Con propósitos comparativos, también usamos la línea humana de adenocarcinoma mamario MCF7 y la línea de glándula mamaria normal NMuMG. LM3, LMM3 y LP07 fueron mantenidas en minimal essential medium (MEM) (41500, Gibco BRL) suplementado con suero fetal bovino (SFB), 2 mM L- glutamina y 80 µg/

mL gentamicina, definido como medio completo (MC), en frascos plásticos (Corning) a 37° C en 5% CO₂. Los sucesivos pasajes se hicieron levantando las células con tripsina (0.25 % tripsina, 0.02 % EDTA en PBS libre de Ca²⁺ y Mg²⁺; 80 mM Na₂HCO₃, 20 mM NaH₂CO₃, 100 mM NaCl). La línea MCF7 se mantuvo en Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture F- 12 HAM (D- MEM) (D- 2906, Sigma) suplementado con 10 % SFB y 50 µg/ mL gentamicina. La línea NMuMG se mantuvo en D- MEM suplementado con 10 % SFB, 50 µg/ mL gentamicina y 10 µg/ mL insulina, como recomienda la ATCC. Los estudios de tráfico de MAPK, y su efecto sobre la proliferación y la apoptosis, tras estimulación con H₂O₂, fueron realizados sobre la línea celular LP07. En éste caso, la línea fue mantenida en D- MEM suplementado con 10% SFB, y los ensayos realizados en D- MEM.

Aislamiento y purificación de mitocondrias en órganos y tumores. Las mitocondrias de tumores, glándula mamaria, pulmón e hígado fueron aisladas por centrifugación diferencial, como se describió previamente (Carreras *et al*, 2001). Brevemente, los tejidos se lavaron y homogeneizaron en buffer MSHE (0.22 M manitol, 0.07 M sacarosa, 0.5 mM EGTA, 2 mM HEPES/ KOH, pH 7.4) (1/ 10 v/ v), a 4° C. El homogenato se centrifugó a 600 x g por 10 min en un rotor JA- 17 y el sobrenadante fue luego centrifugado a 10000 x g por 10 min. Las mitocondrias aisladas fueron luego purificadas en MSHE suplementado con 0.1% albúmina sérica bovina (BSA) y buffer Percoll (30% Percoll, 0.225 M manitol, 1 mM EGTA, 25 mM HEPES/ KOH, 0.1% BSA) para remover organelas contaminantes y mitocondrias dañadas (Hovius *et al*, 1990). El pellet mitocondrial se lavó una vez en MSHE con BSA, dos veces en 150 mM KCl y una vez más en MSHE sin BSA. Las mitocondrias se resuspendieron en MSHE y se guardaron a -80° C. El homogenato de 600 x g se almacenó a -80° C para el análisis de la actividad y expresión de las isoformas citosólicas de la NOS y la determinación de las actividades de catalasa y glutathion peroxidasa. El contenido de proteínas se evaluó siguiendo el método de Lowry. Para practicar estudios de microscopia electrónica de transmisión, las mitocondrias purificadas de tumores y tejidos normales se fijaron en glutaraldehído al 3%, luego se post- fijaron en 1% tetra- óxido de osmio en 0.1 M buffer fosfato y se embebieron en Epon. Se prepararon secciones con ultramicrotomo,

contrastadas con acetato de uranilo y citrato. Se examinaron áreas representativas y se fotografiaron en un microscopio electrónico Zeiss EM 109 a 80 KV.

Fraccionamiento submitocondrial. Las mitocondrias se rompieron osmóticamente diluyendo el pellet mitocondrial en 4 volúmenes de H₂O destilada, y luego se centrifugaron a 12000 x g por 10 min; el sobrenadante contiene la membrana externa y el espacio intermembrana, mientras que el pellet contiene mitoplastos, vesículas de membrana interna que encierran matriz mitocondrial. La fracción de mitoplastos se sonica dos veces a 40 W de potencia por 10 seg. cada vez en un sonicador Cole- Palmer (WPI, Sarasota, FL, USA). Esta fracción se centrifuga a 8000 x g por 10 min para remover las mitocondrias y/ o mitoplastos enteros remanentes. Este sobrenadante, junto con el del primer paso se ultracentrifugan a 100000 x g por 30 min, para obtener membrana interna y matriz, y membrana externa y espacio intermembrana, en el pellet y sobrenadante de cada una de las dos fracciones, respectivamente (Alonso *et al*, 2004).

Actividad NOS. La actividad de NOS se determinó por conversión de L- [³H]arginina a L- [³H]citrulina como se describió previamente, con modificaciones menores (Carreras *et al*, 2002). Las muestras se congelaron y descongelaron una vez y la actividad se midió en 50 mM buffer fosfato, suplementado con 50 mM L- valina, en presencia de 100 µM L- Arg (mitocondria) o 20 µM L- Arg (homogenato), 100 µM NADPH, 0.1 µM calmodulina, 0.3 mM CaCl₂, 1 µM flavina adenina dinucleotido (FAD), 1 µM flavina mononucleotido (FMN) y 10 µM tetrahidrobiopterina (BH₄), pH 7.4. La actividad específica se determinó luego de sustraer la actividad remanente en presencia de un exceso (10 veces) del inhibidor competitivo N^G- monometil- L- arginina (L- NMMA).

Producción mitocondrial de peróxido de hidrógeno. La producción de H₂O₂ se monitoreó continuamente en un espectrofluorómetro Hitachi F- 2000 (Hitachi Ltd, Tokio, Japón) con longitudes de onda de excitación y emisión de 315 y 425 nm, respectivamente (Poderoso *et al*, 1996). El ensayo se realizó en 50 mM buffer fosfato, 50 mM L- valina, pH 7.4, suplementado con 12.5 U/ mL peroxidasa de alfalfa, 250 µM

ácido *p*- hidroxifenilacético, y 0.15 mg proteína mitocondrial/ mL, con 10 mM succinato como sustrato. Para explorar los efectos de la utilización del NO y la actividad de mtNOS sobre la velocidad de producción mitocondrial de H₂O₂ el ensayo se inició con 0.1 mM L- Arginina o pulsos de 0.05- 10 μM NO o, comparativamente, con 2 μM antimicina (Riobó *et al*, 2002; Giulivi, 1998). Para determinar la tasa de producción de H₂O₂ dependiente de NO, se agregó 1 mM L- NMMA a las preparaciones mitocondriales en los casos apropiados. Todas las variaciones fluorométricas en las diferentes condiciones se deben al H₂O₂ ya que son completamente inhibidas por 3 μM catalasa. Para uniformar la máxima tasa de producción de H₂O₂, en todos los casos las preparaciones mitocondriales fueron suplementadas con 1 mM SOD- mimetic TBAP.

Actividad mitocondrial; transferencia de electrones. La actividad de citocromo oxidasa se determinó a través de la oxidación de 50 μM citocromo *c* reducido, a 550 nm, en un espectrofotómetro Hitachi 3000; $\epsilon_{550} = 21 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. La velocidad de la reacción fue determinada como una constante de pseudo- primer orden y expresada como $k \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$. La actividad de NADH- citocromo *c* reductasa y succinato- citocromo *c* reductasa se ensayó siguiendo la reducción de 30 μM citocromo *c* en presencia de 1 mM KCN y, con 150 μM NADH u 8 mM succinato, como dadores de electrones.

Enzimas antioxidantes. La actividad de la Mn- SOD mitocondrial se determinó mediante la inhibición de la reducción del citocromo *c* por el sistema xantina/ xantina oxidasa (McCord y Fridovich, 1969). Brevemente, la reducción de 10 μM citocromo *c* por 3.5 mU/ ml xantina oxidasa y 50 μM xantina fue evaluada a 550 nm en 50 mM buffer fosfato, pH 7.8 con 0.1 mM EDTA a 25° C, y referido a una curva de calibración hecha con Cu/ Zn- SOD titulada comercialmente.

La actividad de catalasa se determinó observando el decaimiento del H₂O₂ a 240 nm. La velocidad de la reacción se determinó como una constante de pseudo- primer orden y se expresó como $k \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ (Chance, 1954). Las determinaciones se realizaron en 50 mM buffer fosfato, 0.1% Triton X- 100, pH 6.8, suplementado con 10 mM H₂O₂; los resultados se refirieron a una curva de calibración de catalasa.

La actividad de glutathion peroxidasa se determinó siguiendo la oxidación de NADPH a 340 nm; $\epsilon_{340} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Las muestras se incubaron en 100 mM buffer fosfato, 1 mM EDTA, pH 7.7, suplementado con 5 mM glutathion reducido, 0.15 mM NADPH, 1 mM azida sódica, 0.25 U glutathion reductasa y 0.5 mM tert-butilhidroperoxido (Seglen, 1972).

Ensayos de proliferación. Las células se sembraron en placas de 96 hoyos en las densidades apropiadas: LM3 o LMM3; 3×10^3 células/ hoyo, LP07; 6×10^3 células/ hoyo en 0.2 ml MC, y NMuMG; 6×10^3 células/ hoyo en D-MEM suplementado con 10% SFB e insulina, y se dejaron 24 hs para que se adhieran al plástico. Luego se trataron con concentraciones crecientes de H_2O_2 (0.1 μM - 1 mM) en MEM o D- MEM sin SFB. En experimentos comparativos, para examinar el efecto del H_2O_2 endógeno, se incluyó 5 mM del inhibidor de catalasa 3- amino- 1, 2, 4- triazol (ATZ) 3 hs previas al tratamiento. Tras 48 hs de incubación, la proliferación se determinó por un ensayo no radioactivo (Cell Titer 96; Aqueous Non- Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, WI) siguiendo las instrucciones del fabricante. La absorbancia se determinó en un lector de ELISA a 492 nm. Los ensayos realizados sobre la línea LP07 en los que se estudió el efecto de los inhibidores de MAPK sobre la proliferación tras la inducción con 1 y 50 μM H_2O_2 , se siguieron por incorporación de [^3H]timidina. Brevemente, las células LP07 se sembraron, se dejaron 24 hs en ausencia de SFB, y se trataron según se explica en el párrafo anterior, en presencia de 0.8 μCi / hoyo de [^3H]timidina (actividad específica: 70 a 90 Ci/ mmol; NEN/ Dupont, Boston, Mass.). Las células se levantaron con tripsina. La radioactividad se midió en un contador de centelleo líquido (Wallac 1414, Turku, Finlandia). Los inhibidores se colocaron 1- 2 hs previas al estímulo con H_2O_2 . En todos los casos, los tratamientos se realizaron por octuplicado.

Citometría de flujo. Para comparar la concentración endógena de H_2O_2 , se utilizaron las líneas celulares tumorales y NMuMG. Asimismo, se aislaron hepatocitos de ratas recién nacidas (P2) y adultas (P90), como se describió previamente (Burk *et al*, 1978). Se resuspendieron 10^6 células en HBSS (suplementado con 1mM CaCl_2 y 1mM MgCl_2 , pH, 7.4) y se incubaron con 5 μM 2', 7'- diclorofluorescina diacetato (DHCF-

DA) por 30 min a 37° C en oscuridad. El ensayo se llevó a cabo en un citómetro de flujo Ortho Cytoron Absolute (Johnson & Johnson, U.S.A). Para detectar células muertas, se usó yoduro de propidio (0.005%). Para cada análisis, se registraron 2×10^4 eventos.

Para estudiar el ciclo celular, las células LP07 se estimularon con H₂O₂, se levantaron y se incubaron con 100 µg/ mL yoduro de propidio en 0.1% citrato de sodio, 0.1% Triton X- 100 a 4° C, overnight en oscuridad (Nicoletti *et al*, 1991). El análisis del ciclo celular se realizó en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton- Dickinson, Mountain View, CA). Asimismo, se estudió apoptosis con el fluorocromo Anexina V: se utilizó el kit FICT- annexin V (Immunotech), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Lisados celulares; obtención de núcleo, mitocondria y citosol. Las células se sembraron en placas de Petri, se privaron de SFB 24 hs, se trataron con H₂O₂, se lavaron y recolectaron. Se lisaron en buffer MSHE en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasas (1 mM PMSF, 5 µg/ mL leupeptina, 5 µg/ mL pepstatina, 5 µg/ mL aprotinina, 25 mM NaF y 1 mM NaVO₄). Los núcleos se obtuvieron por centrifugación a 600 x g, las mitocondrias a 8000 x g. Los núcleos fueron sucesivamente lavados (10 mM Tris, 1.5 mM EDTA, 0.01% Nonidet P- 40, 10% glicerol, pH 7.4) y lisados (10 mM Tris, 1.5 mM EDTA, 0.4 M KCl, 10% glicerol, pH 7.4). Núcleos lisados y sobrenadantes de 8000 x g se ultracentrifugaron a 100000 x g. La pureza de las fracciones se determinó mediante western blot de proteínas específicas de la mitocondria (proteínas del complejo I y IV), mediante citometría de flujo con yoduro de propidio para detectar ADN nuclear, y mediante la determinación de actividad de la enzima citosólica lactato deshidrogenasa. Proietti *et al* (2005) observaron ausencia de contaminación entre las fracciones nuclear y citosólica por western blot de PI3K (enzima citosólica) y RB (enzima nuclear). El contenido de proteínas se evaluó por el método de Lowry.

Transfección. Células LP07 se incubaron en placas de 6 hoyos sobre un porta objetos, en D- MEM sin SFB, con Lipoanfectamina 2000 (Gibco) y el plásmido conteniendo ERK2- GFP (gentileza de Stork P: Horgan y Stork, 2003) durante toda la

noche. Luego se reemplazó el cultivo por medio fresco con SFB, y se marcaron las células como se describe en el párrafo de microscopía confocal.

Western blot. Las proteínas se separaron por electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida según descrito por Laemmli, y se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se lavaron en 20 mM Trisbase, 137 mM NaCl, 0.1%, Tween- 20, pH 7.4 (TTBS), se bloquearon en TTBS con 5% leche en polvo descremada, y luego se incubaron con los primeros anticuerpos, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y ajustando las diluciones de los mismos para cada sistema. Luego se lavaron e incubaron con segundos anticuerpos para ratón, conejo o cabra conjugados con peroxidasa de alfalfa. Las bandas se detectaron por quimioluminiscencia usando ECL o ECL Advance.

Microscopía Confocal. Células LP07 se sembraron sobre cubreobjetos en D-MEM. Se tiñeron con un marcador mitocondrial específico, MitoTracker Red 580 (Molecular probes) (100 nM, 45 min a 37° C) y con un marcador nuclear, Hoescht (5µg/mL, 10 min a 37° C). Luego se fijaron en 4% paraformaldehído, 12% sacarosa. Se bloquearon en 1% BSA, 0.3% Triton X- 100, PBS, pH 7.4, en cámara húmeda por 1 hr. a temperatura ambiente. Las células fijadas y bloqueadas se incubaron con el primer anticuerpo en 1% BSA, 0.3% Triton X- 100, PBS, pH 7.4, a 4° C, overnight en cámara húmeda; luego se lavaron y se incubaron con un segundo anticuerpo anti ratón conjugado con el marcador fluorescente verde Cy2, por 1 hr. a temperatura ambiente. Finalmente, los cubreobjetos se lavaron y se montaron sobre portaobjetos en medio de montaje Fluorsave (Calbiochem). Las muestras se estudiaron en un microscopio confocal Nikon C1.

Microscopía electrónica con inmuno- marcación. Células LP07 se resuspendieron en formaldehído, se deshidrataron y se embebieron en LR White (Carreras *et al*, 2004). Se utilizó el anticuerpo primario anti fosfo- ERK1/2 diluido 1:100 en PBS. Las grillas se contrastaron con 1% acetato de uranilo. El inespecífico se sustrajo mediante incubación en 5% suero de cabra al comienzo del procedimiento. Las

muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM- 109 T a 80 kv.

Inmuno- precipitación. Las fracciones citosólica y mitocondrial (500 y 300 μ g de proteína, respectivamente) se inmuno- precipitaron en buffer de lisis (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 % glicerol, 0.5% Nonidet P- 40, 1 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 5 μ g/ mL leupeptina, 5 μ g/ mL pepstatina, 5 μ g/ mL aprotinina, 25 mM NaF y 1 mM NaVO₄, pH 7.4) con los primeros anticuerpos apropiados, por 2 hs., u overnight a 4° C. Luego se agregó proteína A/ G- agarosa (Santa Cruz) o proteína G- agarosa (Sigma) para precipitar los inmuno- complejos, por 1 hr. a 4° C. Los complejos se lavaron luego en buffer de lisis, y se hirvieron en buffer de siembra previo a la corrida electroforética (Proietti *et al*, 2005).

Ensayo de actividad kinasa. Los ensayos de fosforilación *in vitro* se llevaron a cabo siguiendo a Hochbaum y *col.* (2003), pero sin el agregado de DTT en los buffers, dado que los tratamientos realizados eran precisamente reacciones de oxidación. Brevemente, se inmuno- precipitaron MEK, MKK3, MKK4, ERK1/2, p38 y JNK1/2 en buffer de lisis (20 mM HEPES, 2.5 mM MgCl₂, 10 mM EDTA, 1% NP- 40, 0.1% SDS, 40 mM β - glicerofosfato, 2 mM NaVO₄, en presencia de inhibidores de proteasas, pH 7.5), como se describe en el párrafo anterior. Se utilizaron la proteína mielina básica (MBP) y ATF- 2 como sustratos de ERK1/ 2 y, JNK1/ 2 y p38 respectivamente. La proteína humana recombinante ERK1- GST fusionada a agarosa (Stressgen) se utilizó como sustrato de MEK. Las proteínas inmuno- precipitadas se lavaron una vez en PBS, 1% NP- 40, 2 mM NaVO₄, una vez en 100 mM Tris, 0.5 M LiCl, pH 7.5, y se resuspendieron en buffer de reacción kinasa (12.5 mM MOPS, pH 7.5, 12.5 mM β - glicerofosfato, 7.5 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, 0.5 mM NaF, 0.5 μ M NaVO₄). Se incubaron con H₂O₂ 15 min a temperatura ambiente cuando correspondía. Luego se lavaron y resuspendieron en buffer de reacción kinasa. Las duplas MAPKK/ MAPK o MAPK/ sustrato se incubaron en presencia de 1 mM ATP y γ -ATP (10 μ Ci/ reacción) a 30° C por 30 min. La reacción se frenó por el agregado de buffer de siembra. Las muestras se corrieron en SDS- PAGE y se reveló por autorradiografía. La actividad de p38 se determinó utilizando un ensayo de fosforilación no radioactivo (Cell Signaling)

siguiendo las instrucciones del fabricante, nuevamente evitando el agregado de DTT. Se desarrollaron en paralelo inmuno- precipitaciones para determinar la especificidad de los anticuerpos por western blot.

Ensayo de interacción de MAPK. Para estudiar la interacción entre MAPK, las fracciones citosólica y mitocondrial (500 y 300 µg respectivamente) se incubaron en presencia de la proteína recombinante humana ERK1- GST fusionada a agarosa, o de las proteínas recombinantes humanas JNK2 o p38, inmuno- inmovilizadas en agarosa mediante anticuerpos específicos, en el buffer de lisis descrito en el párrafo anterior, overnight a 4° C. ERK1, p38 y JNK2 se oxidaron con H₂O₂ cuando correspondía, por 15 min. Tras la incubación, las partículas de agarosa con los complejos proteicos, fueron precipitadas, lavadas 3 veces en buffer de lisis y luego hervidas en buffer de siembra. Finalmente las muestras se corrieron en SDS-PAGE, y se revelaron las membranas con MEK, MKK3 o MKK4 respectivamente, y los anticuerpos de MAPKs correspondientes como control de carga.

Materiales. Citocromo c, Cu/Zn SOD, xantina, xantina oxidasa, calmodulina, tetrahidrobiopterina, Tris, NADPH, NADH, FAD, FMN, sacarosa, glucosa, HEPES, EDTA, EGTA, succinato, glicerol, Nonidet P- 40, ditioneitol, leupeptina, aprotinina, PMSF, pepstatina, Percoll, KCN, ácido p- hidroxifenilacético, peroxidasa de alfalfa, L- arginina, L- glutamina, L- NMMA, manitol, BSA, antimicina A, Tween 20, Triton X-100, diclorofluorescina diacetato (DHCF-DA), catalasa, glutation, H₂O₂ y 3- amino-1,2,4- triazol (ATZ) son de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Mn- SOD mimetic TBAP es de Calbiochem. La tripsina es de Gibco BRL. Los anticuerpos monoclonales anti NOS neuronal (N-31020) y policlonales anti NOS endotelial (N-30300) son de Transduction Laboratories. El policlonal anti macrophage NOS (sc-650) es de Santa Cruz. Los anticuerpos secundarios son de GE Health Care Biosciences. Los anticuerpos anti MAPK y MAPKK son de Cell Signaling. El anticuerpo anti ciclina D1 y anti p38 (para inmunoprecipitación) son de Santa Cruz. L- [2,3,-³H]- Arginina y la [³H]timidina son de NEN (Boston, MA, USA). La solución de acrilamida, las membranas de PVDF, y el ECL son de GE Health Care Biosciences. La solución de NO (1.2- 1.8 mM) se prepara burbujeando gas NO (AGA GAS Inc., Maumee, OH) en agua

des- gaseada con He por 30 min a temperatura ambiente y se guarda por una semana a 4° C.

Análisis de los datos. Los datos se analizaron por ANOVA de una vía, y por método de Scheffé de comparaciones a posteriori. Se comprobaron los supuestos de normalidad y homocedacia.

Resultados

Primera parte

La disminución de la actividad de la óxido nítrico sintasa mitocondrial y el peróxido de hidrógeno, relacionan la proliferación tumoral persistente al comportamiento embrionario.

Estructura y función mitocondrial. Luego del aislamiento y la purificación, las mitocondrias de tumores se mostraron mas voluminosas y bizarras que las mitocondrias obtenidas de los respectivos tejidos controles; se observó asimismo forma y tamaño mitocondrial variable, con pérdida de crestas y tendencia a la agregación (Fig. 27). Para examinar las funciones mitocondriales ligadas a la conversión de energía, se examinó la tasa de transferencia de electrones en las diferentes preparaciones, con aceptores específicos para los distintos complejos de la cadena respiratoria. De este modo, las mitocondrias de embriones o neonatos y las organelas tumorales presentaron baja actividad de los complejos I- III, II- III y IV, respecto del hígado adulto (Tabla 1; $p < 0.05$).

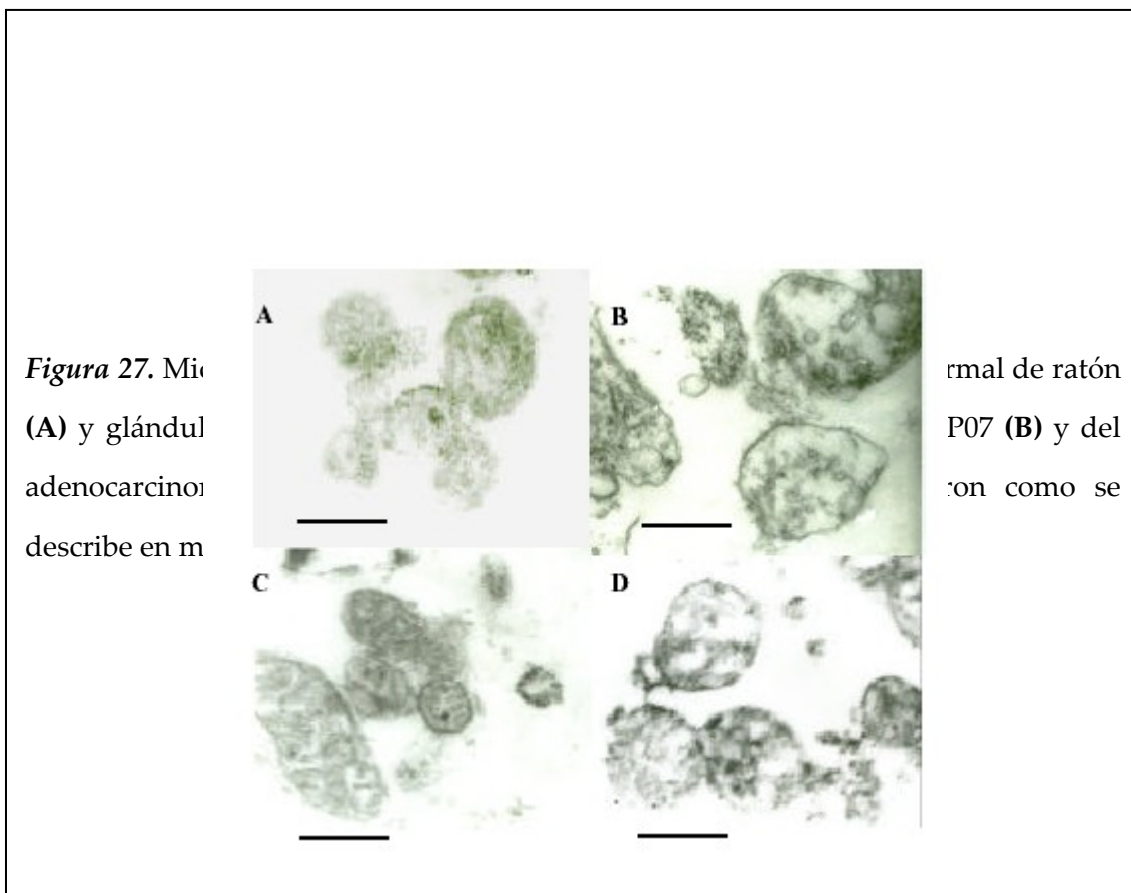


Tabla 1. Actividad respiratoria mitocondrial de tejidos normales y tumorales^a

Para detalles, ver materiales y métodos.

	Complejo I-III <i>(nmoles cit c/min.mg prot)</i>	Complejo II-III	Complejo IV <i>(k' / min.mg prot)</i>
<i>Tejidos adultos normales, quiescentes</i>			
Hígado de rata	550 ± 46	83 ± 9	20 ± 1
Hígado de ratón	511 ± 37	72 ± 8	14 ± 1
Pulmón de ratón	429 ± 46	35 ± 6 ^c	17 ± 1
<i>Tejidos proliferantes normales</i>			
Hígado fetal de rata (E19)	170 ± 28 ^c	37 ± 7 ^c	5 ± 1 ^c
Glándula mamaria de rata preñada ^b	225 ± 18 ^c	23 ± 2 ^c	22 ± 3 ^d
<i>Tumores</i>			
M3	105 ± 15 ^c	29 ± 5 ^c	4 ± 1 ^c
MM3	103 ± 14 ^c	14 ± 2 ^c	7 ± 1 ^c
P07	122 ± 6 ^c	23 ± 3 ^c	8 ± 1 ^c

(a) Los datos se expresan como media ± ES de 4-23 experimentos por triplicado.

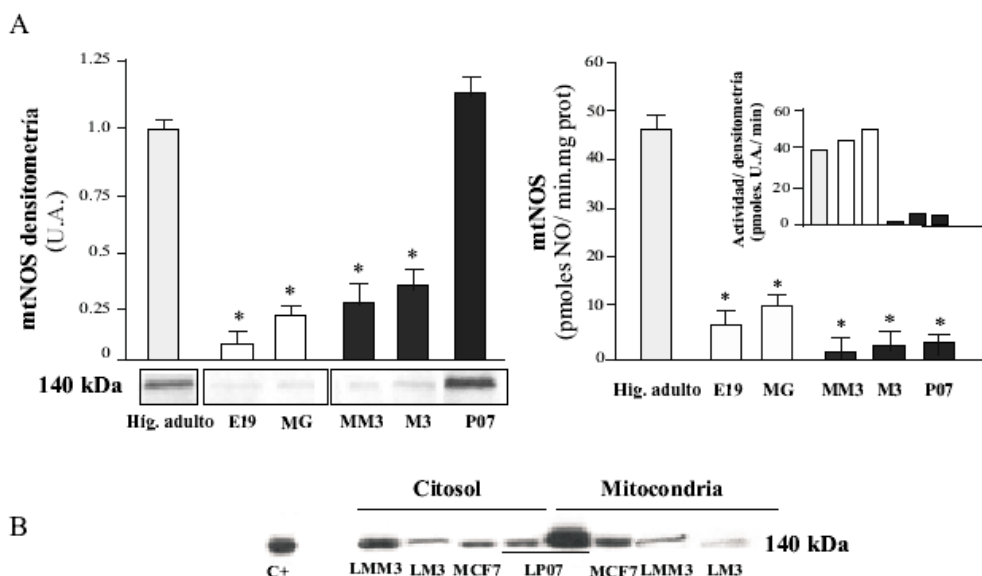
(b) Se juntaron 8-10 glándulas de animal para obtener valores individuales para glándula mamaria de rata preñada. (c) p<0.05 vs hígado de rata adulta o hígado o pulmón de ratón adulto.

(d) p<0.05 vs tumores e hígado fetal E19.

mtNOS en tejidos normales y tumorales. La mtNOS se encontró expresada tanto en las mitocondrias murinas normales como tumorales, así como también en la línea celular tumoral humana MCF7. Sin embargo, el nivel de proteína expresado resultó dependiente del tipo de tumor. En M3 y MM3, la expresión de mtNOS fue menor que en tejidos normales, y similar a la expresión en mitocondrias de hígado proliferante (E19) y glándula mamaria de rata preñada. En cambio, las mitocondrias de

P07 presentaron una expresión robusta de mtNOS, similar a la del hígado adulto (Fig. 28A, izq.). Sin embargo, e independientemente de la expresión de la proteína, la actividad de mtNOS se mostró marcadamente disminuida en todas las mitocondrias tumorales, y al mismo nivel que las mitocondrias de hígado fetal o glándula mamaria (Fig. 28A, der.). Por lo tanto, la relación entre la actividad de la mtNOS y su expresión resultó marcadamente inferior en tumores que en tejidos normales (Fig. 28A, inset). Como se describió previamente (Giulivi *et al*, 1998; Elfering *et al*, 2002; Riobo *et al*, 2002), la mtNOS de 140 kDa fue reconocida tanto en tejidos sanos como tumorales por anticuerpos anti- iNOS y anti- nNOS. En tumores, también se detectó en el citosol la presencia de una isoforma de 140 kDa con la misma inmuno- reactividad (Fig. 28B). No se encontró eNOS en ninguna de las diferentes fracciones subcelulares. Es interesante

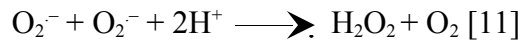
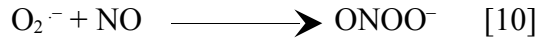
Figura 28. Expresión de NOS mitocondrial en tumores. En **A** (izq.), western blot representativo y densitometría de la mtNOS en los adenocarcinomas murinos de mama M3, MM3 y pulmón P07 (negro); se compara la mtNOS tumoral con la de hígado adulto (gris) y la presente en tejidos proliferantes como el hígado de embrión de rata E19 y la glándula mamaria lactante (blanco). La densitometría de mtNOS se expresa como la media \pm E.S. de 5 experimentos independientes, en unidades arbitrarias (U. A.). En **A** (der.), se muestra la actividad de mtNOS en los diferentes grupos estudiados; en el *Inset*, la relación entre la actividad y la expresión de mtNOS. En **B**, se muestra un western blot representativo de las NOS citosólicas y la mitocondrial de las líneas derivadas de los tumores en cuestión, y de la línea de adenocarcinoma humano MCF7. * $p < 0.05$ respecto del hígado adulto.



Producción de H₂O₂ dependiente de mtNOS. La mitocondria es la fuente principal de producción de O₂⁻ y de su producto dismutado por Mn-SOD, el H₂O₂ (Boveris *et al*, 1997). La tasa de producción de O₂⁻ y H₂O₂ aumenta al inhibir la cadena de transporte de electrones a nivel del complejo III por antimicina (véase introducción para más detalle). En este estudio, las mitocondrias tumorales presentaron una marcada disminución en la velocidad de producción de H₂O₂ con antimicina respecto de las organelas de hígado adulto; asimismo, éste parámetro fue 50% menor en el hígado proliferante de E19 que en el órgano adulto (Fig. 29). Fisiológicamente, el óxido nítrico inhibe la citocromo oxidasa y el sitio *b-c1* en el complejo III e incrementa el nivel del radical ubisemiquinona, que cede electrones al O₂ y conduce a la formación de O₂⁻ (Poderoso *et al*, 1996 y 1999). De acuerdo con este análisis, se observó que cuando las mitocondrias se suplementaron solamente con L- arginina, el sustrato de la NOS, las organelas de hígado adulto alcanzaron casi el 90% de la velocidad máxima de producción de H₂O₂, adquirida con antimicina. En cambio, ni los tumores ni los tejidos embrionarios o proliferantes pudieron alcanzar ese porcentaje de producción de H₂O₂ en presencia del sustrato. Este efecto deriva de una limitada concentración de NO en la matriz mitocondrial, que se debe a su vez a una actividad disminuida de la mtNOS en tejidos tumorales y proliferantes.

Respuesta de la mitocondria tumoral al óxido nítrico. La mitocondria tumoral utiliza el NO de manera diferente que las organelas normales. De este modo, el pico de producción de H₂O₂ dependiente de NO en mitocondrias de tumores M3 y MM3 fue alrededor de 50% del obtenido en hígado de ratón adulto, mientras que las mitocondrias del tumor P07 tuvieron una respuesta aún mas pobre (17% respecto de hígado adulto) (Fig. 30). Asimismo, el pico máximo de H₂O₂ se observó entre concentraciones de NO de 0.25- 0.75 µM en M3, MM3 y P07 y, a 2 µM NO en el hígado de ratón adulto. En

todos los casos, las curvas ascendentes y descendentes de producción de H₂O₂ representan la utilización preferencial del O₂⁻ para producir H₂O₂ o, con mayor [NO] en la matriz, para la formación de peroxinitrito, de acuerdo con las constantes de velocidad de las respectivas reacciones [10] y [11]: $k_1 = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ seg.}^{-1}$; $k_2 = 1.9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ seg.}^{-1}$ (Poderoso *et al*, 1999).



Asimismo, las curvas tumorales indican una respuesta limitada al NO y una relativamente rápida transición de la reacción [11] a la [10]. Además, los tumores y los tejidos proliferantes presentan un 30- 60% de la actividad de Mn- SOD con respecto al hígado adulto ($p < 0.05$, tabla 2).

Figura 29. Producción de H₂O₂ dependiente de mtNOS. La producción de H₂O₂ mitocondrial de hígado adulto (gris), hígado fetal E19 (blanco) y tumores (negro) se siguió fluorométricamente a través de la oxidación del ácido *p*- hidroxifenilacético dependiente de H₂O₂ por la peroxidasa de alfalfa. Comparativamente, la reacción se realizó suplementando la preparación de mitocondrias (0.15 mg/ ml) con 2 μM antimicina o 100 μM L- arginina, en presencia de 10 mM succinato de sodio. Los efectos de la arginina se refieren a la velocidad de producción de H₂O₂ dependiente de NO específicamente, ya que fue inhibida por el inhibidor de la NOS, L- NMMA (1 mM). * $p < 0.05$ respecto del hígado adulto.

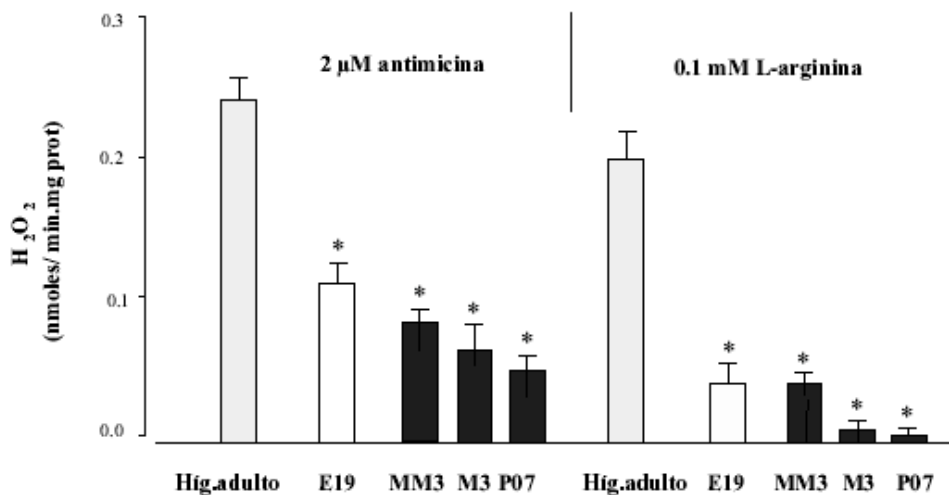
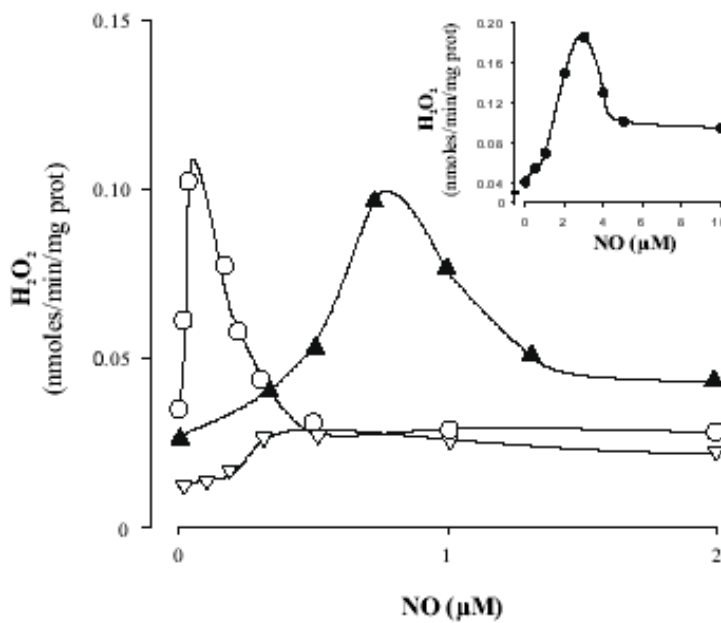


Figura 30. Efecto del óxido nítrico sobre la producción mitocondrial de H_2O_2 en tumores (0.15 mg/ml en cubetas como en el inseto). (inset). uno por



Células tumorales y concentración de H_2O_2 en el estado estacionario. El H_2O_2 difunde fuera de la mitocondria y contribuye a la concentración de H_2O_2 en el citosol en el estado estacionario ($[H_2O_2]_{ss}$) (Boveris *et al*, 1997). La $[H_2O_2]_{ss}$ también depende del catabolismo de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa, las cuales en tumores presentaron no más del 5- 40% de actividad con respecto al tejido adulto (Tabla 2). Por lo tanto, la $[H_2O_2]_{ss}$ dependiente de NO puede ser calculada de acuerdo a la ecuación 1

(donde $+d[\text{H}_2\text{O}_2]/dt$ es la velocidad de producción de H_2O_2 dependiente de L- arginina, $k3$ es la constante de reacción de segundo orden para el catabolismo del H_2O_2 por catalasa, y $k4$ la constante para la reacción catalizada por glutatión peroxidasa (Boveris *et al*, 1997).

$$[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{ss}} = +d[\text{H}_2\text{O}_2]/dt / (k3I [\text{catalasa}] + k4 [\text{glutatión peroxidasa}]) \quad [Ec.1]$$

De acuerdo con esta ecuación, la $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{ss}}$ dependiente de NO se estimó en $4-8 \times 10^{-11}$ M en hígado proliferante y tumores, y cerca de dos órdenes de magnitud mayor (10^{-9} M), en hígado adulto. Una contribución significativa del H_2O_2 dependiente de NO a los oxidantes totales de la célula se observó por citometría de flujo; los hepatocitos adultos aislados exhibieron mayor fluorescencia al ser incubados con DCFH, lo que indica una mayor concentración de oxidantes intracelulares que en tumores o células NMuMG proliferantes (Fig. 31A; $p < 0.05$). Más aún, en presencia de L- arginina, la $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{ss}}$ dependiente de NO estimada, se correlaciona con la fluorescencia en las líneas tumorales y los hepatocitos aislados ($r^2 = 0.8$, Fig. 31B). Es notable que dada una producción similar de H_2O_2 mitocondrial, la fluorescencia media de las líneas tumorales LM3, LMM3 y LP07 fue más alta que la de los hepatocitos proliferantes aislados de neonatos P2 (Fig. 31B; $p < 0.05$); este efecto de una fluorescencia tumoral media mayor que la de hepatocitos proliferantes, integra la baja producción de H_2O_2 y las limitadas actividades de catalasa y glutatión peroxidasa. (Tabla 2, *Ec.1*).

Tabla 2. Enzimas Antioxidantes ^a

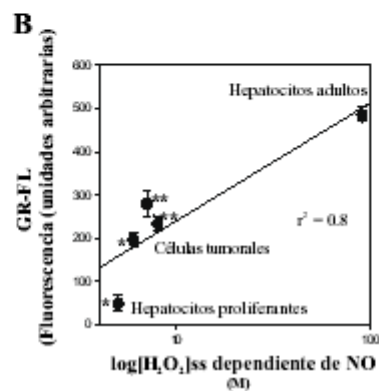
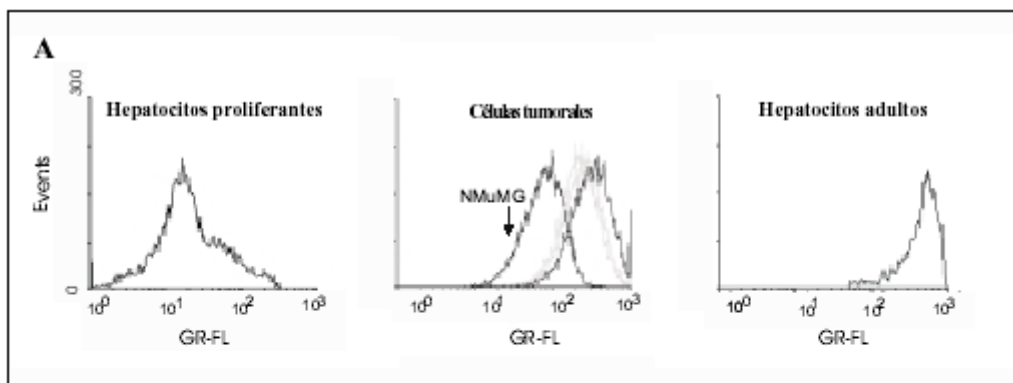
Para técnicas analíticas, ver materiales y métodos.

	Catalasa	Glutation peroxidasa	Mn-SOD
	<i>(μM)</i>		
<i>Tejidos adultos normales quiescentes</i>			
Hígado de rata	4.8 \pm 1.2	4.0 \pm 0.6	4.9 \pm 0.4
Hígado de ratón	7.6 \pm 1.8	4.3 \pm 0.7	4.9 \pm 0.6
Pulmón de ratón	-	-	4.9 \pm 0.8
<i>Hígado fetal de rata (E19)</i>	0.2 \pm 0.1 ^b	0.4 \pm 0.1 ^b	2.9 \pm 0.3 ^b
<i>Tumores</i>			
M3	0.3 \pm 0.02 ^b	0.6 \pm 0.1 ^b	1.7 \pm 0.3 ^b
MM3	0.5 \pm 0.1 ^b	1.9 \pm 0.2 ^b	2.3 \pm 0.5 ^b
P07	0.1 \pm 0.02 ^b	0.7 \pm 0.1 ^b	2.1 \pm 0.4 ^b

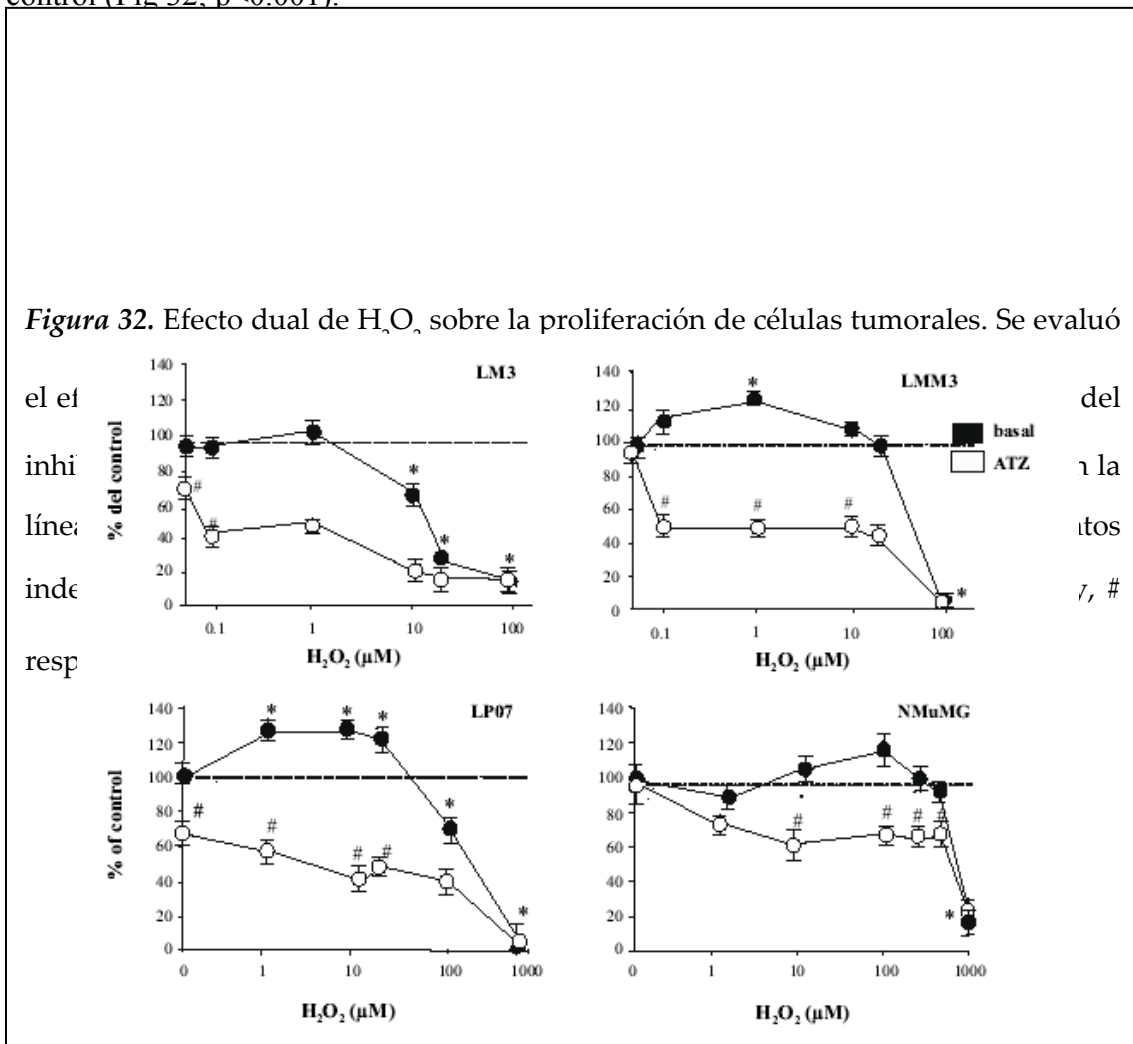
(a) Los datos representan la media \pm ES de 3-13 experimentos por duplicado.

(b) P<0.05 respecto a tejidos adultos.

Figura 31. Concentración espontánea de H_2O_2 en el estado estacionario de tejidos normales y tumorales. A) En el centro, fluorescencia de DCFH en las líneas tumorales murinas LM3 (gris claro), LMM3 (gris oscuro) y LP07 (negro), y en la línea inmortalizada de glándula mamaria murina NMuMG, en comparación con hepatocitos proliferantes aislados de ratas recién nacidas P2 (izq.) y hepatocitos



El H_2O_2 modula la proliferación de células tumorales. Para relacionar el estado redox con la progresión del ciclo celular, estudiamos el comportamiento de líneas celulares tumorales en respuesta a diferentes concentraciones de H_2O_2 . Como se muestra en la figura 32, las células tumorales mostraron una respuesta bifásica, caracterizada por un incremento en la proliferación a concentraciones bajas de H_2O_2 (0.1- 10 μM , promedio 1 $\mu M H_2O_2$) (5- 20%; $p < 0.05$) y una aguda inhibición de la proliferación a mayor concentración de H_2O_2 ; a 100- 200 $\mu M H_2O_2$, el ciclo celular se arresta completamente y/ o se activan mecanismos de muerte celular ($p < 0.05$). Las células normales NMuMG, con menor concentración de oxidantes intracelulares de acuerdo a la fluorescencia con DCFH, mostraron una fase de proliferación más duradera, tolerando mayores concentraciones de H_2O_2 , tan altas como 500 μM . De acuerdo a la Ec. 1, cuando las células se tratan con el inhibidor de la catalasa, ATZ, aumenta la concentración de H_2O_2 citosólico, y en consecuencia devienen muy sensibles al mismo, razón por la cual, exhiben un marcado decremento en la proliferación con respecto al control (Fig 32; $p < 0.001$).



Señalización celular en líneas tumorales e hígado proliferante. Estudiamos entonces la expresión de ciclina D1, una proteína involucrada en la proliferación celular, así como también la actividad de ERK1/ 2 y p38, las cuales participan en la proliferación, y en el arresto del ciclo celular y la apoptosis; y en la modulación de la ciclina D1. Ciclina D1 se encontró sobre- expresada en las líneas tumorales y también en el hígado fetal proliferante E19, mientras que se encontró poco expresada en el hígado quiescente de rata adulta (Fig. 33). En cambio, p38 presentó su máxima expresión en hígado de rata adulta y estaba particularmente activa en este tejido (Fig. 33). La ciclina D1 presentó una modulación dual ante el tratamiento con H₂O₂ en células tumorales; en LP07 y a baja concentración de H₂O₂ (1 μM), la expresión de ciclina D1 aumentó un 100%, mientras que a mayor concentración (50 μM) disminuyó hasta el

25%
obs
34).
H₂O
y d
p38

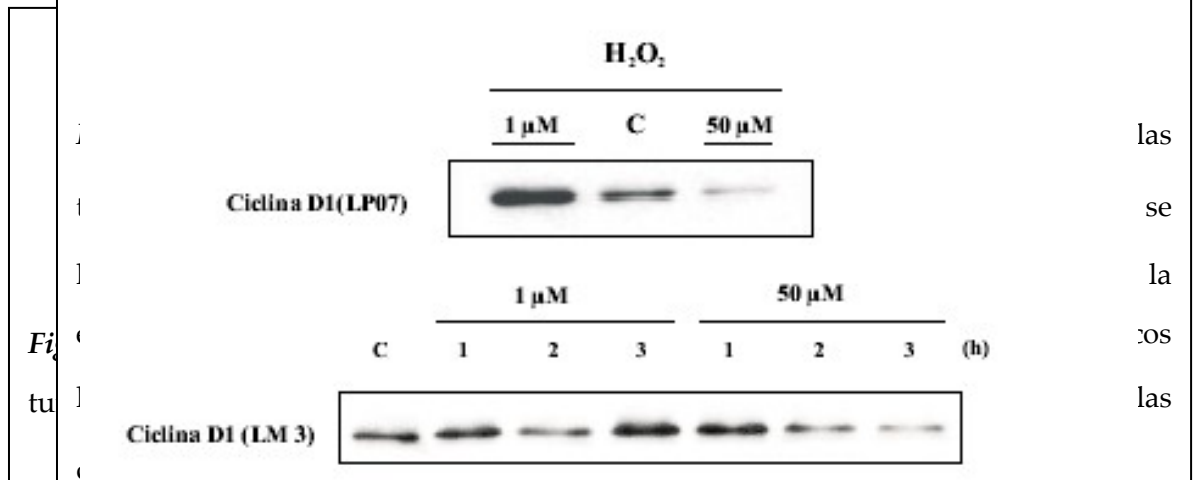
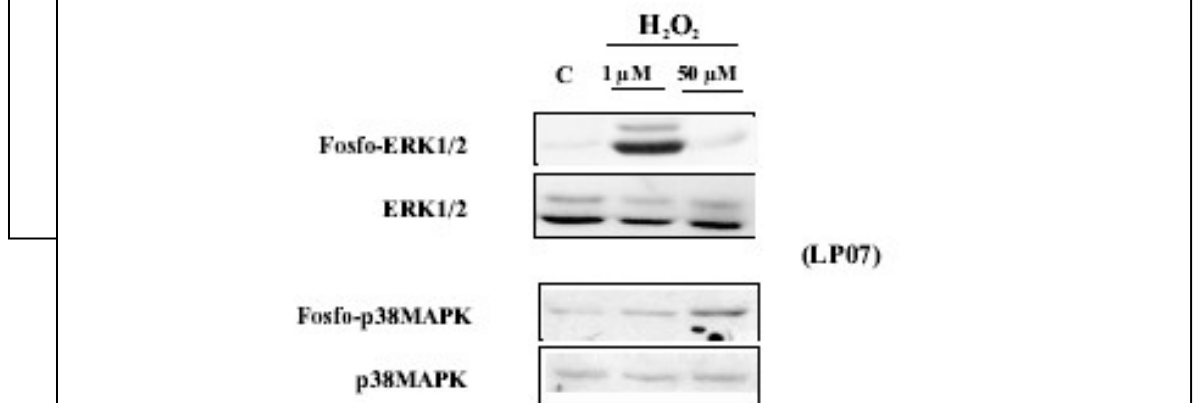


Fig. 33
tu

las
se
la
cos
las



- Los resultados de esta primera parte de la tesis fueron publicados en ***Cancer Research*, 63: 6370-77, 2003. Decreased mitochondrial nitric oxide synthase activity and hydrogen peroxide relate persistent tumoral proliferation to embryonic behaviour.** Soledad Galli, Mariana Inés Labato, Elisa Bal de Kier Joffé, María Cecilia Carreras y Juan José Poderoso.

- Con los resultados de esta primera etapa, la autora obtuvo el **Premio “Iniciación en la Investigación Científica” otorgado por la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA, año 2003.**

Segunda parte

EL peróxido de hidrógeno modula el tráfico de MAPKs y la progresión del ciclo celular en células tumorales

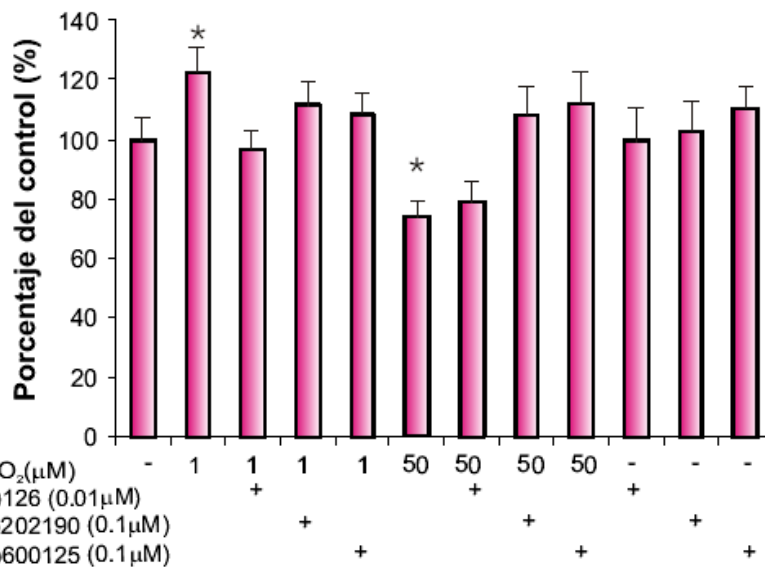
El H₂O₂ deriva en efectos opuestos sobre la progresión del ciclo celular y los caminos de señalización intracelular. El estado redox influye en la decisión del destino final de la célula en cuanto a proliferación, arresto del ciclo celular o apoptosis (ver introducción para mayor detalle). En la primera parte de los resultados, se mostró que concentraciones crecientes de H₂O₂, 1- 250 μM, hacían variar la tasa de proliferación en las células tumorales LP07, desde un fenotipo altamente proliferante a un fenotipo de arresto; y este efecto se veía exacerbado por el inhibidor de la catalasa (Galli *et al*, 2003). En esta segunda parte, se repitió el experimento en presencia de [³H]- timidina, y se observó que el tratamiento con 1 μM H₂O₂, ocasionaba más de un 20% de incremento en la proliferación, mientras que 50 μM H₂O₂ reducía la tasa proliferativa al 60% del control. Para determinar si estos efectos opuestos estaban mediados por MAPKs, se midió la incorporación de timidina tras preincubar las células con los inhibidores de las vías de kinasas apropiados: U0126 (ERK), SB202190 (p38) y SP600125 (JNK). U0126 inhibió el aumento en la proliferación, mientras que no se observó efecto con SB202190 o SP600125 al estimular con 1 μM H₂O₂. En cambio, SB202190 y SP600125 restauraron completamente el arresto ocasionado por 50 μM H₂O₂, y no se observó modificación con U0126 (Fig. 35A). Por lo tanto, dependiendo de la concentración de oxidantes, ERK, o p38 y JNK, gobiernan los diferentes destinos de las células tumorales.

La expresión de la ciclina D1 se asocia con el compromiso de la célula para entrar en fase S del ciclo celular (Pestell *et al*, 1999), lo cual culmina en la división de la célula. Al estudiar la ciclina D1, observamos que el patrón de expresión siguió los efectos vistos en el ensayo de proliferación. En este sentido, hubo un aumento de la cantidad de proteína tras estimular con 1 μM H₂O₂, que fue revertido con el inhibidor de la vía de ERK, U0126. Por el contrario, se observó disminución de la expresión de ciclina D1 con 50 μM H₂O₂, que fue revertido por los inhibidores de p38 y JNK (Fig. 35B).

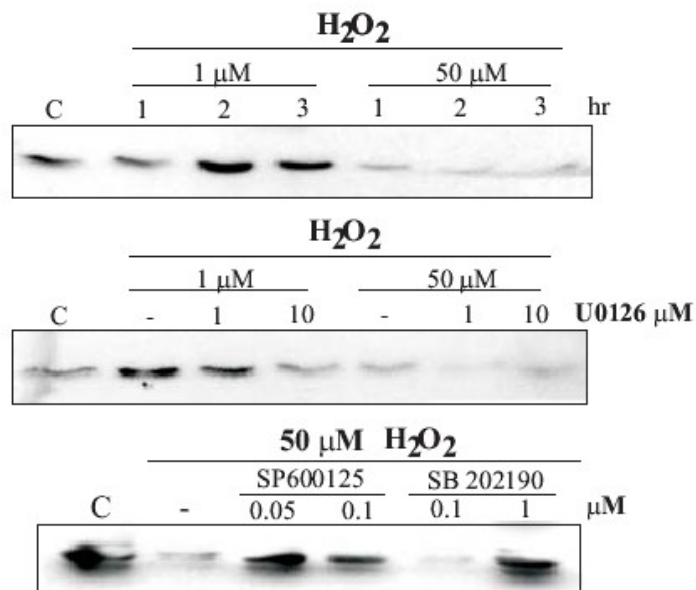
Figura 3.

A) Ensayo de estimulación con H₂O₂ se estimuló con H₂O₂ y se estimuló con H₂O₂ inhibido con U0126, Sb202190 y Sp600125. p < 0.05.

blot sobre inhibido

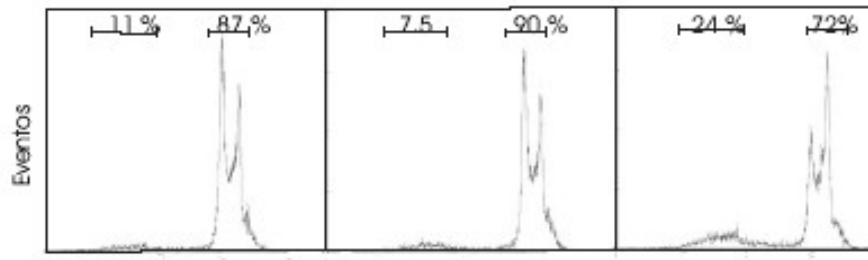
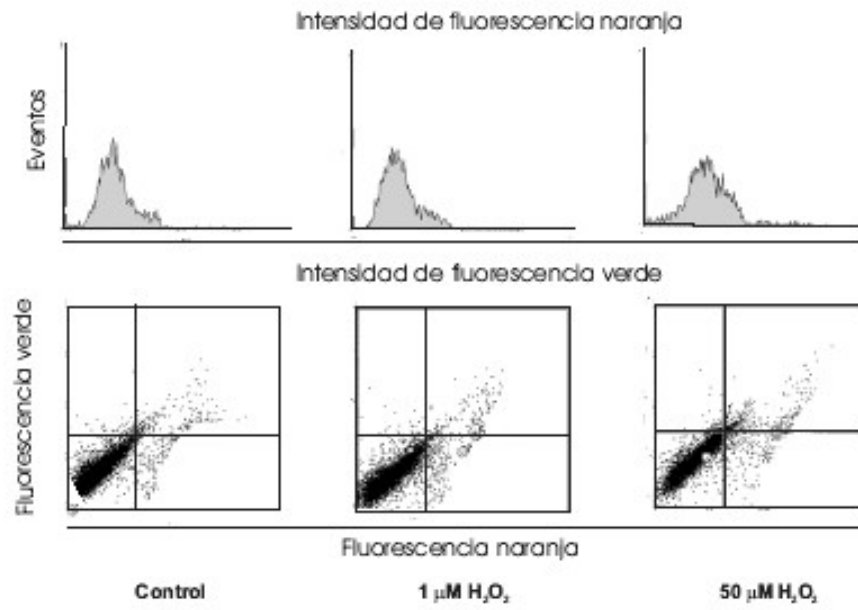


élulas LP07. Las células se estimuló con H₂O₂ y se estimuló con H₂O₂ inhibido con U0126, Sb202190 y Sp600125. * p < 0.05 por western blot sobre inhibido.



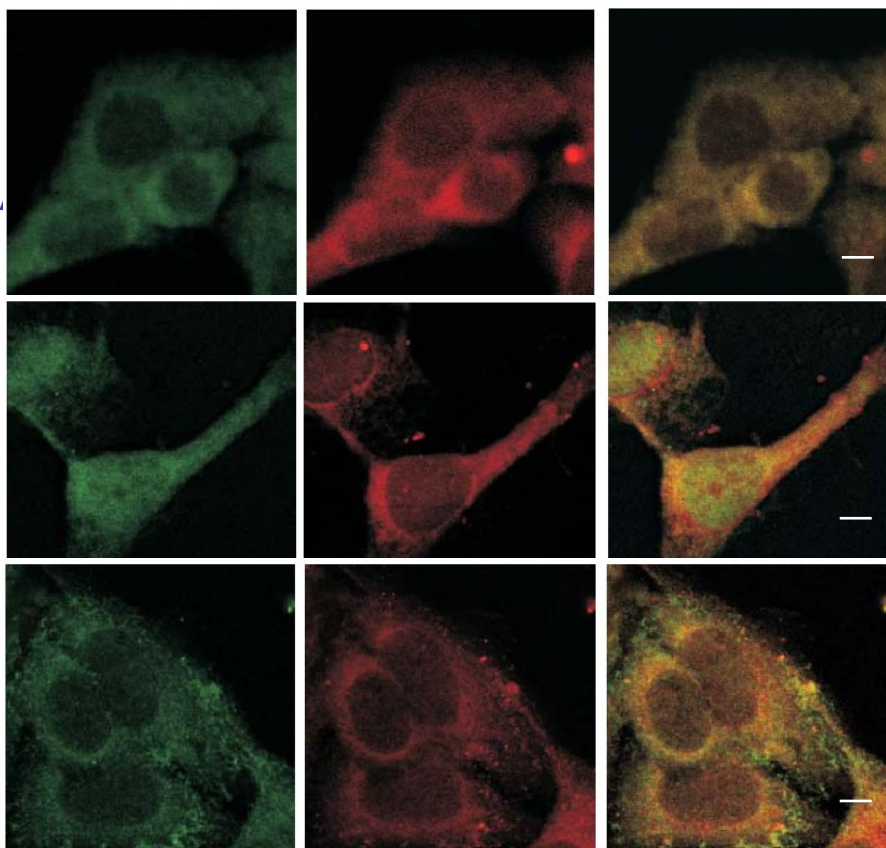
La disminución en la proliferación observada tras la estimulación con 50 μM H_2O_2 podría deberse a que ocasiona un arresto en el ciclo celular, o bien a que conduce las células a apoptosis. Para determinar cual era el proceso desencadenado por esta concentración de H_2O_2 , evaluamos por citometría de flujo y tinción con ioduro de propidio, los estadios del ciclo en el que se encontraban las células tras los tratamientos con H_2O_2 . En todos los casos se observaron los picos diploide y tetraploide, correspondientes a células vivas y en activa división. Con alta $[\text{H}_2\text{O}_2]$ no se observó un incremento significativo en el pico hipodiploide, característico de células apoptóticas (Fig. 36A). Asimismo, se evaluó la apoptosis temprana de las células LP07 tras ser estimuladas con H_2O_2 por citometría de flujo, usando Anexina V; este compuesto reconoce a la fosfatidil- serina, un antígeno que la célula expone en su membrana cuando está entrando en apoptosis. No se observó positivo para la tinción con Anexina V ni aún tras la estimulación con 50 μM H_2O_2 . (Fig 36B).

Figura 36. Determinación de arresto del ciclo celular y apoptosis. **A)** se evaluó la progresión del ciclo celular por tinción con ioduro de propidio (IP) y citometría de flujo. Los resultados se presentan como un histograma de frecuencias. Los dos picos principales que se observan son los picos diploide y tetraploide (de izq. a der.), correspondientes a células vivas y en activa división. Hacia la izquierda se encuentra el pico hipodiploide, correspondiente a las células apoptóticas, que presentan DNA fragmentado. **B)** Determinación de apoptosis por tinción conjunta con Anexina V y ioduro de propidio, y citometría de flujo. En el panel del superior se grafica un histograma de frecuencias para la fluorescencia verde correspondiente a la Anexina. En todos los casos el resultado es negativo ($< 10^1$, en la escala de intensidad de fluorescencia verde). En el panel inferior se grafica un dot plot para las dos intensidades de fluorescencia, correspondientes al IP (naranja) y a la anexina V (verde). En todos los casos se observa que las células son negativas para ambos fluoróforos.

A**B**

MAPK en la mitocondria. Luego se intentó establecer la participación de la mitocondria en la respuesta celular y en los caminos de señalización en las células tumorales LP07, tanto en condiciones de proliferación como de arresto. Previamente se ha reportado la presencia de ERK, p38 y JNK en la mitocondria (Alonso *et al*, 2004, Baines *et al*, 2002). Nuestro grupo encontró que ERK estaba presente en la mitocondria de cerebro de rata, y que su expresión estaba modulada durante el desarrollo (Alonso *et al*, 2004). Más aún, la activación del ERK mitocondrial era dependiente del estado

Figura 37. Co- localización de las MAPKs en mitocondrias de LP07. **A)** Microscopía confocal utilizando anticuerpos específicos anti MAPKs y un marcador específico de mitocondria, el MitoTracker Red 580. Panel superior: P- ERK; panel medio: P- JNK, panel inferior: P- p38. Barra: 10 μ m. **B)** serie de fotografías correspondientes a la inmuno- marcación específica para P- ERK1/2 seguido de microscopía electrónica de transmisión. Las flechas indican los puntos correspondientes a las bolitas de oro conjugadas al segundo anticuerpo.



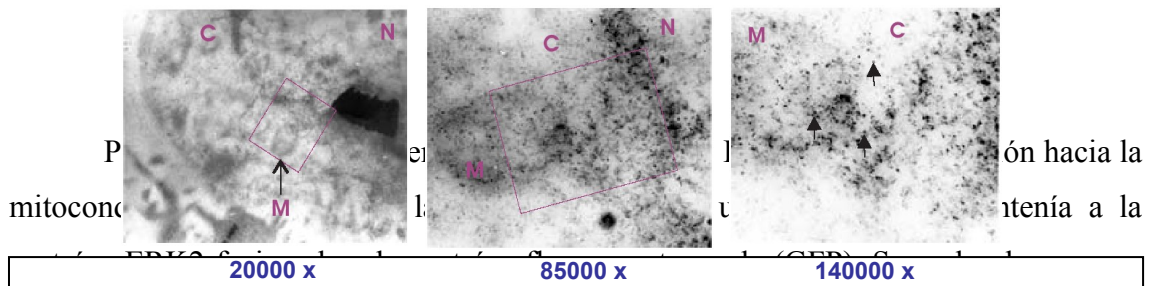
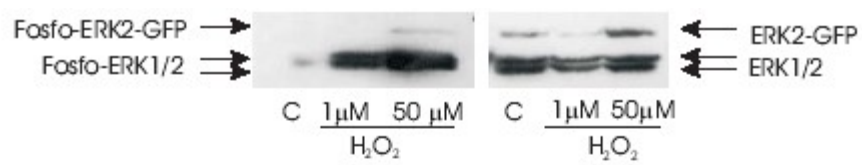
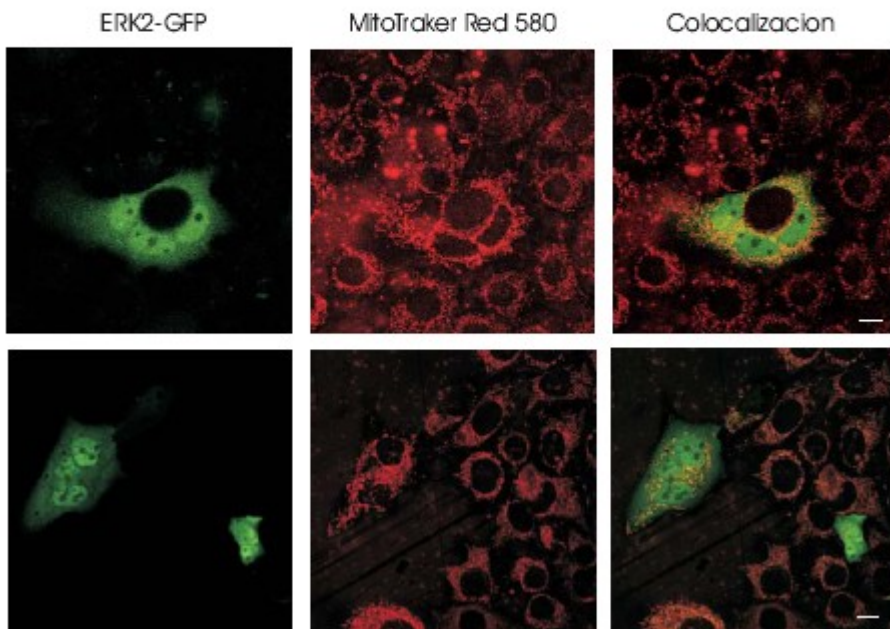


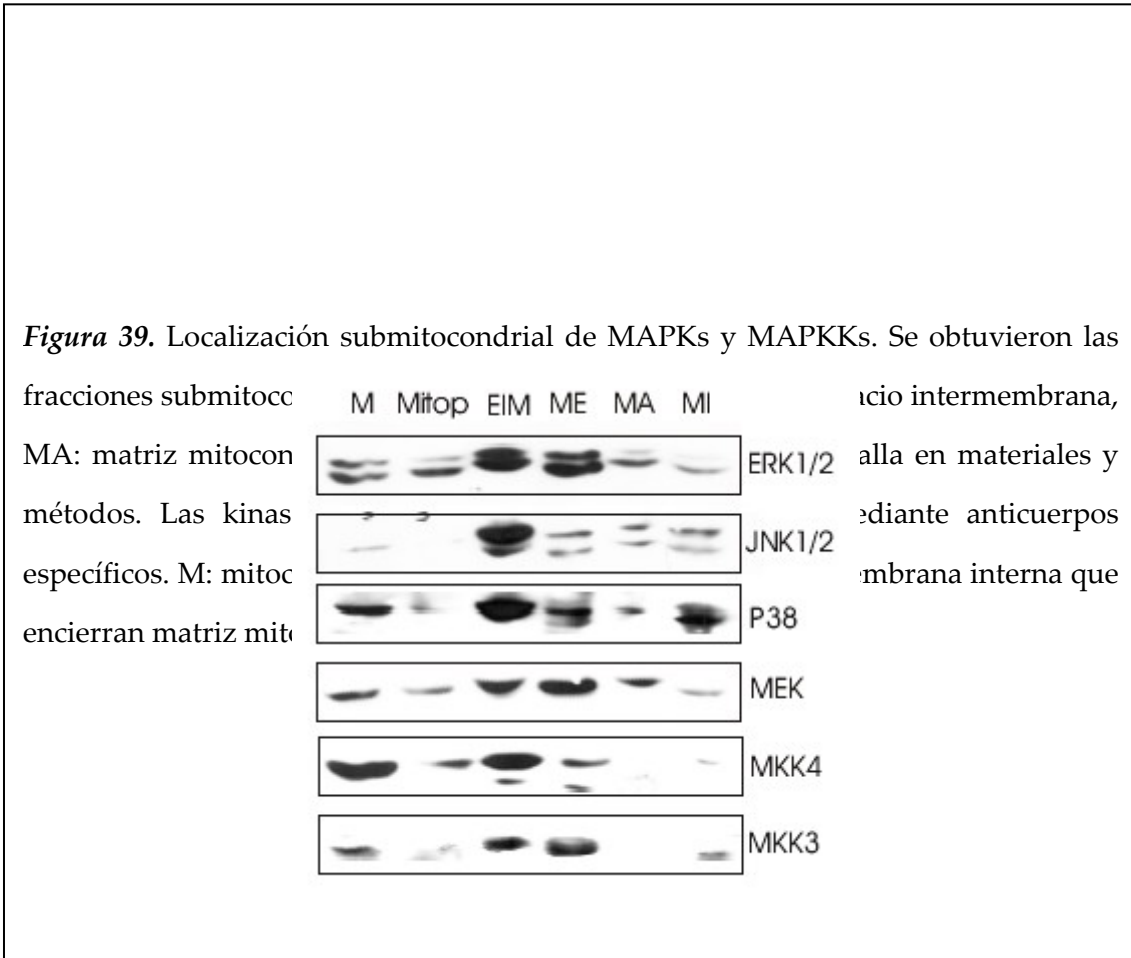
Figura 1
 LP07 c
B
 fluoresc
 H_2O_2 ; E
 fotos ol



élulas
 oteína
 as con
 n dos

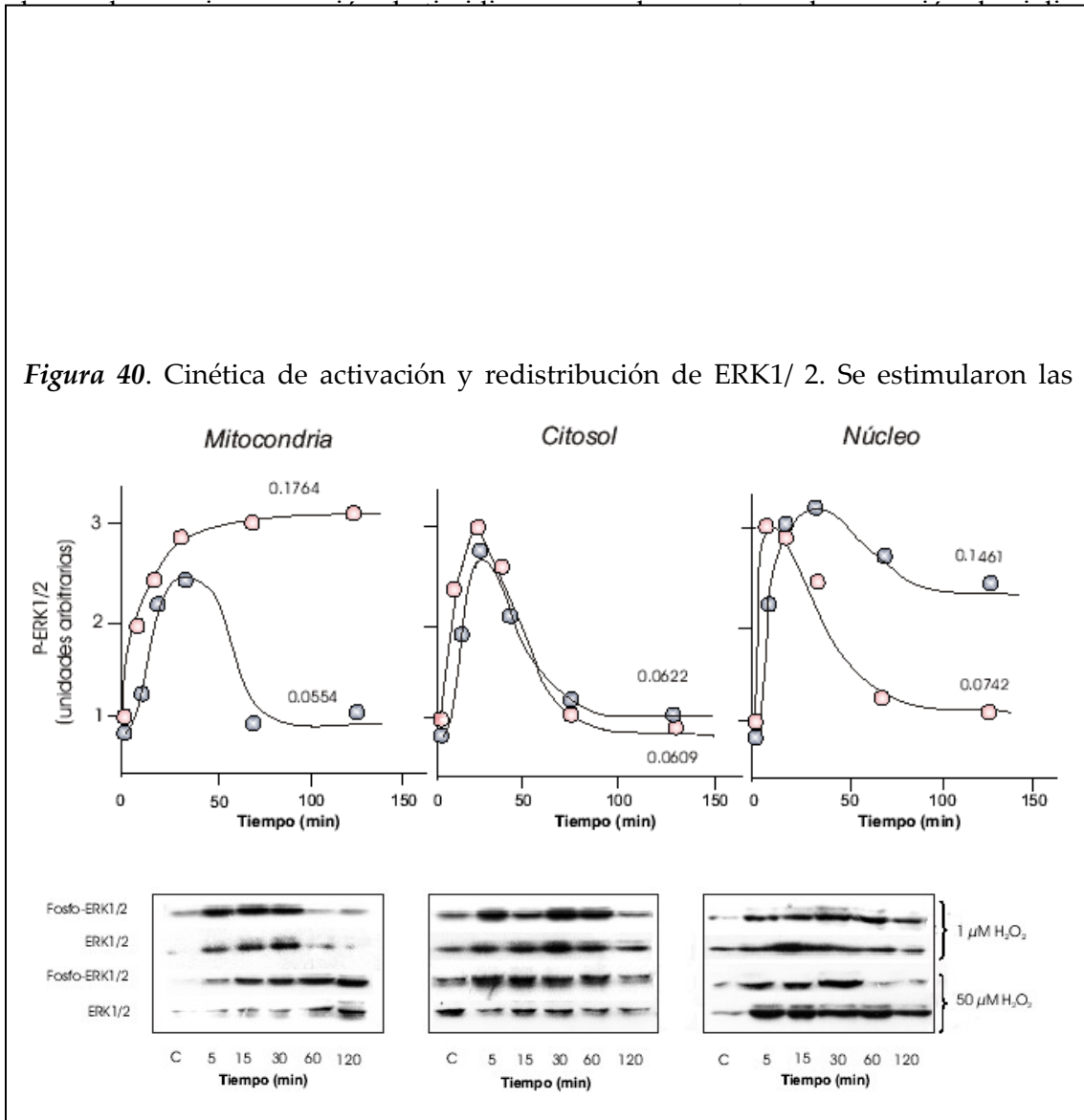


Una vez corroborada la presencia de MAPKs en las mitocondrias de LP07, intentamos determinar en que parte de la mitocondria se localizaban preferencialmente. Para esto, obtuvimos las fracciones submitocondriales (membrana externa, membrana interna, espacio intermembrana y matriz mitocondrial) y se buscó la presencia de las enzimas por western blot con anticuerpos específicos. Observamos en todos los casos que tanto las MAPKs como las MAPKKs se localizaban preferencialmente en la membrana externa y el espacio intermembrana (Fig. 39). Este resultado había sido previamente observado por nuestro grupo en mitocondrias de cerebro de rata (Alonso *et al*, 2004) para la kinasa ERK.

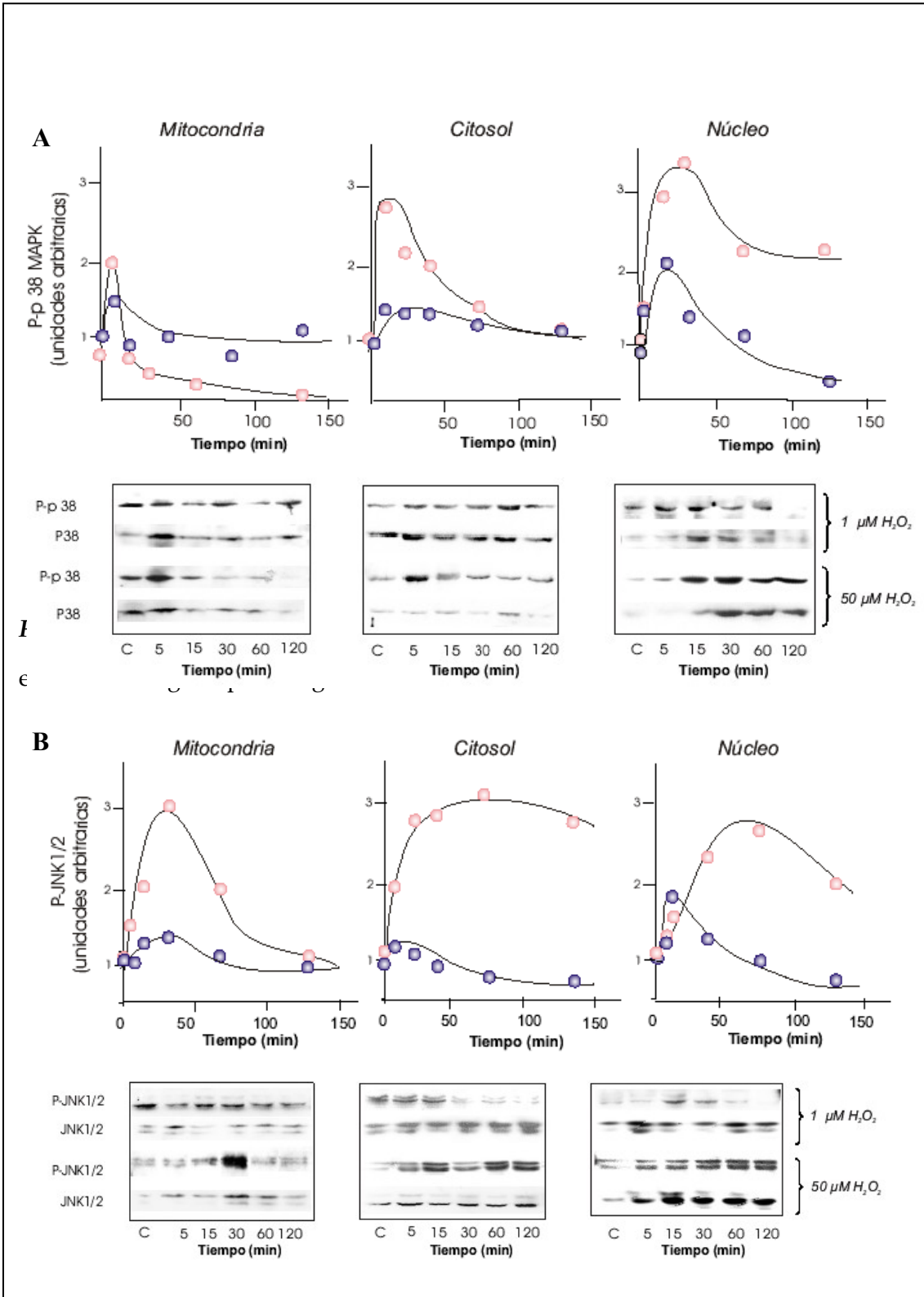


El tráfico de kinasas dependiente del estado redox, incluye el compartimiento mitocondrial. El propósito principal en esta parte del estudio era acertar el tráfico dinámico de MAPKs en respuesta al estímulo oxidativo, así como también explorar el rol de la mitocondria sobre el circuito intracelular de las kinasas y sus efectos finales. Para esto se obtuvieron las fracciones subcelulares -citocitol, mitocondrias y núcleos- de las células LP07, y se siguió el tráfico y la activación de ERK1/ 2, p38 y JNK1/ 2 por western blot, tras la estimulación con 1 y 50 μM H_2O_2 , durante un período prolongado de tiempo. Las fracciones obtenidas estaban libres de contaminantes unas de otras, según pudimos comprobar, y como se muestra y detalla en la parte de figuras adicionales (Fig. 49).

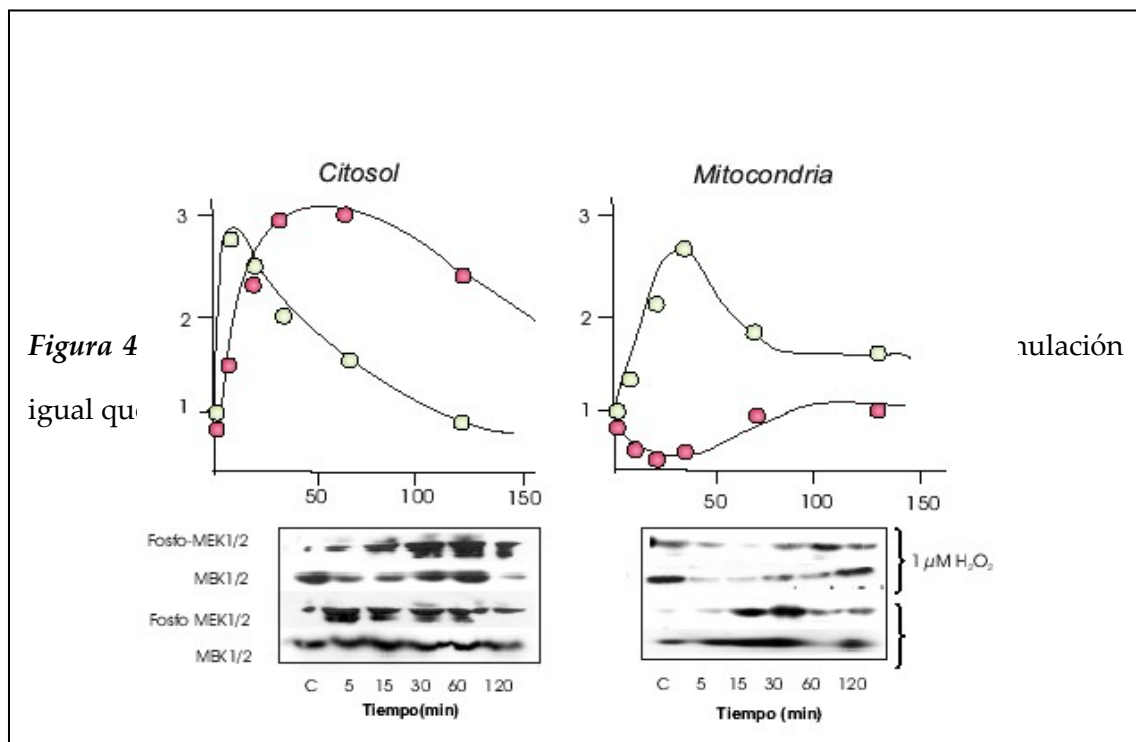
Los resultados de las cinéticas de activación muestran diferencias remarcables en cuanto a la respuesta de las MAPKs. Cuando las células fueron estimuladas con 1 μM H_2O_2 , se observó un rápido incremento de ERK1/ 2 fosforilado (P- ERK) paralelamente en mitocondria, citosol y núcleo; las variaciones de P- ERK1/ 2 se asociaron a cambios análogos de ERK total en mitocondria y núcleo. Luego de 30 min de incubación, P-ERK retornaba a su nivel basal en mitocondria y citosol, mientras que era retenido en la fracción nuclear. Tras estimulación con 50 μM H_2O_2 , la cinética observada en el compartimiento citosólico era prácticamente la misma, pero por el contrario, ERK era retenido en la mitocondria mientras decaía velozmente en el núcleo (Fig. 40). La suma de las áreas bajo las curvas fue constante, lo que sugiere que las retenciones opuestas en uno u otro compartimiento son dependientes. Es sabido que la permanencia de ERK en el núcleo es necesaria para que ocurran los efectos últimos desencadenados por estas moléculas (Pouysségur *et al*, 2002; Brunet *et al*, 1999), no siendo suficiente la entrada transitoria de las mismas. En este sentido, la retención ocasionada con el estímulo 1 μM H_2O_2 se condice con los efectos proliferativos



En contraste con la cinética de ERK, JNK1/ 2 y p38 se vieron poco influenciados por la estimulación con baja concentración de H₂O₂ (1 μM). Sin embargo, con 50 μM de estímulo, las formas fosforiladas tanto de JNK como p38 (P- JNK y P- p38), aumentaron en citosol y mitocondria, y translocaron al núcleo, donde permanecieron por un periodo prolongado de tiempo. P- p38 mostró una salida de la mitocondria a los pocos minutos post- estimulación, que correlaciona con su entrada al núcleo. P- JNK si bien no mostró una salida neta de la mitocondria, si volvió a su estado basal, a medida que se observaba aumento de la kinasa en el núcleo. Es decir, que en ambos casos no se observó la retención mitocondrial observada para ERK, con 50 μM H₂O₂. Por lo tanto, una vez más, la mitocondria estaría actuando como modulador de la entrada de las MAPKs al núcleo. Destacamos que la retención nuclear observada para estas kinasas al ser estimuladas las células con alta [H₂O₂], se relaciona con los efectos redox sobre la progresión del ciclo celular. Las cinéticas de P- JNK1/ 2 y P- p38 también se vieron asociadas a cambios semejantes en la proteína total (Fig. 41).



MAPKs kinasas en mitocondria. ERK1/ 2, p38 y JNK1/ 2 son fosforilados en residuos tirosina o treonina por sus kinasas upstream MEK1/ 2, MKK3 y MKK4, respectivamente. Considerando que el paso por la mitocondria involucra un nuevo punto de vista en cuando a señalización celular, es importante determinar la presencia del las MAPKKs en la organela, y su respuesta a la estimulación con oxidantes, así como también el tráfico a través de los compartimientos subcelulares. Como se observa en la figura 42, a 1 μM H_2O_2 , P- MEK1/2 y MEK total disminuyen marcadamente en la mitocondria y aumentan en el citosol, lo que sugiere que la liberación de MEK de la mitocondria, contribuye al pool citosólico. A 50 μM H_2O_2 , P- MEK aumenta en mitocondria y citosol. MKK3 y MKK4 no presentaron cambios significativos con baja concentración de H_2O_2 . Sin embargo, tras la estimulación con 50 μM H_2O_2 , estas MAPKKs manifestaron una salida de la mitocondria, en paralelo con un aumento del pool citosólico y nuclear (Fig. 43) (cabe destacar que estas dos MAPKKs son capaces de translocar al núcleo, y no así MEK que presenta una secuencia de exclusión nuclear (ver introducción para mayor detalle y Torii *et al*, 2004). Estos resultados sugieren que las MAPKKs se mueven fuera de la mitocondria y hacia el citosol, y núcleo en el caso de MKK3 y MKK4, lo cual favorecería la interacción con sus proteínas blanco. La activación diferencial a 1 y 50 μM H_2O_2 de MAPKKs contribuiría a la regulación del tráfico de MAPKs, y una vez más, la mitocondria actuaría como regulador de la disponibilidad de kinasas en los compartimientos citosólico y nuclear.



A

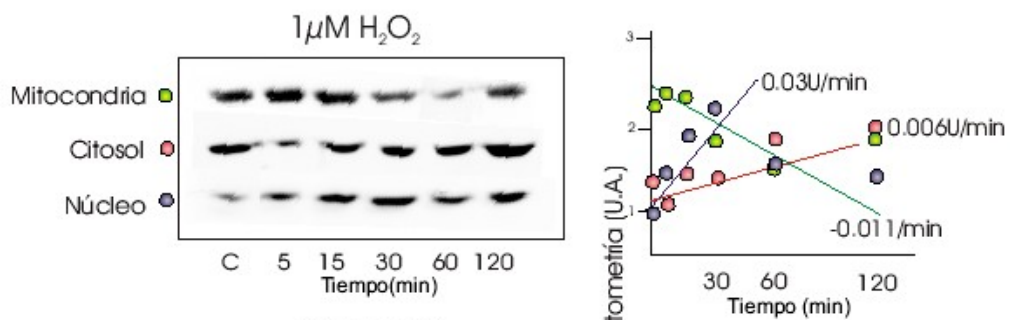
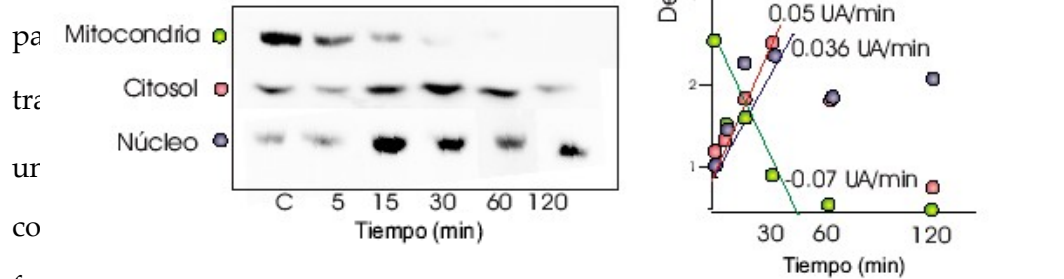
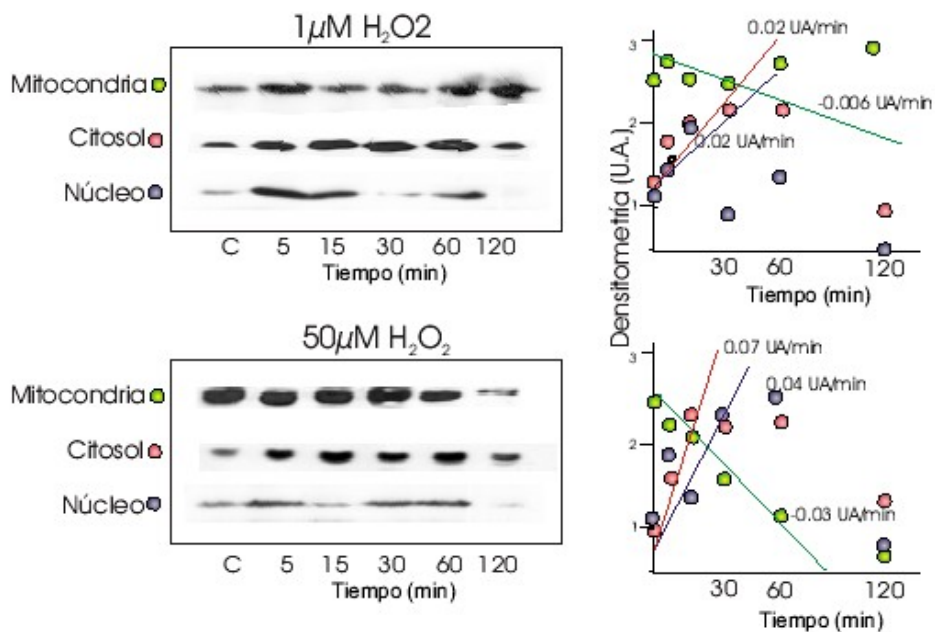


Figura 1



fracción, se indica la pendiente de las mismas.

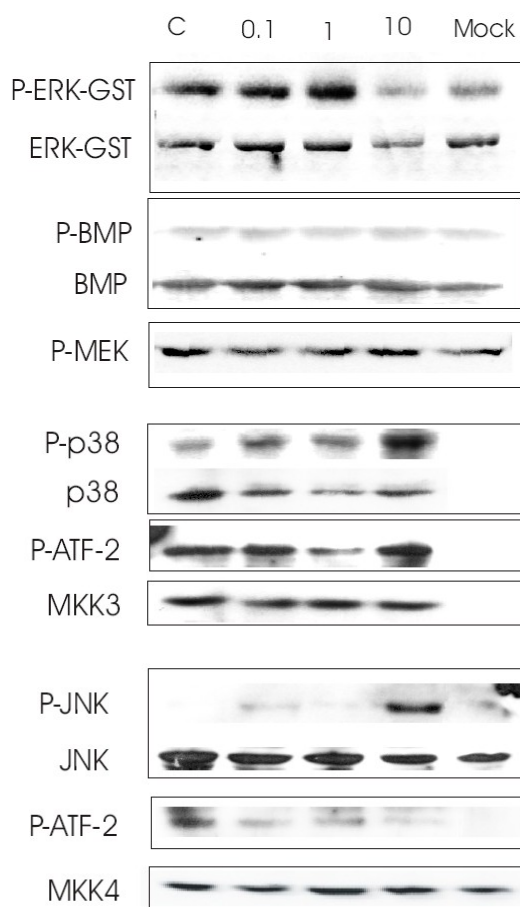
B



La oxidación favorece diferencialmente la fosforilación de MAPKs, pero no su actividad catalítica intrínseca. Hasta aquí se describieron los efectos diferenciales del H₂O₂ sobre el tráfico de MAPKs y la progresión del ciclo celular, así como la presencia de las kinasas en la mitocondria. La pregunta pendiente es, cuál es el mecanismo por el cual el H₂O₂ es capaz de lograr la activación de MAPK de manera específica y diferencial. Para responder esta pregunta, primero determinamos los efectos del H₂O₂ sobre la fosforilación de MAPKs, y sobre su actividad catalítica intrínseca, a través de ensayos de fosforilación *in vitro*. Para esto utilizamos la proteína recombinante ERK1 fusionada a GST y agarosa (como sustrato de MEK), o bien se inmuno-precipitaron ERK, p38 y JNK a partir de extractos celulares en condiciones normales de cultivo, las cuales luego fueron oxidadas con 0.1- 10 μM H₂O₂ y subsecuentemente enfrentadas con sus MAPKKs o sus sustratos respectivos, en presencia de ³²P- γATP. Es de destacar, que para estos ensayos *in vitro* se utilizó sustancialmente menos H₂O₂ para evitar la desnaturalización de las proteínas. Las MAPKs cambiaron significativamente su nivel de fosforilación tras la oxidación al ser incubadas con las kinasas upstream; ERK se vio preferencialmente fosforilado cuando se oxidó con baja concentración de H₂O₂ (0.1- 1 μM), y la eficiencia de fosforilación disminuyó con alta concentración de H₂O₂. Por el contrario, p38 y JNK incrementaron su nivel de fosforilación tras la oxidación con alta concentración de H₂O₂ (Fig. 44). Estos resultados sugieren que la oxidación de las MAPKs favorece que sean fosforiladas por sus respectivas MAPKKs, y esto lleva a un incremento del efecto final específico de la MAPK, dado que su actividad catalítica intrínseca depende de su estado de fosforilación. Por su parte, la oxidación de MAPKs no afectó la fosforilación resultante sobre la proteína de mielina básica (MBP) o ATF- 2, sustratos respectivos de ERK o, p38 y JNK. Esto indica, que la actividad catalítica intrínseca de la kinasa no se ve afectada por la oxidación de la molécula.

Figura 44. Ensayos de fosforilación *in vitro*. Se utilizó la proteína recombinante ERK1 fusionada a GST agarosa (como sustrato de MEK), o bien se inmunoprecipitaron ERK, p38 y JNK de extractos citosólicos en condiciones basales de cultivo. Se inmunoprecipitaron asimismo MAPKKs de los mismos extractos, y se realizaron dos ensayos en paralelo: en el primer caso, se co-incubaron las MAPKs, previa oxidación, con sus correspondientes MAPKKs en presencia de ^{32}P - γATP y se evaluó la fos

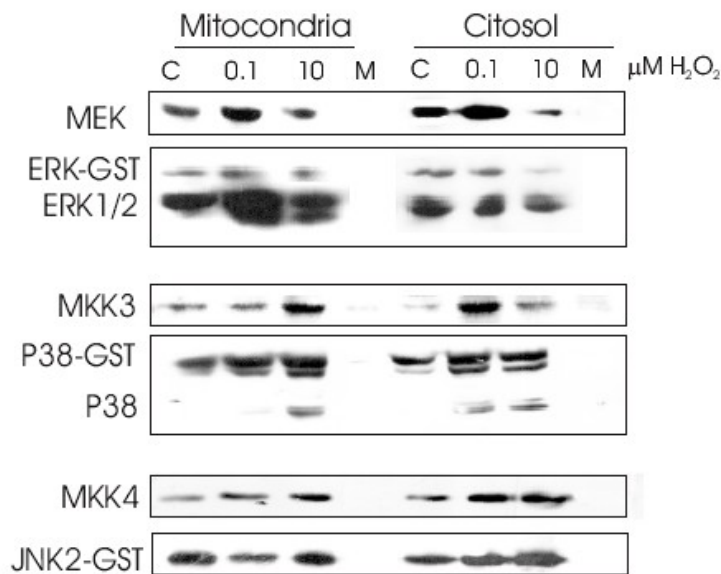
MAPK, tras la
 mismo por aut
 carga de todas
 revelados con a
 control incubar
 proteína básica
 activadora (MA



caso, se enfrentó a la
 ó la fosforilación del
 nuestra el control de
 s por western blot y
 os casos se realizó un
 piamente dicha o la
 sencia de la proteína

Eficiencia de interacción MAPK- MAPKK estimulada por H₂O₂ en citosol y mitocondria. Los efectos diferentes del H₂O₂ sobre las kinasas, recaen probablemente sobre cambios conformacionales específicos que favorecen estéricamente la interacción entre las MAPKs y sus respectivas MAPKs. Para investigar esta hipótesis, se desarrollaron ensayos de interacción proteína- proteína. Esencialmente, la proteína recombinante ERK1- GST unida covalentemente a bolitas de agarosa, o las proteínas recombinantes p38 y JNK2 inmovilizadas mediante anticuerpos específicos a pelotas de agarosa, se oxidaron con concentraciones crecientes de H₂O₂ como se describió anteriormente, y se incubaron posteriormente con las fracciones citosólica o mitocondrial de células LP07 en condiciones normales de cultivo. Se buscó luego la formación de complejos MEK- ERK, MKK3- p38 y MKK4- JNK por western blot. Los resultados mostraron que la oxidación de ERK1- GST con baja concentración de H₂O₂, resultó en una marcada asociación de MEK a ERK, así como en una marcada fosforilación de ERK, tanto en mitocondria como en citosol (Fig. 45). Asimismo, es notable que se ve favorecida la formación del dímero ERK1- GST- ERK endógeno tras la oxidación suave de la kinasa. Esta interacción se mostró desestabilizada con mayor nivel de oxidación de la molécula. Del mismo modo, los ensayos de unión con p38 y JNK mostraron que la interacción con sus respectivas MAPKKs se veía favorecida tras la incubación con alta concentración de H₂O₂, en mitocondria, y en el caso de p38 también se vio favorecida la formación del dímero entre la proteína recombinante y la endógena con 10 μM H₂O₂. Estos resultados sugieren que la oxidación de las MAPKs le confiere un cambio conformacional a la molécula que determina una mejor interacción con sus proteínas activadoras, siendo esto al menos en parte, la causa de la adquisición de los mayores niveles de fosforilación tras la oxidación. Asimismo, cabe destacar la diferente sensibilidad de las MAPKs, a la oxidación, que posiblemente determinaría la activación diferencial de uno u otro camino de señalización dependiendo del estado redox de la célula.

Figura 45. Ensayos de interacción MAPK- MAPKK. Se utilizó la proteína recombinante humana ERK1 unida covalentemente a agarosa, o las proteínas recombinante anticuerpo p. Estos complejos en células LP07 por western blot

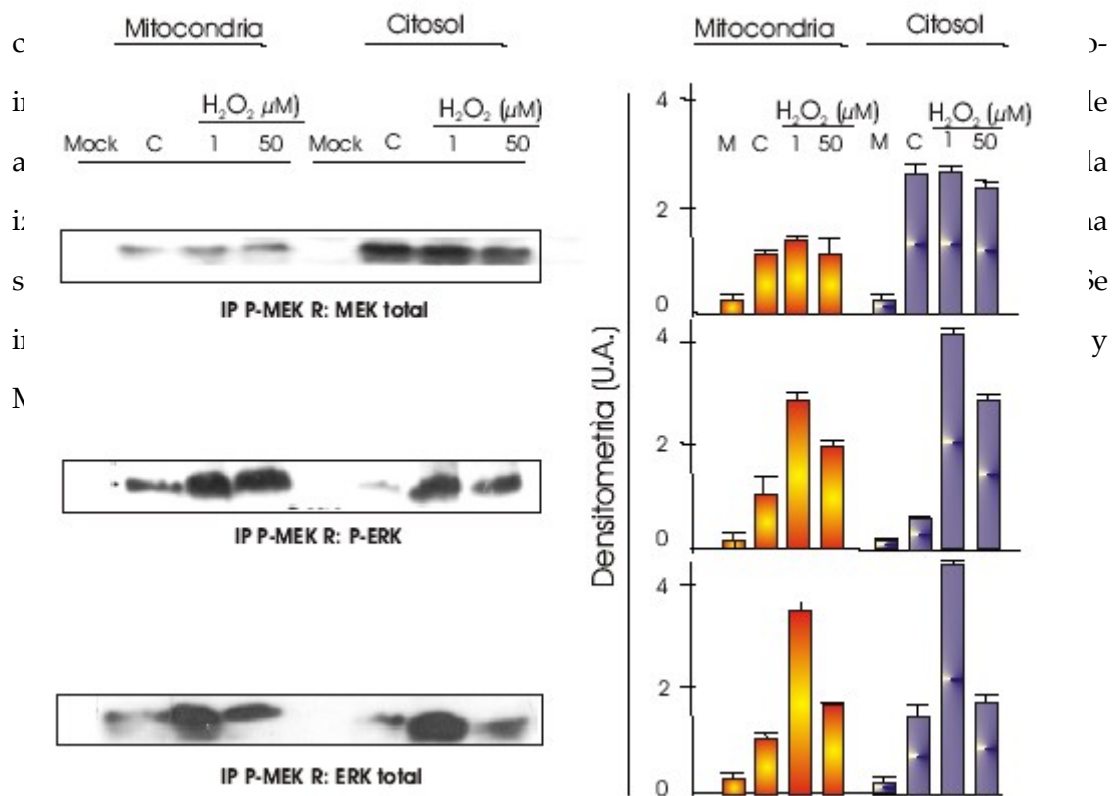


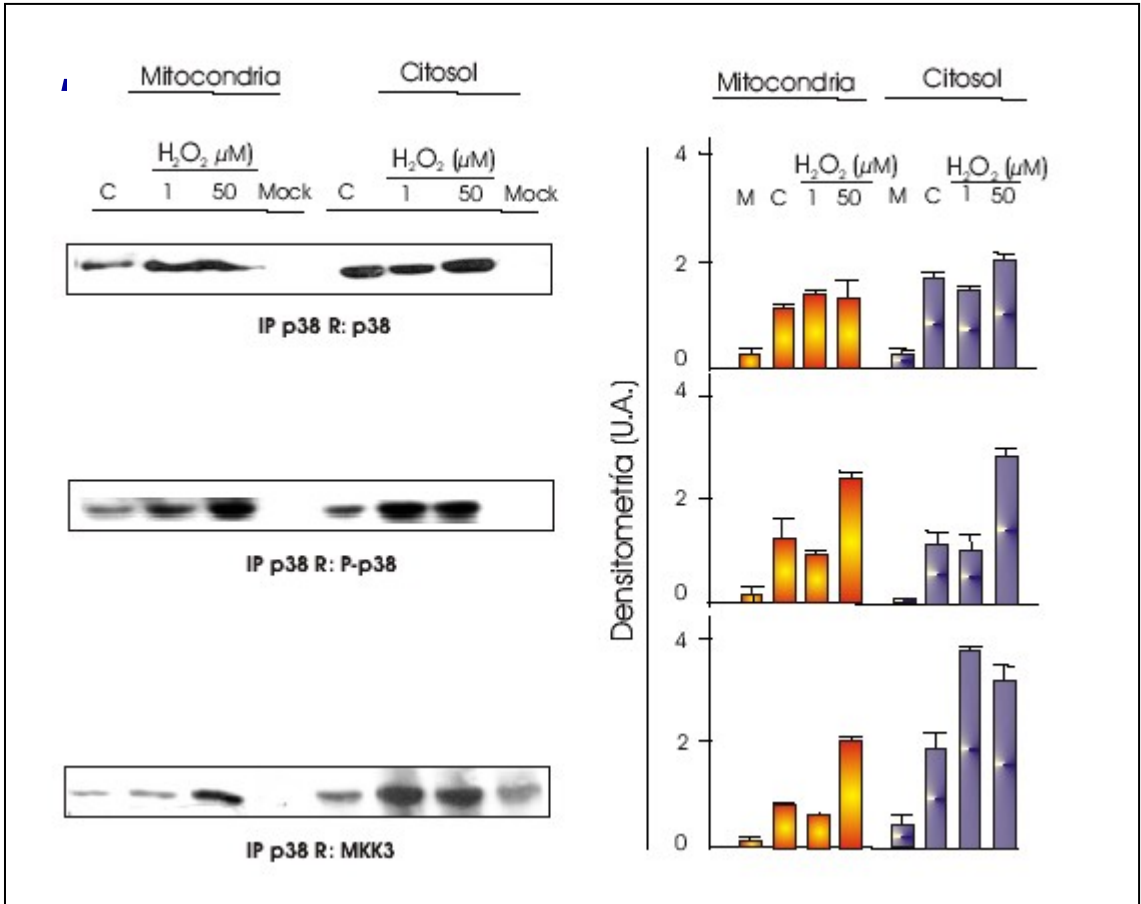
medio de un con agarosa. citosólicos de detectaron por inante.

El H₂O₂ modifica diferencialmente la unión de las MAPKs a sus MAPKKs in vivo. En un paso posterior se intentó estudiar si las interacciones MAPKs- MAPKKs vistas *in vitro* eran representativas del comportamiento fisiológico. Para eso, se inmunoprecipitaron P- MEK y p38 en mitocondria y citosol de LP07, luego de haber sido estimuladas con H₂O₂ 1 y 50 μM , y se buscó la formación de complejos por western blot. La co- inmunoprecipitación de P- MEK con P- ERK incrementó marcadamente con baja concentración de H₂O₂, pero se vio disminuida con concentración más alta. De acuerdo con esto, se vio asimismo que la proporción de ERK total unida a MEK era menor con 50 μM H₂O₂, pero cuando éste estaba unido, era fosforilado por MEK. En

cuanto a p38, se observó que la formación del complejo p38- MKK3 se veía incrementada tras la estimulación con alta concentración de H₂O₂ (Fig. 46).

Figura 46. Ensayos de interacción MAPK- MAPKK *in vivo*. Células LP07 se estimularon con 1 y 50 μM H₂O₂. Luego se obtuvieron las fracciones mitocondrial y





Discusión

Primera parte

Estudios recientes proponen un mecanismo molecular común así como un comportamiento biológico similar entre tejidos tumorales y embrionarios (Chodosh, 2002; Tsai y McKay, 2002). Los resultados aquí expuestos sugieren que se requiere un aumento en los niveles de NO y H₂O₂ mitocondrial para la transición en el desarrollo de proliferación a quiescencia, y que limitaciones críticas a esta secuencia podrían contribuir a una proliferación tumoral des- regulada y persistente. Asimismo, en este estudio se analizó por primera vez el rol de la óxido nítrico mitocondrial en el cáncer. La promoción de la proliferación requiere una inhibición controlada de la respiración mitocondrial (Simonnet *et al*, 2002). De acuerdo con esto, la actividad mitocondrial en organelas tumorales y en tejidos proliferantes se mantuvo entre el 20- 30% respecto de las organelas de tejidos quiescentes (Tabla 1). De este modo, una baja síntesis de ATP acoplada al transporte de electrones, un bajo contenido de complejos mitocondriales y la eliminación del DNA mitocondrial correlacionan con un crecimiento tumoral más rápido y agresivo (Simonnet *et al*, 2002), y con alto comportamiento invasivo (Amuthan *et al*, 2002). En cambio, la completa despolarización del potencial de membrana mitocondrial dependiente de la respiración (Holmuamedov *et al*, 2002) o, la inhibición crítica del complejo I (Armstrong *et al*, 2001) (que también resulta en un aumento de NO en la matriz, Riobó *et al*, 2001), pueden inducir un arresto del ciclo celular y apoptosis. En conexión con la disminución en la transferencia de electrones, las mitocondrias de tejidos proliferantes y tumorales solo retienen entre el 20- 50% de la máxima producción de H₂O₂ con respecto a las organelas provenientes de tejidos adultos, cuando se tratan con antimicina (Fig. 29). De acuerdo con los datos de la tabla 1 y con Simonnet y col. (2002), se supone que las diferencias surgen de las concentraciones relativas de los componentes de la cadena respiratoria, que contribuyen a la formación de O₂⁻/ H₂O₂ así como también a la succinato deshidrogenasa (complejo II) o al ubiquinol (complejo III). Es interesante que la eliminación de enzimas y/ o la mutación específica en genes del complejo II lleva al desarrollo de tumores como el paraganglioma (Ackrell, 2002).

Nuestro grupo reportó que la mtNOS está sujeta a modulación durante el desarrollo (Riobo *et al*, 2002). Aquí demostramos que los tejidos proliferantes presentan baja actividad mtNOS mientras que los tejidos estables presentan alta actividad de mtNOS. La actividad específica parece preservarse durante el desarrollo. Sin embargo, se necesita de más información para determinar la causa de la baja actividad mtNOS en los tumores. La reducida actividad de esta enzima con respecto a su expresión y su pobre respuesta al calcio en los diferentes compartimentos celulares, es coherente con la existencia de una mtNOS no funcional.

De acuerdo con los mecanismos de utilización de NO en la mitocondria (Poderoso *et al*, 1999), la modulación de la mtNOS influye en el estado redox de la célula y en los caminos de señalización intracelular (Riobo *et al*, 2002; Giulivi, 1998). Un marcado aumento del contenido y actividad de la mtNOS durante la transición de tejido en proliferación a tejido quiescente lleva a una mayor concentración de H₂O₂ en el estado estacionario, y viceversa. De la misma manera, el desarrollo del neuroblasto a neurona madura se asocia con un aumento de la mtNOS y el H₂O₂ en cerebro y cerebelo de rata (Riobo *et al*, 2002). Sobre estas bases, una muy baja actividad de mtNOS y una respuesta limitada al NO, hace que la [H₂O₂]_{ss} tumoral se aproxime a aquella desarrollada por los tejidos fetales. Por lo tanto la actividad de mtNOS, la producción mitocondrial de H₂O₂ y la [H₂O₂]_{ss} dependiente de NO van de la mano con la concentración total de oxidantes en la célula y varía enormemente entre la quiescencia y la proliferación normal o de células tumorales (Fig. 31). En hepatocitos adultos, la [H₂O₂]_{ss} dependiente de NO se mostró coherente con la fluorescencia intracelular obtenida en hepatocitos aislados por perfusión de hígado de rata. (Boveris y Cadenas, 1997) (Figs. 31). Por lo tanto, a pesar que los peroxisomas también contribuyen a la [H₂O₂]_{ss}, la contribución de la mitocondria para determinar el estado redox celular a lo largo de los procesos vitales de la célula, es sumamente importante. Por ejemplo, los efectos de la cascada de TNF sobre el balance entre la supervivencia y la apoptosis son regulados mediante la modulación del transporte de electrones y la producción de especies reactivas del O₂ en la mitocondria; estos efectos no se manifiestan en presencia de inhibidores mitocondriales o en células sin mtDNA o sin mitocondrias (Navdeep *et al*, 2001). Asimismo, el H₂O₂ ha sido alternativamente considerado como un agente proliferante o como un promotor del arresto del ciclo celular y de la apoptosis. Como

demonstraron Davies (1999) y Antunes y Cadenas (2001), concentraciones crecientes de H_2O_2 promueven señales opuestas. En este trabajo, la proliferación celular tumoral depende de la concentración del H_2O_2 (Fig. 32), lo que sugiere que las células cancerosas responden a este estímulo del mismo modo que lo hacen las células normales; se deduce entonces que, *in vivo* y a baja mtNOS y $[H_2O_2]_{ss}$, se favorece la proliferación celular, mientras que el arresto del ciclo y la apoptosis ocurrirían a concentraciones mayores de mtNOS y H_2O_2 . De acuerdo con esto, un aumento en la expresión y actividad de mtNOS en mitocondrias de hígado y cerebro han sido relacionados a la liberación de citocromo *c* y apoptosis (Denis y Bennet, 2003; Ghauforifar *et al*, 1999). Se sugiere por lo tanto que, a) las células tumorales no son capaces de incrementar la actividad de la mtNOS en el ciclo celular como lo hacen las células normales; b) la falta de la contribución mitocondrial resulta en una $[H_2O_2]_{ss}$ fija y no modulable que puede ser una plataforma general para sostener la proliferación tumoral e impedir la progresión del ciclo hacia el arresto y la apoptosis.

El “baile recíproco entre el cáncer y el desarrollo” (Chodosh, 2002) queda representado aquí por una actividad similar de ciclina D1 y MAPKs en tumores y en tejidos proliferantes y/ o en desarrollo; de acuerdo con esto, ratones transgénicos diseñados para sobre- expresar la ciclina D1 en la glándula mamaria, exhiben un desarrollo precoz de la mama, similar al observado durante el embarazo. Asimismo, nuestros resultados muestran que la expresión en tumores de ciclina D1 y la activación de cascadas proliferativas (ERK1/ 2) o pro- apoptóticas (p38) están sujetas a efectos duales del H_2O_2 (Fig. 33 y 34); en estas condiciones el tiempo de exposición al H_2O_2 es compatible con una activación a largo plazo de MAPKs y con un efecto importante en la expresión de la ciclina D1 y en la progresión del ciclo celular (Meloche *et al*, 1992). Estos resultados sugieren de manera contundente que tanto en tejidos normales como tumorales, la actividad mitocondrial y la concentración de H_2O_2 en el estado estacionario dependiente de mtNOS, participan en el balance entre las cascadas de señalización que contribuyen a mantener las condiciones para el crecimiento tumoral descontrolado. El NO y el H_2O_2 derivado pueden contribuir a la actividad de otras proteínas mitocondriales pro- apoptóticas; de acuerdo con esto, el antioxidante N-acetil- L- cisteína suprime la apoptosis dependiente de NO en células tumorales al prevenir el incremento en los niveles de la proteína Bax (Ho *et al*, 1997). En el contexto

analizado, los efectos del NO mitocondrial podrían terminar con la expresión de isoformas mutadas de las NOS, que se asociarían a diferentes efectos sobre la señalización en tumores. Por ejemplo, la disrupción del gen de la iNOS clásica o la inhibición de la NOS pueden respectivamente promover o evitar la tumorigénesis en ratones *apc* (-/-) (Scott *et al*, 2001; Ahn y Ohshima, 2001). Los efectos de la iNOS clásica sobre la invasión tumoral pueden depender en una compleja relación entre el tumor y el hospedador. Sin embargo, la actividad defectuosa de la mtNOS tumoral va en el mismo sentido que reportes anteriores que vinculan la pérdida de la expresión de la iNOS y la resistencia a la apoptosis por NO endógeno con un aumento en la metástasis y la progresión tumoral (Shi *et al*, 2000; Xie y Huang, 2003). Finalmente, el NO juega un rol antioxidante importante en células y mitocondrias (Paxinou *et al*, 2001). Por lo tanto, una prolongada exposición de la mitocondria a bajas concentraciones de O₂ en la matriz, podría contribuir a la formación de mitocondrias neoplásicas, que llevaría finalmente a la disminución de la transferencia de electrones y a la producción de especies reactivas del oxígeno.

Segunda parte

Los resultados de esta segunda etapa, muestran que los cambios en la respuesta celular relacionados con las cascadas de MAPKs, debidos a variaciones en el estado redox, son consecuencia de una compleja secuencia de eventos que incluye la oxidación de proteínas, y cambios conformacionales que alteran la exposición de sitios de unión proteína- proteína. En este sentido, Kamata y Hirata (1999) discuten en una revisión que el H₂O₂ es capaz de modificar caminos de señalización, que el efecto de este oxidante podría deberse a la oxidación misma de las proteínas, y en particular los residuos cisteína serían los aminoácidos blanco, en donde se daría preferencialmente esta reacción de oxidación. Así, se observaron efectos redox en las vías de la fosfolipasa C (PLC γ) que lleva a un aumento en la concentración de calcio en citosol a partir de reservorios intracelulares; también en la vía del inositol trifosfato (IP3). Las serina/ treonina fosfatasas también son moduladas por redox: se ha descrito que la oxidación del residuo cisteína presente en el sitio activo de MKP1 y MKP2A inhibe la actividad enzimática de las mismas (Nemani y Lee, 1993). Por su parte, Lander y *col* (1995) observaron que Ras era activado por estrés oxidativo; en particular, vieron que el NO reaccionaba con un residuo cisteína expuesto sobre la superficie de la molécula, y esto ocasionaba su activación. Kamata y Hirata (1999) también mencionan una modulación dual de los oxidantes sobre los caminos de señalización celular: mientras que estimulan muchos receptores tirosina kinasas, PLC γ , MAPKs, entre otros, la oxidación en residuos cisteína resulta en la inactivación de muchos factores de transcripción, entre estos, NF κ B, Myb, p53 y AP- 1.

Los residuos cisteína reaccionan con H₂O₂ para dar tres derivados: el ácido sulfénico, -SOH; el ácido sulfinico, -SOOH; y el ácido sulfónico, -SOOOH. Se acepta que la oxidación para dar Cys- SOH, es reversible; sin embargo es un intermediario inestable y susceptible de mayor oxidación, siendo esta irreversible (Cho *et al*, 2004). Se ha propuesto que la formación de puentes disulfuro con cisteínas vecinas, evitaría la mayor oxidación de las mismas, previniendo entonces la pérdida irreversible de la funcionalidad de la proteína (Savitsky y Finkel, 2002).

En nuestro trabajo, observamos que las vías de MAPKs se activan diferencialmente con H₂O₂. En particular, 1 μM H₂O₂ conduce a un aumento en la proliferación, aumento en la expresión de ciclina D1, y asimismo desencadena todo un tráfico intercompartimental de la kinasa ERK, que culmina con su entrada al núcleo, en donde ejercería sus efectos intrínsecos culminando en la división celular. Asimismo observamos que *in vitro*, la oxidación suave de la kinasa (0.1- 1 μM H₂O₂) favorece su interacción con MEK, y un aumento en la fosforilación (Figs. 35, 36 y 40 a 45). Esta concentración de H₂O₂ no ocasiona cambios significativos sobre el tráfico de JNK y p38. Contrariamente, 50 μM H₂O₂, ocasiona arresto del ciclo celular, disminución en la expresión de ciclina D1, y un tráfico coordinado de JNK y p38, que culmina con la entrada de ambas kinasas al núcleo. Por su parte, la interacción de estas proteínas con sus respectivas MAPKKs, así como su fosforilación, se ve favorecida tras la oxidación fuerte de las moléculas (10 μM H₂O₂) (Figs. 41 a 45). Es decir, que ERK1/ 2 y, por otro lado JNK y p38 manifiestan distinta sensibilidad a la oxidación, y esto sería probablemente la causa de la activación y tráfico diferencial que se observan *in vivo*, en las células LP07. Estudiamos entonces las secuencias aminoacídicas de estas kinasas en busca de una posible interpretación de los resultados hasta aquí obtenidos. En todos los casos, las kinasas muestran entre 5 y 7 cisteínas en toda la secuencia, y estas no estarían formando puentes disulfuro, de acuerdo a un cálculo probabilístico desarrollado con el programa DiANNA, servidor web: <http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/> (Ferre y Clote, 2005). Sin embargo detectamos una diferencia importante en la distribución de estos residuos en el dominio de interacción proteína- proteína de las kinasas. Las MAPKs poseen dos sitios de interacción proteína- proteína: el dominio CD (common docking) ha sido bastante estudiado, y se compone de una serie de aminoácidos ácidos rodeados por un conjunto de aminoácidos hidrofóbicos (se muestra en la figura 47, encerrado en un óvalo azul). Este sitio interaccionaría con aminoácidos básicos localizados en los sustratos o en las MAPKKs o MAPK fosfatasas (Tanoue y Nishida, 2003). Por su parte, Tanoue y *col.* (2001) vieron que además del dominio CD, las kinasas interactuaban de forma específica con sus sustratos y MAPKKs por otro dominio, altamente conservado, al que llamaron dominio ED, por su contenido de aminoácidos aspártico y glutámico (Fig. 47, encerrado en amarillo). Estos autores sugieren que en la estructura de la molécula, los dominios CD y ED estarían formando

un bolsillo, con alta especificidad, en el cual encajaría la MAPKK o el sustrato correspondiente (Fig. 48). Lo interesante de esto resulta de observar que ERK, posee dos residuos cisteína en el dominio ED, mientras que p38 y JNK solo uno (Fig. 47, señalado con flechas rojas). Esto sería probablemente la causa de la diferencia en la sensibilidad a la oxidación que manifiestan las kinasas. En este sentido, pensamos que la oxidación de una de las dos cisteínas del dominio ED de ERK sería suficiente para favorecer la interacción con MEK, mientras que la oxidación de ambas, que ocurriría al aumentar la concentración del oxidante, llevaría a la desestabilización de la interacción probablemente por el exceso de cargas negativas ingresadas al entorno. La formación de puentes disulfuro entre estas dos cisteínas no sería posible, pues la distancia entre los carbonos α de las mismas es de 15 Å, y para la formación de puentes, no debe superar los 8 Å (Kosen, 1992). Por su parte, p38 y JNK requerirían mayor $[H_2O_2]$ para oxidar el único residuo que muestran en las cercanías del dominio ED. En este momento estamos haciendo en el laboratorio estudios de espectrometría de masa tras la oxidación de las kinasas, ya sea bloqueando o no los residuos cisteína con 4- vinil- piridina, para determinar cuales aminoácidos son sustrato de la oxidación y participan por lo tanto del cambio conformacional que le estaría ocurriendo a la kinasa.

A

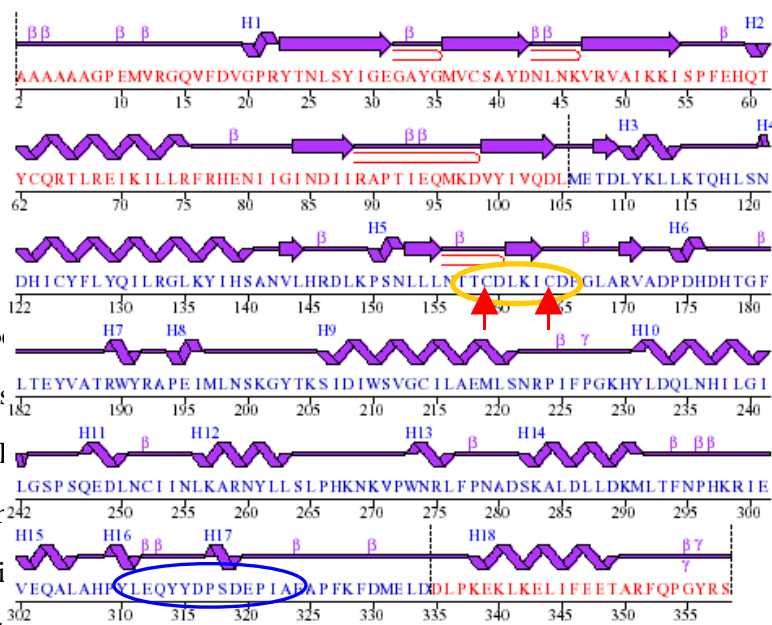
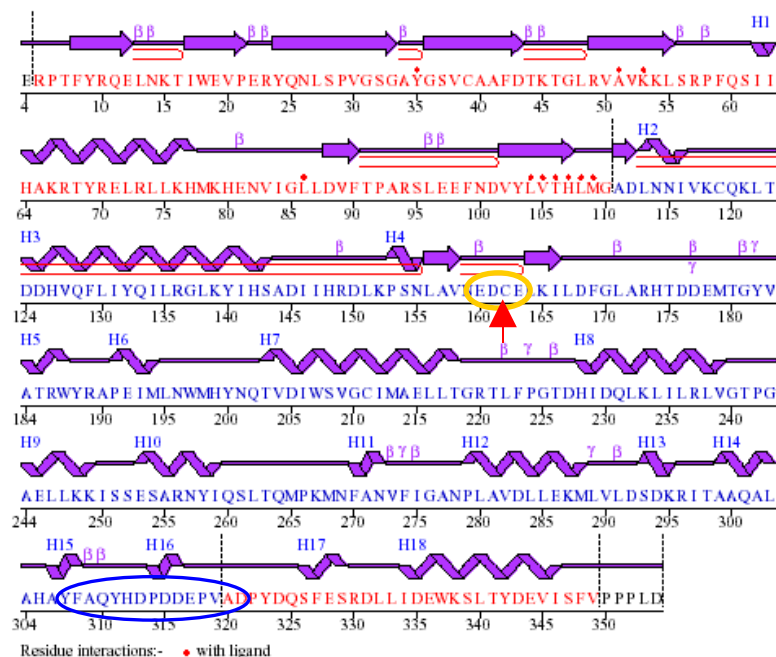


Figura 47. Se encierran los ERK y p38.1 otras dos kir PDB (proteí residuos cist

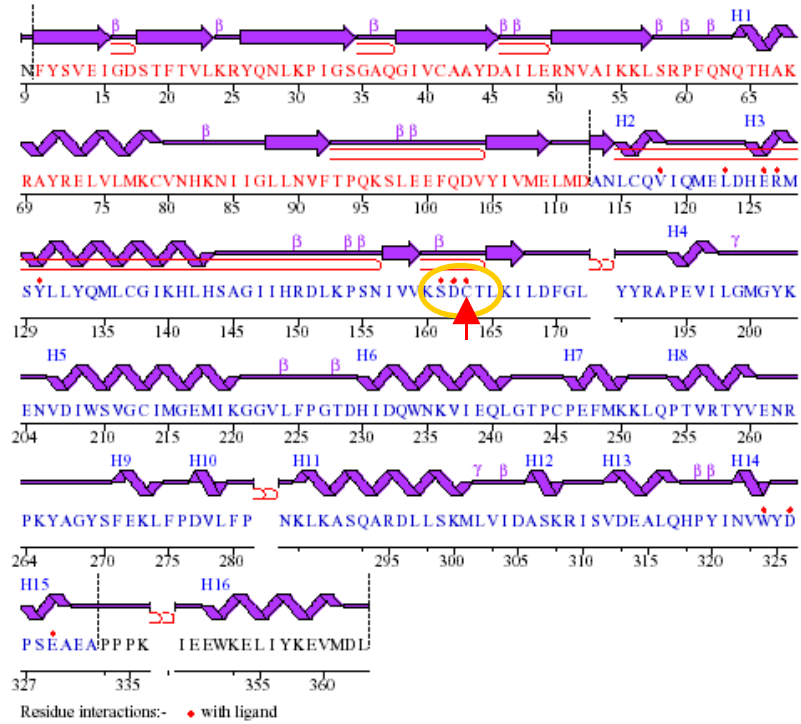
amarillo se el caso de inios en las el programa indican los . En azul se

encierra el dominio CD.

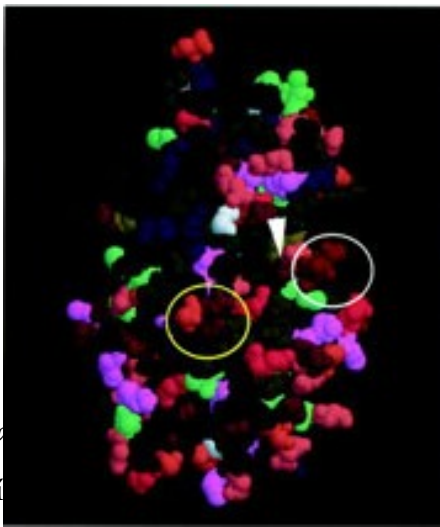
B



C



A



B

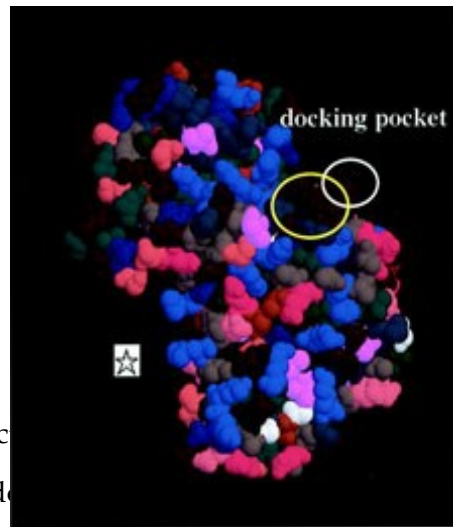
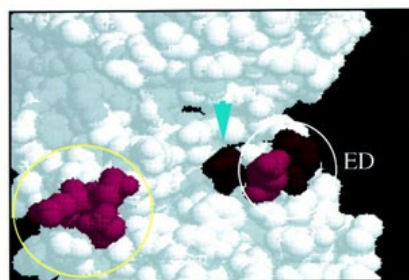


Figura 1. Estructura tridimensional de p38. Los círculos blancos encierran los aminoácidos del dominio ED. El asterisco indica el sitio activo. Tomada de Tanoue y *col.* (2001). C) Representación esquemática del bolsillo de docking. Se indican los

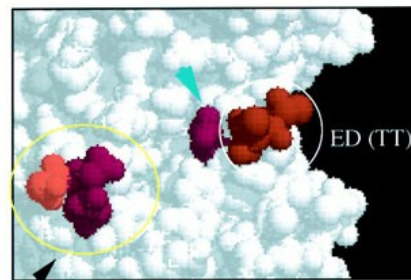
Docking Groove

p38

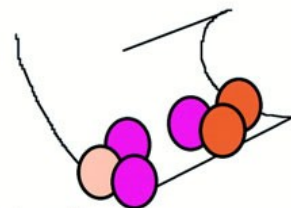
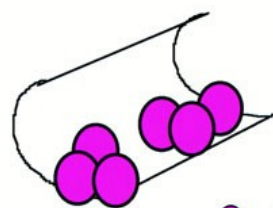


CD

ERK2



CD



- = D or E (negatively charged)
- = T
- = S

La mitocondria toma un rol importante como moduladora del circuito de las kinasas y de su efecto final en cuanto al destino celular. En este sentido observamos que tanto para ERK tras la estimulación con 1 μM H_2O_2 , como para p38 y JNK al ser estimuladas las células con 50 μM H_2O_2 , ocurre un aumento de la kinasa fosforilada en la mitocondria, y luego hay una salida de la misma, en paralelo con la retención nuclear de las MAPKs. En este sentido pensamos que la mitocondria estaría generando un suministro constante de MAPKs fosforiladas al núcleo de la célula. Una vez que aumenta la $[\text{H}_2\text{O}_2]$, P- MEK es liberado de la mitocondria; aparentemente, el pool mitocondrial de MEK y P- MEK contribuyen al aumento de esta kinasa en el citosol. En este punto, nos preguntamos si MEK activa ERK en citosol o en mitocondria. De la figura 40, deducimos que a tiempos cortos, podría ser que active ERK en ambas fracciones, pero la activación sostenida (>30 min post estímulo) se daría solo en la mitocondria. MEK fosforilaría a ERK unido a la membrana mitocondrial externa (Figs. 39 y 42). Una vez fosforilado, ERK es liberado de la mitocondria y contribuye a sostener la señal nuclear. Contrariamente, a 50 μM H_2O_2 observamos retención de ERK en la mitocondria. Este fenómeno podría deberse a la disminución en la capacidad de interactuar con ERK o MEK de la kinasa oxidada (Figs. 40 y 45). Varios autores reportaron que para la entrada de ERK al núcleo es necesario que esta kinasa esté formando un homodímero (Khokhlatchev *et al*, 1998; Adachi *et al*, 1999). Pensamos que para que ocurra la salida de ERK de la mitocondria hacia el núcleo, posiblemente se requiera la formación de este dímero. Al estar desfavorecida, la kinasa se acumularía en la mitocondria. Queda por estudiar si la mutante de ERK, H176E L₄A ERK2, que es incapaz de formar dímeros con otra molécula de ERK (Khokhlatchev *et al*, 1998) podría traslocar hacia y fuera de la mitocondria. Por lo tanto, con alta $[\text{H}_2\text{O}_2]$, si bien P- ERK y P- MEK están presentes en mitocondria, las condiciones no estarían dadas para sostener una alta tasa de fosforilación de ERK. Como se muestra en la figura 46, *in vivo*, tanto la interacción MEK- ERK, como la fosforilación de ERK están disminuidas, y consecuentemente, el tiempo de retención nuclear es significativamente menor. Aún no hemos definido si la retención en el espacio intermembrana constituye un impedimento estérico para la activación y liberación de ERK; pensamos que probablemente así sea.

Por otra parte, con alta $[H_2O_2]$, MKK3 y MKK4 son liberados de la mitocondria, al tiempo en que aumentan en citosol y núcleo (Fig. 43). En este sentido, pensamos que la formación de dímeros MKK3- p38 y MKK4- JNK que se ve favorecida con la oxidación, favorecería la activación de estas kinasas, que viajarían fuera de la mitocondria, y hacia el núcleo, acompañadas por sus respectivas MAPKKs.

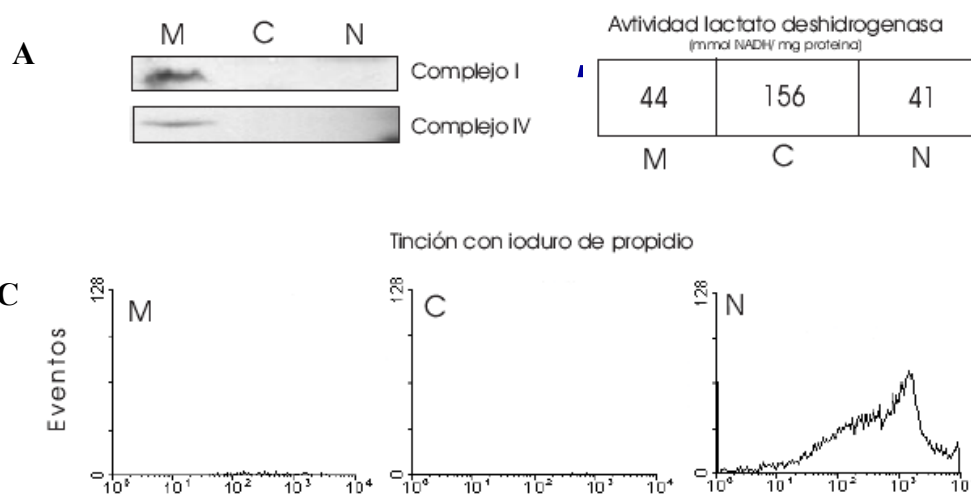
Discusión final

Los resultados expuestos en esta Tesis, muestran una relación en la concentración de H_2O_2 intracelular, y el estadio del ciclo celular; baja $[H_2O_2]_{ss}$ se observa en tejidos proliferantes como hígado embrionario de rata, y células tumorales, mientras que la $[H_2O_2]_{ss}$ es mayor en tejidos quiescentes como el hígado de rata adulta (Fig. 31). Asimismo, se observa activación constitutiva de la vía de ERK1/ 2 en tejido embrionario y tumoral, mientras que en tejidos quiescentes, la cascada predominante es la de p38 (Fig. 33). De acuerdo con esto, observamos que la estimulación suave con H_2O_2 desencadena un tráfico intracelular de ERK, mientras que la oxidación fuerte, de JNK y p38 (Figs. 40 y 41). Estos hechos, sumados a que los tejidos neoplásicos son incapaces de aumentar la $[H_2O_2]_{ss}$ (Fig. 28 y 29, y discusión: primera parte), darían cuenta de la proliferación persistente que manifiestan las células tumorales.

***Figuras
adicionales***

Fraccionamiento subcelular. Se obtuvieron las fracciones subcelulares según se detalla en la parte de materiales y métodos. Se comprobó que las fracciones estuvieran libres de contaminación de unas con otras. Para esto, se siguió la presencia de DNA nuclear con ioduro de propidio y citometría de flujo, se detectó la presencia de proteínas específicas mitocondriales por western blot, y se ensayó la actividad de lactato deshidrogenasa, enzima citosólica. Se observó poca o nula contaminación de las fracciones (Fig. 49).

Figura 49. Fraccionamiento subcelular. Control de pureza de las diferentes fracciones subcelulares. A) Western blot utilizando anticuerpos específicos contra una subunidad del complejo I (panel superior) y una subunidad del complejo IV (panel inferior) de la cadena mitocondrial de transporte de electrones. B) tinción de DNA nuclear con ioduro de propidio, seguido por citometría de flujo. C) Actividad de lactato deshidrogenasa, enzima característica de citosol. M: mitocondria, C: citosol, N: núcleo.



Referencias

Referencias

Ackrell BA. *Cytopathies involving mitochondrial complex II. Mol. Aspects Med.*, 23: 369-8, 2002.

Adachi M, Fukuda M, Nishida E. *Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. EMBO J.*, 18(19): 5347-58, 1999.

Ahn B, Ohshima H. *Suppression of intestinal polyposis in Apc (Min/+) mice by inhibiting nitric oxide production. Cancer Res.*, 61: 8357-60, 2001.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem. J.*, 357: 593-615, 2001.

Allen RG, Tresini M.. *Oxidative stress and gene regulation. Free Rad.. Biol. Med.*, 28(3): 463-99, 2000.

Alonso M, Melani M, Converso D, Jaitovich A, Paz C, Carreras MC, Medina JH, Poderoso JJ. *Mitochondrial extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) are modulated during brain development. J. Neurochem.*, 89(1): 248-56, 2004.

Amuthan G, Biswas G, Ananatheerthavarada H, Vijayasathy C, Shephard H, Avadhani NG. *Mitochondrial stress-induced calcium signaling, phenotypic changes and invasive behavior in human lung carcinoma A549 cells. Oncogene*, 21: 7839-49, 2002.

Antunes F, Cadenas E. *Cellular titration of apoptosis with steady state concentrations of H₂O₂: submicromolar levels of H₂O₂ induce apoptosis through Fenton chemistry independent of the cellular thiol state.* **Free Rad. Biol. Med.**, 30: 1008-18, 2001.

Arbabi S, Maier RV. *Mitogen-activated protein kinases.* **Crit. Care Med.**, 30(1):S74-S79, 2002.

Armstrong JS, Hornung B, Lecane P, Jones DP, Knox SJ. *Rotenone-induced G2/M cell cycle arrest and apoptosis in a human B lymphoma cell line PW.* **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 289: 973-8, 2001.

Baines CP, Zhang J, Wang GW, Zheng YT, Xiu JX, Cardwell EM, Bolli R, Ping P. *Mitochondrial PKCepsilon and MAPK form signaling modules in the murine heart: enhanced mitochondrial PKCepsilon-MAPK interactions and differential MAPK activation in PKCepsilon-induced cardioprotection.* **Circ. Res.**, 90(4): 390-7, 2002.

Bakeeva LE, Chentsov YuS, Skulachev VP. *Mitochondrial framework (reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle.* **Biochim. Biophys. Acta**, 501(3): 349-69, 1978.

Bal de Kier Joffe ED, Puricelli LI, Vidal MC, Lustig ES. *Characterization of two murine mammary adenocarcinoma tumors with different metastatic ability.* **J. Exp. Clin. Cancer Res.**, 2: 151-160, 1983.

Behrens A, Sibilica M, Wagner EF. *Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation.* **Nat. Genet.**, 21(3): 326-9, 1999.

Bhat N, Zhang P. *Hydrogen peroxide activation of multiple mitogen-activated protein kinases in an oligodendrocyte cell line: role of extracellular signal-regulated kinase in hydrogen peroxide-induced cell death.* **J. Neurochem.**, 72: 112-119, 1999.

Bijur GN, Jope RS. *Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation.* **J. Neurochem.**, 87(6):1427-35, 2003.

Blough NV, Zafiriou OC. *Reaction of superoxide with nitric oxide to form peroxynitrite in alkaline aqueous solution. Inorg. Chem.*, 24: 3502-3504, 1985.

Borutaité V, Brown GC. *Rapid reduction of nitric oxide by mitochondria, and reversible inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide. J. Biochem.*, 315: 295-299, 1996.

Bost F, McKay R, Bost M, Potapova O, Dean NM, Mercola D. *The Jun kinase 2 isoform is preferentially required for epidermal growth factor-induced transformation of human A549 lung carcinoma cells. Mol. Cell Biol.*, 19(3): 1938-49, 1999.

Boveris A, Cadenas E, Stoppani AOM. *Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. Biochem. J.*, 156: 435-444, 1976.

Boveris A, Cadenas E. *Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species*. Edited by Linda Biadasz Clerch and Donald Massaro. Oxygen and gene expression, and cellular function, (pp 1-25). Marcel Dekker, Inc. New York, 1997.

Boveris A, Cadenas E. *Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species*. Edited by Linda Biadasz Clerch and Donald Massaro. *Oxygen and gene expression, and cellular function*, (pp 1-25). Marcel Dekker, Inc. New York, 1997.

Boveris A, Cadenas E. *Mitochondrial production of superoxide anion and its relationship to the antimycin-insensitive respiration. FEBS. Lett.*, 54: 311-314, 1975.

Boveris A, Oshino N, Chance B. *The cellular production of hydrogen peroxide. Biochem. J.*, 128: 617-30, 1972.

Brancho D, Ventura JJ, Jaeschke A, Doran B, Flavell RA, Davis RJ. *Role of MLK3 in the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling cascades. Mol. Cell Biol.*, 25(9): 3670-81, 2005.

Brandt MD. *The stoichiometry of proton pumping and ATP synthesis in mitochondria. Biochemist.*, 16: 20-24, 1994.

Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. *Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. Nature*, 351: 714-718, 1991.

Bredt DS, Snyder SH. *Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87(2): 682-5, 1990.

Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, Bredt DS. *Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and α 1-syntrophin mediated by PDZ domains. Cell*, 84: 757-767, 1996.

Brenman JE, Chao DS, Xia H, Aldape K, Bredt DS. *Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. Cell*, 82(5): 743-752, 1995.

Brenman JE, Xia, H, Chao, DS, Black SM, Bredt DS. *Regulation of neuronal nitric oxide synthase through alternative transcripts. Dev. Neurosci.*, 19: 224-231, 1997.

Bruckner SR, Tammariello SP, Kuan CY, Flavell RA, Rakic P, Estus S. *JNK3 contributes to c-Jun activation and apoptosis but not oxidative stress in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. J. Neurochem.*, 78(2): 298-303, 2001.

Brunet A, Roux D, Lenormand P, Dowd S, Keyse S, Pouyssegur J. *Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. EMBO J.*, 18(3): 664-74, 1999.

Brunet A, Roux D, Lenormand P, Dowd S, Keyse S, Pouyssegur J. *Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. EMBO J.*, 18(3):664-74, 1999.

Burk RF, Nishiki K, Lawrence RA, Chance B. *Peroxide removal by selenium-dependent and selenium-independent glutathione peroxidases in hemoglobin free perfused rat liver.* **J. Biol. Chem.** 253: 43-46, 1978.

Cadenas E, Poderoso JJ, Antunes F, Boveris A. *Analysis of the pathways of nitric oxide utilization in mitochondria.* **Free Rad. Res.**, 33: 747-56. 2000.

Cannon B, Nedergaard J. *The biochemistry of an inefficient tissue: brown adipose tissue.* **Essays Biochem.**, 20: 110-64, 1985.

Cao G, Luo Y, Nagayama T, Pei W, Stetler RA, Graham SH, Chen J. *Cloning and characterization of rat caspase-9: implications for a role in mediating caspase-3 activation and hippocampal cell death after transient cerebral ischemia.* **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, 22(5): 534-46, 2002.

Carreras MC, Converso DP, Lorenti AS, Barbich M, Levisman DM, Jaitovich A, Antico Arciuch VG, Galli S, Poderoso JJ. *Mitochondrial nitric oxide synthase drives redox signals for proliferation and quiescence in rat liver development.* **Hepatology**, 40(1): 157-66. 2004.

Carreras MC, Galli S, Converso D, Cadenas E, Poderoso JJ. *Mitochondrial nitric oxide and redox signaling modulation of cell behavior.* En: **Nitric Oxide, Cell Signaling, and Gene Expression**. Santiago Lamas y Enrique Cadenas eds. Marcel Dekker Inc. EEUU. 2005.

Carreras MC, Melani M, Riobo N, Converso D, Gatto E, Poderoso JJ. *Neuronal nitric oxide synthases in brain and extraneural tissues.* **Methods Enzymol.**, 359: 413-423, 2002.

Carreras MC, Peralta J, Converso D, Finocchietto P, Rebagliati I, Zaninovich A, Poderoso JJ. *Modulation of liver mitochondrial NOS implicated in thyroid-dependent regulation of O₂ uptake.* **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, 281(6): H2282-8, 2001.

Carreras MC, Peralta JG, Converso DP, Finocchietto PV, Rebagliatti I, Zanginovich AA, Poderoso JJ. *Modulation of liver mitochondrial NOS is implicated in thyroid dependent regulation of O₂ uptake. Am. J. Physiol. (Heart. Circ. Physiol.),* 281: H2282-2288, 2001.

Challis BC, Kyrtopoulos SA. *The chemistry of nitroso compounds. Part 12. The mechanism of nitrosation and nitration of aqueous piperidine by gaseous dinitrogen tetraoxide and dinitrogen trioxide in aqueous alkaline solutions. Evidence for the existence of molecular isomers of dinitrogen tetraoxide and dinitrogen trioxide. J. Chem. Soc. Perkin Trans.,* 2: 1296-1302, 1978.

Chance, B. *Special methods: catalase.* In: Glick, D., ed. *Methods of Biochemical analysis.* New York: Interscience, pp 408-424, 1954.

Chang L, Karin M. *Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature.,* 410(6824): 37-40, 2001.

Charles IG, Palmer RM, Hickery MS, Bayliss MT, Chubb AP, Hall VS, Moss DW, Moncada S. *Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,* 90(23): 11419-23, 1993.

Chen PF, Tsai AL, Berka V, Wu KK. *Endothelial nitric-oxide synthase. Evidence for bidomain structure and successful reconstitution of catalytic activity from two separate domains generated by a baculovirus expression system. J. Biol. Chem.,* 271(24): 14631-5, 1996.

Chen RH, Sarnecki C, Blenis J. *Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. Mol. Cell. Biol.,* 12(3): 915-27, 1992.

Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH. *MAP kinases. Chem. Rev.,* 101(8): 2449-76, 2001.

Chen ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA, Power DA, Ortiz de Montellano PR, Kemp BE. *AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. FEBS. Lett.*, 443(3):285-9, 1999.

Cho SH, Lee CH, Ahn Y, Kim H, Kim H, Ahn CY, Yang KS, Lee SR. *Redox regulation of PTEN and protein tyrosine phosphatases in H₂O₂ mediated cell signaling. FEBS. Lett.*, 560(1-3): 7-13, 2004.

Chodosh LA. *The reciprocal dance between cancer and development. N. Eng. J. Med.*, 347: 134-136, 2002.

Cleeter MW, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S, Schapira AH. *Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. FEBS. Lett.*, 345: 50-54, 1994.

Colombo L, Bonaparte Y, Klein S, Stillitani-Délia I. *Selección in vivo de una línea tumoral con alta incidencia de metástasis pulmonares. Medicina (Bs As)*, 40: 827-828, 1980.

Craxton A, Shu G, Graves JD, Saklatvala J, Krebs EG, Clark EA. *p38 MAPK is required for CD40-induced gene expression and proliferation in B lymphocytes. J. Immunol.*, 161(7): 3225-36, 1998.

Da Silva J, Pierrat B, Mary JL, Lesslauer W. *Blockade of p38 mitogen-activated protein kinase pathway inhibits inducible nitric-oxide synthase expression in mouse astrocytes. J. Biol. Chem.*, 272(45): 28373-80, 1997.

Davies KJA. *The Broad Spectrum of Responses to Oxidants in Proliferating Cells: A New Paradigm for Oxidative Stress. IUBMB Life*, 48: 41-47, 1999.

Davis RJ. *Signal transduction by the JNK group of MAP kinases.* **Cell.**,103(2): 239-52, 2000.

Denicola A, Souza JM, Radi R. *Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 95: 3566-3571, 1998.

Denis J, Bennet JPJr. *Interactions among nitric oxide and Bcl-family proteins after MPP + exposure of SH- SY5Y neural cells I: MPP + increases mitochondrial NO and Bax protein.* **J. Neurosci. Res.**, 72: 76-88, 2003.

Diament MJ, Garcia C, Sitillitani I, Muñiz Saavedera V, Manzur T, Vauthay L, Klein S. M. *Spontaneous murine lung adenocarcinoma P07: a new experimental model to study paraneoplastic syndromes of lung cancer.* **Int. J. Mol. Med.**, 2: 45-50, 1998.

Diaz G, Falchi AM, Gremo F, Isola R, Diana A. *Homogeneous longitudinal profiles and synchronous fluctuations of mitochondrial transmembrane potential.* **FEBS. Lett.**, 475(3):218-24, 2000.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation.* **Nature**, 399(6736):601-5, 1999.

Elfering S, Sarkela TN, Giulivi C. *Biochemistry of mitochondrial nitric oxide synthase.* **J. Biol. Chem.**, 277: 38079-38086, 2002.

Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C. *Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase.* **J. Biol. Chem.**, 277(41): 38079-86, 2002.

Eliasson M, Blackshaw S, Schell M, Bredt D. *Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 94: 3396-401, 1997.

Engelman JA, Lisanti MP, Scherer PE. *Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis. J. Biol. Chem.*, 273(48): 32111-20, 1998.

Falluel-Morel A, Aubert N, Vaudry D, Basille M, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ. *Opposite regulation of the mitochondrial apoptotic pathway by C2-ceramide and PACAP through a MAP-kinase-dependent mechanism in cerebellar granule cells. J. Neurochem.*, 91(5): 1231-43, 2004.

Ferre F, Clote P. DiANNA: a web server for disulfide connectivity and prediction. *Nucleic Acids Reseach*, 33: W230-W232, 2005.

Franco MC, Antico Arciuch V, Peralta J, Galli S, Lopez L, Romorini L, Poderoso J, Carreras MC. *Hypothyroid phenotype is contributed by mitochondrial complex I inactivation due to translocated neuronal nitric oxide synthase. J. Biol. Chem.*, en prensa.

Frank V, Kadenbach B. *Regulation of the H⁺/e⁻ stoichiometry of cytochrome c oxidase from bovine heart by intramitochondrial ATP/ADP ratios. FEBS. Lett.*, 382(1-2): 121-4, 1996.

Frey TG, Mannella CA. *The internal structure of mitochondria. Trends Biochem. Sci.*, 25(7):319-24, 2000.

Frost JA, Steen H, Shapiro P, Lewis T, Ahn N, Shaw PE, Cobb MH. *Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins. EMBO J.*, 16(21):6426-38, 1997.

Fukuto J, Cho JY, Switzer CH. *The chemical properties of NO and nitrogen oxides. In Nitric Oxide Biology and Pathobiology* (Ed. Ignarro, L.) pp. 23-40, Academic Press, San Diego, 2000.

Gaitanaki C, Konstantina S, Chrysa S, Beis I. *Oxidative stress stimulates multiple MAPK signalling pathways and phosphorylation of the small HSP27 in the perfused amphibian heart.* **J. Exp. Biol.**, 206(16): 2759-69, 2003.

Galli S, Labato MI, Bal de Kier Joffé E, Carreras MC, Poderoso JJ. *Decreased mitochondrial nitric oxide synthase activity and hydrogen peroxide relate persistent tumoral proliferation to embryonic behaviour.* **Cancer Res.**, 63: 6370-77, 2003.

Gatto E.M, Riobó NA, Carreras MC, Schöpfer F, Pargament G, Poderoso JJ. *Circulating plasma factors in Parkinson's disease enhance nitric oxide release of normal human neutrophils.* **J. Neurol. Sci.**, 165: 66-70, 1999.

Geller DA, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Nussler AK, Di Silvio M, Wang SC, Nakayama DK, Simmons RL, Snyder SH, Billiar TR. *Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 90(8): 3491-5, 1993.

Ghafourifar P, Richter C. *Nitric oxide synthase activity in mitochondria.* **FEBS. Lett.**, 418(3): 291-6, 1997.

Ghauforifar P, Schenk U, Klein SD, Richter C. *Mitochondrial nitric oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria.* **J. Biol. Chem.**, 274: 31185-31188, 1999.

Ghosh DK, Abu-Soud HM, Stuehr DJ. *Reconstitution of the second step in NO synthesis using the isolated oxygenase and reductase domains of macrophage NO synthase.* **Biochemistry**, 34(36): 11316-20, 1995.

Ghosh DK, Stuehr DJ. *Macrophage NO synthase: characterization of isolated oxygenase and reductase domains reveals a head-to-head subunit interaction.* **Biochemistry**, 34(3): 801-7, 1995.

Giulivi C, Poderoso JJ, Boveris A. *Production of nitric oxide by mitochondria. J. Biol. Chem.*, 273(18): 11038-43, 1998.

Giulivi C, Poderoso JJ, Boveris A. *Production of nitric oxide by mitochondria. J. Biol. Chem.*, 273: 11038-11043, 1998.

Giulivi C. *Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism. Biochem. J.*, 332: 673-9, 1998.

Giulivi C. *Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism. Biochem. J.*, 332: 673-9, 1998.

Gonzalez FA, Seth A, Raden DL, Bowman DS, Fay FS, Davis RJ. *Serum-induced translocation of mitogen-activated protein kinase to the cell surface ruffling membrane and the nucleus. J. Cell Biol.*, 122(5): 1089-101, 1993.

Hackenbrock CR. *Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. Reversible ultrastructural changes in isolated liver mitochondria. J. Cell Biol.*, 30: 269-297, 1966.

Hall AV, Antoniou H, Wang Y, Cheung AH, Arbus AM, Olson SL, Lu WC, Kau CL, Marsden PA. *Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1). J. Biol. Chem.*, 269(52): 33082-90, 1994.

Hallberg B, Rayter SI, Downward J. *Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. J. Biol. Chem.*, 269(6): 3913-6, 1994.

Halliwell B, Cross CE. *Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. Environ Health Perspect.*, 102(10): 5-12, 1994.

Ham J, Babij C, Whitfield J, Pfarr CM, Lallemand D, Yaniv M, Rubin LL. *A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. **Neuron**, 14(5): 927-39, 1995.*

Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. *A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. **Science**, 265(5173): 808-11, 1994.*

Han J, Lee JD, Tobias PS, Ulevitch RJ. *Endotoxin induces rapid protein tyrosine phosphorylation in 70Z/3 cells expressing CD14. **J. Biol. Chem.**, 268(33): 25009-14, 1993.*

Haq R, Brenton JD, Takahashi M, Finan D, Finkielsztejn A, Damaraju S, Rottapel R, Zanke B. *Constitutive p38HOG mitogen-activated protein kinase activation induces permanent cell cycle arrest and senescence. **Cancer Res.**, 62(17): 5076-82, 2002.*

Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J. Clin. Invest.*, 100: 2417-2423, 1997.

Haynes V, Elfering S, Traaseth N, Giulivi C. *Mitochondrial nitric oxide Synthase: Enzyme expresión, characterization and regulation. **J. Bioenergetics and biomembranes**, 34 (4): 341-345, 2004.*

Henkart PA. *ICE family proteases: mediators of all apoptotic cell death? **Immunity**, 4(3): 195-201, 1996.*

Heytler PG. *Uncouplers of oxidative phosphorylation. **Pharmacol. Ther.**, 10(3): 461-72, 1980.*

Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M. *Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. **Genes Dev.**, 7(11): 2135-48, 1993.*

Ho YS, Lee HM, Mou TC, Wang YJ, Lin JK. *Suppression of nitric oxide induced apoptosis by N-acetyl-L-cysteine through modulation of glutathione, bcl-2 and bax protein levels.* **Mol. Carcinog.**, 19:101-13, 1997.

Hochbaum D, Tanos T, Ribeiro-Neto F, Altschuler D, Coso OA. *Activation of JNK by Epac is independent of its activity as a Rap guanine nucleotide exchanger.* **J. Biol. Chem.**, 278(36): 33738-46, 2003.

Hofmann C, Shepelev M, Chernoff J. *The genetics of Pak.* **J. Cell Sci.**, 117(19): 4343-54, 2004.

Hollenbach E, Neumann M, Vieth M, Roessner A, Malfertheiner P, Naumann M. *Inhibition of p38 MAP kinase- and RICK/ NF-kappaB-signaling suppresses inflammatory bowel disease.* **FASEB J.**, 18(13): 1550-2, 2004.

Holmuhamedov E, Lewis L, Bienengraeber M, Holmuhamedova M, Jahangir A, Terzic A. *Suppression of human tumor cell proliferation through mitochondrial targeting.* **FASEB J.**, 16: 1010-6, 2002.

Horgan AM, Stork PJ. *Examining the mechanism of Erk nuclear translocation using green fluorescent protein.* **Exp. Cell Res.**, 285(2): 208-20, 2003.

Hovius R, Lambrechts H, Nicolay K, de Kruiff B. *Improved methods to isolate and subfractionate rat liver mitochondria. Lipid composition of the inner and outer membrane.* **Biochim. Biophys. Acta.**, 1021: 217-226, 1990.

Huang PL, Dawson TM, Bredt DS, Snyder SH, Fishman MC. *Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene.* **Cell**, 75(7): 1273-86, 1993.

Huie RE, Pajmada S. *The reaction of NO with superoxide.* **Free Radic. Res. Commun.**, 18: 195-199, 1993.

Ignarro L. *Introduction and overview*. En ***Nitric Oxide Biology and Pathobiology*** (Ed. Ignarro, L.) pp. 23-40, Academic Press, San Diego, 1999.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide*. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA.***, 84: 9265-9269, 1987.

Ito Y, Mishra NC, Yoshida K, Kharbanda S, Saxena S, Kufe D. *Mitochondrial targeting of JNK/SAPK in the phorbol ester response of myeloid leukemia cells*. ***Cell Death Differ.***, 8(8): 794-800, 2001.

Janssens SP, Shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB, Bloch KD. *Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase*. ***J. Biol. Chem.***, 267(21): 14519-22, 1992.

Jiang Y, Gram H, Zhao M, New L, Gu J, Feng L, Di Padova F, Ulevitch RJ, Han J. *Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta*. ***J. Biol. Chem.***, 272(48): 30122-8, 1997.

Johnson GV, Bailey CD. *The p38 MAP kinase signaling pathway in Alzheimer's disease*. ***Exp. Neurol.***, 183(2): 263-8, 2003.

Juo P, Kuo CJ, Reynolds SE, Konz RF, Raingeaud J, Davis RJ, Bleniss HP, Blenis J. *Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway requires ICE/ CED-3 family proteases*. ***Mol. Cell. Biol.***, 17(1): 24-35, 1997.

Kamata H, Hirata H. *Redox regulation of cellular signaling*. ***Cell Signal.***, 11: 1-14, 1999.

Kanai A, Pearce L, Clemens P, Birder L, VanBibber M, Choi S, de Groat W, Peterson J. *Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection*. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA.***, 98: 14126-141231, 2001.

Karin M, Lin A. *NF-kappaB at the crossroads of life and death. Nat. Immunol.*, 3(3): 221-7, 2002.

Karin M. *The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. J. Biol. Chem.*, 270(28): 16483-6, 1995.

Khokhlatchev AV, Canagarajah B, Wilsbacher J, Robinson M, Atkinson M, Goldsmith E, Cobb MH. *Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. Cell*, 93(4): 605-15, 1998.

King AJ, Sun H, Diaz B, Barnard D, Miao W, Bagrodia S, Marshall MS. *The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. Nature*, 396(6707): 180-3, 1998.

Kleinert H, Schwarz PM, Forstermann U. *Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. Biol. Chem.*, 384(10-11): 1343-64, 2003.

Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. *The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. Science*, 275(5303): 1132-6, 1997.

Kobzik L, Stringer B, Balligand JL, Reid MB, Stamler JS. *Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 211(2): 375-81, 1995.

Kohnke D, Ludwig B, Kadenbach B. *A threshold membrane potential accounts for controversial effects of fatty acids on mitochondrial oxidative phosphorylation. FEBS. Lett.*, 336(1): 90-4, 1993.

Kolch W, Calder M, Gilbert D. *When kinases meet mathematics: the systems biology of MAPK signalling. FEBS. Lett.*, 579(8): 1891-5, 2005.

Kosen PA. En: Stability of protein pharmaceuticals (Ahern TJ y Manning MC Eds.). Plenum Press, New York, 1992.

Kuan CY, Yang DD, Samanta Roy DR, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA. *The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. Neuron*, 22(4): 667-76, 1999.

Kwon SH, Pimentel DR, Remondino A, Sawyer DB, Colucci WS. *H₂O₂ regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. J. Mol. Cell Cardiol.*, 35(6): 615-21, 2003.

Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. *Endotelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89: 6348-6352, 1992.

Lander HM, Ogiste JS, Teng KK, Novogrodsky A. *p21ras as a common signaling target of reactive free radicals and cellular redox stress. J. Biol. Chem.*, 270(36): 21195-8, 1995.

Lee K, Esselman WJ. *Inhibition of PTPs by H₂O₂ regulates the activation of distinct MAPK pathways. Free Radic. Biol. Med.*, 33(8):1121-32, 2002.

Lee YJ, Cho HN, Soh JW, Jhon GJ, Cho CK, Chung HY, Bae S, Lee SJ, Lee YS. *Oxidative stress-induced apoptosis is mediated by ERK1/2 phosphorylation. Exp. Cell. Res.*, 291(1): 251-66, 2003.

Lei K, Davis RJ. *JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100(5): 2432-7, 2003.

Le-Niculescu H, Bonfoco E, Kasuya Y, Claret FX, Green DR, Karin M. *Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death.* **Mol. Cell. Biol.**, 19(1): 751-63, 1999.

Lenormand P, Sardet C, Pages G, L'Allemain G, Brunet A, Pouyssegur J. Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. **J. Cell. Biol.**, 122(5): 1079-88, 1993.

Lin A. *Activation of the JNK signaling pathway: breaking the break on apoptosis.* **Bioessays**, 25: 1-8, 2003.

Liu J, Lin A. *Role of JNK activation in apoptosis: A double- edged sword.* **Cell Res.**, 15: 36-42, 2005.

Liu J, Minemoto Y, Lin A. *c-Jun N-terminal protein kinase 1 (JNK1), but not JNK2, is essential for tumor necrosis factor alpha-induced c-Jun kinase activation and apoptosis.* **Mol. Cell. Biol.**, 24(24): 10844-56, 2004.

Liu SL, Lin X, Shi DY, Cheng J, Wu CQ, Zhang YD. *Reactive oxygen species stimulated human hepatoma cell proliferation via cross-talk between PI3-K/PKB and JNK signaling pathways.* **Arch. Biochem. Biophys.**, 406(2): 173-82, 2002.

Lodish H, et al, eds. *Molecular cell Biology* (3rd edn), Scientific American Books, 1999.
Lopez-Figueroa MO, Caamano C, Morano MI, Ronn LC, Akil H, Watson SJ. *Direct evidence of nitric oxide presence within mitochondria.* **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 272(1): 129-33, 2000.

Lores-Arnaiz S, D'Amico G, Czerniczyniec A, Bustamante J, Boveris A. *Brain mitochondrial nitric oxide synthase: in vitro and in vivo inhibition by chlorpromazine.* **Arch. Biochem. Biophys.**, 430(2): 170-7, 2004.

Lotscher HR, Winterhalter KH, Carafoli E, Richter C. *Hydroperoxides can modulate the redox state of pyridine nucleotides and the calcium balance in rat liver mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76(9): 4340-4, 1979.

Lowe PN, Smith D, Stammers DK, Riveros-Moreno V, Moncada S, Charles I, Boyhan A. *Identification of the domains of neuronal nitric oxide synthase by limited proteolysis. Biochem. J.*, 314 (1): 55-62, 1996.

Majumder PK, Pandey P, Sun X, Cheng K, Datta R, Saxena S, Kharbanda S, Kufe D. *Mitochondrial translocation of protein kinase C delta in phorbol ester-induced cytochrome c release and apoptosis. J. Biol. Chem.*, 275(29): 21793-6, 2000.

Mannella CA. *Introduction: our changing views of mitochondria. J. Bioenerg. Biomembr.*, 32(1):1-4, 2000.

Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN, Lamas S, Michel T. *Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. FEBS. Lett.*, 307(3): 287-93, 1992.

Maundrell K, Antonsson B, Magnenat E, Camps M, Muda M, Chabert C, Gillieron C, Boschert U, Vial-Knecht E, Martinou JC, Arkininstall S. *Bcl-2 undergoes phosphorylation by c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinases in the presence of the constitutively active GTP-binding protein Rac1. J. Biol. Chem.*, 272(40): 25238-42, 1997.

Mayer B, John M, Bohme E. *Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin. FEBS. Lett.*, 277(1-2): 215-9, 1990.

Mayer B, Schmidt K, Humbert P, Bohme E. *Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells Ca²⁺-*

*independently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 164(2): 678-85, 1989.*

McCord JM, Fridovich I. *Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, 244, 6049-6055, 1969.*

McMillan K, Masters BS. *Prokaryotic expression of the heme- and flavin-binding domains of rat neuronal nitric oxide synthase as distinct polypeptides: identification of the heme-binding proximal thiolate ligand as cysteine-415. **Biochemistr.**, 34(11): 3686-93, 1995.*

Meloche S, Seuwen K, Pages G, Pouyssegur J. *Biphasic and synergistic activation of p44 MAPK (ERK-1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity. **Mol.Endocrinol.**, 6: 845-854, 1992.*

Michel T, Li GK, Busconi L. *Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 90(13): 6252-6, 1993.*

Mitchell P. *Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. **Science**, 206(4423): 1148-59, 1979.*

Mizukami Y, Okamura T, Miura T, Kimura M, Mogami K, Todoroki-Ikeda N, Kobayashi S, Matsuzaki M. *Phosphorylation of proteins and apoptosis induced by c-Jun N-terminal kinase1 activation in rat cardiomyocytes by H₂O₂ stimulation. **Biochim. Biophys. Acta.**, 1540(3): 213-20, 2001.*

Moyes CD, Hood DA. *Origins and consequences of mitochondrial variation in vertebrate muscle. **Annu. Rev. Physiol.**, 65:177-201, 2003.*

Nagata Y, Takahashi N, Davis RJ, Todokoro K. *Activation of p38 MAP kinase and JNK but not ERK is required for erythropoietin-induced erythroid differentiation. **Blood**, (6): 1859-69, 1998.*

Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Forstermann U, Murad F. *Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. FEBS. Lett.*, 316(2): 175-80, 1993.

Nathan C. *Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J.*, 6: 3051-3064, 1992.

Navdeep S, Chandel PT, Schumacker PT, Robert H. *Reactive oxygen species are downstream products of TRAF-mediated signal transduction. J. Biol. Chem.*, 276: 42728-42736, 2001.

Nemani R, Lee EY. *Reactivity of sulfhydryl groups of the catalytic subunits of rabbit skeletal muscle protein phosphatases 1 and 2A. Arch. Biochem. Biophys.*, 300(1): 24-9, 1993.

Newton DC, Bevan SC, Choi S, Robb GB, Millar A, Wang Y, Marsden PA. *Translational regulation of human neuronal nitric-oxide synthase by an alternatively spliced 5'-untranslated region leader exon. J. Biol. Chem.*, 278(1): 636-44, 2003.

Nguyen TT, Scimeca JC, Filloux C, Peraldi P, Carpentier JL, Van Obberghen E. *Co-regulation of the mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1, and the 90-kDa ribosomal S6 kinase in PC12 cells. Distinct effects of the neurotrophic factor, nerve growth factor, and the mitogenic factor, epidermal growth factor. J. Biol. Chem.*, 268(13): 9803-10, 1993.

Nicholls DG, Locke RM. *Thermogenic mechanisms in brown fat. Physiol. Rev.*, 64(1): 1-64, 1984.

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. *A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J. Immunol. Methods.*, 139(2): 271-9, 1991.

O'Rourke B. *Myocardial K_{ATP} channels in preconditioning.* **Circ. Res.**, 87: 845-855, 2000.

Palade G. *The fine structure of mitochondria.* **Anal. Rec.**, 114: 427-451, 1952.

Parker CG, Hunt J, Diener K, McGinley M, Soriano B, Keesler GA, Bray J, Yao Z, Wang XS, Kohno T, Lichenstein HS. *Identification of stathmin as a novel substrate for p38 delta.* **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 249(3): 791-6, 1998.

Paxinou E, Weisse M, Chen Q, Souza JM, Hertkorn C, Selak M, Daikhin E, Yudkoff M, Sowa G, Sessa WC, Ischiropoulos H. *Dynamic regulation of metabolism and respiration by endogenously produced nitric oxide protects against oxidative stress.* **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 98: 11575-80, 2001.

Peralta JG, Finocchietto PV, Converso D, Schöpfer F, Carreras MC, Poderoso JJ. *Modulation of mitochondrial nitric oxide synthase and energy expenditure in rats during cold acclimation.* **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, 284(6): H2375-83, 2003.

Perregaux DG, Dean D, Cronan M, Connelly P, Gabel CA. *Inhibition of interleukin-1 beta production by SKF86002: evidence of two sites of in vitro activity and of a time and system dependence.* **Mol. Pharmacol.**, 48(3): 433-42, 1995.

Pestell RG, Albanese C, Reutens AT, Segall JE, Lee RJ, Arnold A. *The cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation.* **Endocr. Rev.**, 20(4): 501-34, 1999.

Poderoso JJ, Boveris A. *Regulation of oxygen metabolism by nitric oxide.* In **Nitric oxide: Biology and Pathobiology**, (Ed. L. Ignarro) Cap. 23, pp355-368, Academic Press, San Diego, 2000.

Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobó N, Schöpfer F, Boveris A. *Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles.* **Arch. Biochem. Biophys.**, 328: 85-92, 1996.

Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobo N, Shöpfer F, Boveris A. *Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles.* **Arch. Biochem. Biophys.** 328: 85-92, 1996.

Poderoso JJ, Carreras MC, Schöpfer FJ, Lisdero CL, Riobó NA, Giulivi C, Evelson P, Boveris A, Cadenas E. The reaction of nitric oxide with ubiquinol: kinetic properties and biological significance. **Free Radic. Biol. & Med.**, 26 (7/8): 925-935, 1999a.

Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero CL, Schöpfer FJ, Riobó NA, Cadenas E, Boveris A. *The regulation of mitochondrial oxygen uptake by redox reactions involving nitric oxide and ubiquinol.* **J. Biol. Chem.**, 274 (53): 37709-37716, 1999b.

Pollock JS, Klinghofer V, Forstermann U, Murad F. *Endothelial nitric oxide synthase is myristylated.* **FEBS. Lett.**, 309: 402-404, 1992.

Potapova O, Anisimov SV, Gorospe M, Dougherty RH, Gaarde WA, Boheler KR, Holbrook NJ. *Targets of c-Jun NH(2)-terminal kinase 2-mediated tumor growth regulation revealed by serial analysis of gene expression.* **Cancer Res.**, 62(11): 3257-63, 2002.

Pouyssegur J, Lenormand P. *Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling.* **Eur. J. Biochem.**, 270(16): 3291-9, 2003.

Pouyssegur J, Volmat V, Lenormand P. *Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling.* **Biochem. Pharmacol.**, 64(5-6):755-63, 2002.

Proietti C, Salatino M, Rosembliht C, Carnevale R, Pecci A, Kornblihtt AR, Molinolo AA, Frahm I, Charreau EH, Schillaci R, Elizalde PV. *Progestins induce transcriptional activation of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) via a Jak- and Src-dependent mechanism in breast cancer cells. Mol. Cell. Biol., 25(12): 4826-40, 2005.*

Pryor WA, Squadrito GL. *The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. Am. J. Physiol., 268: L699-L722, 1995.*

Richards MK, Marletta MA. *Characterization of neuronal nitric oxide synthase and a C415H mutant, purified from a baculovirus overexpression system. Biochemistry, 33(49): 14723-32, 1994.*

Rickwood D, Wilson MT, Darley-Usmar VM. *Isolation and characteristics of intact mitochondria. En Mitochondria: a practical approach (Darley-Usmar V.M, Rickwood D & Wilson MT eds.) IRL Press, Washington, pp:1-16, 1987.*

Riobo N, Melani M, Sanjuan N, Fiszman M, Gravielle M, Carreras MC, Cadenas E, Poderoso JJ. *The modulation of mitochondrial nitric-oxide synthase activity in rat brain development. J. Biol. Chem., 277(45): 42447-55, 2002.*

Riobó NA, Clementi E, Melani M, Boveris A, Cadenas E, Moncada S, Poderoso JJ. *Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH:ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation. Biochem J., 359:139-45, 2001.*

Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, Tuft RA, Pozzan T. *Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. Science, 280(5370): 1763-6, 1998.*

Rolfe DF, Brand MD. *The physiological significance of mitochondrial proton leak in animal cells and tissues. Biosci. Rep., 17(1): 9-16, 1997.*

Roux PP, Blenis J. *ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68(2): 320-44, 2004.

Ruffels J, Griffin M, Dickenson JM. *Activation of ERK1/2, JNK and PKB by hydrogen peroxide in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of ERK1/2 in H₂O₂-induced cell death. Eur. J. Pharmacol.*, 483(2-3): 163-73, 2004.

Rutter GA, Rizzuto R. *Regulation of mitochondrial metabolism by ER Ca²⁺ release: an intimate connection. Trends. Biochem. Sci.*, 25(5): 215-21, 2000.

Ruvolo PP, Deng X, Carr BK, May WS. *A functional role for mitochondrial protein kinase Calpha in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. J. Biol. Chem.*, 273(39): 25436-42, 1998.

Sabapathy K, Jochum W, Hochedlinger K, Chang L, Karin M, Wagner EF. *Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. Mech. Dev.*, 89(1-2): 115-24, 1999.

Savitsky PA, Finkel T. *Redox regulation of Cdc25C. J. Biol. Chem.*, 277(23): 20535-40, 2002

Sarafian TA, Bredesen DE. *Is apoptosis mediated by reactive oxygen species? Free Radic Res.*, 21(1): 1-8, 1994.

Schöpfer FJ, Riobo NA, Carreras MC, Alvarez B, Cadenas E, Radi R, Boveris A, Poderoso JJ. *Oxidation of ubiquinol by peroxynitrite: implications for nitrosative damage in mitochondria. Biochem. J.*, 349: 35-42, 2000.

Scott DJ, Hull MA, Cartwright EJ, Lam WK, Tisbury A, Poulosom R, Markham AF, Bonifer C, Coletta PL. *Lack of inducible nitric oxide synthase promotes intestinal tumorigenesis in the Apc (-/+) mouse. Gastroenterology*, 121: 889-99, 2001.

Seglen, P.O. *Preparation of rat liver cells. Exp. Cell Res.*, 74: 450-454, 1972.

Shaulian E, Karin M. *AP-1 as a regulator of cell life and death. Nat. Cell Biol.*, 4(5): E131-6, 2002.

Shaw AW, Vosper AJ. *Solubility of nitric oxide in aqueous and non-aqueous solvents. J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 8: 1239-1244, 1977.

Sherman PA, Laubach VE, Reep BR, Wood ER. *Purification and cDNA sequence of an inducible nitric oxide synthase from a human tumor cell line. Biochemistry*, 32(43): 11600-5, 1993.

Sheta EA, McMillan K, Masters BS. *Evidence for a bidomain structure of constitutive cerebellar nitric oxide synthase. J. Biol. Chem.*, 269(21): 15147-53, 1994.

Shi Q, Xiong Q, Wang B, Le X, Khan NA, Xie K. *Influence of Nitric Oxide Synthase II Gene Disruption on Tumor Growth and Metastasis. Cancer Res.*, 60: 2579–2583, 2000.

Silvagno F, Xia H, Bredt DS. *Neuronal nitric oxide synthase- μ , an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. J. Biol. Chem.*, 271: 11204-11208, 1996.

Simonnet H, Alazard N, Pfeiffer K, Gallou C, Beroud C, Demont J, Bouvier R, Schagger H, Godinot C. *Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma. Carcinogenesis*, 23: 759-68, 2002.

Sjöstrand FS. *The ultrastructure of cells as revealed by electron microscope. Int. Rev. Cytol.*, 5: 455-533, 1956.

Slater A, Stefan C, Nobel I, van den Dobbsteven D, Orrenius S. *Intracellular redox changes during apoptosis. Cell Death Differ.*, 3: 57-62, 1996.

Stanbury DM. *Reduction potentials involving inorganic free radicals in aqueous solutions. Adv. Inorg. Chem.*, 33: 69-138, 1989.

Stryer L. en *Biochemistry* (3ra. edición) Freeman, New York, 1988.

Sumbayev VV, Yasinska IM. *Regulation of MAP kinase-dependent apoptotic pathway: implication of reactive oxygen and nitrogen species. Arch. Biochem. Biophys.*, 436(2): 406-12, 2005.

Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. *Small GTP-binding proteins. Physiol. Rev.*, 81(1): 153-208, 2001.

Takenaka K, Moriguchi T, Nishida E. *Activation of the protein kinase p38 in the spindle assembly checkpoint and mitotic arrest. Science*, 280(5363): 599-602, 1998.

Tang F, Tang G, Xiang J, Dai Q, Rosner MR, Lin A. *The absence of NF-kappaB-mediated inhibition of c-Jun N-terminal kinase activation contributes to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. Mol. Cell. Biol.*, 22(24): 8571-9, 2002.

Tang G, Minemoto Y, Dibling B, Purcell NH, Li Z, Karin M, Lin A. *Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. Nature*, 414(6861): 313-7, 2001.

Tanoue T, Maeda R, Adachi M, Nishida E. *Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. EMBO J.*, 20(3): 466-79, 2001.

Tanoue T, Nishida E. *Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. Cell Signal.*, 15(5): 455-62, 2003.

Terada H. *Uncouplers of oxidative phosphorylation. Environ. Health Perspect.*, 87:213-8, 1990.

Torii S, Nakayama K, Yamamoto T, Nishida E. *Regulatory mechanisms and function of ERK MAP kinases. J. Biochem.*, (Tokyo) 136(5): 557-61, 2004.

Torres J, Darley-Usmar V, Wilson MT. *Inhibition of cytochrome c oxidase in turnover by nitric oxide: mechanism and implications for control of respiration. Biochem. J.*, 312: 169-173, 1995.

Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimnual A, Bar-Sagi D, Jones SN, Flavell RA, Davis RJ. *Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. Science*, 288(5467): 870-4, 2000.

Traverse S, Gomez N, Paterson H, Marshall C, Cohen P. *Sustained activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade may be required for differentiation of PC12 cells. Comparison of the effects of nerve growth factor and epidermal growth factor. Biochem. J.*, 288 (2): 351-5, 1992.

Trumpower BL. *The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc₁ complex. J. Biol. Chem.*, 265: 11409-11412, 1990.

Tsai R, McKay R. *A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. Genes & Development*, 16: 2991 - 3003, 2002.

Urtreger AJ, Diamant MJ, Ranuncolo SM, Vidal MC, Puricelli LI, Klein SM, Bal de Kier Joffé E. *New murine cell line derived from spontaneous lung tumor induces paraneoplastic syndromes. Int. J. Oncol.*, 18: 639- 647, 2001.

Urtreger AJ, Ladeda VE, Puricelli LI, Rivelli A, Vidal MC, Lustig ES, Bal de Kier Joffé E. *Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated with invasive and metastatic phenotype in two new murine mammary tumor cell lines. Int. J. Oncol.*, 11: 489-496, 1997.

van den Heuvel L, Smeitink J. *The oxidative phosphorylation (OXPHOS) system: nuclear genes and human genetic diseases. Bioessays*, 23(6): 518-25, 2001.

Wang W, Chen JX, Liao R, Deng Q, Zhou JJ, Huang S, Sun P. *Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. Mol. Cell. Biol.*, 22(10): 3389-403, 2002.

Wang X, McGowan CH, Zhao M, He L, Downey JS, Fearn C, Wang Y, Huang S, Han J. *Involvement of the MKK6-p38gamma cascade in gamma-radiation-induced cell cycle arrest. Mol. Cell. Biol.*, 20(13): 4543-52, 2000.

Wang Y, Newton DC, Robb GB, Kau CL, Miller TL, Cheung AH, Hall AV, VanDamme S, Wilcox JN, Marsden PA. *RNA diversity has profound effects on the translation of neuronal nitric oxide synthase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96(21): 12150-5, 1999.

Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. *Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. Science*, 270(5240): 1326-31, 1995.

Xie K, Huang S. *Contribution of nitric oxide-mediated apoptosis to cancer metastasis inefficiency. Free Rad. Biol. Med.*, 34: 969-986, 2003.

Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ. *BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. Mol. Cell. Biol.*, 19(12):8469-78, 1999.

Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincon M, Zheng TS, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA. *Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. Nature*, 389(6653): 865-70, 1997.

Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. *Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. Science*, 275(5303): 1129-32, 1997.

Yee AS, Paulson EK, McDevitt MA, Rieger-Christ K, Summerhayes I, Berasi SP, Kim J, Huang CY, Zhang X. *The HBPI transcriptional repressor and the p38 MAP kinase: unlikely partners in G1 regulation and tumor suppression. Gene*, 336(1): 1-13, 2004.

Yu C, Minemoto Y, Zhang J, Liu J, Tang F, Bui TN, Xiang J, Lin A. *JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD. Mol. Cell*, 13(3): 329-40, 2004.

Zarubin T, Han J. *Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. Cell Res.*, 15(1): 11-8, 2005.

Zeviani M, Tiranti V, Piantadosi C. *Mitochondrial disorders. Medicine* (Baltimore). 77(1); 59-72, 1998.

Zhang L, Jope RS. *Oxidative stress differentially modulates phosphorylation of ERK, p38 and CREB induced by NGF or EGF in PC12 cells. Neurobiol. Aging.*, 20(3): 271-8, 1999.

Zhong WB, Wang CY, Ho KJ, Lu FJ, Chang TC, Lee WS. *Magnolol induces apoptosis in human leukemia cells via cytochrome c release and caspase activation. Anticancer Drugs*, 14(3): 211-7, 2003.