

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

*Facultad de Ciencias*

Departamento de Fisiología



*TESIS DOCTORAL*

**SEÑAL DE CALCIO Y OXIDANTES  
EN LA APOPTOSIS DE CÉLULAS  
LEUCÉMICAS HL-60**

Presentada por **D. David González Flores** para optar al título de **Doctor Europeo** por la Universidad de Extremadura.

Dirigida por el Dr. José Antonio Pariente Llanos y la Dra. Ana Beatriz Rodríguez Moratino.





**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
Campus Universitario  
Avda. de Elvas, s/n  
06006 Badajoz  
Teléfono: 924-289300 EXT. 86956  
Fax: 924-289388

Dña. ANA BEATRIZ RODRÍGUEZ MORATINOS, Profesora Titular de Universidad y D. JOSÉ ANTONIO PARIENTE LLANOS, Catedrático de Universidad, ambos del Departamento de Fisiología de la UEX,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral, presentada por D. David González Flores, con el título: **“SEÑAL DE CALCIO Y OXIDANTES EN LA APOPTOSIS DE CÉLULAS LEUCÉMICAS HL-60”**, ha sido realizada bajo nuestra dirección, en el Departamento de Fisiología (Facultad de Ciencias) de la Universidad de Extremadura, entendiendo que se encuentra finalizada y que reúne los requisitos de originalidad, autorizan su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que conste a efectos oportunos, firman el presente documento en Badajoz, a 18 de Febrero de 2013

Fdo. Ana Beatriz Rodríguez Moratinos

Fdo. José Antonio Pariente Llanos





Este trabajo de investigación ha sido realizado con cargo al Proyecto de Investigación del Ministerio de Ciencia e Innovación BFU-2010-15049



# ***AGRADECIMIENTOS***

Somos la suma de todas las personas que hemos conocido. Esa verdad resulta evidente, y aunque este texto está lejos de ser un ejercicio de introspección, no quería desaprovechar la oportunidad para decir que yo no soy una excepción. Nadie podría decirme cómo sería si hubiera tenido otros padres, otra familia, otros amigos, otro ambiente... Pero a día de hoy, en febrero de 2013, miro hacia atrás y veo cuán distinto era hace diez, quince años. Es en ese preciso momento cuando comprendo la enorme influencia que una serie de personas, para bien o para mal, me han ayudado a la hora de forjar mi personalidad. Sinceramente, espero haber contribuido también en la vida de unas pocas personas a las que admiro en distintos ámbitos y que son también responsables de que hoy remate este documento, a punto de ser impreso y encuadernado.

No podría comenzar de otra manera este apartado que recordando a las dos personas que me han acompañado todo este tiempo. A vosotros, José Luis y María de los Ángeles, mis padres. Mi Doctorado es el reflejo de los valores que ambos me habéis inculcado, con la honestidad y el corazón por bandera. Mejor que nadie sabéis como ha sido mi vida, y por qué tipo de situaciones he ido pasando. Conocéis sin duda los detalles de cada una de las etapas que he tenido desde preescolar hasta hoy en día, y como me he sentido. Fueran buenas o malas etapas, siempre habéis confiado en mí y en mi criterio para escoger mi camino, y jamás me habéis impedido conseguir mis metas. Es más, habéis tratado de potenciar aquellas áreas por las que me he sentido interesado. Sólo espero conseguir que os sintáis tan orgullosos de mí como yo lo estoy de vosotros. Espero haceros disfrutar de este trabajo, que es también vuestro.

A mi familia, especialmente a mi abuela María y mi tía Loli, siempre apoyándome, y a mis primos Alberto y Javi, que me han ayudado con la encuadernación de la tesis e incluso en mis desplazamientos a Roma. A mis amigos que tengo desde aquel lejano tiempo en el que estudiaba en el Colegio Virgen de Guadalupe: Gustavo, Copete, Ángel, Pablo, Guille, Antonio Sudón... He crecido y descubierto el mundo con vosotros, y eso no se olvida. A Bayón y Olalla, que se han comportado todo este tiempo como esos hermanos mayores que no he tenido. A mis profesores del colegio, que intentaron (con mayor o menor éxito) que mostrara todo mi potencial. A todos, siempre vuestro.

Quisiera agradecer también la orientación y perspectiva que me proporcionaron el Dr. Fernando Henao y el Dr. Francisco Centeno, los cuáles guiaron mis primeros pasos cuando más perdido y confuso estaba. Mi futuro profesional era incierto, y supieron abrir mi visión sobre el mundo científico. Reconozco que mi estancia en el Departamento de Bioquímica de Cáceres fue corta pero muy grata junto a Chus y Montaña que hicieron que me sintiese uno más aquél tiempo que pasamos juntos. Eran mis primeros momentos de doctorado, y su tenacidad, dedicación y profesionalidad me animaron a seguir con ello.

Como no podía ser de otra forma, gracias a mis directores José Antonio y Ana Beatriz he conseguido llegar hasta aquí hoy. Toda mi formación investigadora os la debo a vosotros, que me habéis mostrado como es este mundo de la ciencia. Por vuestra paciencia, consejos, amistad y consideración, siempre estará presente en mi carrera y mi persona una huella vuestra. José Antonio Pariente me brindó la oportunidad de trabajar con él y confió en mí para el desarrollo de esta tesis, a pesar de todas las dificultades. Ana siempre ha demostrado cercanía y apoyo, y no fueron pocas las veces que recurrí a ella en busca de consejo y ayuda.

Me gustaría también mostrar mi gratitud a la Dra. Carmen Barriga, por escucharme y atenderme cuando lo necesitaba, y aconsejarme sobre aquello que preguntase. Es el alma mater del Departamento y ello tiene por mi parte una gran admiración.

A mis compañeros Ignacio Bejarano y Javier Espino. Hemos trabajado junto varios años, codo con codo, y admito que vuestra ayuda ha sido fundamental en muchos momentos. Seis manos hacen más que dos, y tres cerebros piensan más rápido que uno. Además, ha sido un verdadero placer encontrarme con mis viejos compañeros de la carrera en esta nueva etapa: María, Jonathan y Cristina Carrasco. Juntos empezamos los estudios universitarios, y poco a poco los estamos concluyendo. Nadie hubiera dicho hace diez años que las cosas serían así.

A aquellos sénior del Departamento de Fisiología que tan amablemente mostraron su entera disposición para colaborar en el desarrollo de esta tesis y me enriquecieron con sus conocimientos. Sergio Paredes, Pedro Cosme, JJ, Pilar, muchas gracias por vuestra ayuda en el laboratorio así como por vuestra simpatía. Me resultó mucho más fácil adaptarme a la vida en el laboratorio gracias al buen ambiente que siempre mostráis.



Compañeros de cada día Ana Marchena, Elena, Cubero, Cristina Sánchez, Lourdes, Rafa y Sole, “la gente de aplicada”, por su colaboración y amistad. Me siento privilegiado de haberos tenido como compañeros.

I would like to thank our Turkish contributors, specially Cihangir Uguz, for their pleasant and friendly attitude. Your presence in the laboratory has been so interesting, and I feel grateful for your hospitality when I was in Isparta.

Prof.ssa Lina Ghibelli, non avrei potuto scrivere questo paragrafo senza menzionarla. Il fatto di avermi accolto nel suo gruppo mi ha permesso di conseguire il Dottorato Europeo e per questo le sono grato. Nell’Università degli Studi di Roma “Tor Vergata” ho avuto modo di imparare tantissimo, sia a livello professionale che personale. Non dimenticherò mai questa esperienza.

Vorrei, inoltre, ricordare i miei colleghi di laboratorio di Roma: Emanuele, Milena, Fanny, Rolando, Antonella, Flavia, Francesca e Ivana. Grazie a tutti per avermi fatto sentire come a casa mia e per avermi aiutato nel lavoro quando occorreva. A tutti voi auguro un futuro professionale e personale pieno di successi.

Y, por qué no, a la gente con la que ahora comparto mi vida y que siento más cercanos. David y Dani, sois mis hermanos musicales, y tenéis la capacidad de hacerme desconectar de la vorágine de tareas, trabajos, ejercicios, experimentos, exámenes, congresos y proyectos que se arremolinan diariamente en torno a mí. “Kami”, espero seguir compartiendo momentos de ocio y momentos de charla; seguro que entre los dos arreglamos el mundo. Sarai, gracias por hacerme madurar y por nuestra relajada amistad; sé que hemos aprendido mucho el uno del otro. Las dos Anas, Alberto, Agustín, Chicago, Antonio, os agradezco vuestra simpatía y amistad, y que tengáis paciencia cuando muestro mi lado menos amable. Manu, Pe y MDZ, me habéis aportado apoyo cuando las circunstancias me superaban (no muchas veces, he de aclarar, no os lo vayáis a creer demasiado), y disfruto pasando las horas muertas con vosotros, ya sea de fiesta o hablando de “vainas”. Belén, eres la última en llegar, pero también te incluyo porque me ayudaste en momentos difíciles sin esperar nada a cambio, y porque aprendo de ti cada día.



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Apoptosis.</b>	<b>3</b>
1.1.1. Evolución histórica	3
1.1.2. Caspasas	7
1.1.3. Proteínas de la familia Bcl-2	11
1.1.4. Tipos de apoptosis	14
<b>1.2. Homeostasis del calcio intracelular</b>	<b>20</b>
1.2.1. Liberación de calcio desde los depósitos intracelulares	21
1.2.2. Entrada de calcio desde el medio extracelular	25
1.2.3. Mecanismos de eliminación del calcio del citoplasma	26
1.2.4. Participación de otras organelas citoplasmáticas en la homeostasis del calcio	30
1.2.5. Papel del calcio en la apoptosis	32
<b>1.3. Especies reactivas de oxígeno</b>	<b>36</b>
1.3.1. Papel de las ROS en la apoptosis	37
1.3.2. ROS y la homeostasis del calcio	40
1.3.3. Papel de las ROS en trastornos del crecimiento Celular	43
<b>2. OBJETIVOS. OBJECTIVES.</b>	<b>47</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>53</b>
<b>3.1. Lista de reactivos</b>	<b>55</b>
3.1.1. Líneas celulares y los medios de cultivo	55

3.1.2. Fluoróforos	55
3.1.3. Otros reactivos utilizados	56
1.1.4. Composición de diferentes tampones o soluciones	57
<b>3.2. Cultivos celulares</b>	<b>59</b>
3.2.1. Cultivo de células HL-60	59
3.2.2. Cultivo de células K562	59
3.2.3. Cultivo de células U937	60
<b>3.3. Determinación de la concentración de calcio intracelular</b>	<b>61</b>
3.3.1. Características de los fluoróforos	61
3.3.2. Condiciones de carga del Fura2-AM	62
3.3.3. Condiciones de carga del Fluo4-AM	63
3.3.4. Tratamiento y elaboración de los datos obtenidos	63
<b>3.4. Determinación del potencial de membrana</b>	<b>65</b>
<b>3.5. Determinación de la actividad caspasa -3, -8 y -9</b>	<b>67</b>
3.5.1. Cuantificación de proteínas	68
<b>3.6. Viabilidad celular</b>	<b>69</b>
<b>3.7. Determinación de ROS intracelular</b>	<b>70</b>
<b>3.8. Evaluación de la apoptosis</b>	<b>71</b>
<b>3.9. Tratamiento estadístico</b>	<b>72</b>
<b>4. RESULTADOS. RESULTS.</b>	<b>73</b>
<b>4.1. Caspase-3 and -9 are activated in human myeloid HL-60 cells by calcium signal</b>	<b>77</b>
<b>4.2. Oxidative Stress-Induced Caspases are Regulated in Human Myeloid HL-60 Cells by Calcium Signal</b>	<b>87</b>
<b>4.3. TNF<math>\alpha</math>-induced apoptosis in human myeloid cell lines is dependent of intracellular ROS generation</b>	<b>95</b>
<b>4.4. TNF<math>\alpha</math>-induced apoptosis in human histiocytic lymphoma cell line is dependent of ROS generation and calcium signaling</b>	<b>121</b>

<b>5. DISCUSIÓN GENERAL.</b>	<b>151</b>
<b>6. CONCLUSIONES. CONCLUSIONS.</b>	<b>157</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>163</b>



# *Abreviaturas*

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNmt	ADN mitocondrial
ADP	Adenina nucleótido difosfato
AIF	factor inductor de la apoptosis
Akt	proteína kinasa B (PKB)
AM	Acetilmetil éster
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
Apaf-1	factor activador de proteasas apoptóticas-1
APO1	antígeno de apoptosis-1
ARNm	ácido ribonucleico
Asp	Ácido aspártico (D)
Bad	promotor de muerte asociado a Bcl-2
BAPTA	ácido 1,2-bis(o-aminofnoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético
Bcl-2	linfoma de células B-2
Bcl-B	proteína de la familia Bcl-2 cuya secuencia con alta homología con la proteína Boo (Diva)
Bcl-xL	Bcl extra-large
BH	homología Bcl-2
Bid	dominio de interacción con Bcl-2
Bik	proteína citocida de interacción Bcl-2
Ca <sup>2+</sup>	Ión calcio
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub>	Concentración de ión calcio en el citoplasma
Calpaína	proteasa activada por calcio
CaM	calmodulina
CARD	dominio de reclutamiento de caspasa
Caspasa	cisteinil-aspartato proteasa
CAT	catalasa

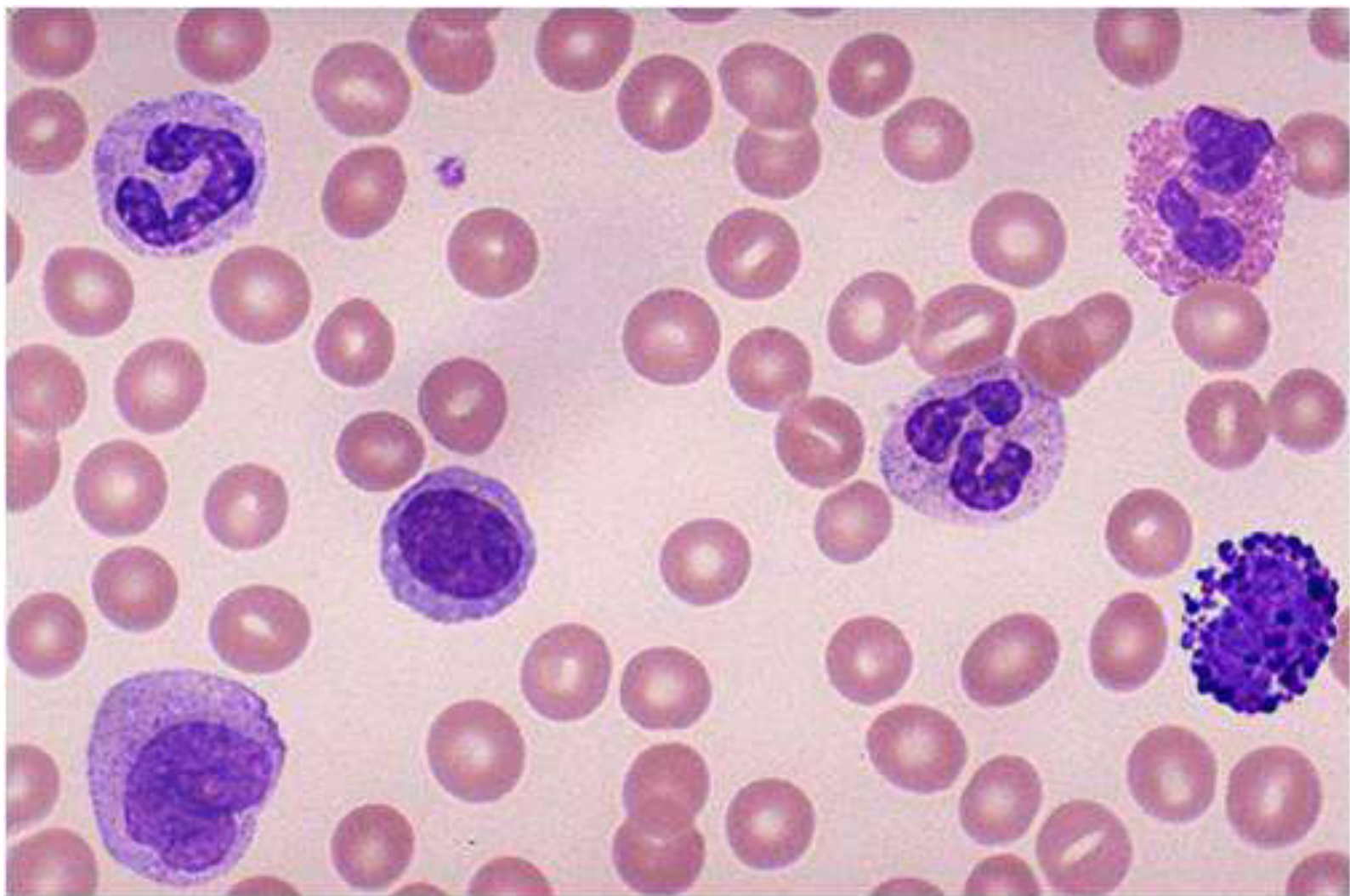
Cdk	ciclina dependiente de kinasa
Ced-9	regulador de muerte de Caenorhabditis elegans
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
CMPC	Guanosina monofosfato cíclico
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CRIC	Liberación de calcio inducida por calcio
DD	dominio de muerte
DED	dominio efector de muerte
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
ECC	Entrada capacitativa de calcio
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenglicol tetracético
ERK1	kinasa regulada por señal extracelular
ER	retículo endoplásmico
ERN	especies reactivas de nitrógeno
FADD	dominios de muerte asociados a Fas
FADH <sub>2</sub>	forma hidroquinona de flavin adenina dinucleotide (FAD)
FLIP	proteína inhibitoria FLICE
FCCP	Carbonil cianido-p-trifluorometoximetilhidrazona
FLC	Fosfolipasa C
G6PD	glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
Glu	Ácido glutámico (E)
GMPc	guanosina monofosfato cíclico
GSH	glutation reducido
GSH-Px	glutation peroxidasa
GSH-Rd	glutation reductasa
GSSG	glutation oxidado, disulfuro de glutatión
H	Histidina (His)
H <sup>+</sup>	Protón
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrógeno
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetansulfónico
Hrk	factor activador de harakiri
IAP	proteína inhibidora de apoptosis



ICAD	inhibidor de desoxirribonucleasa activada por caspasa
ICE	enzima convertidora de interleukina-1 $\beta$
IP <sub>3</sub>	Inositol 3,4,5-trifosfato
IP <sub>3</sub> R	Canal de calcio sensible a IP <sub>3</sub>
JNK	cinasa de c-Jun N-terminal
K <sup>+</sup>	Ión potasio
kDa	Kilodalton
L	Leucina (Leu)
LOX	lipoxigenasa
MAPK	proteín cinasa dependiente de mitogenos
Mcl-1	proteína de diferenciación de células de leucemia mieloide inducida
mCRIC	Liberación de calcio mitocondrial inducida por calcio
Mn <sup>2+</sup>	Ión manganeso
Na <sup>+</sup>	Ión sodio
NAADP	Nicotidamina adenina dinucleótido fosfato
NAD	dinucleotido nicotinamida y adenina
NAD(P)H	dinucleotido nicotinamida y adenina fosfato
NAT	N-acetiltransferasa
NF- $\kappa\beta$	Factor nuclear-kappa $\beta$
NK	Células “natural killers”
N-IAP	proteínas inhibidoras de la apoptosis neuronal
nm	Nanómetro
NO	Óxido nítrico
$\cdot$ NO	Radical de óxido nítrico
nM	nanomolar
O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
$\cdot$ OH	Radical hidroxilo
ONOO-	peroxinitrito
PARP	poli-ADP-ribosa polimerasa
PERK	proteína cinasa similar a kinasa de ER
PIP	Fosfoinositol fosfatasas
PKA	proteína cinasa A
PKC	proteína cinasa C

PMCA	Ca <sup>2+</sup> -ATPasa de la membrana plasmática
PPTm	poro de permeabilidad transitoria mitocondrial
PRK2	cinasa relacionada con proteína kinasa C
Puma	modulador de apoptosis sobrerregulado p53
Rb	proteínas del retinoblastoma
RYR	receptor de rianodina
ROC	Canal de calcio operado por receptores
ROS	especies reactivas de oxígeno
SERCA	Ca <sup>2+</sup> -ATPasa de retículo sarco/endoplasmico
Smac/DIABLO	Segundo activador mitochondrial de caspasas/ proteína de unión directa a IAP de pI
SMOC	Canal de calcio alterado por segundos mensajeros
SOC	Canal de calcio operado por el vaciamiento de los almacenes
SOD	superóxido dismutasa
TBHQ	2,5-di(tert-butil)-1,4-hidroquinona
TG	Tapsigargina
TNF $\alpha$	factor- $\alpha$ de necrosis tumoral
TNFR1	receptor 1 del TNF receptor
TPEN	N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine
TRAILR1	receptor de ligando inductores de apoptois relacionados con TNF
TRPC	Canales de calcio receptores de potenciales de membrana transitorios
UCP	Proteína desacopladora
UTP	Uridina-5'-trifosfato
V	Valina (Val)
VDAC	canal aniónico dependiente de voltaje
VOC	Canal de calcio operado por voltaje

# 1. INTRODUCCIÓN







# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1 APOPTOSIS

La apoptosis o “muerte celular programada”, es un mecanismo típico de organismos pluricelulares que implica la destrucción controlada de las estructuras de la célula que acaba con la integridad celular, y que resulta muy diferente *a priori* de otros tipos de muerte celular. Se caracteriza por una variedad de sucesos morfológicos y bioquímicos, que incluyen condensación de la cromatina, fragmentación del ADN, desintegración de la membrana plasmática, con externalización de fosfatidil serina (Wyllie, 1980).

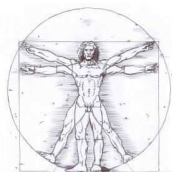
La clasificación de los distintos tipos de muerte celular resulta problemática, ya que es normal encontrarse células que presentan estados intermedios que resultan ambiguos. No obstante, se puede diferenciar los procesos de apoptosis y los de necrosis gracias a varios rasgos específicos (Tabla I).

Característica	Apoptosis	Necrosis
Resulta incontrolable	NO	SI
Se produce rotura de membrana	NO	SI
Existe respuesta inflamatoria	NO	SI
Existe desequilibrio iónico	SI	SI
Activación de proteínas específicas	SI	NO
Típico de procesos de desarrollo	SI	NO
Presencia de cuerpos apoptóticos	SI	NO

**Tabla I:** Rasgos diferenciales entre la apoptosis y la necrosis.

### 1.1.1 *Evolución histórica*

El científico alemán Carl Vogt fue el primero en describir el principio de apoptosis en 1842. En 1885, Walther Flemming realizó una descripción más precisa del proceso de la muerte celular programada. Sin embargo, no fue hasta 1965 cuando este tema



# 1. INTRODUCCIÓN

---

resurgió. Mientras estudiaba tejidos usando microscopía electrónica, John Foxtan Ross Kerr en la Universidad de Queensland fue capaz de distinguir apoptosis de la muerte celular por traumatismo (Kerr, 1965). Después de la publicación de un artículo describiendo el fenómeno, Kerr fue invitado a unirse a Alastair R Currie, así como a Andrew Wyllie, un alumno de Currie, en la Universidad de Aberdeen. En 1972, el trío publicó un artículo en el “British Journal of Cancer” (Kerr y cols., 1972). Kerr había usado inicialmente el término de necrosis celular programada, pero en el artículo, el proceso de muerte celular natural se llamó apoptosis. Kerr, Wyllie y Currie agradecieron a James Cormack, profesor de griego en la Universidad de Aberdeen, por sugerir el término apoptosis. Kerr recibió el “*Paul Ehrlich and Ludwig Darmstaedter Prize*” el 14 de marzo del 2000 por su descripción de la apoptosis. Compartió el premio con el biólogo de Boston Robert Horvitz (O’Rourke y Ellem, 2000). El Premio Nobel en Medicina del 2002 fue otorgado a Sydney Brenner, Horvitz y John E. Sulston por sus trabajos sobre apoptosis.

En griego clásico, apoptosis significa la “caída” de los pétalos u hojas de las plantas y los árboles. Cormack reintrodujo el término para uso médico como si hubiera tenido dicho significado para los griegos dos mil años atrás. Hipócrates usó el término para señalar la pérdida ósea. Galen extendió este significado a la “caída de postillas”. Todavía hoy hay dudas sobre cuál sería la correcta pronunciación en griego.

En el artículo original de Kerr, Wyllie y Currie, hay un pie de página que habla sobre la pronunciación (Kerr y cols., 1972):

*"We are most grateful to Professor James Cormack of the Department of Greek, University of Aberdeen, for suggesting this term. The word "apoptosis" (ἀπόπτωσης) is used in Greek to describe the "dropping off" or "falling off" of petals from flowers, or leaves from trees. To show the derivation clearly, we propose that the stress should be on the penultimate syllable, the second half of the word being pronounced like "ptosis" (with the "p" silent), which comes from the same root "to fall", and is already used to describe the drooping of the upper eyelid."*



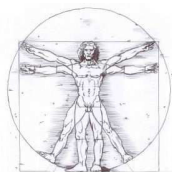
# 1. INTRODUCCIÓN

---

Con el análisis genético de la apoptosis en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, llevado a cabo por el grupo de Horvitz, comenzó la investigación sobre el mecanismo de apoptosis y se descubrió que los tres genes más importantes eran ced-3, ced-4 y ced-9. Ced-3 y ced-4 aceleran el proceso de apoptosis, mientras que ced-9 previene su curso (Hengartner y Horvitz, 1994). Posteriormente se publicó que una familia de cisteín-proteasas con especificidad por residuos de ácido aspártico eran los homólogos en mamíferos de ced-3, las denominadas caspasas. La caspasa-3, un miembro de la familia de las caspasas, está activa en la apoptosis de multitud de células, y siempre juega un papel importante en la vía de señalización de apoptosis (Yuan y cols.,1993; Alnemri y cols.,1996).

La apoptosis es un programa de muerte celular de múltiples pasos y múltiples vías que es inherente a todas las células del cuerpo. Con el cáncer, el cociente entre apoptosis y división celular sufre alteraciones. El tratamiento de cáncer por quimioterapia y radioterapia destruye las células diana básicamente induciendo apoptosis. La apoptosis es esencial para que se produzca un desarrollo normal y la desregulación de este proceso puede conducir a una variedad de defectos que son letales en embriones, perturbación específica de tejidos y una alta susceptibilidad al cáncer. Aunque extensos estudios bioquímicos y morfológicos han revelado diferentes mecanismos involucrados en el desarrollo de la apoptosis, los eventos clave que subyacen a la inducción de apoptosis permanecen desconocidos. Numerosos genes que codifican productos reguladores de la apoptosis están altamente conservados a través de la evolución, aportando la prueba de que el mecanismo de apoptosis y su regulación es una propiedad fundamental de las células eucarióticas en animales, plantas y levaduras (Trubiani y cols., 2005). Por ejemplo, la diferenciación de los dedos de la mano y del pie en un embrión humano en desarrollo ocurre porque las células entre los dedos entran en apoptosis; el resultado es que no tenemos los dígitos palmeados.

Una célula inicia la señalización apoptótica en respuesta a estrés, el cual puede conducir al suicidio celular. La unión de receptores nucleares por glucocorticoides, calor, falta de nutrientes, infección vírica, hipoxia y un incremento de la concentración del calcio intracelular (Mattson & Chan, 2003), por ejemplo, por daño a la membrana, puede conducir a la liberación de señales apoptóticas intracelulares debido a daño



# 1. INTRODUCCIÓN

---

celular. Una gama de componentes celulares, tales como la poli-ADP ribosa polimerasa, podrían ayudar a regular la apoptosis (Chiarugi & Moskowitz, 2002).

Antes de que el proceso real de muerte celular sea desencadenado por enzimas, las señales apoptóticas deben causar que las proteínas reguladoras inicien la vía apoptótica. Este paso permite a las señales apoptóticas causar muerte celular, o que el proceso se detenga, si la célula ya no necesitase morir. Varias proteínas están implicadas, pero se han identificado dos métodos principales de regulación: afectando la funcionalidad mitocondrial, o directamente transduciendo la señal vía proteínas adaptadoras a los mecanismos apoptóticos. Otra vía extrínseca de iniciación identificada en varios estudios de toxinas es un incremento de la concentración de calcio en la célula causada por la actividad del fármaco, el cual también puede causar apoptosis vía calpaínas.

Se pueden establecer tres estadios o eventos en el fenómeno apoptótico: fase inductora (genética: con la expresión descontrolada de genes, por ejemplo: p53); fase efectora (donde entran en juego de manera muy activa las ROS) y fase degradativa (con la producción de cuerpos apoptóticos) (Mates, 1999). Estas fases de muerte celular, pueden ser estimuladas por numerosos factores: hipertermia, radiación ionizante, agentes quimioterapéuticos y la ausencia de ciertos factores de crecimiento. Pero los investigadores, en los últimos años, han llegado a la conclusión de que las ROS, desencadenan sin lugar a dudas, señales que participan en la aparición de fenómenos apoptóticos (Park y cols., 2004).

Entre cincuenta mil y setenta mil millones de células mueren cada día debido a apoptosis de promedio en un humano adulto. Para un niño de entre 8 y 14 años, la media es de aproximadamente veinte mil y treinta mil millones de células al día.

La investigación en torno a la apoptosis se ha incrementado sustancialmente desde el principio de la década de los noventa. Además de su importancia como fenómeno biológico, procesos defectivos de apoptosis están implicados en una amplia variedad de enfermedades. Un exceso de apoptosis causa atrofia, mientras que una cantidad insuficiente de ella resulta en proliferación celular incontrolada, como el cáncer.





# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1.2 *Caspasas*

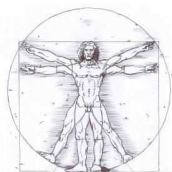
Las caspasas son un grupo de proteasas citosólicas que reciben este nombre debido a que todas tienen un grupo cisteína reducido en el centro activo; así mismo, la mayoría de ellas reconocen una secuencia de 4 aminoácidos (x-Glu-x-Asp) y cortan el enlace peptídico del lado carboxilo de ese aspártico, lo cual ha permitido desarrollar inhibidores específicos (Thornberry y cols., 1997); el otro aspecto que le da nombre es el hecho de que son hidrolasas. De todo esto se extrae el nombre caspasa (Cisteína ASPártico hidrolASA).

### - Clasificación de las caspasas

Desde un punto de vista funcional se clasifican en caspasas iniciadoras y caspasas ejecutoras. Dentro de las caspasas iniciadoras están la -2, -8, -9 y -10. Son autoactivantes. Tienen un prodominio amino terminal, presentando dominios estructurales similares. Estos pueden ser o dominios DED (*Death Efector Domain*) o CARD (*Caspase Recruitment Domain*). Los receptores de muerte, tales como Fas (también conocido como APO-1 o CD95) (Kischkel y cols., 1995) presentan dominios como DED y CARD en su zona intracelular. Ciertas proteínas adaptadoras como Mot 1 anclan las caspasas a estos dominios y al receptor.

Entre las caspasas ejecutoras están la -3, -6 y -7. Tienen un prodominio de 20-30 aminoácidos eliminados también por proteólisis sin dominios estructurales. La proteólisis que las activan suele ser llevada a cabo por las caspasas iniciadoras. Todas las caspasas son sintetizadas como cimógenos (aunque se ha visto que la caspasa -8 tiene cierta actividad incluso antes de ser separada de su prodominio). Los motivos CARD y DED son motivos de interacción con los que se asocian proteínas adaptadoras tales como Apaf-1, PIDD-cosoma, inflamosoma, FADD, etc.

Otra caspasa de mamíferos es la caspasa -14. En invertebrados está Ced-1, Dcp-1 y Promo.



# 1. INTRODUCCIÓN

---

## - Mecanismos de activación de caspasas

La activación de las procaspasas implica el procesamiento proteolítico en los residuos de ácido aspártico que separan cada uno de estos tres dominios de la proenzima con la finalidad de separarlos (Rotonda y cols., 1996). Tras la proteólisis se produce una asociación entre la subunidad grande y la pequeña para formar un heterodímero, y dos heterodímeros se asocian para formar un tetrámero con dos sitios catalíticos independientes que unirán y cortarán el sustrato (Figura 1) (Rotonda y cols., 1996).

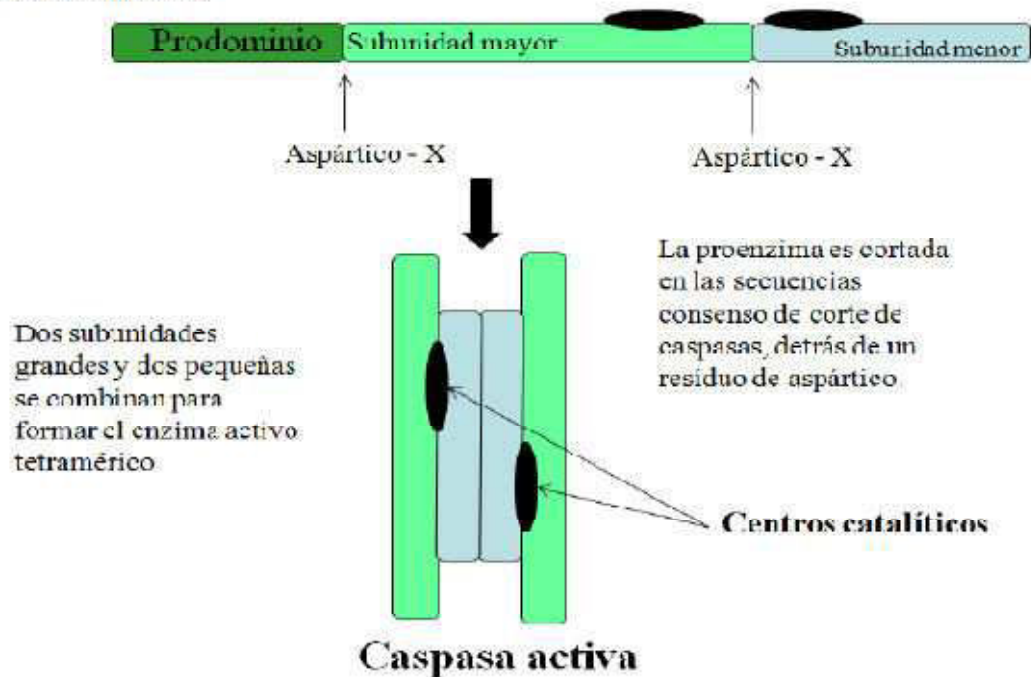
Existen tres mecanismos generales de activación de caspasas:

- **Activación por otra caspasa.** Todos los dominios derivan de la proenzima por un corte en el residuo de ácido aspártico, el sitio de consenso de las caspasas, implicando que estas enzimas puedan autoactivarse o ser activadas por otras caspasas como parte de una cascada de amplificación. Esta estrategia es utilizada para la activación de las caspasas efectoras de prodominio corto (Salvesen & Dixit, 1997).
- **Activación inducida por proximidad.** Este tipo de activación requiere de participación de los receptores de muerte situados en la superficie de la membrana plasmática. Después de la activación, estos receptores se agregan y reclutan una serie de moléculas adaptadoras y a las procaspasas formando complejos de señalización de inducción de muerte o DISC (*death-inducing signalling complex*) (Wallach y cols, 1998; Abe y cols., 2000). En estas condiciones se aumenta la concentración local de estas procaspasas y su baja e intrínseca actividad proteasa es suficiente para permitir que varias moléculas inactivas se corten mutuamente y se activen unas a otras (Ashkenazi & Dixit, 1998; Boatright & Salvesen, 2003). Esta estrategia es utilizada para la activación de las procaspasas -8 y -10 durante el desarrollo de la apoptosis extrínseca activada por los receptores de muerte que será descrita con más detalle en posteriores apartados (Fan y cols., 2005).



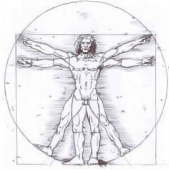
# 1. INTRODUCCIÓN

## Proenzima inactiva



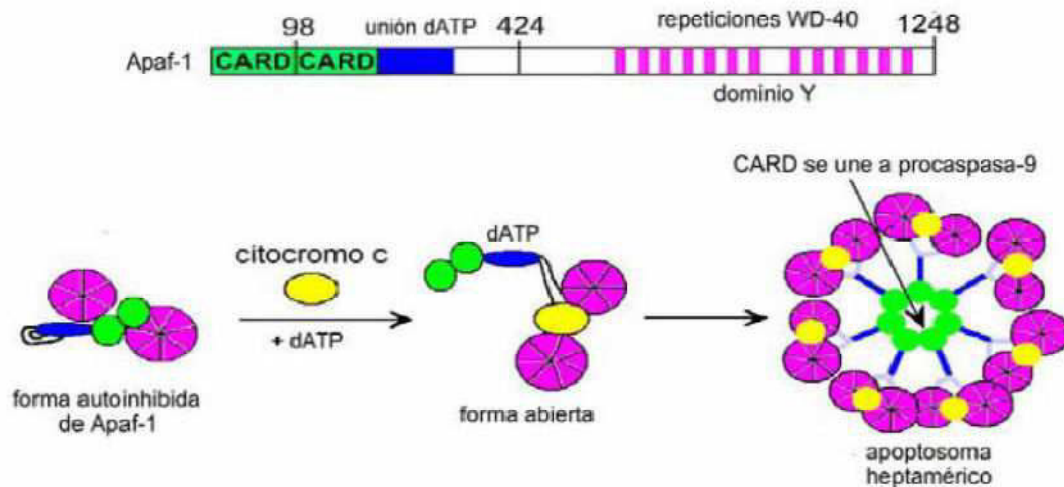
**Figura 1.** Activación de las procaspasas. Las procaspasa contiene tres dominios: un prodominio, una subunidad grande y otra pequeña. La procaspasa es inactiva y una vez que sufre dos roturas proteolíticas se separan las tres subunidades. La subunidad grande y la pequeña forman un heterodímero por unión de sus sitios activos. La unión de dos heterodímeros para formar el heterotetrámero activo tiene lugar entre las dos subunidades pequeñas adyacentes rodeadas por las subunidades grandes.

- **Asociación con una subunidad reguladora.** El mecanismo de activación más complejo es el utilizado por la caspasa-9, que requiere de una molécula reguladora Apaf-1 (Figura 2). Apaf-1 presenta 3 dominios funcionales: en el extremo amino hay una secuencia CARD con una alta homología a la secuencia CARD de la caspasa-9, en la zona central presenta un dominio de unión del dATP y, finalmente, en el extremo carboxilo presenta el dominio WD-40, rico en dobletes de residuos triptófano y ácido aspártico que se repiten 40 veces. Este último está considerado como un dominio de unión proteína-proteína a través de cual el citocromo *c* interacciona con Apaf-1 (Hu y cols., 1998). La unión del citocromo *c* y de la molécula de ATP facilita un cambio conformacional en la estructura de Apaf-1 permitiendo que oligomerice con otras moléculas de Apaf-1 y forme un heptámero, surgiendo una estructura denominada apoptosoma, que



# 1. INTRODUCCIÓN

reclutará procaspasas-9 a través de interacciones entre los dominios CARD presentes tanto en el Apaf-1 como en la procaspasa 9 (Jiang & Wang, 2000; Shi, 2002). La activación de la procaspasa 9 dentro del apoptosoma se produce por una proteólisis autocatalítica (Figura 2) (Fan y cols., 2001; Arnoult y cols., 2003).



**Figura 2.** Formación del apoptosoma. El Apaf-1, factor activador de proteasas apoptóticas, está formado por tres dominios: dominio CARD o de reclutamiento de caspasas, dominio de unión al dATP y dominio Y de repeticiones WD-40. En condiciones normales se encuentra en el citosol en forma inerte. Una vez recibidas por la célula las señales de muerte, el citocromo sale de la mitocondria. Al unirse el citocromo c y el dATP a la molécula de Apaf-1, ésta se activa y se abre dejando al exterior la superficie de oligomerización. Varias unidades Apaf-1 se unen formando el apoptosoma dejando la zona CARD en el centro que es donde va a unirse el prodominio N-terminal de las procaspasas-9 (Modificada de Cascales, 2003).

## - Apoptosis independiente de caspasas

La caracterización de las caspasas permitió el desarrollo de inhibidores de caspasas que pueden ser usados para determinar si un proceso celular implica la activación de las caspasas. Usando estos inhibidores se descubrió que las células pueden morir mostrando una morfología similar a la apoptosis sin activación caspasa. Estudios posteriores relacionaron este fenómeno a la liberación de AIF (*apoptosis inducing factor*) de la mitocondria y su translocación al núcleo mediada por su NLS (*nuclear localization*



# 1. INTRODUCCIÓN

---

*signal*). Dentro de la mitocondria, el AIF está anclado a la membrana interna. Para su liberación, dicha proteína debe ser cortada por una proteasa calpaína dependiente de calcio (Rosado y cols., 2006).

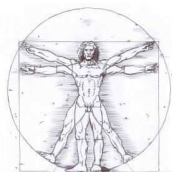
## 1.1.3 *Proteínas de la familia Bcl-2*

Bcl-2 es el miembro prototipo de una familia de proteínas que contienen al menos una región de homología Bcl-2 (BH). Esta familia de proteínas se divide en proteínas multidominio antiapoptóticas (prototipos: Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>), las cuales contienen cuatro dominios BH (BH1234) los cuales corresponden al segmento  $\alpha$ -hélice (Figura 3) (Adams y Cory, 1998; Kelekar y Thompson, 1998); proteínas multidominio (prototipos: Bax, Bak), que contienen tres dominios BH (BH 123); y proteínas proapoptóticas BH3 (prototipos: Bid, Bad) (Letai y cols., 2002). El principal sitio de acción de las proteínas tipo Bcl-2 es probablemente la membrana mitocondrial (Kroemer y Reed, 2000).

En general, los miembros anti-apoptóticos muestran conservación de secuencias en sus cuatro dominios. Las moléculas pro-apoptóticas muestran frecuentemente menos conservación de secuencia del primer segmento  $\alpha$ -helicoidal, BH4 (Korsmeyer y cols., 2000).

Los miembros anti-apoptóticos son inicialmente proteínas integrales de membrana que se encuentran en la mitocondria, retículo endoplásmico o membrana nuclear (Hockenberry y cols., 1990; Krajewski y cols., 1993; Zhu y cols., 1996). Por el contrario, una sustancial parte de ciertos miembros pro-apoptóticos se localizan en el citosol o el citoesqueleto previamente a la señal de muerte (Hsu y cols., 1997).

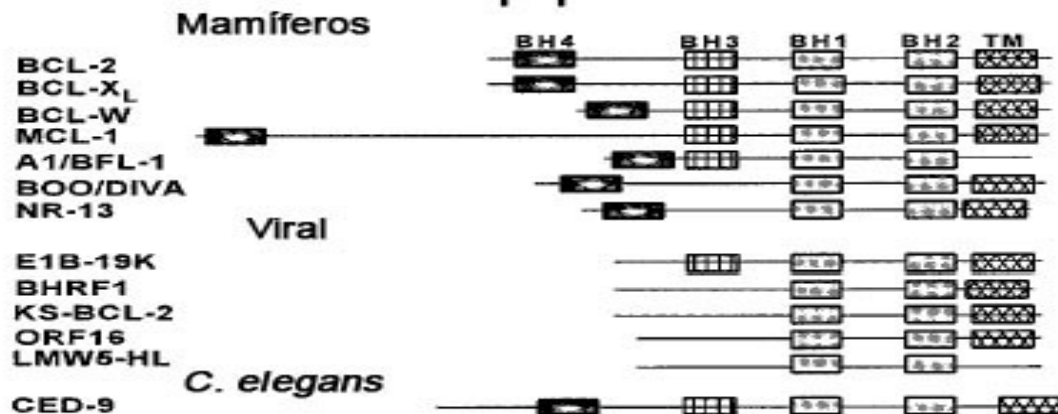
Bajo ciertas circunstancias, estímulos proapoptóticos promueven una señalización de la vía de transducción de (AP)-1/p53; estas familias de factores de transcripción regulan el promotor de Bax, conduciendo a una apoptosis dependiente de la síntesis de proteínas por incremento de los niveles de Bax y del cociente Bax/Bcl-2 (Roos & Kaina, 2006). Sin embargo, los estímulos apoptóticos típicamente activan más que la regulación de Bax. Bax está presente en el citosol de las células viables,



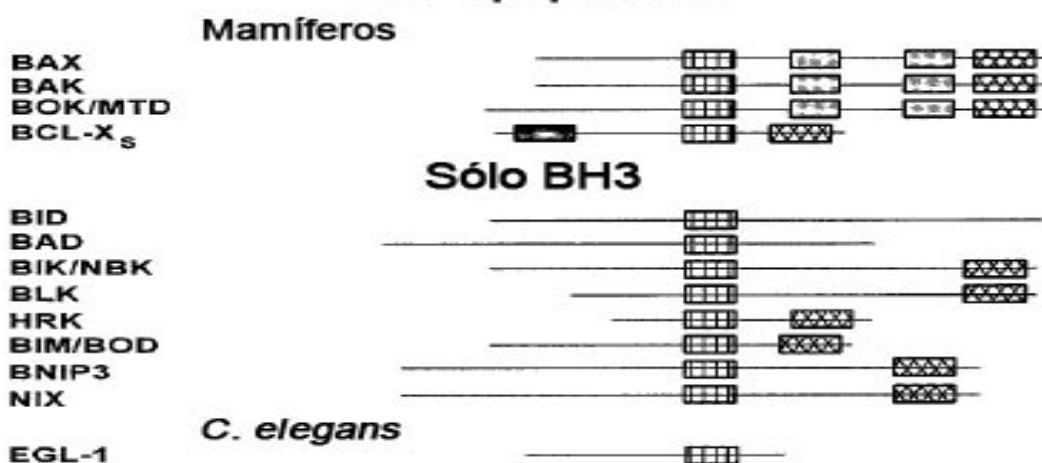
# 1. INTRODUCCIÓN

## La familia BCL-2

### Anti-apoptóticas



### Pro-apoptóticas



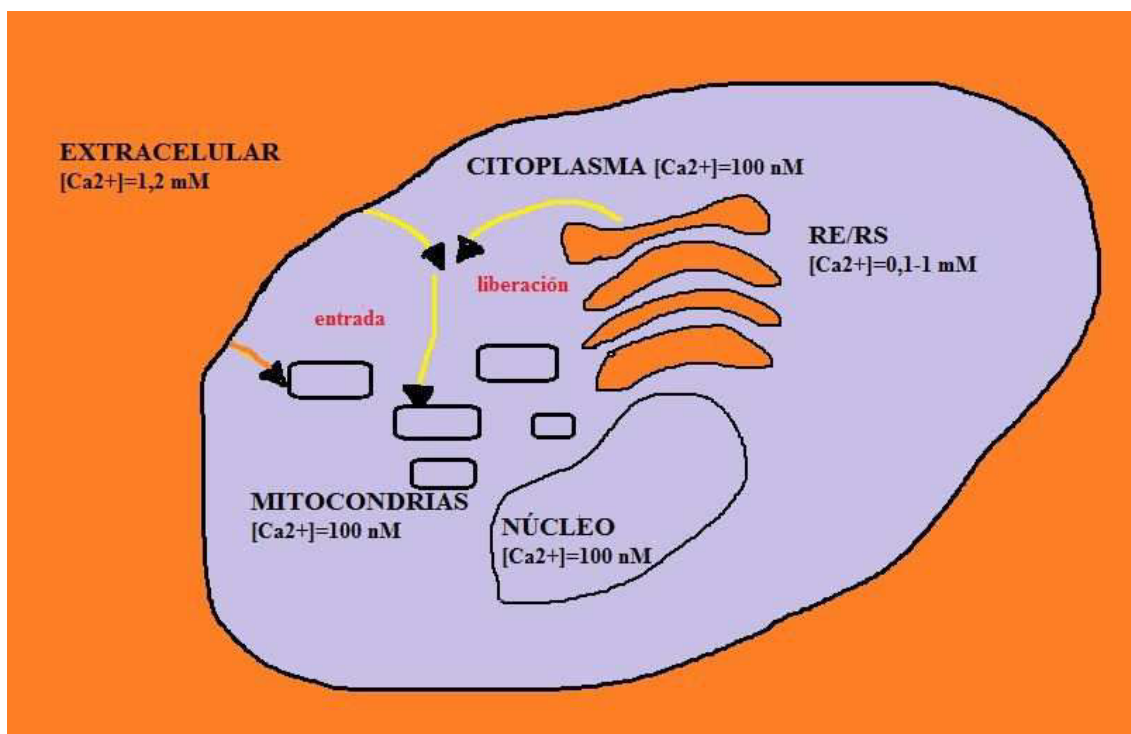
**Figura 3:** Índice de miembros pro-apoptóticos y anti-apoptóticos de la familia BCL-2. Se muestran las regiones de homología BCL-2 (BH1-4), así como los dominios hidrofóbicos carboxiloterminales (TM). (Tomado de Korsmeyer y cols., 2000).

por chaperonas como la Ku/70 (Mancinelli y cols. 2006) y 14-3-3 (Nomura y cols., 2003). Los estímulos apoptóticos liberan Bax a través de la acetilación de Ku70 (Cohen y cols., 2004) o la fosforilación de la 14-3-3 dependiente de JNK (Tsuruta y cols., 2004). La liberación de Bax es necesaria pero no suficiente para la activación, y se requieren eventos específicos adicionales. Bax puede ser activada por varios estímulos, a través de mecanismos específicos que están enfocados a diferentes dominios de la proteína, y pueden llevar a diferentes resultados finales (Ghibelli & Diedrich, 2010).

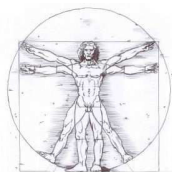


# 1. INTRODUCCIÓN

Se ha podido comprobar que los diferentes miembros de la familia Bcl-2 tienen relación con la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Así, Bcl-2 y otras proteínas anti-apoptóticas reducen los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo endoplásmico, y consecuentemente moderan la eficacia de mediadores apoptóticos que usan señales de  $\text{Ca}^{2+}$  (y la implicación de la mitocondria con sus subsiguientes efectos). De manera contraria, Bax (y otras proteínas pro-apoptóticas de la familia) promueve la recarga de los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplasmático, los cuales al expulsar su contenido, conducen a una sobrecarga en el citosol de  $\text{Ca}^{2+}$  y la consecuente implicación de la mitocondria (Giacomello y cols., 2007). El modelo está descrito de manera esquemática en la Figura 4.



**Figura 4.** Distribución de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula. Lugares con altas o bajas  $[\text{Ca}^{2+}]$  están marcados de naranja o azul, respectivamente. Vías locales y globales de propagación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  desde la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE hasta la mitocondria están marcados con flechas amarillas y naranjas, respectivamente. (Modificado de Hajnóczky *et al.*, 2003).



# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1.4 Tipos de apoptosis

La apoptosis es un mecanismo genéticamente predeterminado que puede ejecutarse a través de dos vías moleculares (Figura 5). Las mejores caracterizadas y las más prominentes se llaman vías extrínseca e intrínseca. En la vía extrínseca (también conocida como “vía del receptor de muerte”), la apoptosis es producida por la activación inducida por ligando de receptores de muerte en la superficie celular. Tales receptores de muerte incluyen el receptor-1 del factor de necrosis tumoral (TNF), CD95/Fas (el receptor de CD95L/FasL), así como los receptores -1 y -2 del ligando que induce apoptosis relacionada con TNF (TRAIL). En la vía intrínseca, juega un importante papel la mitocondria, ya que un colapso de esta por diversos factores lleva a la liberación de proteínas proapoptóticas desde la mitocondria hacia el citosol. Por esta razón a la vía intrínseca también se la conoce como “vía mitocondrial”.

### - *Vía intrínseca*

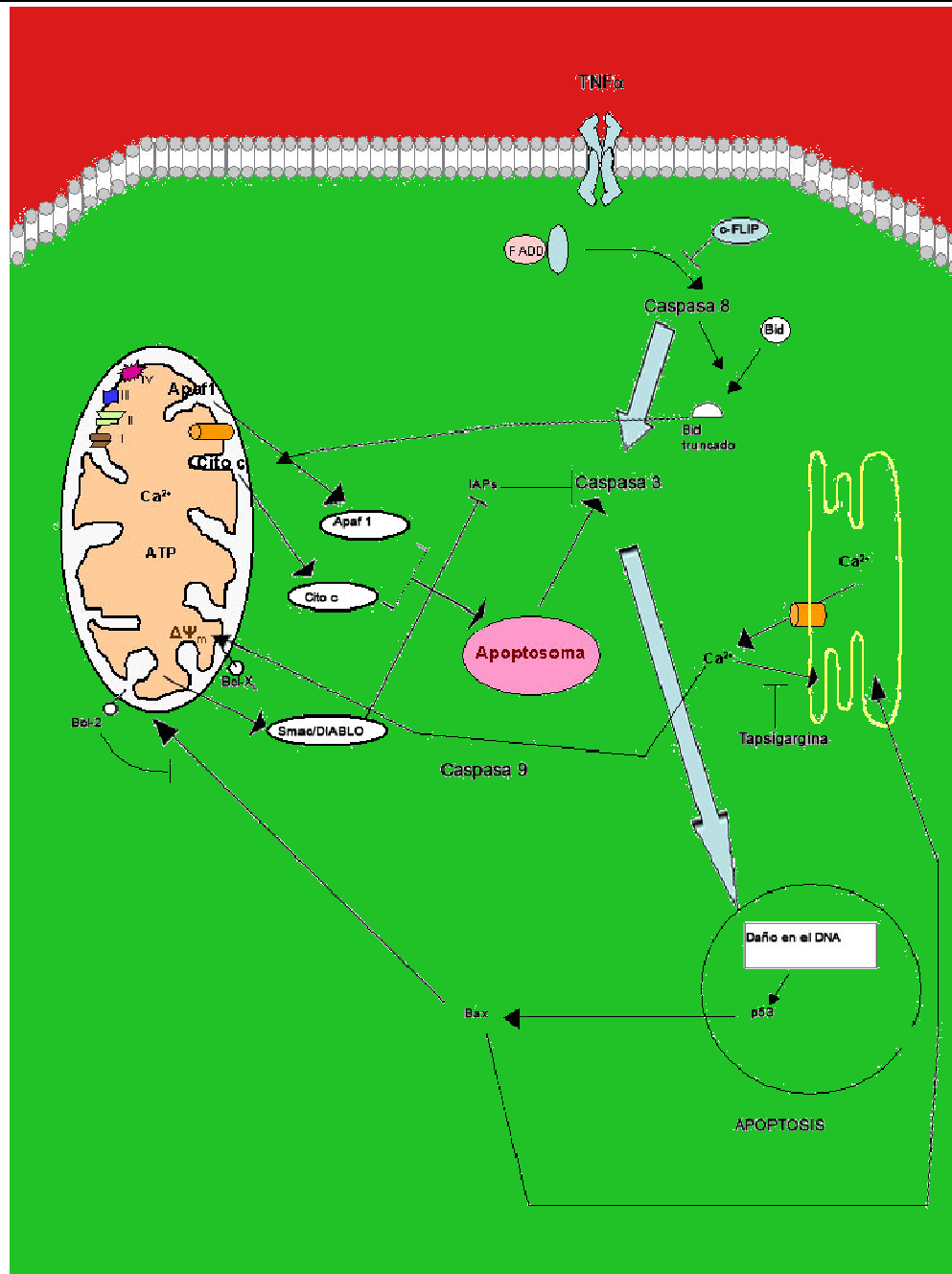
En la vía intrínseca (también conocida como “vía mitocondrial”), la apoptosis es el resultado de una cascada intracelular de eventos en la cual la permeabilización mitocondrial juega un papel crucial (Scaffidi *et al.*, 1998).

Los tumores aparecen más frecuentemente a través de la vía intrínseca que de la extrínseca debido al delicado equilibrio mitocondrial, altamente sensible a la variación en la concentración de iones (Mohan y cols., 2010). Hay también un grupo creciente de evidencias que indican que el óxido nítrico es capaz de inducir apoptosis ayudando a disipar el potencial de membrana de la mitocondria y por tanto hacerla más permeable (Brüne, 2003). Una investigación en 1999 muestra como el óxido nítrico puede tanto iniciar como inhibir la apoptosis debido a las variables celulares (Brüne y cols., 1999).

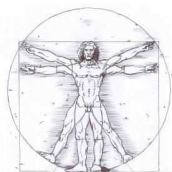




# 1. INTRODUCCIÓN



**Figura 5:** Rutas de la apoptosis: La vía extrínseca comienza con la unión de un ligando (en la figura representado por el TNF $\alpha$ ) a su receptor de membrana, lo cual activa a la caspasa-8 al inhibirse c-FLIP. La caspasa-8 por un lado activa a la caspasa-3 (conduciendo a daño en el DNA más adelante) y por otro trunca a Bid, que de esta manera produce una serie de eventos en la mitocondria que terminan en la liberación al citoplasma de citocromo c y Apaf-1, que forman el apoptosoma, y también de SMAC/Diablo, que inhibe a las IAPs (vía intrínseca). Ambos sucesos permiten también la activación de la caspasa-3. Nótese que la vía intrínseca también puede ser provocada por la liberación de calcio debido a la presencia de fármacos o de la presencia de Bax.



# 1. INTRODUCCIÓN

---

Las proteínas de la familia de Bcl-2 regulan la apoptosis ejerciendo su acción sobre la mitocondria. La activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 provocan un aumento en la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial, en concreto del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial, que produce un canal de salida en la membrana externa de las mitocondrias permitiendo así la liberación de numerosas proteínas proapoptóticas del espacio intermembrana (Hajnóczky y cols., 2003); entre ellas, SMAC/DIABLO (la cual bloquea los inhibidores de caspasas) y citocromo *c*. El PPTm, también llamado “Poro de Permeabilización Transitoria Mitocondrial” es regulado por varias proteínas, tales como las ya citadas de la familia Bcl-2 de mamíferos de genes anti-apoptóticos, las homólogas del gen *ced-9* encontrado en *C. elegans* (Dejean y cols., 2006). Las proteínas Bcl-2 son capaces de promover o inhibir la apoptosis por acción directa sobre MAC/PPMEM. Bax y/o Bak forman el poro, mientras que Bcl-2, Bcl-xL o Mcl-1 inhiben su formación.

El estrés oxidativo activa muchas respuestas incluyendo MAP cinasas tales como JNK y p38, las cuales están implicadas tanto en la ruta de supervivencia como en la de apoptosis en respuesta a estrés. La fosforilación de Bax en la treonina 167 por JNK/p38 es requerida para la translocación mitocondrial (Kim y cols., 2006), y así permitiendo así a Bax responder al estrés oxidativo.

El citocromo *c*, una vez en el citosol, se une al Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) y ATP, los cuales entonces se unen a la pro-caspasa-9 para crear un complejo proteínico multimolecular conocido como “apoptosoma”, que activa directamente a la caspasa-9. Las proteínas mitocondriales conocidas como SMACs (*small mitochondria-derived activator of caspases*) son liberadas hacia el citosol seguidamente de un incremento en la permeabilidad mitocondrial. SMAC se une a los inhibidores de proteínas apoptóticas (IAPs) y los desactiva, evitando que los IAPs detengan el proceso apoptótico y por tanto permitiendo proceder a la apoptosis. IAP también suprime normalmente la actividad de las caspasas (Fesik & Shi, 2001).

Finalmente, la caspasa-9 activa a la caspasa-3, la cual se encarga de desactivar la proteína PARP (Poli-ADP-ribosa polimerasa), encargada de la reparación del ADN. La vía mitocondrial puede conectarse también con la vía de receptores de muerte, ya que una vez activada la caspasa-8 por dichos receptores, esta caspasa activa a la proteína



# 1. INTRODUCCIÓN

---

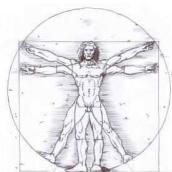
Bid, lo que provoca la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial y la activación de la caspasa-9.

## - *Vía extrínseca*

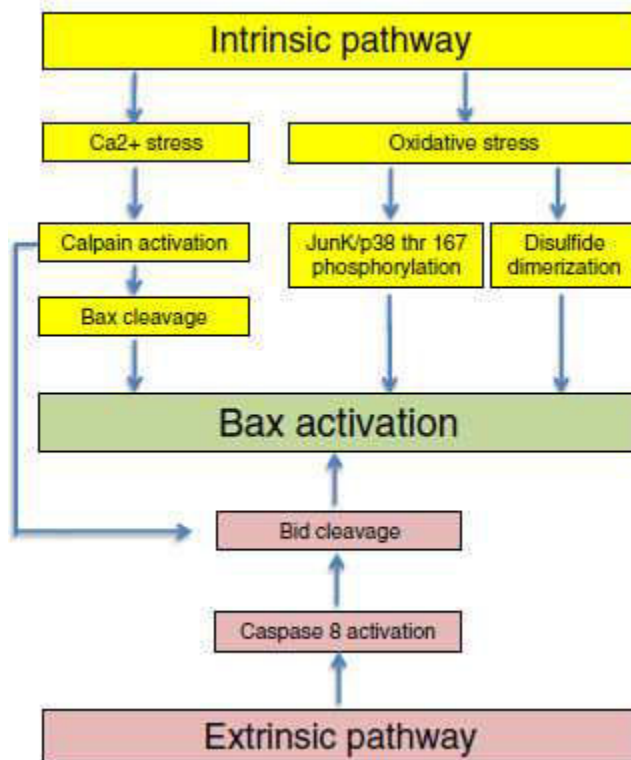
Se han sugerido dos teorías de la iniciación directa mediada por receptor de los mecanismos apoptóticos en mamíferos: el modelo inducido por TNF (tumor de necrosis tumoral) y el modelo mediado por ligando Fas-Fas, ambos involucrando a los receptores del TNF (familia TNFR) acoplados a las señales extrínsecas.

El TNF es un citoquina producida principalmente por macrófagos activado, y es el principal mediador extrínseco de apoptosis. La mayoría de las células en el cuerpo humano tienen dos receptores para TNF: TNF-R1 y TNF-R2. Se ha demostrado que la unión del TNF a TNF-R1 inicia la ruta que lleva a la activación de caspasas a través de proteínas mediadoras de membrana TRADD (*TNF receptor-associated death domain*) y las proteínas de dominio de muerte asociadas a Fas cIAP1/2 inhiben la señalización de TNF $\alpha$  uniéndose a TRAF2. FLIP inhibe la activación de caspasa-8 (FADD) (Chen & Goedel, 2002). La unión a este receptor puede también indirectamente llevar a la activación de factores de transcripción implicados en supervivencia celular y respuestas inflamatorias. La unión entre TNF y la apoptosis muestra que una producción anormal de TNF juega un papel fundamental en varias enfermedades humanas, especialmente en enfermedades autoinmunes.

El receptor de Fas (también conocido como Apo-1 o CD95) se une al ligando Fas (FasL), una proteína transmembrana parte de la familia del TNF (Wajant, 2002). La interacción entre Fas y FasL resulta en la formación del complejo de señalización inductor de muerte (DISC), el cual contiene a FADD, caspasa-8 y caspasa-10. En algunos tipos celulares (tipo I), la caspasa-8 procesada directamente activa a otros miembros de la familia caspasa, y lleva a cabo la ejecución de la apoptosis de la célula. En otro tipos celulares (tipo II), el Fas-DISC empieza un mecanismo de retroalimentación que gira en torno a incrementar la liberación de factores proapoptóticos de la mitocondria y la activación amplificada de la caspasa-8.



# 1. INTRODUCCIÓN



**Figura 6.** Mecanismos de activación directa de Bax. La activación de Bax es dependiente de caspasa en la vía extrínseca, pero independiente de caspasas en la vía intrínseca. Los mecanismos de activación indirecta de Bax no están incluidos (Tomado de Ghibelli & Diedrich, 2010).

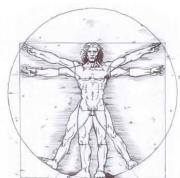
Seguidamente a la activación de TNF-R1 y Fas en células de mamíferos, se establece un balance entre los miembros proapoptóticos (Bax, Bid, Bak o Bad) y antiapoptóticos (Bcl-XL y Bcl-2) de la familia Bcl-2 (Murphy y cols., 2000). Este balance es la proporción de homodímeros proapoptóticos que se forman en la membrana externa de la mitocondria. Los homodímeros proapoptóticos son requeridos para hacer permeable la membrana mitocondrial para la liberación de los activadores de caspasas tales como citocromo c y SMAC. El control de las proteínas proapoptóticas bajo condiciones celulares normales no se conoce completamente, pero en general, Bax o Bak son activadas por la activación de proteínas BH3-only, parte de la familia Bcl-2. Los mecanismos de activación de Bax aparecen resumidos en la Figura 6. Como unión de la vía extrínseca e intrínseca, la caspasa-8 proteoliza a Bid resultando en Bid truncada que es un potente activador de Bax (Li y cols., 1998). Así, t-Bid permite la amplificación de la apoptosis por reclutamiento de señales de citocromo



# 1. INTRODUCCIÓN

---

c/apoptosoma/caspasa-9 y, en caso de células con sobreexpresión de proteínas IAP, permite la finalización de la apoptosis promoviendo la liberación de SMAC/diablo dependiente de Bax y por tanto la degradación de las IAPs (Ghibelli & Diedrich, 2010).



# 1.INTRODUCCIÓN

---

## 1.2 HOMEOSTASIS DEL CALCIO CELULAR

El calcio es uno de los mensajeros intracelulares más importantes de los descritos hasta ahora, porque está implicado en una larga lista de procesos bioquímicos intracelulares y extracelulares (Carafoli, 1987). Cuando aumenta la concentración de calcio intracelular se produce la activación de fenómenos que ocurren en un corto período de tiempo como la contracción muscular (Reembold, 1992) y secreción (Brown y cols., 1985), o a más largo plazo como puede ser el crecimiento o la diferenciación celular (Buonanno y Fields, 1999). El calcio es imprescindible para la coagulación de la sangre.

Diversos autores han caracterizado, en diferentes tipos celulares, respuestas que por su duración, han sido considerados como patrones diferentes de movilización de calcio. Esto les ha inducido a organizarlas en dos tipos: respuestas transitorias (Pandol y Schoeffield-Payne, 1987) y respuestas sinusoidales u oscilaciones (Woods y cols., 1986; Camello, 2000).

La concentración de calcio citosólico en reposo varía según el tipo celular, aunque suele oscilar entre 20-100 nM. Esta concentración basal puede verse incrementada mediante la estimulación de las células con sus respectivos agonistas, ya que estos generan moléculas capaces de movilizar calcio de los depósitos internos, como el IP<sub>3</sub> (Streb y cols., 1983), ADP ribosa cíclica (Galione, 1994) o NAADP (Cancela y cols., 1999).

Otro modo de aumentar la concentración intracelular de calcio en la célula es mediante la apertura de canales situados en la membrana plasmática, que permiten el movimiento del ión desde el exterior celular a favor de gradiente.

La relocalización de calcio que tiene lugar en la apoptosis es irreversible, lo que difiere de los cambios de calcio intracelular causados por el factor de crecimiento.



# 1.INTRODUCCIÓN

---

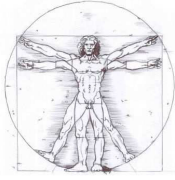
## 1.2.1 *Liberación de calcio desde los depósitos intracelulares*

La concentración de calcio que una célula puede almacenar en los depósitos intracelulares está regulada básicamente por dos fenómenos: por la presencia de canales en la membrana del depósito y por la existencia en el interior del depósito de proteínas capaces de unir calcio en su estructura. La liberación del calcio almacenado en células de mamíferos puede estimular respuestas de factores clave en la vía de la apoptosis (Berridge y cols., 1998).

### - Canales existentes en los depósitos

Para que se produzca la liberación de calcio desde los depósitos intracelulares es necesario que se abran una serie de canales situados en los mismos, que son específicos para dicho ión. Su identificación y posterior clasificación se llevó a cabo teniendo en cuenta el tipo de molécula que los regula. Entre ellos destacamos los siguientes tipos:

- Canal de  $\text{Ca}^{2+}$  sensible a  $\text{IP}_3$  ( $\text{IP}_3\text{R}$ ): La molécula que regula la apertura de este tipo de canales es el inositol 1,4,5-trisfosfato ( $\text{IP}_3$ ), generado cuando se activa la fosfolipasa C por medio de la subunidad  $\alpha$  de la proteína G acoplada a un receptor (Bernstein y cols., 1992; Kim y cols., 2000). Se han identificado al menos tres tipos de  $\text{IP}_3\text{R}$ , que pueden aparecer en forma de monómeros o heterotetrámeros (Monkawa y cols., 1995); estos tipos presentan diferente afinidad por la molécula de  $\text{IP}_3$  y se ven regulados de manera diferente por fosforilación (Sudhof y cols., 1991). De su estructura cabe destacar que, es el dominio central del sitio donde van a unirse tanto el calcio como el ATP, permitiendo la activación del mismo. También se sabe que esta es la zona susceptible de ser fosforilada una vez ha adoptado la estructura heterotetramérica (Mikoshiha, 1993; Sato y cols., 2004). El papel del calcio en la regulación de la actividad del canal es doble, ya que a bajas concentraciones



# 1.INTRODUCCIÓN

---

(100-300 nM) estimula su apertura, mientras que tras el estímulo del mismo con el  $IP_3$ , altas concentraciones de calcio citosólicas reducen su actividad hasta llegar a inhibirla por completo.

Estos canales de calcio, también pueden ser regulados por la acción de proteínas como las tirosinas cinasas dependientes de AMPc y CMPc (El-Daher y cols., 1996). Algunos estudios implican a la proteína cinasa C (PKC), en la regulación negativa del receptor del  $IP_3$ , mediante su fosforilación. La proteína cinasa C activada por la proteína cinasa A fosforila sobre todo al receptor del  $IP_3$  tipo I (Vermassen y cols., 2004). Por otro lado, la PKC fosforila el receptor del  $IP_3$  de modo diferente si es excitada por el calcio o calcio unido a la calmodulina, lo que sugiere la existencia de dos mecanismos diferentes de regulación del receptor del  $IP_3$  en función de la fosforilación (Vermassen y cols., 2004).

Para que la PKC reconozca como sustrato al receptor del  $IP_3$  es necesario la actividad de una pequeña proteína, que presenta similares dominios con las proteínas G citosólicas, denominada RACK 1 (Patterson y cols., 2004).

- Canal receptor de la rianodina: Este tipo de canales fueron descritos en primer lugar en el músculo esquelético como responsable de la salida de calcio desde el retículo sarcoplásmico, y posteriormente otras investigaciones llegaron a la conclusión de que también poseía un papel importante en la liberación de calcio en células no excitables (Langhorst y cols., 2004; ZhuGe R y cols., 2004).

Al igual que el tipo de receptores del  $IP_3$ , han sido descritas hasta el momento al menos tres isoformas. Este tipo de canales está regulado por moléculas como la ADP ribosa cíclica o el propio calcio, aunque principalmente son modulados por la cafeína o la rianodina, un alcaloide procedente de las plantas, de la que recibe el nombre dicho canal (McPherson y Campbell, 1993). Se ha comprobado que empleando este alcaloide a concentración nanomolar bloquea el receptor de modo que la estructura del receptor permanece en una conformación abierta, por lo que el calcio se escapa desde los depósitos (Fill y Coronado, 1988). Se cree que la calmodulina posee un papel modulador importante, sobre este tipo de canales, ya que en las células acinares pancreáticas





# 1.INTRODUCCIÓN

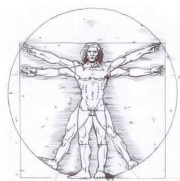
---

de rata, al inhibir dicha proteína desaparece la acción estimuladora que sobre ellos posee la cafeína, rianodina o el ADP ribosa cíclico (Ozawa, 1999).

- Canal receptor del NAADP: Desde que en 1995, Lee y Aarhus describieran que el NAADP (ácido nicotínico adenin dinucleótido fosfato) podía provocar movilización de calcio, muchos son los autores que se han interesado por este mecanismo. Sus investigaciones en tipos celulares como los oocitos de estrellas de mar y células acinares pancreáticas, han dado lugar a la idea de que el NAADP iniciaría la señal de liberación de calcio inducida por calcio (CICR o *calcium-induced calcium release*) de los almacenes sensibles a  $IP_3$  y a ADP ribosa cíclica, permitiendo la aparición de un patrón oscilatorio (Cancela y cols., 1999; Santella y cols., 2000; Petersen y Cancela, 2000; Churchill y Galione, 2001). El NAADP es sintetizado por la propia célula en el interior de la mitocondria, participando en su síntesis la misma enzima que genera el ADP ribosa cíclica. El AMPc es el principal estímulo para generar el NAADP a través de esta enzima (Wilson y Galione, 1998).

Otra hipótesis enunciada por Chini y Dousa en 1999, afirma que la fructosa 1,6-difosfato activa la liberación de calcio mediante los canales sensibles a la rianodina, mientras que inhibe la liberación a través del  $IP_3R$  y el NAADP. Por lo que dependiendo del estado metabólico de la célula, ésta podría activar una ruta u otra de liberación de calcio, generando un tipo de señalización u otra en función de ese estado. Hoy día se conoce que el NAADP es capaz de liberar calcio, a parte desde el retículo, también desde las organelas ácidas, como los lisosomas, y desde el interior del núcleo a través de la envoltura nuclear del retículo (Gerasimenko y Gerasimenko, 2004; López y cols., 2006).

- Canal receptor de esfingosina 1-fosfato: Esta molécula puede liberar calcio desde el retículo endoplásmico, ya que se une a proteínas situadas en el retículo endoplasmático que secuestran el calcio en su estructura haciendo que lo liberen (Mao y cols., 1996) o mediante la activación de los canales de rianodina, esto último se comprobó mediante la adición de bloqueantes del canal de rianodina, que inhibieron a su vez la liberación de calcio provocada por el esfingosina 1-fosfato (Dettbarn y cols., 1995).



# 1.INTRODUCCIÓN

---

Este tipo de derivados de los lisofosfolípidos (fosfolípidos que han perdido una de sus dos cadenas de ácidos grasos) van a actuar mediante dos rutas muy diferentes; una de ellas es mediante la activación de la fosfolipasa C (PLC) (ruta clásica de calcio), ruta PLC dependiente. Y otra mediante una ruta independiente de la PLC, ya que presentan sus propias proteínas esfingosinas cinasas (SphK/S1P). También van a presentar una actividad reguladora negativa sobre otros canales que liberan calcio. Esta función negativa sobre la movilización de calcio se debe a la actuación de los receptores S1p(1), activados por la proteína cinasa C (PKC) (Meyer, 2004).

- *Proteínas secuestradoras de  $Ca^{2+}$  en el interior de los depósitos*

Desde mediados de los años 90, los investigadores están prestando cada vez más atención a las proteínas encargadas de unir y por tanto retener el calcio en el interior de los depósitos. Según algunos autores, un paso previo al vaciamiento de los depósitos de calcio debería de ser la liberación de calcio por parte de estas proteínas que lo secuestran en el interior del depósito, permitiendo que exista esa diferencia de concentración entre ambas partes de la célula sin que afecte a la integridad celular. Entre esas proteínas podemos destacar la calreticulina y la calsecuestrina, dos proteínas, cuya función es básicamente el unir calcio y mantenerlo formando complejos en el interior del retículo endoplasmático (Camacho y Lechleiter, 1995). Ambas han sido descritas en la mayoría de las células eucarióticas y gran parte de las procariontas, lo cual refleja la gran importancia que poseen. Además, también han sido relacionadas con el fenómeno de entrada capacitativa de calcio regulándolo de forma retrógrada (Shind y cols., 2003).

Otro importante grupo de proteínas que tienen la capacidad de retener calcio en el interior del retículo, lo componen las chaperonas, entre las que destacan la calnexina y la familia de las proteínas sensibles a shock térmico (*Heat Shock Proteins* o HSP). Otro grupo de chaperonas son la grp78, grp 94 y un grupo de proteínas con capacidad de reducir grupos disulfuro (tioredoxinas): Erp72, p50 y la proteína disulfuro isomerasa



# 1.INTRODUCCIÓN

---

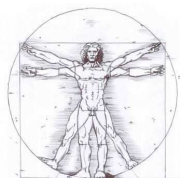
(Nigam y cols., 1994). También se ha sugerido que secuestran calcio, pero no tan eficazmente como las anteriores.

## 1.2.2 *Entrada de calcio desde el medio extracelular*

El calcio liberado de los depósitos intracelulares a veces resulta insuficiente para llevar a cabo una activación completa de los mecanismos celulares, o para que una vez finalizado los estímulos, las células puedan rellenar sus depósitos. Por ello es muy importante que las células puedan incorporar calcio a su citoplasma procedente del exterior celular. En células excitables la entrada de calcio desde el exterior puede ocurrir gracias a la apertura de canales que son activados por voltaje (VOC o *voltage operated channel*), sin embargo en células no excitables en donde no se produce cambios en la polaridad de la membrana, tan grandes como para que puedan existir el tipo de canales anteriores, la entrada de calcio se produce activada por receptores (ROC o *receptor operated channel*), por segundos mensajeros (SMOC o *second messenger operated channel*) o por el vaciamiento de los depósitos intracelulares (SOC o *store operated channel*).

La entrada de calcio a través de los canales operados por voltaje (VOC), ocurre muy brevemente, debido a la corta duración de los potenciales de acción que operan los canales (Tsien y cols., 1995). Este tipo de canales han sido descritos principalmente en células excitables como por ejemplo en neuronas, células musculares y algunas células endocrinas. En este tipo de células, durante la transmisión del potencial de acción el movimiento de cargas a un lado y otro de la membrana, induce el cambio de conformación del canal, que adopta un estado abierto transitorio, de modo que el calcio puede entrar a favor de gradiente (McCleskey, 1994).

Los canales operados por receptores (ROC), a diferencia del tipo anterior son unos canales muy ubicuos, pudiendo encontrarlos tanto en neuronas como en algunos modelos celulares de glándulas secretoras. Pueden ser activados por diferentes tipos de moléculas, como son los neurotransmisores (acetilcolina, glutamato, ATP y ADP) y algunos agonistas celulares. La apertura de este tipo de canales es muy rápida, lo que



# 1.INTRODUCCIÓN

---

implicaría un contacto directo entre el receptor y el canal, o mediante un sistema de proteínas acoplados a los receptores, capaces de activar el canal inmediatamente al producirse el contacto del ligando, como puede ser el caso de las proteínas G heterotriméricas (Sage, 1992). Recientemente también se ha descrito la presencia de este tipo de canales en plaquetas, en respuesta a los estímulos inducidos por el ADP (Sargeant y Sage, 1994).

Otro tipo de canal, que se ha encontrado en plaquetas, y que provoca la entrada de calcio son los canales activados por segundos mensajeros (SMOC). Además de en plaquetas han sido descritos también en las células endoteliales, accionados por  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{IP}_3$ , y también en algunos modelos de células excitables.

El último tipo de entrada de calcio es aquel estimulado por el vaciamiento de los depósitos intracelulares, que representa el principal fenómeno de entrada de calcio en células no excitables y también el más complejo. Este fenómeno es conocido como entrada capacitativa de calcio (ECC), y se basa en que el vaciamiento o estado de relleno de los depósitos activa, regula y finaliza la entrada de calcio procedente del exterior de la célula, a través de canales situados en la membrana plasmática. Este mecanismo fue propuesto en primer lugar por Putney, que enunció un modelo que explicaba como la activación de un receptor en la membrana, unido a la formación del  $\text{IP}_3$ , causaba una entrada de calcio desde el exterior de la célula. En ese momento se observó que mientras que la eliminación de  $\text{IP}_3$  en el interior de la célula se producía rápidamente, la entrada de calcio no se detenía hasta que no se rellenaban completamente los depósitos (Putney, 1986). Recientemente se ha puesto de manifiesto la importancia del citoesqueleto en la ECC, el cual ejerce un efecto dual sobre la ECC, no sólo desde su inicio sino también durante su mantenimiento (Ben-Amor y cols., 2006; Rosado y cols., 2005a; Rosado y cols., 2005b).

## *1.2.3 Mecanismos de eliminación del calcio del citoplasma*

Al término de la estimulación celular, que viene acompañada de un incremento de la concentración de calcio en el citoplasma, es necesario que la concentración



# 1.INTRODUCCIÓN

---

citosólica de calcio retorne a los niveles basales, para permitir que la célula cumpla correctamente su función y esté dispuesta a responder a un nuevo estímulo. El calcio es retirado del citosol mediante la activación de una serie de bombas e intercambiadores cuya función será reintroducir el calcio en los depósitos o expulsarlo al exterior de la célula.

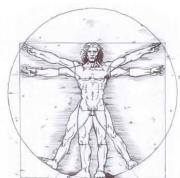
- *Reintroducción de calcio en los depósitos intracelulares*

Siempre y cuando la concentración de calcio intracelular no alcance concentraciones superiores a la del calcio del espacio intraluminal, el cual varía en un rango cercano a mM, el calcio liberado desde el retículo por la acción de los estímulos, es reintroducido en el retículo mediante la actuación de una bomba denominada  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa del retículo sarcoendoplasmático (SERCA), la cual fue por vez primera aislada en células musculares (Wuytack y cols., 1992).

Se han identificado tres tipos diferentes de genes para SERCA, que originan tres isoformas diferentes de proteína (Exton, 1997). Estas isoformas pueden ser expresadas conjuntamente en el mismo tipo de célula, lo que podría estar relacionado con la existencia de diferentes tipos de depósitos en la misma célula (Cavallini y cols., 1995). Esta bomba tiene una alta afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  (0,1-0,4  $\mu\text{M}$ ); además de que su actividad está regulada en función de la concentración de dicho ión (Carafoli, 1992).

En los últimos años con los avances en la ingeniería genética y la inmunología, mediante la expresión de los genes que originan SERCA, se están diseñando nuevos anticuerpos que permiten el reconocimiento en diferentes modelos celulares de nuevas isoformas de SERCA, expresadas mediante corte y transcripción de modo alternativo de los exones que codifican para estas bombas. De este modo se ha podido demostrar la existencia de al menos cinco tipos nuevos de SERCA derivados del gen de SERCA tipo 3, denominado SERCA 3 h3b, SERCA3 h3c, SERCA 3 h3d, SERCA3 h3e y SERCA3 h3b/c (Martín y cols., 2002).

Para poder investigar el papel de SERCA en la ruta de señalización del calcio se han diseñado diferentes drogas como el ácido ciclopiazónico, la curcumina, la tapsigargina y la 2,5-di(tert-butil)-1,4-hidroquinona (TBHQ). La tapsigargina se une



# 1.INTRODUCCIÓN

---

estequiométricamente a todo tipo de SERCAs causando su bloqueo irreversible, impidiendo que continúe bombeando calcio al interior, resultando por tanto muy útil para analizar el efecto que tiene en la célula el vaciamiento del retículo endoplasmático sin interferir con ninguna otra ruta (Wictome y cols., 1992). Por otro lado está la TBHQ, de acción similar a la tapsigargina en cuanto al mecanismo de actuación, pero con menor potencia a la hora de inhibir las distintas isoformas de SERCA, e incluso alguna de las isoformas son totalmente insensibles a esta droga (Cavallini y cols., 1995; Jardín y cols., 2007; López y cols., 2005; López y cols., 2006). Recientemente en plaquetas humanas, mediante el uso combinado de ambas drogas ha sido descubierta la existencia de un segundo tipo de depósitos diferente al sistema tubular denso que en este modelo hace las veces de retículo endoplasmático (Cavallini y cols., 1995; Rosado y cols., 2004). SERCA también puede ser regulada mediante cambios en el potencial redox a través de proteínas como ERp57, que se ven activadas por la calreticulina (Ly y Camacho, 2004).

Además de SERCA existen otros tipos de  $H^+$ -ATPasa: V, F y P, que van a reintroducir calcio a otros depósitos como por ejemplo al interior de los lisosomas (Yoshimori y cols., 1991).

## - Mecanismo de expulsión de calcio al exterior celular

Este tipo de mecanismos constituyen la segunda forma que las células tienen para poder recuperar la concentración de calcio basal, mediante la expulsión del calcio desde el citoplasma al exterior celular. Este fenómeno es llevado a cabo mediante dos tipos de transportadores diferentes, una es la  $Ca^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) y el otro es un intercambiador  $Na^+ / Ca^{2+}$ .

La PMCA es una ATPasa caracterizada por la formación de un intercambiador covalente y por su inhibición por vanadato y lantano (Pedersen y Carafoli, 1987; Pariente y cols., 1999; Lajas y cols., 2001). Han sido descritas hasta cuatro isoformas en humanos denominados: PMCA1, PMCA2, PMCA 3 y PMCA 4 (Strehler y Zacharias, 2001); todas ellas con similar estructura molecular, formada por diez segmentos que atraviesan la membrana y cinco dominios extracelulares mientras que sus extremos



# 1.INTRODUCCIÓN

---

amino y carboxilo están orientados al interior celular (Guerini, 1998; Strehler y Zacharias, 2001).

La actividad de esta bomba se ve regulada por mensajeros secundarios como la  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina, proteínas tirosinas cinasas, PIPs, proteínas serina/treonina cinasas como la proteína cinasa A y C, y por proteasas como la calpaína (Strehler y Zacharias, 2001; Pariente y cols., 2003). Los incrementos en la concentración de calcio en el citoplasma de la célula provocados por el estímulo de los agonistas, provoca la síntesis o activación de estos mensajeros secundarios, incrementando o inhibiendo la actividad de la PMCA (Rosado y Sage, 2000; Pariente y cols., 2001).

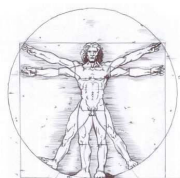
Por otra parte, el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  es un transportador de iones bidireccional que combina el movimiento de un ión sodio con el transporte de calcio en el sentido contrario. De este modo este intercambiador participa en la regulación de la concentración de calcio citosólico en diferentes tipos celulares, aunque su presencia no es universal, y puede actuar expulsando calcio desde el citosol o introduciendo al interior el ión (actividad reversa en algunos modelos celulares).

Han sido descritos al menos tres tipos diferentes de intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ : un intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  dependiente de potasio, otro independiente de este ión, y un último tipo neutro respecto al potasio situado en la mitocondria (Matsuda y cols., 2001) que puede ser inhibido por el SEA0400.

El intercambiador independiente de potasio transporta 3 ó 4 moléculas de sodio por cada calcio (Blaustein y Lederer, 1999) y al menos se han descrito tres isoformas distintas (Nicoll y cols., 1990; Li y cols., 1994; Nicoll y cols., 1996). Por el contrario el intercambiador dependiente de potasio, introduce 4 iones sodio por cada ión calcio que expulsan (Lytton y cols., 2002) y se han descubierto seis isoformas (Cai y Lytton, 2004).

## - Proteínas citosólicas secuestradoras de calcio

Al igual que en el interior del retículo endoplasmático, en el citoplasma de la célula también existe una gran cantidad de proteínas que van a unir el calcio liberado desde el



# 1.INTRODUCCIÓN

---

retículo, actuando como sensores, efectores y proteínas tamponantes que inician, ejecutan o terminan determinadas funciones celulares dependientes de calcio.

La mayoría de las moléculas secuestradoras de calcio actúan como tampones de la concentración de calcio intracelular, manteniendo su concentración muy baja en condiciones de reposo, de modo que mantienen un equilibrio entre el calcio libre y unido a proteínas. Está bien establecido que, tanto en células excitables como no excitables, aproximadamente el 98-99% del calcio existente en el citoplasma está unido a una serie de moléculas (Neher y Augustine, 1992; Mogami y cols., 1999).

Entre las proteínas capaces de unir calcio en el citoplasma celular, destacamos la calreticulina, calbindina, parvalbúmina y calmodulina. Esta última es una de las más importantes ya que su subunidad reguladora es capaz de unir dos moléculas de calcio, liberándose en estas condiciones la subunidad catalítica activa. Esta subunidad catalítica llevará a cabo funciones tan importantes como la de activar a la PKC, para que ésta actúe inhibiendo el receptor del  $IP_3$  o los TRPC de la membrana plasmática.

## *1.2.4 Participación de otras organelas citoplasmáticas en la homeostasis del calcio*

La mitocondria es otro importante componente involucrado en los mecanismos de señalización de calcio (González y cols., 2003). Localizado en las proximidades de los canales que liberan calcio, va a actuar secuestrando parte del calcio liberado desde los almacenes sensibles a los agonistas y liberando este calcio secuestrado lentamente una vez la estimulación ha terminado (Berridge y cols., 2000). El transporte del calcio a través de la membrana interna mitocondrial es mediada por tres tipos de mecanismos:

- Un mecanismo de entrada de calcio controlada a través de un transportador de baja afinidad, que actúa gracias al gradiente electroquímico creado por la extrusión de protones durante la síntesis de ATP, cuya efectividad es bastante alta. Este transportador necesita que la concentración de dicho ión en sus proximidades sea muy alta (Berridge y cols., 2000; Pariente y cols., 2003).





# 1.INTRODUCCIÓN

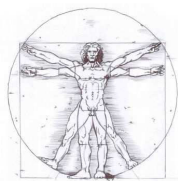
---

- Dos mecanismos de expulsión de calcio desde el interior mediante: dos cotransportadores que intercambian el calcio por sodio o protones; y por último, mediante el poro de transición mitocondrial cuya función podría estar involucrada en la liberación de calcio desde la mitocondria inducido por altas concentraciones del propio ión en el citoplasma (mCRIC) (Icha y cols., 1997). La permeabilidad de este último poro, puede presentar dos estados en función del pH, voltaje y estado redox de la mitocondria. Un estado reversible de baja conductancia, que permite a la mitocondria participar en la señalización del calcio; y otro estado irreversible que presenta una alta conductancia que lleva al colapso del potencial de membrana mitocondrial permitiendo incluso la liberación del citocromo C y la activación de fenómenos de apoptosis (Berridge y cols., 2000).

En el fenómeno conocido como “ola de calcio”, consistente en la propagación de un incremento local en la concentración de calcio desde el punto donde se origina el estímulo hacia otros puntos de la célula, la mitocondria juega un papel modulador importantísimo, controlando la velocidad a la que esta ola se propaga por la célula (Camello, 2000; Landgraf y cols., 2004).

Por otro lado la mitocondria también puede participar en los mecanismos de señalización de calcio, mediante una participación activa en el fenómeno de la entrada capacitativa de calcio desde el exterior celular, aunque hasta el momento tan solo se ha descrito un papel modulador, bien incrementando o disminuyendo la entrada de calcio, pero nunca activando por sí misma este fenómeno (Budd y Nicolls, 1996; Hoth y cols., 1997).

El aparato de Golgi es un orgánulo celular relevante desde el punto de vista de la secreción de proteínas, pero que hasta ahora se había considerado de poca importancia en la ruta de señalización del calcio. Wuytack y colaboradores (2003) en una de sus publicaciones, apuntan que este orgánulo podría tener un papel regulador en la señalización de calcio, más en concreto en las oscilaciones de calcio citoplasmático. Estos autores han descrito la existencia de un secuestro de calcio en el interior de las



# 1.INTRODUCCIÓN

---

cisternas que componen este aparato, gracias a la actuación del transportador de calcio y manganeso, denominado PMR1/SPCA  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ .

El análisis filogenético de este transportador concluyó que está estrechamente relacionado mediante una proteína ancestral con SERCA, lo que indica que posiblemente en el pasado la función de almacén de calcio no era exclusiva del retículo endoplasmático, y con el paso del tiempo, el aparato de Golgi sacrificó esta función en beneficio de una mayor especialización en la síntesis y secreción de proteínas; y por tanto actualmente tan sólo almacena la cantidad de calcio necesaria para poder llevar a cabo los fenómenos de secreción proteica (Wuytack y cols., 2003).

Estos resultados apoyan las observaciones realizadas previamente por Yim y cols., (2003) en las que sugerían un papel de almacén de calcio para la cisterna intermedia del aparato de Golgi. En este caso la localización de las proteínas GRP94 y p58, dos chaperonas que normalmente están expresadas en el retículo endoplasmático, en la cisterna del Golgi; junto con el efecto que la tapsigargina tenía en la retención de las mismas de dichas cisterna, hizo suponer que este compartimento celular podía almacenar calcio (Yim y cols., 2003).

## *1.2.5 Papel del calcio en la apoptosis*

El papel crítico que poseen los cambios de concentración de calcio se ha probado en gran variedad de tejidos bajo condiciones que inducen apoptosis (Hajnóczy y cols., 2003). Los primeros estudios de Kaiser y Edelman en 1977 demostraron que la apoptosis de timocitos estimulada por glucocorticoides está asociada con un aumento en el flujo de calcio, observaciones que posteriormente McConkey y colaboradores confirmaron en 1989 utilizando otras técnicas. Sin embargo, los almacenes intracelulares de calcio parecen ser afectados, como el calcio localizado en el retículo endoplásmico que es expulsado en una línea celular linfoide en respuesta a tratamiento con glucocorticoides (Lam y cols., 1993); se ha documentado un fenómeno similar en una línea celular mieloide dependiente de interleucina 3 (IL-3) (Baffy y cols., 1993). Evidencias indirectas sugieren que el calcio almacenado en la mitocondria también es



# 1.INTRODUCCIÓN

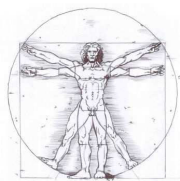
---

afectado (Richter, 1993), a la vez que ocurre una caída en el potencial de membrana mitocondrial como antesala al incremento de calcio en varios modelos de apoptosis (Backway y cols., 1997; Macho y cols., 1997). Incrementos rápidos y sostenidos de calcio preceden a la histólisis de las dianas de linfocitos citotóxicos T (Allbritton y cols., 1988) y células natural killers (NK) (McConkey y cols., 1990). En linfocitos T en desarrollo las uniones de alta afinidad de los receptores de células T induce apoptosis (Smith y cols., 1989) que involucra a las elevaciones sostenidas de calcio (McConkey y cols., 1989a; Nakagama y cols., 1992). En leucocitos de humanos, los aumentos sostenidos de calcio inducidos por su agonista *N*-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) conducían a apoptosis (Espino y cols., 2011).

Pruebas independientes de la participación del flujo de calcio en la activación de la apoptosis se han producido en estudios con bloqueadores de canales específicos de calcio (Juntti-Berggren y cols., 1993). Esta también se apoya en estudios con el inhibidor de la SERCA, taspigargina, el producto de la planta *Thapsia garganica*, que también puede provocar todos los sucesos morfológicos y bioquímicos de la apoptosis en timocitos (Jiang y cols., 1994) y en algunos otros tipos celulares (Kaneko y Tsukamoto, 1994; Choi y cols., 1995; Levick y cols., 1995).

Tras una subida en la concentración de calcio citosólico, si los sistemas de recaptación del retículo endoplasmático no logran devolver dicha concentración a sus niveles basales, el calcio puede entrar en la mitocondria a través de sus canales específicos. Cuando la concentración de calcio mitocondrial alcanza unos niveles altos, la situación se vuelve insostenible para la mitocondria, con la consecuente despolarización de la membrana mitocondrial y la salida de elementos proapoptóticos que contenía la mitocondria, tales como citocromo *c* o SMAC-Diablo (Zamzani y Kroemer, 2001), y desencadenando la vía intrínseca de la apoptosis.

La activación de caspasas es promovida por dicha expulsión de citocromo *c* desde la mitocondria (Liu y cols., 1996), lo que sugiere que la activación de esta vía apoptótica está acoplada a la pérdida de función mitocondrial (McConkey y Orrenius, 1997). Una de las propuestas más respaldadas para explicar la salida de estos elementos de la mitocondria es la formación del poro de permeabilidad transitorio. Este fenómeno, descrito hace casi 30 años por Hunter y Haworth, es un complejo de proteínas



# 1.INTRODUCCIÓN

---

preexistentes de las membranas mitocondriales interna y externa que forma un largo canal de conductancia permeable a solutos menores a 1,5 kDa. El poro aparece con altas concentraciones de calcio mitocondrial (el calcio interactúa con la ciclofilina D para inducir la apertura del poro) y otros estímulos incluyendo oxidantes, ácidos grasos libres y depleción de nucleótidos de adenina (Basso y cols., 2005). Es inhibido por pH ácido, antioxidantes tales como el glutatión reducido (GSH) y la ciclosporina A (Brookes y cols., 2004a).

Pruebas recientes sugieren que el calcio juega un papel clave también en la enfermedad de Alzheimer. Esta patología, descrita por primera vez por Alois Alzheimer en 1906, está caracterizada por atrofia cortical, acumulación de fibras anormales en los somas neuronales, y la presencia, en el espacio extracelular, de placas seniles, cuyo principal componente es el llamado péptido A- $\beta$  (Giacomello y cols., 2007). Hace unos 10 años se propuso que una alteración en la homeostasis del calcio intracelular podía contribuir al desarrollo del Alzheimer. La hipótesis propuesta era que una sobrecarga de calcio podía llevar a un incremento en la producción A $\beta$  o, alternativamente, que la sobrecarga de los almacenes de calcio causada por mutaciones en algunos genes podían exacerbar la toxicidad de A $\beta$  favoreciendo así la muerte celular Ca<sup>2+</sup>-dependiente (LaFerla, 2002).

Recientemente se han identificado un grupo de cambios secuenciales de calcio; dos muy tempranos que ocurren antes de cualquier otra alteración apoptótica, mientras que un cambio más tardío coincide con la aparición de apoptosis. Curiosamente, los dos cambios pre-apoptóticos ocurren simultáneamente en todas las células estimuladas, mientras que el último ocurre a diversos tiempos, de manera sincronizada con el resto de eventos apoptóticos (Cerella y cols., 2007).

La primera fase se caracteriza por una alta [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> en contraposición a una baja concentración en el retículo, que parece ser consecuencia de la reducida eficiencia del sistema de reciclado de calcio a nivel de sistema de bombeo activo del retículo. Esto es señal de una disminución en la respuesta celular: el significado de esta fase podría ser el inducir una condición de “stand-by” respecto del papel anti-apoptótico.

La segunda fase se caracteriza por baja concentración de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> y alta concentración de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ER</sub>, lo cual podría señalar el “deseo” de entrar en apoptosis. De



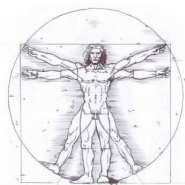
# 1.INTRODUCCIÓN

---

hecho, existen varias evidencias de que un incremento de calcio en el retículo sensibiliza a las células para la apoptosis (Nakamura y cols., 2000; Pinton y cols., 2001; Lilliehook y cols., 2002), correlacionado con la propensión a liberar calcio.

La tercera señal coincide con la apoptosis, y está en línea con los datos bien aceptados que describen una baja  $[Ca^{2+}]_{ER}$  y una alta  $[Ca^{2+}]_c$  comprobado en células apoptóticas, probablemente como resultado de un colapso de las  $Ca^{2+}$ -ATPasas (Cerella y cols., 2007).

En conclusión, la capacidad de la mitocondria para acumular y expulsar calcio parece íntimamente ligada a múltiples papeles de estos orgánulos con las células: por un lado, la acumulación/expulsión de calcio modula los papeles bioenergéticos cruciales de la mitocondria así como la cinética y amplitud de la señal de calcio; por otro lado, la acumulación masiva de calcio en la mitocondria dirige a muerte celular necrótica; finalmente, incrementos más modestos en la concentración de calcio mitocondrial, pero en presencia de otros agentes tóxicos, activan la vía mitocondrial de la apoptosis.



# I.INTRODUCCIÓN

---

## 1.3 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

En la última mitad del siglo pasado, como resultado de las investigaciones llevadas a cabo por científicos como Boveris, hemos comenzado a tomar conciencia acerca de la existencia de un nuevo tipo de sustancias que tenían *a priori* unos efectos devastadores en nuestro organismo, pero que a medida que vamos profundizando en su estudio, nos estamos dando cuenta que pueden llegar a desarrollar diversas funciones beneficiosas incluso para la viabilidad celular. Estas sustancias se agruparon posteriormente bajo la terminología de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).

El término de especie reactiva de oxígeno agrupa a una serie de radicales o moléculas, en cuya estructura albergan un átomo de oxígeno. También existen radicales libres nitrogenados o especies reactivas de nitrógeno (RNS) y radicales libres basados en otros elementos, como puede ser el azufre (Aranda, 2003). El oxígeno normalmente acepta cuatro electrones y es convertido en agua. En sistemas biológicos, la reducción del oxígeno ocurre de manera parcial, lo que resulta en la generación de ROS citotóxicas (Yokouchi y cols., 2008).

Se ha demostrado que los oxidantes estimulan la señalización de calcio por incremento de la concentración de calcio citosólico, lo que sugiere un posible papel fisiológico de los oxidantes en la regulación de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  (González y cols., 2006). El incremento en el transporte de calcio a través de canales de calcio, así como la inhibición de bombas de calcio ocurren en la presencia de oxidantes, y estas macromoléculas podrían ser posibles dianas de los oxidantes para influir en la señalización de calcio (Pariente y cols., 2001).



# I.INTRODUCCIÓN

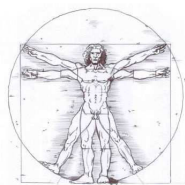
---

## 1.3.1 *Papel de las ROS en la apoptosis*

La concentración de  $O_2^-$  en la matriz mitocondrial es entre 5 y 10 veces mayor que en el citosol o en el núcleo (Cadenas & Davies, 2000). La cadena respiratoria mitocondrial además de ser la mayor fuente de ROS intracelular, es a su vez una importante diana para el daño producido por ROS; por otra parte los radicales libres generados en la mitocondria podrían inhibir uno o más componentes de la cadena de transporte de electrones, acelerando así la generación de ROS, que contribuirían a la aparición de una disfunción en condiciones de estrés oxidativo (Genova y cols., 2001; Liu y cols., 2002; Muller y cols., 2003; Turrens, 2003). Es ampliamente conocido que el metabolismo celular depende de un continuo aporte de ATP de la mitocondria, esencial en la mayoría de los tejidos.

Por tanto, cualquier daño que debilite la cadena respiratoria podría tener un gran impacto sobre la viabilidad celular. Para ello la célula cuenta con un sistema de defensa de detoxificación de ROS, además de sistemas de reparación de los daños causados por las mismas.

Recientes trabajos han situado la mitocondria en el foco de la regulación de la apoptosis y su relación con las ROS (Giorgi y cols., 2008; Gogvadze y cols., 2010). Estudios realizados en diferentes tipos celulares indican que el tratamiento con  $\alpha$ -tocoferol succinato ( $\alpha$ -TOS), un análogo de la vitamina E, genera ROS y estimula una rápida entrada de calcio a la célula y consecuentemente a la mitocondria, que fue prerequisite para inducir el PPTm (Gogvadze y cols., 2010). Las ROS son capaces de oxidar indiscriminadamente lípidos, proteínas y ácidos nucleicos alterando su estructura y su función (Cross y cols., 1998; Ames y cols., 1993). Este tipo de reacciones lleva a la formación de agregados de proteínas y facilita la formación del PPTm, que provoca la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la liberación de proteínas proapoptóticas, como el citocromo *c*, desde el espacio intermembrana al citoplasma celular, que iniciarán la cascada de reacciones que culminan en la apoptosis o muerte celular programada (Ott y cols., 2007). El citocromo *c* está cargado positivamente y se



# I. INTRODUCCIÓN

---

une a la cardiolipina (cargada negativamente) en la cara exterior de la membrana interna mitocondrial. La salida de citocromo *c* a través del PPTm o poros Bax/Bak requiere un aumento de ROS mediante un mecanismo que implicaría la peroxidación de la cardiolipina, que provoca un cambio de sus propiedades físicas, necesaria para romper la unión del citocromo *c* a la cardiolipina, y por tanto a la membrana interna mitocondrial (Ott y cols., 2002). El daño oxidativo en el ADN causa modificaciones en la bases púricas y pirimidínicas, la estructura molecular de la desoxirribosa, roturas en la cadenas dobles y sencillas, además de crear enlaces cruzados en otra moléculas. Modificaciones en el ADN son potencialmente mutagénicas contribuyendo a la aparición de cáncer, envejecimiento prematuro y enfermedades neurodegenerativas. Una importante diana de ROS es el ADN mitocondrial (ADNmt), que codifica para 30 polipéptidos y 22 ARN de transferencia, que son esenciales para la cadena de transporte de electrones y generación de ATP por fosforilación oxidativa. El ADNmt es especialmente susceptible al ataque de ROS debido a su proximidad a la cadena de transporte de electrones y la falta de histonas protectoras.

Bajo condiciones de estrés oxidativo el ADNmt contiene un número de entre 10 y 20 veces mayor de bases modificadas oxidativamente que el ADN nuclear. El daño oxidativo en el ADN es la principal fuente de inestabilidad genómica de la mitocondria y conlleva a la disfunción respiratoria. Además esta inestabilidad genómica mitocondrial es uno de los factores más importantes en el envejecimiento.

Un importante mecanismo de toxicidad del  $O_2^{\cdot-}$  es la oxidación directa e inactivación de las proteínas hierro-azufre (Fe-S), tales como las aconitasas y las asociadas liberación de hierro. Dada liberación de hierro, este se puede conjugar con  $H_2O_2$ , siendo los ingredientes para la reacciones de Haber-Weiss y Fenton que pueden resultar en la generación de radicales hidroxilo que puede oxidar proteínas, ADN y lípidos mitocondriales amplificando así el daño iniciado por el  $O_2^{\cdot-}$ .

La aconitasa mitocondrial (que posee una centro Fe-S) juega un papel importante en el ciclo de Krebs catalizando la conversión de citrato a isocitrato. La inhibición de la aconitasa resulta en una disfunción del ciclo teniendo un gran impacto en la producción energética y la viabilidad celular. Otra proteína Fe-S que es afectada por el  $O_2^{\cdot-}$  la





# I. INTRODUCCIÓN

---

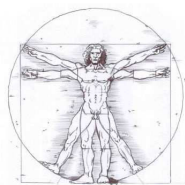
NADH deshidrogenasa del complejo I. Las proteínas oxidadas son reconocidas por las proteasas para ser degradadas y deben ser reemplazadas por su síntesis *de novo*.

La peroxidación lipídica en la mitocondria puede conducir a una supresión del metabolismo mitocondrial. Los peróxidos lipídicos afectan a las funciones vitales de la mitocondria, tales como la fosforilación oxidativa, las propiedades de barrera selectiva de la membrana interna, mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial y la capacidad de tamponamiento de calcio (Zhang y cols., 1990; Albano y cols., 1991; Bacon y cols., 1993). La propiedad de barrera selectiva de la membrana interna mitocondrial se puede ver afectada por los productos de la peroxidación lipídica mitocondrial que pueden interactuar directamente con las proteínas y/o indirectamente con la fracción lipídica de la membrana (Chen y cols., 1995).

Un efecto pernicioso de las ROS es la facilitación de la permeabilidad transitoria mitocondrial dependiente de calcio, que juega un papel en ciertos modos de muerte celular. Adicionalmente, las ROS producen liberación de calcio desde depósitos intracelulares, mitocondriales y sensibles a agonistas (Pariante y cols., 2001), además de participar en la entrada capacitativa de calcio (Rosado y cols., 2004). A pesar de que la mitocondria tiene un papel crucial en la homeostasis del calcio, debido a su captación y retención su capacidad es limitada.

Si el calcio acumulado excede cierto umbral de concentración, será consecuentemente liberado desde la mitocondria por el PPTm. El umbral de calcio del PPTm disminuye cuando la recaptación de calcio está acompañada por estrés oxidativo y depleción de nucleótidos de adenina. De hecho ha sido propuesto que las ROS generadas en la mitocondria están directamente involucradas en la inducción de PPTm. Por tanto, tanto el estrés oxidativo como el fallo en la homeostasis del calcio contribuyen al daño celular mediado por la mitocondria. El PPTm resulta en fallo mitocondrial, que puede conducir a la necrosis debido a la depleción de ATP, o también, a una apoptosis mediada por caspasas si el PPTm se da en una subpoblación de mitocondrias y otras quedasen intactas para producir suficiente ATP para sostener energéticamente el proceso de apoptosis.

La relación entre ROS y apoptosis ha sido puesta de manifiesto en diversos trabajos. En concreto nuestro grupo de investigación ha observado que el tratamiento de



# I. INTRODUCCIÓN

---

plaquetas con su agonista fisiológico trombina, genera  $H_2O_2$  y despolariza la membrana mitocondrial induciendo consecuentemente apoptosis, eventos que quedaron inhibidos tras el tratamiento con catalasa. Cuando se trataron las plaquetas con  $H_2O_2$  exógena aumentó significativamente la liberación de citocromo c de la mitocondria y la activación de la caspasa-9. Como consecuencia de tales eventos hubo un aumento en la activación de la caspasa-3 y la externalización de la fosfatidil serina (López y cols., 2007). Adicionalmente, hemos puesto de manifiesto que el tratamiento con  $H_2O_2$  de células de pancreatoma de rata AR42J induce un aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , despolarización mitocondrial, liberación de citocromo c y activación de caspasa-3 a través de un mecanismo que requiere la recaptación mitocondrial de calcio (Morgado y cols., 2008). En células germinales, como los espermatozoides humano expuestos a tratamiento con  $H_2O_2$  hemos observado que existe un aumento de la activación de las caspasas -3 y -9 y posterior externalización de fosfatidil serina, en un proceso  $Ca^{2+}$ -dependiente (Bejarano y cols., 2008).

## 1.3.2 ROS y la homeostasis del calcio

El calcio es un importante segundo mensajero participando en muchas actividades celulares; alteraciones de la homeostasis del calcio, particularmente un aumento excesivo y prolongado en la  $[Ca^{2+}]_c$  debido al vaciamiento de los almacenes intracelulares o a la entrada de calcio desde el medio extracelular, se ha sugerido ser una señal que precede al proceso de la apoptosis (Nicotera y Orrenius, 1998; Cerella y cols., 2010). Se ha demostrado que el vaciamiento de los depósitos de calcio induce directamente la activación de la apoptosis (Pan y cols., 2000) y que la entrada de calcio desde el medio extracelular es un fenómeno apoptogénico (Jiang y cols., 1994).

El incremento de la  $[Ca^{2+}]_c$  induce incrementos excesivos en la concentración mitocondrial de calcio, llegando incluso a provocar la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la posterior generación de ROS (López y cols., 2007) y apertura del PPTm. Se ha postulado que la apertura del PPTm está asociada a la acumulación de calcio por la mitocondria (Brookes y cols., 2004; Bernardi y Rasola,

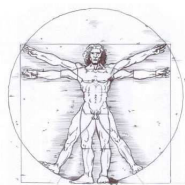


# I. INTRODUCCIÓN

---

2007), por otro lado, estudios experimentales han sugerido que sea una consecuencia de la producción de ROS, en el que una sobrecarga mitocondrial de calcio tendría un papel amplificador, como hemos comentado anteriormente. Diversos estudios experimentales apoyan estos acontecimientos, en particular, el tratamiento de plaquetas con TPEN, quelante de calcio reticular, induce estrés reticular activando caspasas -3, -8 y -9 y promueve la externalización de fosfatidil serina (Marciniak y cols., 2004). En otro tipo celular, como son los espermatozoides, tanto su agonista fisiológico, la progesterona, como el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> evocan la apoptosis mediada por una señal de calcio citosólico y la recaptación de dicho calcio por la mitocondria (Bejarano y cols., 2008; Nicotera & Orrenius, 1998). Adicionalmente, tanto en linfocitos como en neutrófilos, se ha visto que el aumento de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> induce una apertura del PPTm, activación de Bax y liberación de citocromo c, que condujeron a un descenso de la viabilidad celular (Espino y cols., 2010a).

El incremento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> también puede afectar a múltiples enzimas, incluyendo proteasas activadas por calcio, la calcineurina, endonucleasas, fosfolipasas, la oxido nítrico sintasa, calpaínas y transglutaminasas. Estas enzimas controlan la ruptura de numerosos constituyentes celulares, alguno de los cuales están asociados directamente con el proceso apoptótico (Verkhatsky, 2007). Sin embargo, se ha demostrado que tanto la activación de la vía apoptótica extrínseca como la vía apoptótica inducida por el estrés reticular son independientes de incrementos en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> (Zuppini y cols., 2004; Vindis y cols., 2005; Henshall, 2007; Sharma y cols., 2006) y se ha hallado activación de las caspasas-3, -7, -8 mediante mecanismos independientes de incrementos en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> (Baumgartner y cols., 2007; Del Bello y cols., 2007). Alternativamente, hay estudios que indican la existencia de una activación temprana de caspasas no relacionada con el proceso apoptótico, que es llevada a cabo en la célula por mecanismo independientes de los aumentos de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> (Rosado y cols., 2006). También es posible que altas [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en el espacio intermembrana puedan potenciar la liberación del citocromo c compitiendo por los sitios de unión de la cardiolipina (Iverson y Orrenius, 2004). En ocasiones la mitocondria es responsable de decidir si la señal de calcio indica supervivencia o muerte celular. La transferencia de calcio desde retículo endoplásmico a la mitocondria son necesaria para el inicio de determinadas señales apoptóticas



# I. INTRODUCCIÓN

---

(Scorrano y cols., 2003). Debido a la toxicidad de las altas concentraciones de calcio, este se debe mantener a bajas concentraciones en el citosol, encontrándose la mayoría del calcio almacenado en el ER. El calcio es bombeado al interior del ER por la SERCA, y es liberado por señalización molecular mediante la apertura de canales receptores de 1,4,5-trifosfato (IP3R) o rianodina (RYR) (Berridge y cols., 2000). Una parte significativa del calcio liberado es captado por la mitocondria que se encuentra estratégicamente colocada cerca de los canales de liberación de calcio desde el ER (Rizzuto y cols., 1993).

Esta proximidad facilita que la mitocondria module, propague y sincronice la señal de calcio, previniendo al retículo de una depleción reciclando el calcio hacia el retículo de nuevo (Jouaville y cols., 1995; Arnaudeau, 2001). De esta manera la mitocondria además de poner a punto las actividades metabólicas de la célula, puede disparar o retener la señal de apoptosis dependiendo de la magnitud de la señal de calcio mitocondrial, esta magnitud depende a su vez del contenido en calcio del ER (no del calcio libre en el retículo) y este a su vez del equilibrio entre la SERCA y los canales de liberación de calcio. En este sentido, se ha visto que la desestabilización mitocondrial inducida por calcio podría cooperar con la permeabilización de la membrana externa mitocondrial inducida por Bax, y por consiguiente, con la liberación de citocromo *c* (Gogvadze y cols., 2010).

Se han propuesto dos grandes rutas apoptóticas mediadas por enzimas  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes (Rizzuto y cols., 1993; Orrenius y cols., 2003). Una de ellas es la ruta mediada por calpaína, proteasa dependiente de calcio (Goll y cols., 2003; Cheng y cols., 1999; Newcomb, 1998; Harwood y cols., 2005; Nakagawa y Yuan, 2000; Wood y Newcomb, 1999; Mandic y cols., 2002); la otra es la ruta mediada por calcineurina, una fosfatasa  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-dependiente (Devireddy y Green, 2003; Wright y cols., 1997; Fladmark y cols., 2002). El papel de la calpaína en la apoptosis es llevado a cabo a través de Bax y Bid. La calpaína produce la rotura de Bax desde su tamaño completo (21 kDa) a un fragmento (18 kDa) que activa su función apoptótica (Newcomb, 1998). Igualmente, la calpaína puede provocar la activación de Bid por clivaje en un fragmento activo (Chen y cols., 2001). Bax y Bid activos conllevan a la permeabilización de la membrana y consecuente liberación de citocromo *c* y otros factores proapoptóticos de



# I. INTRODUCCIÓN

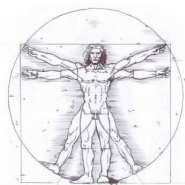
---

origen mitocondrial (Wood y Newcomb, 2000). Se ha visto recientemente que la calpaína activada rompe AIF mitocondrial unido a membrana y es liberado al citosol cuando la mitocondria es permeabilizada (Norberg y cols., 2008). Adicionalmente, el tratamiento de las células con antioxidantes evitó modificaciones oxidativas (carbonilación) de AIF y su subsecuente rotura por la calpaína y liberación desde la mitocondria, en un proceso liderado por el aumento de la  $[Ca^{2+}]_c$ . Así la calpaína va a contribuir en el desarrollo de la apoptosis por vía intrínseca (Norberg y cols., 2010). El papel de la calcineurina en la apoptosis consiste en la capacidad de defosforilación de Bad; dicha defosforilación libera Bad de su proteína inhibidora 14-3-3 en el citosol y así Bad se transloca a la mitocondria donde liberará citocromo *c* e iniciará la cascada de caspasas (Springer y cols., 2000).

Finalmente, también se ha puesto de manifiesto que agonistas fisiológicos movilizadores calcio intracelular, como la trombina en plaquetas, inducen la activación de caspasas -3 y -9 favoreciendo su translocación al citoesqueleto, y a pesar de que se origina un aumento de la  $[Ca^{2+}]_c$ , el mecanismo por el cual se lleva a cabo es independiente de calcio (Amor y cols., 2006). Alternativamente, cuando los depósitos intracelulares de calcio de plaquetas humanas son vaciados con tapsigargina e ionomicina se produjo una activación de caspasas -3 y -9, pero no translocación de las mismas al citoesqueleto, además se verificó que el aumento de la  $[Ca^{2+}]_c$  no era el responsable de dicha activación de caspasas (Amor y cols., 2006). Adicionalmente, se demostró que la activación y translocación de caspasas inducidas por trombina, requieren la participación de la proteína cinasa C (PKC) y la reorganización del citoesqueleto de actina. A pesar de que no parece ser primordial la translocación de las caspasas al citoesqueleto, sí contribuye en su activación (Ben Amor y cols., 2006).

### *1.3.3 Papel de las ROS en trastornos del crecimiento celular*

Está ampliamente documentado que las ROS, tienen un papel clave en la génesis de dos procesos, aparentemente opuestos, como son la apoptosis y el cáncer. También se ha demostrado que varios oxidantes bajo condiciones subtóxicas inducen un incremento



# I.INTRODUCCIÓN

---

en la concentración citosólica de calcio, lo que sugiere un posible papel fisiológico de los agentes oxidantes en la regulación de la señal de calcio (Suzuki y cols., 1997). Hay que señalar que las diferentes isoformas de la SERCA difieren en su susceptibilidad al daño por peróxido de hidrógeno (Grover y cols., 1997).

Ha sido descrita la participación de las ROS en el proceso de activación de los linfocitos T, aumentando la respuesta inmunitaria y los procesos inflamatorios, y provocando también en último extremo la activación de rutas de señalización que desencadenan el proceso de apoptosis celular (Jacobson y cols., 1994; Castedo y cols., 1996). El NO por ejemplo, ha sido implicado directamente en la apoptosis, ya que produce un descenso en la concentración de cardiolipina y en la actividad de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, que provocará en último término la liberación del citocromo *c* al citosol y la inducción de la apoptosis (Umansky y cols., 2000). Otras evidencias de la actividad de las ROS en la activación de la apoptosis, se muestran en los linfocitos humanos, donde la proliferación se ve inhibida por dosis bajas de  $O_2$  y el  $H_2O_2$  induce apoptosis, porque participa en la formación del radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ). Otro ejemplo es el TNF- $\alpha$  que posee un efecto oxidativo, gracias al cual realiza su función y destruye a las células tumorales infectadas por virus. Igualmente, se ha comprobado que  $H_2O_2$  moviliza calcio desde los compartimientos intracelulares en astrocitos del hipocampo (González y cols., 2006) y células acinares pancreáticas (Pariente y cols., 2001).

La respiración mitocondrial genera además de un gradiente de protones, una apreciable cantidad de radical superóxido, sugiriendo una interesante correlación entre estrés oxidativo, la integridad mitocondrial y el fenómeno de la apoptosis (Kim y cols., 2004). De hecho existe en la mitocondria una  $Mn^{2+}$ -superóxido dismutasa que se encarga de retirar de la mitocondria los radicales superóxidos originados, de ahí que cuando promovemos una hiperactividad mitocondrial, mediante estímulos celulares que acarrearán un acúmulo excesivo de calcio en su interior, la producción de radicales es tan grande que esta enzima no pueda tamponarla y se originen daños en la mitocondria (Brookes y cols., 2004b).

Este superóxido creado por la mitocondria es convertido en  $H_2O_2$  tanto por dismutación espontánea como por la enzima superóxido dismutasa (SOD). Otro



# I. INTRODUCCIÓN

---

importante regulador de las ROS mitocondriales es el potencial de membrana mitocondrial. La generación de ROS es exponencialmente dependiente del potencial de membrana mitocondrial (Starkov y Fiskum, 2003), y tanto los desacopladores químicos (por ejemplo, el 2,4-dinitrofenol) (Okuda y cols., 1992) y las nuevas proteínas desacopladoras (UCPs) (Negre-Salvayre y cols., 1997) parecen disminuir la generación de ROS en células enteras y órganos, aunque experimentos *in vitro* con mitocondrias aisladas han revelado efectos contrarios (Cadenas y Boveris, 1980).

Algunos autores opinan que el poder que las especies reactivas de oxígeno tienen para desencadenar procesos apoptóticos, radica en que activan las proteínas caspasa-2 y -9, e inactivan el factor antiapoptótico (Bcl-2), mediante cambios en el pH de la matriz mitocondrial (Takahashi y cols., 2004).

En cuanto al proceso contrario, la proliferación descontrolada de las células que induce la aparición de cáncer, las ROS también tienen una relación directa con este fenómeno; ya que los radicales libres inducen cambios en la secuencia del ADN, que comprenden fenómenos de mutaciones puntuales, deleciones genéticas, amplificación de genes, etc. Estos cambios que provocan activan la expresión de varias moléculas que actúan como señales en la regulación del metabolismo o la regulación del crecimiento, etc.

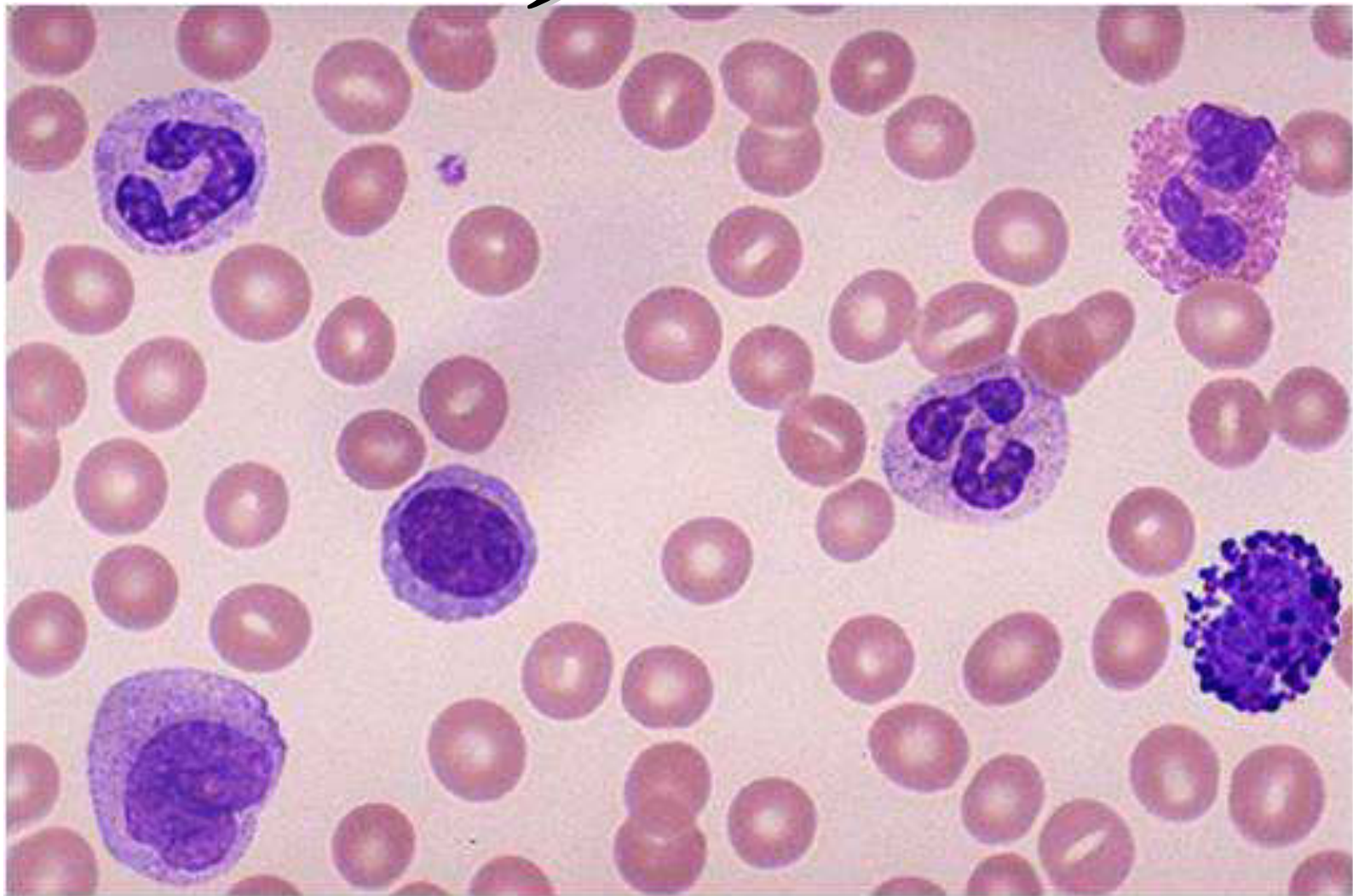
Bajo el estrés oxidativo las ROS desencadenan cascadas de señalización como la de las cinasas de regulación extracelular (ERK), las cinasas amino terminales c-Jun (JNK) y la cinasa proteica p38 activada por mitógenos (MAPK), la vía fosfatidilinositol 3 cinasa (PI<sub>3</sub>K/Akt), el factor nuclear-kappa β (NF-κβ) y las cinasas responsables del choque térmico (HSPF1) (Johnson y cols., 1996; Finkel y Holbrook, 2000); que desencadenan la replicación y traducción descontrolada de algunos genes, y alteran el ciclo vital celular haciendo que la célula se divida descontroladamente.

También se ha comprobado que las ROS dotan a algunos tipos de cáncer, de la capacidad de mutar, evadiendo así los mecanismos de protección de los organismos y provocando daños en los tejidos locales, tales como la invasión de otros tejidos anexos, o incluso la capacidad de migrar y producir metástasis tumoral (Mates, 1999).

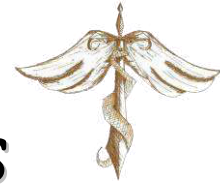




## 2. OBJETIVOS <OBJECTIVES>







## 2.OBJETIVOS/OBJECTIVES

---

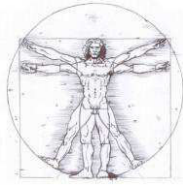


La apoptosis o muerte celular programada es un proceso fisiológico que implica a una serie de acontecimientos bioquímicos en cascada muy finamente regulados, de vital importancia en el desarrollo de los organismos pluricelulares siendo esencial en algunos procesos fisiológicos y en donde las células activan su propia muerte (células suicidas). Es por tanto un importante programa de suicidio celular implicado en procesos tanto fisiológicos como patológicos. Le permite al organismo controlar su número celular y su tamaño tisular manteniendo la homeostasis celular y controlando así el número de células del organismo entero.

Por otro lado, la tecnología de los nanomateriales está evolucionando rápidamente y cada vez se encuentran más aplicaciones para este campo en crecimiento. En el caso concreto de la nanocería, estudios de carácter físico-químicos han revelado que posee un gran potencial como antioxidante y aseguran que se trata de una sustancia inocua. Sin embargo, todavía se necesita una sólida cantidad de estudios biológicos que corroboren dicha presunción.

Ante esta situación, el objetivo principal de esta tesis es el de estudiar la relación entre las especies reactivas de oxígeno, la señal de calcio intracelular y la apoptosis, utilizando para ello la líneas celular HL-60, y comparando su comportamiento con el de las líneas celulares K-562 y U937. Los objetivos específicos que nos hemos planteados son:

- 1- Analizar la señal de calcio inducida por agonistas típicos de la línea de leucemia promielocítica aguda HL-60 como es el UTP, así como la provocada por la taspigargina, además de la especie reactiva de oxígeno  $H_2O_2$ .



## **2.OBJETIVOS/OBJECTIVES**

---

- 2- Estudiar si la señal de calcio inducida por el UTP, la taspigargina y  $H_2O_2$  son capaces de producir despolarización mitocondrial y estimular la actividad caspasa-3 y -9 en las células HL-60.
- 3- Estudiar si el  $TNF\alpha$  es capaz de provocar apoptosis en las línea celular HL-60, así como en la línea mielógena K562 y en la línea de linfoma histiocítico U937.
- 4- Estudiar si la apoptosis producida por TNF está mediada no sólo por la vía extrínseca, sino también si es dependiente de la producción de ROS en las líneas HL-60, K562 y U937.
- 5- Comprobar el efecto de la nanoceria como agente antioxidante en la apoptosis producida por  $TNF\alpha$  en la línea U937.

## 2.OBJETIVOS/OBJECTIVES

---

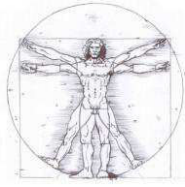


Apoptosis or programmed cell death is a physiological process which involves a number of biochemical events accurately regulated, of huge relevance in terms of the development of multicellular organisms, being essential in some physiological processes where cells activate their own death (suicidal cells). That is why it is an important program of cellular suicide implicated in both physiological and pathological processes. That process allows the organism to control its number of cells and its tissue size supporting cellular homeostasis and thus controlling the number of cells in the whole organism.

On the other hand, nanomaterials technology is growing rapidly and new applications are found every day. In the concrete case of nanocerium, physical-chemical studies have shown it has a big potential as an antioxidant and seems to be an innocuous substance. However, a solid number of biological studies that are able to corroborate such a suspicion are still needed.

Considering that, the main objective of this thesis is studying the relationship between reactive oxygen species, intracellular calcium signaling and apoptosis, using for this the cell line HL-60 and comparing its behaviour with the cell lines K-562 and U937. The specific aims we have suggested are:

- 1- Analysing the calcium signaling induced by agonists, which are typical of human acute promyelocytic leukemia cell line HL-60 like UTP, as well as the signaling induced by thapsigargin and the reactive oxygen species  $H_2O_2$ .
- 2- Studying whether calcium signaling induced by UTP, thapsigargin and  $H_2O_2$  are able to produce mitochondrial depolarization and stimulate caspase-3 and -9 activity in HL-60 cells.

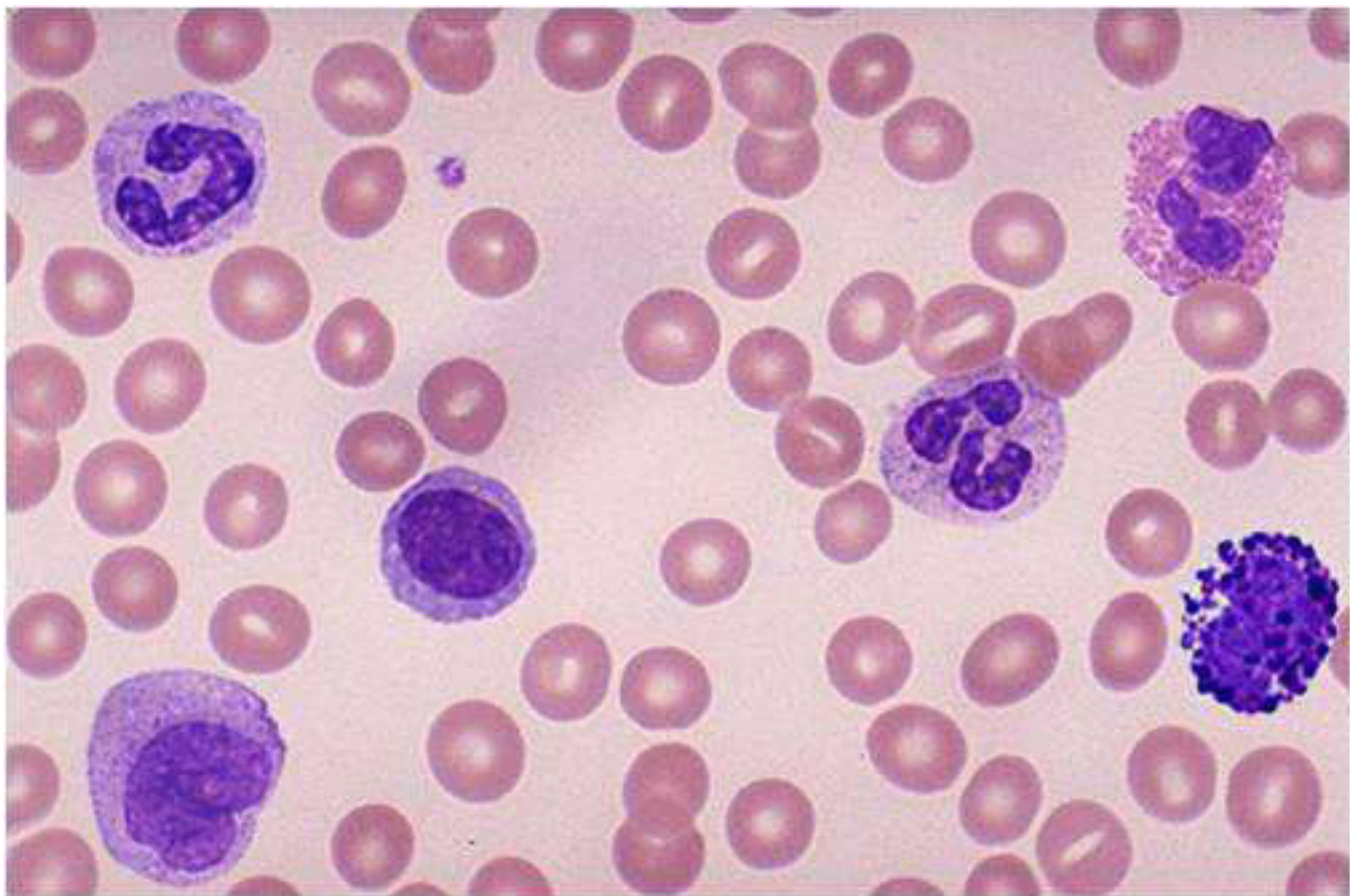


## **2.OBJETIVOS/OBJECTIVES**

---

- 3- Examining whether  $TNF\alpha$  is able to induce apoptosis in HL-60 cell line, as well as in the myelogenous line K562 and in the histiocytic lymphoma line U937.
- 4- Reviewing whether TNF-produced apoptosis is mediated not only by extrinsic pathway, but ROS production too, in HL-60, K562 and U937 lines.
- 5- Checking the effect of nanoceria as antioxidant agent in  $TNF\alpha$ -produced apoptosis in U937 cell line.

# 3. MATERIALES Y MÉTODOS







## 3.MATERIALES Y MÉTODOS

---



### 3.1 LISTA DE REACTIVOS

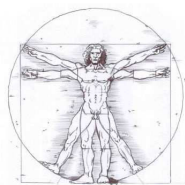
Los reactivos empleados en la realización de los experimentos son agrupados a continuación, según la característica o función que presentan en común.

#### *3.1.1. Líneas celulares y los medios de cultivo*

- Línea celular HL-60 (ECACC)
- Línea celular K562 (ECACC)
- Línea celular U937 (ECACC)
- Albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma Aldrich Química<sup>®</sup>, S.A.)
- Medio RPMI-1640 (Lonza<sup>®</sup>)
- Penicilina (HyClone<sup>®</sup>)
- Estreptomina (HyClone<sup>®</sup>)
- L-Glutamina (Lonza<sup>®</sup>)
- Kit de detección de micoplasma (Sigma<sup>®</sup>)

#### *3.1.2. Fluoróforos*

- DHR-123 (Sigma<sup>®</sup>)
- Diclorofluoresceína (Invitrogen)
- Fluo4-AM (Invitrogen)
- Fura 2-AM (Molecular Probes<sup>®</sup>)
- MitoTracker Red (Molecular Probes<sup>®</sup>)
- Sustrato de caspasa -3 (AC-DEVD-AMC) (Sigma<sup>®</sup>)
- Sustrato de caspasa -8 (Sigma<sup>®</sup>)



## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

- Sustrato de caspasa-9 (AC-LEHD-AMC) (Sigma<sup>®</sup>)
- Tetrametil rodamina (TMRM)(Molecular Probes<sup>®</sup>)

### 3.1.3. Otros reactivos utilizados

- Ácido bis-(o-aminofenoxi)-etano-N,N,N,N-tetracético/BAPTA/Sigma Aldrich Química<sup>®</sup>, S.A.)
- Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N,N,tetraacético (EGTA)(Sigma Aldrich Química<sup>®</sup>, S.A.)
- Ácido plurónico (Molecular Probes<sup>®</sup>)
- Cloruro cálcico (CaCl<sub>2</sub>/Panreac<sup>®</sup>)
- Cloruro de sodio (NaCl/Panreac<sup>®</sup>)
- Cloruro de potasio (KCl/Panreac<sup>®</sup>)
- Cloruro de magnesio (Cl<sub>2</sub>Mg/Panreac<sup>®</sup>)
- D(+)-Glucosa (Panreac<sup>®</sup>)
- DMSO (Sigma Aldrich Química<sup>®</sup>, S.A.)
- FCCP (Sigma Aldrich Química<sup>®</sup>, S.A.)
- HEPES (Sigma<sup>®</sup>)
- Inhibidor de caspasa-3 (Sigma<sup>®</sup>)
- Inhibidor de caspasa-8 (Sigma<sup>®</sup>)
- Inhibidor de caspasa-9 (Sigma<sup>®</sup>)
- Inhibidor pancaspasa (Sigma<sup>®</sup>)
- Nanocería (Departamento de Química de la Universidad de Tor-Vergata)
- N-acetil-cisteína (Sigma<sup>®</sup>)
- NP-40 (Sigma<sup>®</sup>)
- PEG (Sigma<sup>®</sup>)
- Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Sigma Aldrich Química<sup>®</sup>, S.A.)
- Ru360 (C<sub>2</sub>H<sub>26</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>8</sub>O<sub>5</sub>Ru<sub>2</sub>) (Calbiochem<sup>®</sup>)
- Tapsigargina (Sigma Aldrich Química<sup>®</sup>, S.A.)
- TNF $\alpha$  (Sigma<sup>®</sup>)



### 3.MATERIALES Y MÉTODOS

- Tritón X-100 (Sigma Aldrich Química<sup>®</sup>, S.A.)
- Trolox (Sigma<sup>®</sup>)
- Uridín trifosfato (UTP) (Sigma Aldrich Química<sup>®</sup>, S.A.)

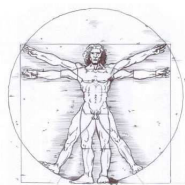
#### 3.1.4 Composición de diferentes tampones o soluciones

COMPOSICIÓN DEL Na <sup>+</sup> -HEPES*		
Reactivos	Concentración (mM)	Concentración (g/L)
HEPES	10	2,383
Cloruro sódico	140	8,19
Cloruro potásico	4,7	10,43
Glucosa	10	1,801
Cloruro cálcico <sup>1</sup>	1,5	0,113
EGTA <sup>1</sup>	2	0,76
Cloruro de Magnesio	1	0,06

<sup>1</sup>: Para preparar la solución libre de Ca<sup>2+</sup>, se añadía 2 mM de EGTA, y no se añadía Cl<sub>2</sub>Ca.

\*: El pH se ajusta entre 7,3 y 7,4 añadiendo NaOH 0,5 M.

COMPOSICIÓN DEL HBSS		
Reactivos	Concentración (mM)	Concentración (g/L)
NaCl	140	8,19
KCl	5,3	0,4
NaHCO <sub>3</sub>	4,2	0,35
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,34	0,048
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,34	0,06



### 3.MATERIALES Y MÉTODOS

---

#### COMPOSICIÓN DEL TAMPÓN DE CASPASAS -3 y -8\*

Reactivos	Concentración (mM)	Concentración (g/L)
HEPES	100	23,83
CHAPS	1,63	1
Sacarosa	292	100

\*: El pH se ajusta entre 7,3 y 7,4 añadiendo NaOH 0,5 M, en agitación constante.

#### COMPOSICIÓN DEL TAMPÓN DE CASPASA -9\*

Reactivos	Concentración (mM)	Concentración (g/100 mL)
Mes	89,8	19,5
PEG	0,5	100
CHAPS	1,63	1

\* El pH se ajusta a 6,5.



## 3.MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 3.2 CULTIVOS CELULARES

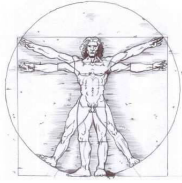
#### *3.2.1 Cultivo de células HL-60*

La línea de células leucémicas promielocíticas humanas HL-60 se cultivó en flasks de 75 cm<sup>2</sup> con medio RPMI1640 suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal inactivado por calor, 1,25% de DMSO, 1% de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100 U/mL de estreptomina a 37 °C en una atmósfera húmeda que contenía 5% de CO<sub>2</sub>. Los cultivos presentaron tiempos de desdoblamiento de aproximadamente 48 horas. Se cambiaba la mitad del medio una vez se alcanzaba aproximadamente el 75-80% de confluencia bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar. Los recuentos de células se realizaron usando cámaras de Neubauer, y la viabilidad fue medida usando el colorante trypan-blue.

El trypan blue es un colorante vital que permite una fácil identificación de las células muertas. Estas toman el colorante y se muestran azuladas con las membranas celulares desiguales. Por el contrario, las células vivas repelen el colorante y aparecen translúcidas e incoloras.

#### *3.2.2 Cultivo de células K562*

Las células K562 fueron la primera línea leucémica mioelógena inmortalizada. Estas células son de eritroleucemia, y la línea se deriva de un paciente CML femenino



## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

de 53 años en crisis blástica (Lozzio & Lozzio, 1975). Las células (pases 6 a 12) crecieron en medio RPMI 1640 suplementado con 2 mM de L-glutamina, 10% de suero bovino fetal inactivado por calor, 100 U/mL de penicilina, 100  $\mu$ g/mL de estreptomina a 37°C bajo atmósfera húmeda con 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células fueron cambiadas periódicamente a una densidad de  $3 \cdot 10^5$  células/mL en flask nuevos y la viabilidad fue superior al 95% en todos los experimentos como se pudo comprobar por el método de exclusión de trypan-blue.

### *3.2.3 Cultivo de células U937*

Las células U937 son monocitos tumorales humanos estabilizados a partir de linfoma histiocítico (Ghibelli y cols., 1998). Las células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal de ternero (FCS), y periódicamente analizado para evitar la presencia de micoplasma usando el kit de detección de micoplasma (Myco-alert TM, Cambrex Bio Science, Milán, Italia). Los experimentos fueron realizados sobre células en la fase logarítmica de crecimiento bajo condiciones de al menos 98% de viabilidad, comprobándolo por el método de exclusión de trypan blue.

## 3.MATERIALES Y MÉTODOS

---

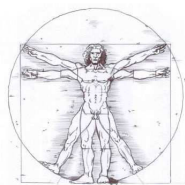


# 3.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL CALCIO INTRACELULAR

### *3.3.1 Características de los fluoróforos*

El Fura 2-acetilmetiléster (Fura 2-AM) se ha convertido en los últimos años en una herramienta fundamental para detectar variaciones intracelulares de la concentración de calcio. Entre sus características destaca poseer una  $K_d$  para el calcio de 150-250 nM, que le permite detectar variaciones de calcio muy pequeñas (del orden de nM). Además presenta dos longitudes de onda de excitación, una a 340 y la otra a 380 nm, y una longitud de onda de emisión de 505 nm, por lo que cuando el ión calcio se une a la molécula, se va a producir un incremento de fluorescencia emitida a 505 nm si excitamos el fluoróforo a la longitud de onda de 340 nm, mientras que por el contrario a la longitud de onda de 380 nm la fluorescencia emitida disminuye. Estas características garantizan que obtengamos una lectura de la concentración de calcio correcta, e impide los errores que conllevan el fotoblanqueo de la sonda o artefactos debidos a la manipulación de las muestras.

Otra cualidad importante de esta sonda es que presenta el punto isobético (punto de isofluorescencia) a 360 nm, lo que resulta útil a la hora de monitorizar los cambios en la fluorescencia no dependiente de calcio o para apreciar la pérdida de fluorescencia (“quenching”), cuando la molécula se une a algunos metales pesados como el  $Mn^{2+}$ .



## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

El inconveniente que presenta el emplear esta sonda es que si nos excedemos tanto en la concentración de Fura 2-AM, como en el tiempo de incubación de las células, puede que las esterasas citosólicas no tengan la capacidad de romper todos los grupos acetoximetil ester, que permiten que la sonda atraviese las membranas, y en tal caso se puede originar compartimentalización de la sonda en diferentes orgánulos intracelulares.

Por su parte, el Fluo-4 también se usa para medir concentraciones de calcio dentro de células vivas, y a menudo se usa en el criblado de alto rendimiento de ligandos de receptor y canales iónicos permeables a calcio.

El Fluo-4, de fluorescencia verde, es una versión mejorada de la sonda de calcio Fluo-3. Es comúnmente usada en su forma no fluorescente de acetoximetil éster (Fluo-4 AM), la cual será cortada por las esterasas citosólicas para liberar el compuesto fluorescente, el Fluo-4. Se carga más rápido, es más brillante a concentraciones equivalentes y se excita bien en 488 nm, longitud del láser del argón, el cual es usada a menudo en laboratorios de investigación biológica (Gee y cols., 2000). El único distribuidor y propietario de la patente es la compañía Invitrogen, que a su vez la adquirió de su inventor original, Molecular Probes.

### 3.3.2 Condiciones de carga del Fura 2-AM

Para llevar a cabo la carga con el Fura2-AM, incubamos las células HL-60 resuspendidas en Na-HEPES ( $\approx 4 \cdot 10^6$  células/mL) con el indicador fluorescente (2  $\mu$ M) durante 45 minutos a 37°C en oscuridad y en presencia de plurónico al 0,04%. Una vez finalizado el período de incubación realizamos una centrifugación suave (150 g) durante 5 minutos y retiramos el sobrenadante, que contiene el exceso del fluoróforo que no ha entrado en las células. Finalmente, resuspendemos el precipitado en nuevo medio de Na-HEPES.

La determinación de la concentración de calcio intracelular se realiza empleando un espectrofluorímetro (Shimadzu RF-5301 PC), en el que introducimos las muestras a razón de 2 mL en la cubeta del espectrofluorímetro atemperado y con agitación continua. Así garantizamos la homogeneidad de la suspensión celular y mantenemos las





## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

muestras a una temperatura constante de 37 °C durante la realización de los experimentos.

Las sustancias empleadas en los ensayos se añadieron directamente en la cubeta a partir de soluciones madre de diferentes concentraciones, para obtener en la cubeta la concentración final deseada. Las muestras se excitaron alternativamente con longitudes de onda de 340 y 380 nm, y se recoge la fluorescencia emitida a la longitud de onda de 505 nm. Los cambios en la concentración de calcio intracelular fueron monitorizados y expresados como el ratio de la fluorescencia emitida cuando excitamos las células a 340 nm, dividido por la emitida al excitar a 380 nm (Ratio: 340/380).

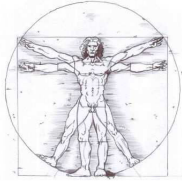
### *3.3.3 Condiciones de carga del Fluo4-AM*

Para llevar a cabo la carga con el Fluo-4,  $1 \cdot 10^7$  células U937/mL se lavaron dos veces en la solución salina balanceada de Hank (HBSS) junto con 1 mg/mL de glucosa y 650 mM de  $\text{CaCl}_2$  para posteriormente incubar con 1 mM de Fluo-4-AM en oscuridad a 20 °C durante 40 minutos. Después de eliminar el sobrenadante, las células U937 se resuspendieron en HBSS en adición a 1 mg/mL de glucosa y 650 mM de  $\text{CaCl}_2$  a una concentración de  $2 \cdot 10^6$  células/ml durante 20 minutos.

La determinación de la concentración de calcio intracelular se realizó por citometría de flujo usando el citómetro de flujo FACSCalibur y los datos fueron analizados con el software WinMdi 2.9.

### *3.3.4 Tratamiento y elaboración de los datos obtenidos*

Una vez hemos registrado los valores de ratio de Fura-2 (340/380) de la fluorescencia obtenida en los experimentos se calculó la concentración de calcio libre intracelular por el método de Grynkiewicz y cols., (1985), cuya fórmula se describe a continuación:



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \left( \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right) \beta$$

En donde: -  $R_{min}$ : Ratio de fluorescencia en medio libre de  $Ca^{2+}$ .

-  $R_{max}$ : Ratio de fluorescencia en condiciones de saturación de  $Ca^{2+}$

-  $\beta$ : Cociente entre  $S_f$  (intensidad de fluorescencia en ausencia de  $Ca^{2+}$  a 380 nm.) y  $S_b$  (intensidad de fluorescencia del fura saturado de  $Ca^{2+}$  a 380 nm).

-  $K_d$ : Constante de disociación del indicador para el  $Ca^{2+}$ , esta suele variar en función de la temperatura. A 37 °C es de 214 nM para el fura 2-AM, y de 400 nM para el fluo4-AM..

Para obtener estos parámetros, se calibró cada experimento. La calibración consiste en saturar de calcio el medio extracelular añadiendo a la cubeta una concentración final de calcio de 1 mM. El  $S_b$  y  $R_{max}$  se obtiene cuando rompemos las células empleando una solución de Tritón X-100 (0,05 %), para que todo el Fura 2 existente en el interior de las células se ponga en contacto con el calcio. A continuación se obtiene el  $S_f$  y  $R_{min}$ , añadiendo una solución con una alta concentración de EGTA (50 mM).

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---



### 3.4 DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA

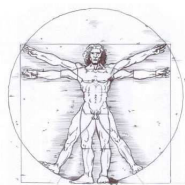
Para la determinación del potencial de membrana se utilizó la sonda fluorescente tetrametilrodamina (TMRM), JC-1 y la sonda MitoTracker Red.

La TMRM contiene en su estructura esteres etílicos y metílicos que permiten la entrada de la sonda a las células o los orgánulos dependiendo del potencial de membrana. Es por esto que se utiliza para calibrar el potencial de membrana mitocondrial en células vivas.

Para llevar a cabo la carga con el indicador fluorescente, incubamos las células HL-60 ( $\approx 4 \cdot 10^6$  células/ml) con TMRM (1  $\mu$ M) durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Una vez finalizado el período de incubación realizamos una centrifugación suave (150 g) durante 5 minutos y retiramos el sobrenadante, que contiene el exceso del fluoróforo que no ha entrado en las células. Finalmente resuspendemos el precipitado en nuevo medio de Na-HEPES.

También usamos el JC-1 (10  $\mu$ g/mL, 37° C, 15 minutos), que es uno de los marcadores más utilizados para detectar cambios en el potencial de membrana. Cuando el potencial de membrana es bajo se encuentra en forma monomérica y emite en verde, pero comenzará a agregarse y a emitir en rojo cuando el potencial de membrana aumenta.

La determinación de potencial de membrana mitocondrial se realiza empleando el espectrofluorímetro (Shimadzu RF-5301 PC), en el que introducimos las muestras a



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

razón de 2 mL en la cubeta del espectrofluorímetro atemperado y con agitación continua. Así garantizamos la homogeneidad de la suspensión celular y mantenemos las muestras a una temperatura constante de 37 °C durante la realización de los experimentos.

Las sustancias empleadas en los ensayos se añadieron directamente en la cubeta a partir de soluciones madre de diferentes concentraciones, para obtener en la cubeta la concentración final deseada. Las muestras se excitaron a una longitud de onda de 543 nm, y se recogió la fluorescencia emitida a la longitud de onda de 575 nm. Los cambios en el potencial de membrana mitocondrial fueron monitorizados, y normalizados presentándolos como cambios en la intensidad de fluorescencia con respecto al valor inicial ( $F/F_0$ ) y expresados como cambios en la intensidad de la fluorescencia emitida a 575 nm para el TMRM, y en el caso del JC-1 se recogió el ratio de fluorescencia emitida a 590 nm (agregados) y 525 nm (monómeros).

En el caso de las células U937, el potencial de membrana mitocondrial fue detectado por incubación con 100 nM de MitoTracker Red (MTR) durante 20 minutos. Las células fueron posteriormente lavadas con PBS dos veces y después medidas por citometría de flujo usando el citómetro de flujo FACSCalibur y los datos fueron analizados con el software WinMdi 2.9.

## 3.MATERIALES Y MÉTODOS

---



### 3.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CASPASA -3, -8

y -9

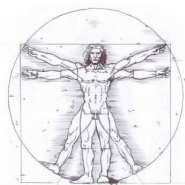
Una vez se han sometido las células ( $\approx 2 \cdot 10^6$  células/100  $\mu$ l) a los distintos tratamientos apoptóticos, se centrifugaron durante 5 minutos a 500 g.

Tras la centrifugación, se resuspendieron 15  $\mu$ L de suspensión celular en 2,5 mL de tampón de caspasa añadiendo 12,5  $\mu$ L de DTT (con una concentración de 5 mM) y 2,5  $\mu$ L de NP40 (para una concentración final del 0,001%) (Bejarano y cols., 2009). La función de dichos detergentes es producir la lisis celular y liberar así el contenido citosólico para que sea accesible después a los sustratos de caspasa.

Posteriormente, sobre los 2,5 mL de tampón de caspasa se le añadió el sustrato de caspasa correspondiente (0,7  $\mu$ L de sustrato de caspasa – 3 AC-DEVD-AMC, 2,5  $\mu$ L de sustrato de caspasa-8 AC-IEPD-AMC ó 2,5  $\mu$ L de sustrato de caspasa-9 AC-LEHD-AMC).

La actividad caspasa presente en el sobrenadante liberó el fluoróforo AMC (7-amino-4-metilcumarina) del sustrato de caspasa, el cual puede ser fácilmente determinado con la ayuda de un lector de placas o un espectrofluorímetro.

La determinación de la actividad caspasa se realizó empleando un lector de placa de fluorescencia (Infinite M200; Tecan Autria GmbH, Groedig, Austria) a razón de 250  $\mu$ L por pocillo, con longitud de onda de excitación de 360 nm y de emisión a 460 nm. Cada sustrato poseen las secuencias específicas que cada caspasa reconoce para así



## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

cortar y liberar el compuesto coloreado, momento en el cual este último comienza a emitir la señal fluorescente.

En general, la medida de actividad caspasa se mide uniendo un péptido coloreado tras el aspártico del sustrato específico de cada caspasa, de manera que la hidrólisis libere el compuesto fluorescente del tipo AMC. Normalmente se usan cumarinas.

Adicionalmente se midió un pocillo blanco, que contenía 250  $\mu$ L de PBS. Todos los tratamientos se realizaron por duplicado.

Los datos fueron calculados como unidades de fluorescencia por miligramo de proteína y se presentaron como incremento relativo respecto al nivel de pretratamiento (muestras sin tratar) (experimento/control).

### *3.5.1 Cuantificación de proteínas*

La medida de la concentración de proteínas con el reactivo Bradford, se basa en la unión de un colorante Coomassie Blue G-250 a las proteínas. El colorante, en solución ácida, está en dos formas, una de color azul y la otra de color naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Este método es sensible (1-15 $\mu$ g), simple, rápido, barato y presenta pocas interferencias con otras sustancias (Bradford, 1976).

Para medir la concentración de proteínas mediante Bradford, es necesario hacer una recta patrón con una proteína conocida, para posteriormente interpolar los valores de absorbancia de nuestra muestra, y saber la concentración de nuestras proteínas.

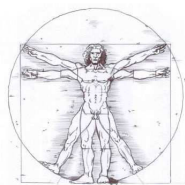


## 3.MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 3.6 VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular se evaluó por el método de MTT basado en la capacidad de las células viables para transformar de una sal de tetrazolio amarilla y soluble en agua a formazán insoluble y de color púrpura. La reducción enzimática de la sal de tetrazolio ocurre sólo en células activas metabólicamente, pero no en células muertas. Las células fueron añadidas en placas de 96 pocillos con una densidad de  $2 \cdot 10^5$ /pocillo y posteriormente incubadas en presencia de diferentes tratamientos. Tras los tratamientos, el medio fue eliminado y se añadió MTT en cada pocillos para posteriormente incubar durante 90 minutos a 37°C en un baño agitador como aparece ya descrito en (Uguz y cols., 2009). Se eliminó el sobrenadante y se añadió DMSO para disolver los cristales de formazán. Los tratamientos se llevaron a cabo por duplicado. La densidad óptica fue medida en un lector de placas automático (Infinite M200; Tecan Austria GmbH, Groedig, Austria) a 490 nm y 650 nm y presentado como incremento relativo al nivel del pretratamiento (experimento/control).



## 3.MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 3.7 DETERMINACIÓN DE ROS INTRACELULAR

La generación de ROS se determinó en una suspensión de células HL-60 o K-562 cargada con dihidrorodamina-123 (DHR 123), en una concentración de 20  $\mu\text{M}$  durante 20 minutos a 37°C, usando un lector de placas (Bejarano y cols., 2011; Espino y cols., 2011). Las células fueron excitadas a 488 nm y la fluorescencia se midió a 543 nm. Los cambios en la generación de ROS fueron registrados, y normalizados como incremento relativo respecto al control.

Por su parte, la cantidad de ROS intracelular en células U937 fue determinada con dos sondas diferentes: 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ) y dihidrorodamina 123 (DHR) (Bejarano y cols., 2011). Las células fueron cargados con 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ , por incubación a 27 °C en oscuridad durante 20 min. Esta sonda es un compuesto no fluorescente al que la célula es permeable; una vez dentro de la célula, es desesterificado y se vuelve fluorescente por oxidación, siendo la fluorescencia proporcional a la producción de ROS. La generación de ROS intracelular fue también medida por incubación de las células con 1  $\mu\text{M}$  de DHR durante 20 minutos. Tras ser cargadas, las células fueron lavadas dos o tres veces en PBS y se llevaron a cabo los análisis por citometría de flujo usando el citómetro de flujo FACSCalibur y los datos fueron analizados con el software WinMdi 2.9.



## 3.MATERIALES Y MÉTODOS

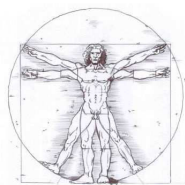
---



### 3.8 EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS

Las células U937 fueron teñidas con 10 µg/mL de Hoechst 33342 durante 20 minutos según (Ghibelli y cols., 1999). Las células con morfología nuclear apoptótica se contaron usando un microscopio de fluorescencia (al menos 100 células en al menos tres campos independientes) y se evaluó la fracción de células apoptóticas respecto del total.

La típica morfología redonda de una célula sana y la vesiculación nuclear apoptótica eran los principales indicadores de la presencia de células apoptóticas. Las dos morfologías principales de interfase, “*budding*” y “*cleavage*” son distinguibles por la estructura de la membrana nuclear y la peculiar forma de la cromatina condensada en los bordes, siendo una masa más o menos sobresaliente en las células en *budding* o bien una media luna no sobresaliente en las células en *cleavage*. La vesiculación nuclear se completa posteriormente con la separación de las vesículas, por un proceso de invaginación o de gemación, y saliendo de la membrana nuclear externa e interna, respectivamente, para alcanzar la morfología fragmentada final. Los núcleos en *budding* tienen masas prominentes de cromatina, mientras que los núcleos en *cleavage* tienen cromatina condensada en forma de media luna. *Budding* y *cleavage* van desapareciendo en momentos posteriores para dar paso a los núcleos fragmentados finales (De Nicola y cols., 2006).



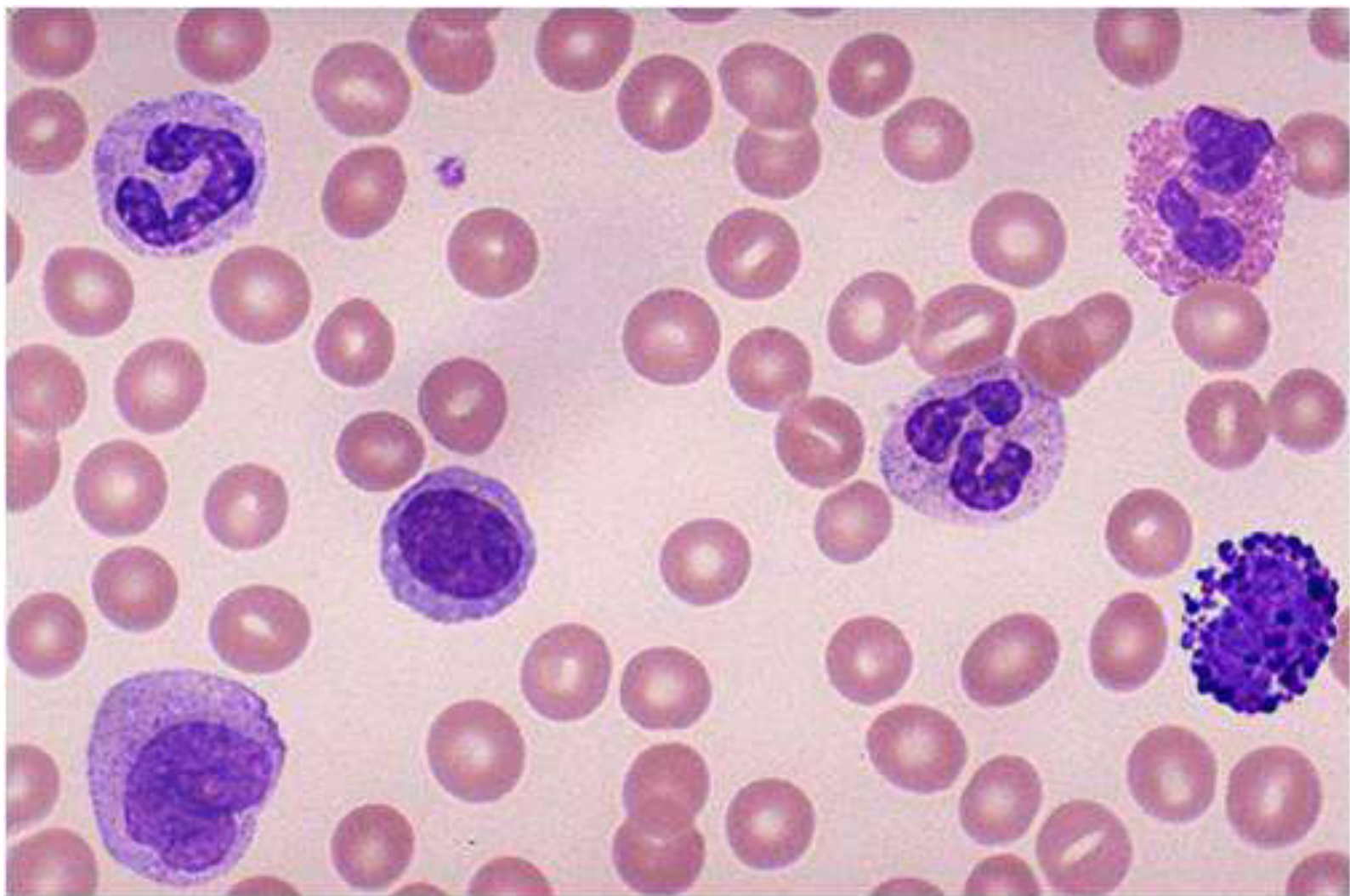
## 3.MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 3.9 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Cuando fue necesario, los datos se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media. Las diferencias estadísticamente significativas se llevaron a cabo mediante la  $t$  de Student,  $z$  de Wilcoxon o la  $U$  de Mann-Whitney, dependiendo de los requisitos que reuniera el muestreo. Los valores de  $p \leq 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

# 4. RESULTADOS (RESULTS)





## 4. RESULTADOS/RESULTS

---

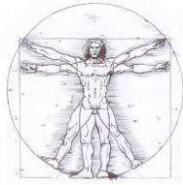


### *Preámbulo*

A continuación exponemos los resultados conseguidos en relación con los objetivos planteados previamente. Por razones de concisión y fidelidad al desarrollo experimental estos resultados se incluyen en el formato original de las publicaciones a las que han dado lugar. En esta Tesis Doctoral no se han incluido datos preliminares o en fase experimental de desarrollo.

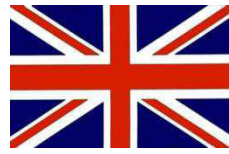
Y aunque lógicamente cada artículo contiene su propia discusión, hemos creído apropiado incluir a continuación de este apartado, otro de “*Discusión General*”, donde aportamos una revisión conjunta de los resultados obtenidos, para poder tener una percepción más integrada de la investigación.

- 4.1. Las caspasas-3 y -9 son activadas en células mieloides humanas HL-60 por la señal de calcio.
- 4.2. Las caspasas inducidas por estrés oxidativo están reguladas en células humanas mieloides HL-60 por señal de calcio.
- 4.3. *La apoptosis inducida por TNF $\alpha$  en líneas celulares mieloides humanas es dependiente de la generación de ROS intracelular.*
- 4.4. *La apoptosis inducida por TNF $\alpha$  en una línea celular de linfoma histiocítico humano es dependiente de la generación de ROS y la señalización de calcio.*



## 4. RESULTADOS/RESULTS

---



### *Preamble*

Following this lines we will show the results obtained relative to the objectives previously suggested. For reasons based on the brevity and accuracy with the experimental procedure, these results are included in their original format of the publications where are collected. In this Doctoral Thesis neither preliminary data nor experimental stage data have been included.

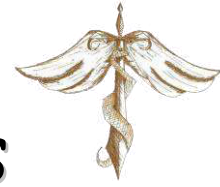
In spite of the fact that each article has it own discussion, we have decided to include after this chapter another one called “*Discusión General*”, where we provide a whole review about the results obtained, and thus having a more settled perception in the investigation.

- 4.1. Caspase-3 and -9 are activated in human myeloid HL-60 cells by calcium signal
- 4.2. Oxidative stress-induced caspases are regulated in human myeloid HL-60 cells by calcium signal
- 4.3. TNF $\alpha$ -induced apoptosis in human myeloid cell lines is dependent of intracellular ROS generation
- 4.4. TNF $\alpha$ -induced apoptosis in human histiocytic lymphoma cell line is dependent of ROS generation and calcium signaling.

**4.1. Las caspasas-3 y -9 son activadas en células mieloides humanas HL-60 por la señal de calcio.**







# 4.RESULTADOS/RESULTS

Mol Cell Biochem (2010) 333:151–157  
DOI 10.1007/s11010-009-0215-1

## Caspase-3 and -9 are activated in human myeloid HL-60 cells by calcium signal

D. González · J. Espino · I. Bejarano ·  
J. J. López · A. B. Rodríguez · J. A. Pariente

Received: 15 May 2009 / Accepted: 7 July 2009 / Published online: 21 July 2009  
© Springer Science+Business Media, LLC. 2009

**Abstract** This study is aimed to determine the role of calcium signaling evoked by the calcium-mobilizing agonist uridine-5'-triphosphate (UTP) and by the specific inhibitor of the endoplasmic reticulum calcium reuptake thapsigargin on caspase activation in human leukemia cell line HL-60. We have analyzed cytosolic free calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_c$ ) determination, mitochondrial membrane potential and caspase-3 and -9 activity by fluorimetric methods, using the fluorescent ratiometric calcium indicator Fura-2, the dye JC-1, and specific fluorogenic substrate, respectively. Our results indicated that treatment of HL-60 cells with 10  $\mu$ M UTP or 1  $\mu$ M thapsigargin induced a transient increase in  $[Ca^{2+}]_c$  due to calcium release from internal stores. The stimulatory effect of UTP and thapsigargin on calcium signal was followed by a mitochondrial membrane depolarization. Our results also indicated that UTP and thapsigargin were able to increase the caspase-3 and -9 activities. The effect of UTP and thapsigargin on caspase activation was time dependent, reaching a maximal caspase activity after 60 min of stimulation. Loading of cells with 10  $\mu$ M dimethyl BAPTA, an intracellular calcium chelator, for 30 min significantly reduced both UTP- or thapsigargin-induced mitochondrial depolarization and caspase activation. Similar results were obtained when the cells were pretreated with 10  $\mu$ M Ru360 for 30 min, a specific blocker of calcium uptake into mitochondria. The findings suggest that UTP- and thapsigargin-induced caspase-3 and -9 activation and mitochondrial membrane depolarization is dependent on rises in  $[Ca^{2+}]_c$  in human myeloid HL-60 cells.

**Keywords** Apoptosis · Caspases · Calcium signal · Thapsigargin · HL-60 cells

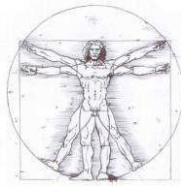
### Abbreviations

BAPTA-AM	1,2-bis( <i>o</i> -aminophenoxy)ethane- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid-acetoxymethyl ester
$[Ca^{2+}]_c$	Cytosolic free calcium concentration
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
DMSO	Dimethylsulfoxide
DTT	Dithiothreitol
EGTA	Ethylene glycol-bis (2-aminoethyleter)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
ER/SR	Sarco-endoplasmic reticulum
FCCP	Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenyl-hydrazone
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-triphosphate
PLC	Phospholipase C
ROS	Reactive oxygen species
SERCA	Sarco-endoplasmic reticulum $Ca^{2+}$ -ATPase
TG	Thapsigargin
UTP	Uridine-5'-triphosphate

### Introduction

Apoptosis is a gene-regulated form of cell death that is critical for normal development and tissue homeostasis. A major component of the apoptotic machinery involves a family of aspartic acid-directed cysteine proteases, called

D. González · J. Espino · I. Bejarano · J. J. López ·  
A. B. Rodríguez · J. A. Pariente (✉)  
Department of Physiology, Faculty of Science,  
University of Extremadura, 06071 Badajoz, Spain  
e-mail: pariente@unex.es



## 4. RESULTADOS/RESULTS

152

Mol Cell Biochem (2010) 333:151–157

caspsas (cysteiny l aspartate-specific proteinases), which cleave multiple protein substrates en masse, leading to the loss of cellular structure and function and ultimately resulting in cell death. Traditionally, two apoptotic pathways have been described: the cell-surface death receptor-dependent extrinsic pathway and the mitochondria-dependent intrinsic pathway [1]. Alternatively, apoptosis has been reported to be induced by endoplasmic reticulum stress which is mainly induced by a reduction in intraluminal free calcium concentration [2].

The caspase family consists of at least 14 enzymes in mammalian cells. In particular, caspases-3, -8, and -9 play a relevant role in apoptosis: caspase-9, in the mitochondrial pathway; caspase-8, in the Fas/CD95 pathway; and caspase-3, more downstream, which is an executioner caspase activated by multiple pathways [3, 4].

The cytosolic free calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_c$ ) is maintained at about 80–100 nM, a very low level relative to the extracellular fluid ( $[Ca^{2+}]_{EC} \approx 1.2$  mM). The major mechanism to lower  $[Ca^{2+}]_c$  is calcium extrusion mediated by the plasma membrane calcium pumps and by the  $Na^+/Ca^{2+}$  exchangers.  $[Ca^{2+}]$  in the nuclear matrix ( $[Ca^{2+}]_n$ ) and in the mitochondrial matrix ( $[Ca^{2+}]_m$ ) is similar to  $[Ca^{2+}]_c$ . However, other intracellular organelles maintain a large calcium concentration gradient versus the cytoplasm. The most important calcium storage compartment is the sarco-endoplasmic reticulum (ER/SR) in most cells. Additionally, sarco-endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA) pumps calcium into the lumen of ER/SR. The ER/SR provides a compartment from which calcium can be mobilized to increase  $[Ca^{2+}]_c$ . However, prolonged changes in calcium distribution including an elevation in  $[Ca^{2+}]_c$ ,  $[Ca^{2+}]_m$ , and  $[Ca^{2+}]_n$  and a decrease in  $[Ca^{2+}]_{ER}$  trigger a variety of cascades that lead to cell death [5].

Mitochondria are the major source of reactive oxygen species (ROS) in cells. Additionally, calcium accumulation has been reported to stimulate mitochondrial ROS production [6, 7]. Notably, if mitochondrial calcium uptake triggers significant depolarization, this may cause a decrease in the mitochondrial membrane potential-dependent complex III-mediated ROS formation [5].

UTP is calcium-mobilizing purinergic agonist of HL-60 cells [8]. This agonist induces calcium signaling by binding to a specific purinergic receptor of the  $P2Y_2$  subtype [9], which has been previously shown to be present in HL-60 cells [10]. This receptor signaling involves G-protein activation of phospholipase C (PLC) with a subsequent increase in the second messenger inositol 1,4,5-trisphosphate ( $IP_3$ ) (for review see [11]).  $IP_3$  then initiates the release of calcium from  $IP_3$ -sensitive calcium stores into the cytoplasm.

In this study, we have investigated the role of calcium signal in UTP- and thapsigargin-induced caspase activation

in human leukemia cell line HL-60, analyzing caspase-3 and -9 activation and mitochondrial depolarization.

### Materials and methods

#### Materials

HL-60 15-12 cell line (ECACC No 88120805) is a variant of HL-60 which is differentiating towards either neutrophils or monocytes, it was purchased from The European Collection of Cell Cultures (ECACC) (Dorset, UK). Fura-2 acetoxymethyl ester (fura-2/AM) and JC-1 were from Molecular Probes (Leiden, The Netherlands). Bovine serum albumin, thapsigargin (TG), dimethylsulfoxide (DMSO), caspase-3 (AC-DEVD-AMC) and -9 (AC-LEHD-AMC) substrate, UTP, ethylene glycol-bis (2-aminoethyl ether)- $N,N,N',N'$ -tetraacetic acid (EGTA), dimethyl BAPTA, carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP), and HEPES were from Sigma (Madrid, Spain). Ru360 was from Calbiochem (Madrid, Spain). RPMI-1640 medium and L-glutamine were from Lonza (Verriers, Belgium), penicillin, and streptomycin were from HyClone (Utah, USA). All other reagents were of analytical grade.

#### HL-60 cells culture

Human promyelocytic leukemia HL-60 cells (passages 6–12) were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin and 1.25% DMSO at 37°C under a humidified condition of 95% air and 5%  $CO_2$ . Cells were routinely plated at a density of  $3 \times 10^5$  cells/ml into fresh flasks and the viability was >95% in all experiments as assayed by the trypan-blue exclusion method.

#### Measurement of cytosolic free calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_c$ )

Cells were loaded with fura-2 by incubation with 2  $\mu$ M fura-2 acetoxymethyl ester (fura-2/AM) for 45 min at 37°C according to a procedure published elsewhere [12]. Once loaded, the cells were washed and gently resuspended in Na-HEPES solution containing (in mM): NaCl, 140; KCl, 4.7;  $CaCl_2$ , 1.2;  $MgCl_2$ , 1.1; glucose, 10; and HEPES, 10 (pH 7.4). Fluorescence was recorded from 2 ml aliquots of magnetically stirred cellular suspension ( $2 \times 10^6$  cells/mL) at 37°C by using a spectrofluorophotometer (Shimadzu RF-5301-PC) with excitation wavelengths of 340 and 380 nm and emission at 505 nm. Changes in  $[Ca^{2+}]_c$  were monitored by using the fura-2 340/380 nm fluorescence ratio



## 4. RESULTADOS/RESULTS

and were calibrated according to the method of [13]. In the experiments where calcium-free medium is indicated, calcium was omitted and 1 mM ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) was added.

### Measurement of mitochondrial membrane potential

HL-60 cells were loaded with the cationic dye JC-1 (10  $\mu$ g/ml, 37°C, 15 min) as described previously [14]. After dye loading, cells were centrifuged and resuspended in fresh Na-HEPES. JC-1 accumulates in mitochondria forming red fluorescent aggregates at high membrane potentials. At low membrane potential, JC-1 exits mainly in the green fluorescent monomeric form. Fluorescence was recorded from 2 ml of cell suspensions ( $4 \times 10^6$  cells/ml) at 37°C using a spectrofluorophotometer (Shimadzu RF-5301-PC). JC-1-loaded cells were excited at 488 nm and emission was detected at 590 nm (JC-1 aggregates) and 525 nm (JC-1 monomers). Data are presented as emission ratios (590/525).

### Caspase activity assay

To determine caspase activity, stimulated or resting cells were sonicated, and cell lysates were incubated with 2 ml of substrate solution (20 mM HEPES, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.1% CHAPS, 5 mM dithiothreitol (DTT), and 8.25  $\mu$ M of caspase substrate; pH 7.4) for 1 h at 37°C, as described elsewhere [15]. Substrate cleavage was measured by using a fluorescence spectrophotometer (Shimadzu RF-5301-PC) with excitation wavelength of 360 nm and emission at 460 nm. The activities of caspase-3 and -9 were calculated from the cleavage of the respective specific fluorogenic substrate (AC-DEVD-AMC for caspase-3 and AC-LEHD-AMC for caspase-9). Preliminary experiments reported that caspase-3 or -9 substrate cleaving was not detected in the presence of the inhibitors of caspase-3 or -9, DEVD-CMK or z-LEHD-FMK, respectively. The data were calculated as fluorescence units per milligram of protein and were presented as fold increase over pretreatment level (untreated samples) (experimental/control). It is worth noting that the spontaneous caspase-3 and -9 activation (non-stimulated control cells) after 60 min were 1.02- and 1.09-fold increase, respectively, compared to caspase activities at the beginning of the incubation (time = 0).

### Statistical analysis

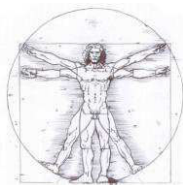
Data are expressed as means  $\pm$  SEM of the numbers of determinations. Analysis of statistical significance was performed by using the Mann-Whitney *U*-test. To compare

the different treatments, statistical significance was calculated by one-way analysis of variance followed by Tukey's multiple comparison tests.  $P < 0.05$  was considered to indicate a statistically significant difference.

### Results

It has been reported that a prolonged elevation in  $[Ca^{2+}]_c$  and alterations in calcium homeostasis initiate the mitochondrial apoptotic pathway [5, 16] and induce endoplasmic reticulum stress that, in turn, leads to apoptosis [17]. In the absence of extracellular calcium (calcium-free medium), fura-2-loaded HL-60 cells were treated both with the calcium-mobilizing classical agonist UTP and thapsigargin, a well-known SERCA inhibitor. As shown in Fig. 1a, stimulation with 10  $\mu$ M UTP induced a typical transient increase in  $[Ca^{2+}]_c$  due to calcium release from internal stores in HL-60 cells. Similarly, stimulation of cells with 1  $\mu$ M thapsigargin caused a transient increase in  $[Ca^{2+}]_c$  (Fig. 1b), also reflecting the release of calcium from internal pools. These increases induced by UTP and thapsigargin were also observed in the presence of normal extracellular calcium (Fig. 1c, d), though the levels of calcium remained raised compared to those obtained in the absence of extracellular calcium. In addition, HL-60 cells were loaded with dimethyl BAPTA, an intracellular calcium chelator, by incubating the cells for 30 min at 37°C with 10  $\mu$ M dimethyl BAPTA-AM. As expected in calcium-free medium, dimethyl BAPTA loading prevented either UTP- and thapsigargin-evoked  $[Ca^{2+}]_c$  elevations in HL-60 cells (Fig. 1a, b).

In a medium containing 1.2 mM extracellular calcium, treatment of cells with 10  $\mu$ M UTP induced a mitochondrial membrane depolarization as detected by the decrease in JC-1 fluorescence ratio (Fig. 2a). Treatment with 1  $\mu$ M FCCP, a mitochondrial uncoupler that collapses the mitochondrial membrane potential, induced maximal decrease in JC-1 fluorescence (Fig. 2a, b). Treatment with 10  $\mu$ M UTP evoked 28% of the effect observed with FCCP. However, when HL-60 cells were loaded with dimethyl BAPTA, UTP exerted a negligible effect on mitochondrial membrane potential, suggesting that increases in  $[Ca^{2+}]_c$  are required for UTP-evoked mitochondrial depolarization (Fig. 2a). Similar results were obtained when the cells were pretreated with 10  $\mu$ M Ru360 for 30 min, a specific blocker of calcium uptake into mitochondria (Fig. 2a). Similarly, in the presence of either dimethyl BAPTA or Ru360, thapsigargin-evoked mitochondrial membrane potential was significantly inhibited (Fig. 2b), which confirms that depletion of intracellular calcium stores and subsequent calcium uptake by the mitochondria induce mitochondrial depolarization.

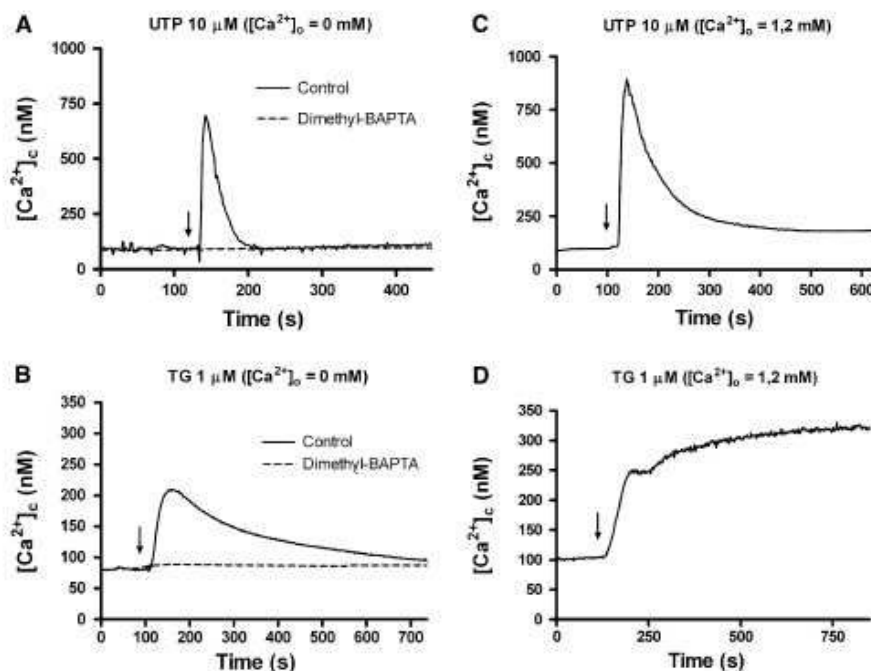


## 4. RESULTADOS/RESULTS

154

Mol Cell Biochem (2010) 333:151–157

**Fig. 1** Effect of UTP and thapsigargin (TG) on  $[Ca^{2+}]_c$ . Fura-2-loaded HL-60 cells were stimulated with 10  $\mu$ M UTP (a, c) or 1  $\mu$ M thapsigargin (TG) (b, d) as indicated by the arrow, in a calcium-normal ( $[Ca^{2+}]_o = 1.2$  mM) (c, d) or -free solution ( $[Ca^{2+}]_o = 0$  mM + 1 mM EGTA) (a, b), in the absence (control) or presence of dimethyl BAPTA (10  $\mu$ M for 30 min) (a, b). Traces are representative of 5–7 independent experiments



To examine the effect of calcium signal on caspase-3 activation, HL-60 cells were again treated with 10  $\mu$ M UTP or 1  $\mu$ M thapsigargin for 1–60 min. Our results show that both UTP (Fig. 3a) and thapsigargin (Fig. 3b) were able to increase the caspase-3 activity in HL-60 cells. The effect of treatments with UTP and thapsigargin on caspase-3 activity was time-dependent, reaching a maximal caspase activity after 60 min of stimulation ( $1.68 \pm 0.08$  fold increase and  $1.67 \pm 0.08$  fold increase in UTP- and thapsigargin-treated cells, respectively;  $P < 0.05$ ). However, as shown in Fig. 4a and b, either dimethyl BAPTA loading or pretreatment with 10  $\mu$ M Ru360 for 30 min, were able to significantly reduce UTP- or thapsigargin-induced caspase-3 activity.

Caspase-9 is an initiator caspase that is involved in the initial steps of mitochondrial apoptosis [18]. To investigate whether the activation of caspase-3 by UTP or thapsigargin is a mitochondrial apoptosis, we checked the caspase-9 activity in the presence of UTP or thapsigargin. As shown in Fig. 5a, treatment of HL-60 cells with 10  $\mu$ M UTP for 60 min induced a significant increase of caspase-9 activity ( $1.90 \pm 0.25$  fold increase,  $P < 0.05$ ). In addition, 1  $\mu$ M thapsigargin was also able to induce activation of caspase-9 in HL-60 cells ( $2.00 \pm 0.20$  fold increase,  $P < 0.05$ ) (Fig. 5b). Consistent with the results presented above, when cells were loaded with 10  $\mu$ M dimethyl BAPTA for 30 min, UTP- or thapsigargin-induced caspase-9 activity were significantly reduced (Fig. 5). Similar results were obtained when HL-60 cells were pretreated for 30 min with

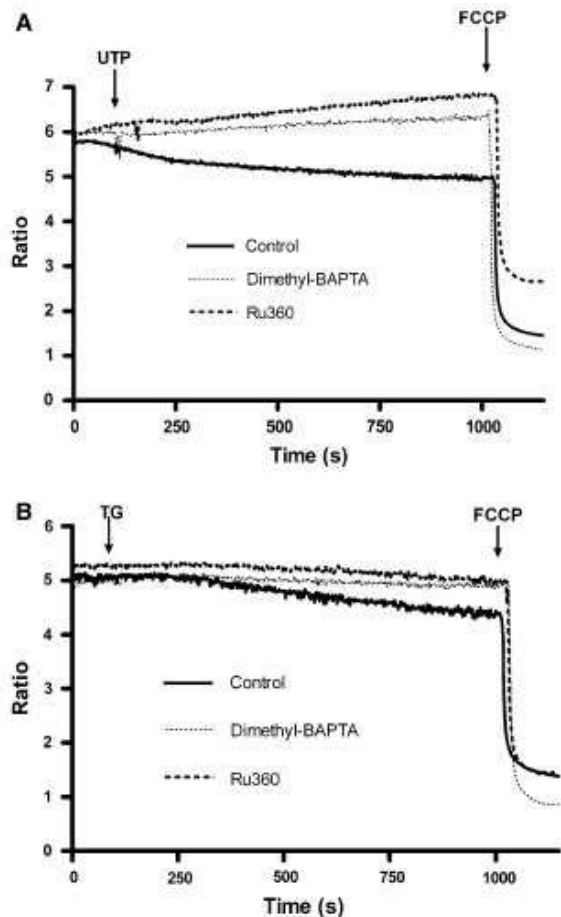
10  $\mu$ M Ru360 (Fig. 5). Taken together, these findings strongly suggest that depletion of intracellular calcium pools by both the calcium-mobilizing agonist UTP and thapsigargin induces activation of caspase-3 and -9.

### Discussion

Cytosolic calcium has been presented as a key regulator of cell survival but this ion can also induce apoptosis in response to a number of pathological conditions [5, 16]. In addition, mitochondria were reported to accumulate calcium provided cytosolic calcium rises exceed 400 nM or provided mitochondrial uptake dominates mitochondrial calcium extrusion [19], thereby leading to depolarization of mitochondrial membranes [20]. Uptake of calcium into mitochondria stimulates the tricarboxylate cycle resulting in augmented reduction of pyridine nucleotides, which may be one of the mechanisms of the coupling of cell and metabolic activity [21]. On the other hand, exposure of mitochondria to high cytosolic free calcium was shown to increase formation of ROS [5]. In return, some cation channels such as transient receptor potential melastatin 2 were gated by the increased ROS production [22]. Then increased calcium influx induces more depolarization of mitochondria and ROS production [23]. The feedback mechanisms caused to increased levels of cell apoptotic factor in the current study. Increased levels of caspase-3 and -9 in the current study may be explained increase in ROS production.

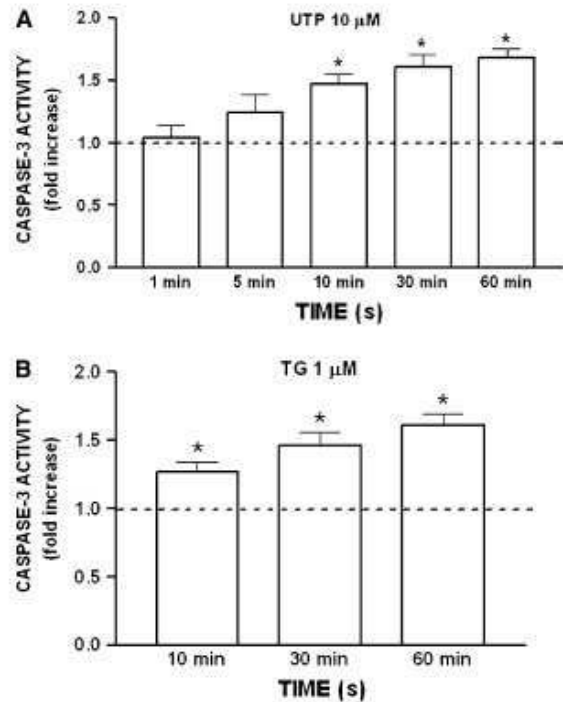


## 4.RESULTADOS/RESULTS



**Fig. 2** Effect of UTP and thapsigargin (TG) on mitochondrial membrane potential. JC-1-loaded HL-60 cells were pretreated with 10  $\mu\text{M}$  dimethyl BAPTA, 10  $\mu\text{M}$  Ru360 or its vehicle (DMSO) for 30 min, in a calcium-normal solution ( $[\text{Ca}^{2+}]_o = 1.2 \text{ mM}$ ); and then stimulated with 10  $\mu\text{M}$  UTP (a) or 1  $\mu\text{M}$  thapsigargin (TG) (b) and 1  $\mu\text{M}$  FCCP (a, b), as indicated by the arrow. Traces are representative of 4–8 independent experiments

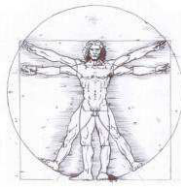
Here, we report that the treatment of human myeloid cell line HL-60 with the calcium-mobilizing agonist UTP (10  $\mu\text{M}$ ) induced a transient increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  due to calcium release from internal stores. This increase was longer in the presence of external calcium, as previously reported [24]. In addition, dimethyl-BAPTA loading prevents UTP-evoked  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  elevations. These stimulatory effects of UTP on calcium signal were followed by a mitochondrial membrane depolarization and by a caspase-3 and initiator caspase-9 activities. To further investigate the role of calcium on caspase activation, we used the specific inhibitor of the ER/SR calcium reuptake thapsigargin, which fully depletes the intracellular calcium stores after few minutes. Incubation of HL-60 cells with thapsigargin



**Fig. 3** Time-dependence course of caspase-3 activation induced by UTP and thapsigargin (TG). HL-60 cells were stimulated with 10  $\mu\text{M}$  UTP (a) or 1  $\mu\text{M}$  thapsigargin (TG) (b) for various periods of time (1–60 min). Caspase-3 activity was estimated as described under 'Materials and methods' section. Values are presented as means  $\pm$  SEM of 6–7 separate experiments and expressed as fold increase over the pretreatment (untreated) level. \*  $P < 0.05$  compared to untreated samples

also induced a mitochondrial depolarization and caspases activation. These results are similar than others previously obtained in both our research group, in human platelets and spermatozoa [25, 26] and others [27].

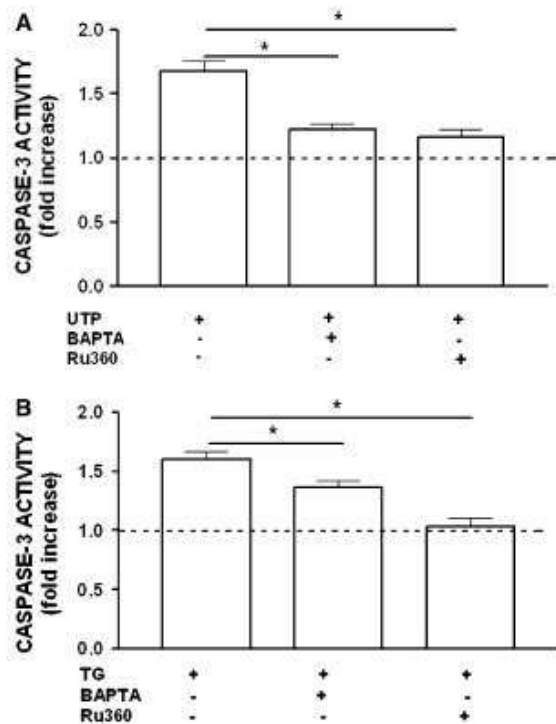
Stored calcium is crucial for a number of cellular functions, including signal transduction cascades that respond to stress conditions [28]. The filling state of the intracellular calcium stores has been reported as a candidate to trigger the initiation of apoptotic events [29, 30]. Our findings indicate that the caspase activation caused by depletion of intracellular calcium stores is probably due to a mitochondrial membrane depolarization, and subsequent releasing of intramitochondrial apoptosis promoting factors. We provide compelling evidences supporting that mitochondrial calcium uptake evoked by rises in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , induces mitochondrial membrane depolarization (as detected by the decrease in JC-1 fluorescence ratio) and caspase-9 and -3 activation. Our results also show that the blockade of both calcium uptake into mitochondria with Ru360 or rises in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  were able to decrease caspase



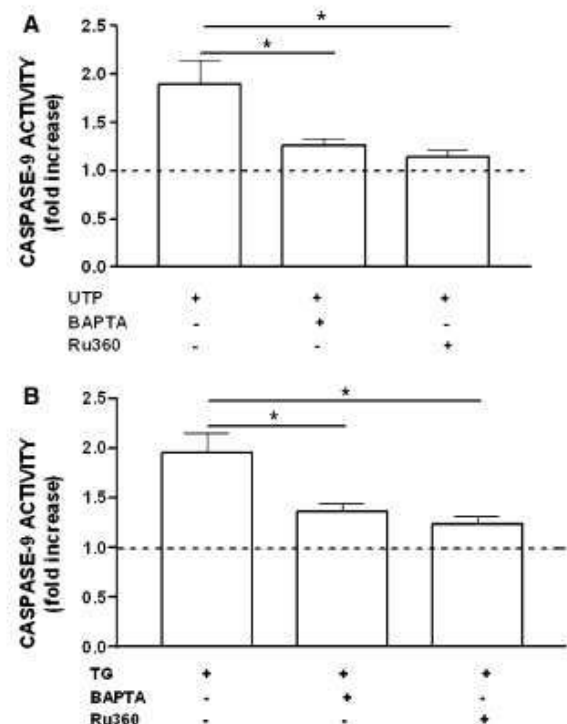
## 4. RESULTADOS/RESULTS

156

Mol Cell Biochem (2010) 333:151–157



**Fig. 4** Effect of calcium signal on caspase-3 activation. Dimethyl BAPTA (10  $\mu$ M for 30 min) or Ru360 (10  $\mu$ M for 30 min) pretreated cells were stimulated for 60 min with 10  $\mu$ M UTP (a) or 1  $\mu$ M thapsigargin (TG) (b). Caspase-3 activity was estimated as described under 'Materials and methods' section. Values are presented as means  $\pm$  SEM of 6–8 separate experiments and expressed as fold increase over the pretreatment (untreated) level. \*  $P < 0.05$ .



**Fig. 5** Effect of calcium signal on caspase-9 activation. Dimethyl BAPTA (10  $\mu$ M for 30 min) or Ru360 (10  $\mu$ M for 30 min) pretreated cells were stimulated for 60 min with 10  $\mu$ M UTP (a) or 1  $\mu$ M thapsigargin (TG) (b). Caspase-9 activity was estimated as described under 'Materials and methods' section. Values are presented as means  $\pm$  SEM of 6–8 separate experiments and expressed as fold increase over the pretreatment (untreated) level. \*  $P < 0.05$ .

activation mediated by UTP and thapsigargin, which were able to release calcium from intracellular stores.

Our results are in agreement with the previous studies obtained by Hajnóczky et al. [31], whose data confirmed that Ru360 is a potent inhibitor of the mitochondrial calcium uptake in permeabilized H9c2 rat cardiac myoblast cells. The effect  $[Ca^{2+}]_c$  elevation on mitochondrial membrane potential and caspase activation is consistent with evidences showing a interaction between mitochondria and intracellular calcium stores and the observation of close physical contacts between both organelles [32, 33]. In fact, there is both structural and functional evidence suggesting the presence of specific and stable interactions between mitochondria and intracellular calcium stores (e.g. endoplasmic reticulum) which facilitate a rapid flux of calcium from endoplasmic reticulum to mitochondria [33–37] and these tight endoplasmic reticulum–mitochondria couplings may also serve to modulate calcium release. In addition, it has been suggested that mitochondria colocalize in small sub-cellular regions where reticulum and mitochondria form

close contacts [37]. This has led to the concept of "intracellular synapse" or "quasi-synaptic" calcium signal transmission between mitochondria and reticulum coined by Hajnóczky's group [32]. The endoplasmic reticulum–mitochondrial interface may be supported by direct links between the organelles or by anchorage of the organelles to cytoskeletal framework [31].

In conclusion, in this investigation, we concluded that the calcium-mobilizing agonist UTP and the specific inhibitor of the endoplasmic reticulum calcium reuptake thapsigargin stimulate mitochondrial membrane depolarization and caspase-9 and -3 activation in human myeloid cell line HL-60. Calcium signal-induced mitochondrial depolarization and caspase activation requires intracellular calcium store depletion and rises in  $[Ca^{2+}]_c$ .

**Acknowledgments** This work was supported by MEC-DGI and Junta de Extremadura grants BFU2007-60091 and PRI07-A024, respectively. I. Bejarano was beneficiary of grant by Junta de Extremadura PRE06070.



# 4.RESULTADOS/RESULTS

Mol Cell Biochem (2010) 333:151–157

157

## References

1. Fadeel B, Orrenius S (2005) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med* 258:479–517
2. Groenendyk J, Michalak M (2005) Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis. *Acta Biochim Pol* 52:381–395
3. Stennicke HT, Salvesen GS (1997) Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8. *J Biol Chem* 272:25123–25129
4. Shi Y (2002) Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9:459–470
5. Hajnóczky G, Davies E, Madesh M (2003) Calcium signaling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 304:445–454
6. Ghafourifar P, Schenk U, Klein SD, Richter C (1999) Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation. *J Biol Chem* 274:31185–31188
7. Starkov AA, Polster BM, Fiskum G (2002) Regulation of hydrogen peroxide production by brain mitochondria by calcium and Bax. *J Neurochem* 83:220–228
8. Verghese MW, Kneisler TB, Boucheron JA (1996) P2U agonists induce chemotaxis and actin polymerization in human neutrophils and differentiated HL-60 cells. *J Biol Chem* 271:15597–15601
9. Alemany R, Sichelschmidt B, zu Heringdorf DM, Lass H, van Koppen CJ, Jakobs KH (2000) Stimulation of sphingosine-1-phosphate formation by the P2Y<sub>2</sub> receptor in HL-60 cells: Ca<sup>2+</sup> requirement and implication in receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> mobilization, but not MAP kinase activation. *Mol Pharmacol* 58:491–497
10. Suh BC, Kim TD, Lee IS, Kim KT (2000) Differential regulation of P2Y<sub>11</sub> receptor-mediated signalling to phospholipase C and adenylyl cyclase by protein kinase C in HL-60 promyelocytes. *Br J Pharmacol* 131:489–497
11. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Bio* 4:517–529
12. Bejarano I, Terrón MP, Paredes SD, Barriga C, Rodríguez AB, Pariente JA (2007) Hydrogen peroxide increases the phagocytic function of human neutrophils by calcium mobilisation. *Mol Cell Biochem* 296:77–84
13. Grynkiewicz C, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440–3450
14. Granados MP, Salido GM, Pariente JA, González A (2005) Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on CCK-8-evoked changes in mitochondrial activity in isolated mouse pancreatic acinar cells. *Biol Cell* 97:847–856
15. Bejarano I, Redondo PC, Espino J, Rosado JA, Paredes SD, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA, Rodríguez AB (2009) Melatonin induces mitochondrial-mediated apoptosis in human myeloid HL-60 cells. *J Pineal Res* 46:392–400
16. Demaurex N, Distelhorst C (2003) Cell biology. Apoptosis—the calcium connection. *Science* 300:65–67
17. Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE (2004) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* 11:372–380
18. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479–489
19. Colegrove SL, Albrecht MA, Friel DD (2000) Quantitative analysis of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake and release pathways in sympathetic neurons. Reconstruction of the recovery after depolarization-evoked [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> elevations. *J Gen Physiol* 115:371–388
20. Kovács R, Schuchmann S, Gabriel S, Kann O, Kardos J, Heinemann U (2002) Free radical-mediated cell damage after experimental status epilepticus in hippocampal slice cultures. *J Neurophysiol* 88:2909–2918
21. Naziroğlu M, Kutluhan S, Yilmaz M (2008) Selenium and topiramate modulates brain microsomal oxidative stress values, Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity, and EEG records in pentylenetetrazol-induced seizures in rats. *J Membr Biol* 225:39–49
22. Naziroğlu M (2007) New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. *Neurochem Res* 32:1990–2001
23. Naziroğlu M (2009) Role of selenium on calcium signaling and oxidative stress-induced molecular pathways in epilepsy. *Neurochem Res*. doi:10.1007/s11064-009-0015-8
24. White JA, Blackmore PF, Schoenbach KH, Beebe SJ (2004) Stimulation of capacitative calcium entry in HL-60 cells by nanosecond pulsed electric fields. *J Biol Chem* 279:22964–22972
25. Bejarano I, Lozano GM, Ortiz A, García JF, Paredes SD, Rodríguez AB, Pariente JA (2008) Caspase 3 activation in human spermatozoa in response to hydrogen peroxide and progesterone. *Fertil Steril* 90:1340–1347
26. Rosado JA, López JJ, Gómez-Arteta E, Redondo PC, Salido GM, Pariente JA (2006) Early caspase-3 activation independent of apoptosis is required for cellular function. *J Cell Physiol* 209:142–152
27. Lei X, Zhang S, Bohrer A, Ramanadham S (2008) Calcium-independent Phospholipase A2 (iPLA2[β])-mediated ceramide generation plays a key role in the cross-talk between the endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria during ER stress-induced insulin-secreting cell apoptosis. *J Biol Chem* 283:34819–34832
28. Meldolesi J, Pozzan T (1998) The endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> store: a view from the lumen. *Trends Biochem Sci* 23:10–14
29. Pigozzi D, Tombal B, Ducret T, Vacher P, Gailly P (2004) Role of store-dependent influx of Ca<sup>2+</sup> and efflux of K<sup>+</sup> in apoptosis of CHO cells. *Cell Calcium* 36:421–430
30. Putney JW Jr, Ribeiro CM (2000) Signaling pathways between the plasma membrane and endoplasmic reticulum calcium stores. *Cell Mol Life Sci* 57:1272–1286
31. Hajnóczky G, Csordas G, Das S, Garcia-Perez C, Saotome M, Roy SS, Yi M (2006) Mitochondrial calcium signaling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake in apoptosis. *Cell Calcium* 40:553–560
32. Csordas G, Thomas AP, Hajnóczky G (1999) Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *EMBO J* 18:96–108
33. Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, Tuft RA, Pozzan T (1998) Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> responses. *Science* 280:1763–1766
34. Camello-Almaraz C, Salido GM, Pariente JA, Camello PJ (2002) Role of mitochondria in Ca<sup>2+</sup> oscillations and shape of Ca<sup>2+</sup> signals in pancreatic acinar cells. *Biochem Pharmacol* 63:283–292
35. Filippin L, Magalhães PJ, Di Benedetto G, Colella M, Pozzan T (2003) Stable interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum allow rapid accumulation of calcium in a subpopulation of mitochondria. *J Biol Chem* 278:39224–39234
36. Hajnóczky G, Csordas G, Madesh M, Pacher P (2000) The machinery of local Ca<sup>2+</sup> signalling between sarcoplasmic reticulum and mitochondria. *J Physiol* 529:69–81
37. Vay L, Hernández-SanMiguel E, Santo-Domingo J, Lobato CD, Moreno A, Montem M, Alvarez J (2007) Modulation of Ca<sup>2+</sup> release and Ca<sup>2+</sup> oscillations in HeLa cells and fibroblasts by mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter stimulation. *J Physiol* 580:39–49





**4.2. Las caspasas inducidas por estrés oxidativo están reguladas en células humanas mieloides HL-60 por señal de calcio.**





# 4.RESULTADOS/RESULTS

Current Signal Transduction Therapy, 2010, 5, 181-186

181

## Oxidative Stress-Induced Caspases are Regulated in Human Myeloid HL-60 Cells by Calcium Signal

D. González, I. Bejarano, C. Barriga, A.B. Rodríguez and J.A. Pariente\*

Department of Physiology, Faculty of Science, University of Extremadura, 06071-Badajoz, Spain

**Abstract:** The present study is aimed to determine the role of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling evoked by hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) on caspase activation in human leukemia cell line HL-60. We have analysed cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ) determination, mitochondrial membrane potential and caspase-3 and -9 activity by fluorimetric methods, using the fluorescent ratiometric  $\text{Ca}^{2+}$  indicator Fura-2, the dye JC-1, and specific fluorogenic substrate, respectively. Our results indicated that treatment of HL-60 cells with  $\text{H}_2\text{O}_2$  induced a transient increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  due to  $\text{Ca}^{2+}$  release from internal stores. The stimulatory effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$  on  $\text{Ca}^{2+}$  signal was followed by a mitochondrial membrane depolarization. Our results also indicated that  $\text{H}_2\text{O}_2$  was able to increase the caspase-3 and -9 activities. The effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$  on caspase activation was time dependent, reaching a maximal caspase activity after 120 min of stimulation. Loading of cells with dimethyl BAPTA, an intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  chelator, significantly reduced  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced mitochondrial depolarization and caspase activation. Similar results were obtained when the cells were pretreated with Ru360, a specific blocker of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake into mitochondria. The findings suggest that  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced caspase-3 and -9 activation and mitochondrial membrane depolarization is dependent on rises in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  in human myeloid HL-60 cells.

**Keywords:** Apoptosis, caspases,  $\text{Ca}^{2+}$  signal, hydrogen peroxide, HL-60 cells.

### INTRODUCTION

Apoptosis or programmed cell death involves a number of biochemical events, including the activation of a series of cytosolic cysteine proteases, called caspases, which lead to specific cell morphology changes and ultimately cell death. Traditionally, two apoptotic pathways have been described: the cell-surface death receptor-dependent extrinsic pathway and the mitochondria-dependent intrinsic pathway [1]. Alternatively, apoptosis has been reported to be induced by endoplasmic reticulum stress, which is mainly induced by a reduction in intraluminal free calcium concentration [2].

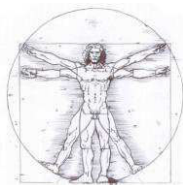
One of the earliest and most consistently observed features of apoptosis is the activation of caspases, which cleave multiple protein substrates *en masse*, leading to the loss of cellular structure and function and ultimately resulting in cell death [3]. The caspase family consists of at least 14 enzymes in mammalian cells. In particular, caspases-3, -8 and -9 play a relevant role in apoptosis: caspase-9, in the mitochondrial pathway; caspase-8, in the Fas/CD95 pathway; and caspase-3, more downstream, which is an executioner caspase activated by multiple pathways [4].

The cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ) is maintained at about 80-100 nM, a very low level relative to the extracellular fluid ( $[\text{Ca}^{2+}]_{EC} \approx 1.2$  mM). The major mechanism to lower  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  is  $\text{Ca}^{2+}$  extrusion mediated by the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pumps and by the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchangers.  $[\text{Ca}^{2+}]$  in the nuclear matrix ( $[\text{Ca}^{2+}]_n$ ) and in the mitochondrial matrix ( $[\text{Ca}^{2+}]_m$ ) is similar to  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ .

However, other intracellular organelles maintain a large  $\text{Ca}^{2+}$  concentration gradient versus the cytoplasm. The most important  $\text{Ca}^{2+}$  storage compartment is the sarco-endoplasmic reticulum (ER/SR) in most cells. Additionally, sarco-endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) pumps  $\text{Ca}^{2+}$  into the lumen of ER/SR. The ER/SR provides a compartment from which  $\text{Ca}^{2+}$  can be mobilized to increase  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . However, prolonged changes in  $\text{Ca}^{2+}$  distribution including an elevation in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]_m$ , and  $[\text{Ca}^{2+}]_n$  and a decrease in  $[\text{Ca}^{2+}]_{ER}$  trigger a variety of cascades that lead to cell death [5].

Mitochondria are the major source of reactive oxygen species (ROS) in the cell. Superoxide ( $\text{O}_2^-$ ) is generated by the operation of complexes I and III in the matrix and is converted to hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) by Mn-superoxide dismutase.  $\text{O}_2^-$  can also rapidly react with another free radical, namely, nitric oxide (NO), yielding more toxic ROS such as peroxynitrite. Among other factors,  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation has been reported to stimulate mitochondrial ROS production. As a storehouse for intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , a source of ROS, and a sensor of oxidative stress [6], mitochondria play a key role in regulation of apoptosis under a variety of pathological conditions [7, 8]. Notably, if mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake triggers significant depolarization, this may cause a decrease in the electrochemical potential across mitochondrial membrane-dependent complex III-mediated ROS formation. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  has been reported to trigger the mitochondrial NO synthase activity and cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  may also control the availability of NO through activation of the  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive cytoplasmic NO synthase [9-13]. Although ROS and  $\text{Ca}^{2+}$  have been separately reported to be important mediators of apoptosis, little correlation between these two mediators has been reported.

\*Address correspondence to this author at the Department of Physiology, Faculty of Science, University of Extremadura, 06071 Badajoz, Spain; Tel: +34 924289300 ext. 86956; Fax: +34 924289388; E-mail: pariente@unex.es



## 4. RESULTADOS/RESULTS

In the present study, the authors investigated whether  $[Ca^{2+}]_i$  plays a role in  $H_2O_2$ -induced caspase activation in human leukemia cell line HL-60, analyzing caspase-3 and -9 activation and mitochondrial depolarization.

### MATERIALS AND METHODS

#### Materials

HL-60 15-12 cell line (ECACC N° 88120805) is a variant of HL-60 which is differentiating towards either neutrophils or monocytes, it was purchased from The European Collection of Cell Cultures (ECACC) (Dorset, U.K.). Fura-2 acetoxyethyl ester (fura-2/AM) and JC-1 were from Molecular Probes (Leiden, The Netherlands). Bovine serum albumin, dimethylsulfoxide (DMSO), caspase-3 (AC-DEVD-AMC) and -9 (AC-LEHD-AMC) substrate,  $H_2O_2$ , ethylene glycol-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), dimethyl BAPTA, carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenyl-hydrazone (FCCP), and HEPES were from Sigma (Madrid, Spain). Ru360 was from Calbiochem (Madrid, Spain). RPMI-1640 medium and L-glutamine were from Lonza (Verwiers, Belgium), penicillin and streptomycin were from HyClone (Utah, USA). All other reagents were of analytical grade.

#### HL-60 Cells Culture

Human promyelocytic leukemia HL-60 cells (passages 6-12) were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 10 % heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin and 1.25% DMSO at 37°C under a humidified condition of 95% air and 5%  $CO_2$ . Cells were routinely plated at a density of  $3 \times 10^5$  cells/mL into fresh flasks and the viability was >95% in all experiments as assayed by the trypan-blue exclusion method.

#### Measurement of Cytosolic Free $Ca^{2+}$ Concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ )

Cells were loaded with fura-2 by incubation with 2  $\mu$ M fura-2 acetoxyethyl ester (fura-2/AM) for 45 minutes at 37°C as described in our previous study [14]. Once loaded, the cells were washed and gently resuspended in Na-HEPES solution containing (in mM): NaCl, 140; KCl, 4.7;  $CaCl_2$ , 1.2;  $MgCl_2$ , 1.1; glucose, 10; and HEPES, 10 (pH 7.4). Fluorescence was recorded from 2 mL aliquots of magnetically stirred cellular suspension ( $2 \times 10^6$  cells/mL) at 37°C by using a spectrofluorophotometer (Shimadzu RF-5301-PC) with excitation wavelengths of 340 and 380 nm and emission at 505 nm. Changes in  $[Ca^{2+}]_i$  were monitored by using the fura-2 340/380 nm fluorescence ratio and were calibrated according to the method of Grynkiewicz *et al.* [15]. In the experiments where  $Ca^{2+}$ -free medium is indicated,  $Ca^{2+}$  was omitted and 1 mM ethylene glycol-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) was added.

#### Measurement of Mitochondrial Membrane Potential

HL-60 cells were loaded with the cationic dye JC-1 (10  $\mu$ g/mL, 37° C, 15 minutes), as described previously [16]. After dye loading, cells were centrifuged and resuspended in fresh Na-HEPES. JC-1 accumulates in mitochondria forming red fluorescent aggregates at high membrane potentials. At

low membrane potential JC-1 exits mainly in the green fluorescent monomeric form. Fluorescence was recorded from 2 mL of cell suspensions ( $4 \times 10^6$  cells/mL) at 37 °C using a spectrofluorophotometer (Shimadzu RF-5301-PC). JC-1-loaded cells were excited at 488 nm and emission was detected at 590 nm (JC-1 aggregates) and 525 nm (JC-1 monomers). Data are presented as emission ratios (590/525).

#### Caspase Activity Assay

To determine caspase activity, stimulated or resting cells were sonicated, and cell lysates were incubated with 2 mL of substrate solution (20 mM HEPES, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.1% CHAPS, 5 mM dithiothreitol (DTT), and 8.25  $\mu$ M of caspase substrate; pH 7.4) for 1 hour at 37°C, as described elsewhere [17]. Substrate cleavage was measured by using a fluorescence spectrophotometer (Shimadzu RF-5301-PC) with excitation wavelength of 360 nm and emission at 460 nm. The activities of caspase-3 and -9 were calculated from the cleavage of the respective specific fluorogenic substrate (AC-DEVD-AMC for caspase-3 and AC-LEHD-AMC for caspase-9). Preliminary experiments reported that caspase-3 or -9 substrate cleaving was not detected in the presence of the inhibitors of caspase-3 or -9, DEVD-CMK or z-LEHD-FMK, respectively. The data were calculated as fluorescence units per milligram of protein and were presented as fold increase over pretreatment level (untreated samples) (experimental/control). Protein concentrations were estimated by the method of Bradford [18].

#### $H_2O_2$ Treatment

$H_2O_2$  was added to the medium at the concentrations to be tested. HL-60 cells were preincubated with 1 mM or 100  $\mu$ M  $H_2O_2$  or vehicle for different time incubation. Once cells were preincubated, subsequent experiments were carried out.

#### Statistical Analysis

Data are expressed as means  $\pm$  SEM of the numbers of determinations. Analysis of statistical significance was performed by using the Student's t-test. To compare the different treatments, statistical significance was calculated by one-way analysis of variance followed by Tukey's multiple comparison tests.  $P < 0.05$  was considered to indicate a statistically significant difference

## RESULTS

#### Measurement of Cytosolic Free $Ca^{2+}$ Concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ )

It has been reported that a prolonged elevation in  $[Ca^{2+}]_i$  and alterations in  $Ca^{2+}$  homeostasis initiate the mitochondrial apoptotic pathway [5, 19] and induce endoplasmic reticulum stress that, in turn, leads to apoptosis [20]. In the presence of normal extracellular  $Ca^{2+}$  concentration, fura-2-loaded HL-60 cells were treated with the reactive oxygen species  $H_2O_2$ . As shown in Fig. (1), stimulation with 1 mM or 100  $\mu$ M  $H_2O_2$  caused a slow and sustained  $[Ca^{2+}]_i$  increase, which reached a stable  $[Ca^{2+}]_i$  plateau after 5-7 minutes of administration [(Fig. (1A) and (1C)]. Fig. (1) also demonstrates that the increase of  $[Ca^{2+}]_i$  induced by  $H_2O_2$  was also observed in  $Ca^{2+}$ -free medium [Fig. (1B) and (1D)], reflecting the release



## 4.RESULTADOS/RESULTS

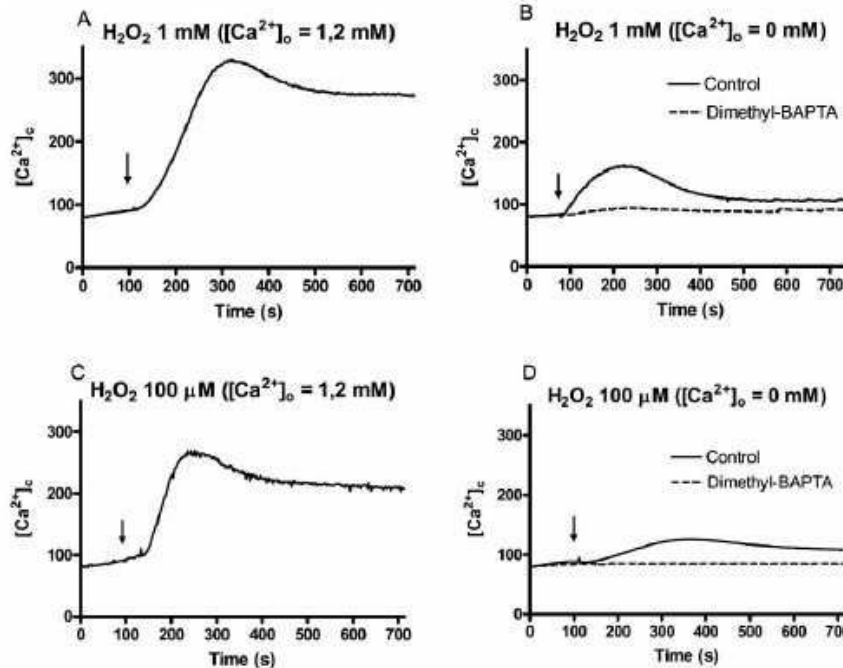


Fig. (1). Effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$  on  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Fura-2-loaded HL-60 cells were stimulated with 1 mM (A and B) or 100  $\mu\text{M}$  (C and D)  $\text{H}_2\text{O}_2$  as indicated by arrows in a  $\text{Ca}^{2+}$ -normal ( $[\text{Ca}^{2+}]_o = 1.2 \text{ mM}$ ) (A and C) or -free solution ( $[\text{Ca}^{2+}]_o = 0 \text{ mM} + 1 \text{ mM EGTA}$ ) (B and D), in the absence (control) or presence of dimethyl BAPTA (10  $\mu\text{M}$  for 30 min) (B and D). Traces are representative of 5-7 independent experiments

of  $\text{Ca}^{2+}$  from intracellular store(s), though the  $\text{Ca}^{2+}$  signal was smaller compared to those obtained in the presence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . In addition, HL-60 cells were loaded with dimethyl BAPTA, an intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  chelator, by incubating the cells for 30 minutes at  $37^\circ\text{C}$  with 10  $\mu\text{M}$  dimethyl BAPTA-AM. As expected, in  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium dimethyl BAPTA loading prevented  $\text{H}_2\text{O}_2$ -evoked  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  elevations in HL-60 cells [Fig. (1B) and (1D)].

### Mitochondrial Depolarization

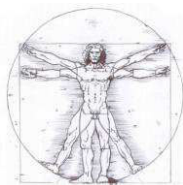
In a medium containing 1.2 mM extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , treatment of cells with 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  induced a mitochondrial membrane depolarization as detected by the decrease in JC-1 fluorescence ratio [Fig. (2A)]. Treatment with 1  $\mu\text{M}$  FCCP, a mitochondrial uncoupler that collapses the mitochondrial membrane potential, induced maximal decrease in JC-1 fluorescence [Fig. (2A) and (2B)]. Treatment with 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  evoked 30% of the effect observed with FCCP [Fig. (2A)]. However, when HL-60 cells were loaded with dimethyl BAPTA, 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  exerted a negligible effect on mitochondrial membrane potential, suggesting that increases in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  are required for  $\text{H}_2\text{O}_2$ -evoked mitochondrial depolarization [Fig. (2A)]. Similar results were obtained when the cells were pretreated with 10  $\mu\text{M}$  Ru360 for 30 min, a specific blocker of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake into mitochondria [Fig. (2A)]. Additionally, treatment of cells with 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  also induced a mitochondrial membrane depolarization (50% of the effect observed with FCCP), which was higher compared to those obtained with 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  [Fig. (2B)]. Simi-

larly, in the presence of either dimethyl BAPTA or Ru360, 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ -evoked mitochondrial membrane potential was significantly inhibited [Fig. (2B)], which confirms that depletion of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores and subsequent  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the mitochondria induce mitochondrial depolarization.

### Caspase-3 and -9 Activities

To examine the effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$  on caspase-3 activation, HL-60 cells were treated with 100  $\mu\text{M}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 10-120 minutes. Our results show that  $\text{H}_2\text{O}_2$  was able to increase the caspase-3 activity in HL-60 cells [Fig. (3A)]. The effect of treatments with 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  on caspase-3 activity was time-dependent, reaching a maximal caspase activity after 120 minutes of stimulation ( $215 \pm 31\%$  above control;  $P < 0.05$ ). However, as shown in Fig. (4A), either dimethyl BAPTA loading or pretreatment with 10  $\mu\text{M}$  Ru360 for 30 minutes, were able to significantly reduce  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced caspase-3 activity.

Caspase-9 is an initiator caspase that is involved in the initial steps of mitochondrial apoptosis [21]. To investigate whether the activation of caspase-3 by  $\text{H}_2\text{O}_2$  is a mitochondrial apoptosis, we checked the caspase-9 activity in the presence of 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . As shown in Fig. (3A), treatment of HL-60 cells with 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  induced a time-dependent increase of caspase-9 activity, reaching a maximal caspase activity after 120 minutes of stimulation ( $182 \pm 54\%$  above control;  $P < 0.05$ ). Consistent with the results presented



## 4. RESULTADOS/RESULTS

184 *Current Signal Transduction Therapy*, 2010, Vol. 5, No. 2

González et al.

above, when cells were loaded with 10  $\mu\text{M}$  dimethyl BAPTA-AM for 30 minutes,  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced caspase-9 activity were significantly reduced [Fig. (4B)]. Similar results were obtained when HL-60 cells were pretreated for 30 min with 10  $\mu\text{M}$  Ru360 [Fig. (4B)]. Taken together, these findings strongly suggest that depletion of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  pools by both the reactive oxygen specie  $\text{H}_2\text{O}_2$  induces activation of caspase-3 and -9.

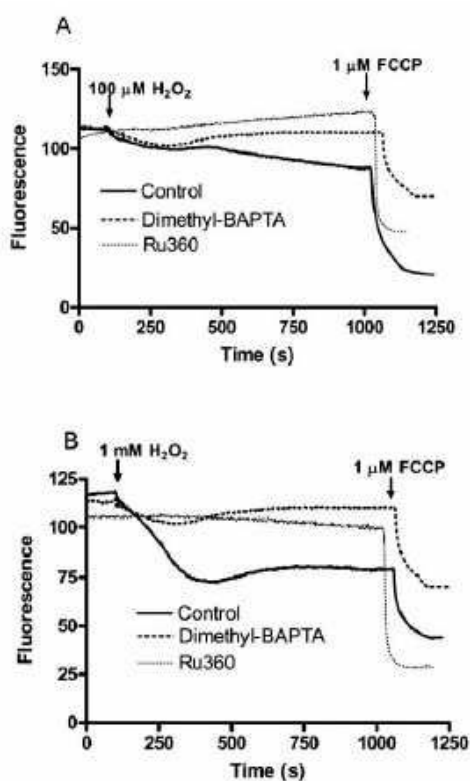


Fig. (2). Effect of hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) on mitochondrial membrane potential. JC-1-loaded HL-60 cells were pretreated with 10  $\mu\text{M}$  dimethyl-BAPTA-AM, 10  $\mu\text{M}$  Ru360 or its vehicle (DMSO) for 30 min, in a  $\text{Ca}^{2+}$ -normal solution ( $[\text{Ca}^{2+}]_i = 1.2 \text{ mM}$ ); and then stimulated with 100  $\mu\text{M}$  (A) or 1  $\text{mM}$  (B)  $\text{H}_2\text{O}_2$  and 1  $\mu\text{M}$  FCCP as indicated by arrows. Traces are representative of 4-8 independent experiments

### DISCUSSION

$[\text{Ca}^{2+}]_i$  increases regulate important cell process and, recently, have been shown as a regulator of process related to programmed cell death or apoptosis [5]. On the other hand, reactive oxygen species (ROS) are able to change the  $\text{Ca}^{2+}$  signalling [22-24]. In addition,  $\text{Ca}^{2+}$  overloading in mitochondria can induce an apoptotic program by stimulating the release of apoptosis promoting factor like cytochrome c, and by generating ROS due to respiratory chain damage [25, 26]. Mitochondria were reported to accumulate  $\text{Ca}^{2+}$  provided cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  rises exceed 400 nm or provided mitochondrial uptake dominates mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  extrusion [27],

thereby leading to depolarization of mitochondrial membranes [28]. Uptake of  $\text{Ca}^{2+}$  into mitochondria stimulates the tricarboxylate cycle resulting in augmented reduction of pyridine nucleotides, which may be one of the mechanisms of the coupling of cell and metabolic activity [29]. On the other hand, exposure of mitochondria to high cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  was shown to increase formation of ROS. In return, some cation channels such as transient receptor potential melastatin 2 were gated by the increased ROS production [30]. This increased  $\text{Ca}^{2+}$  influx induces more depolarization of mitochondria and ROS production [29]. The feedback mechanisms in  $\text{H}_2\text{O}_2$  exposed cells caused to increased levels of  $\text{Ca}^{2+}$  release in the current study. Increased levels of caspase-3 and -9 in the current study may be explained increase in ROS production.

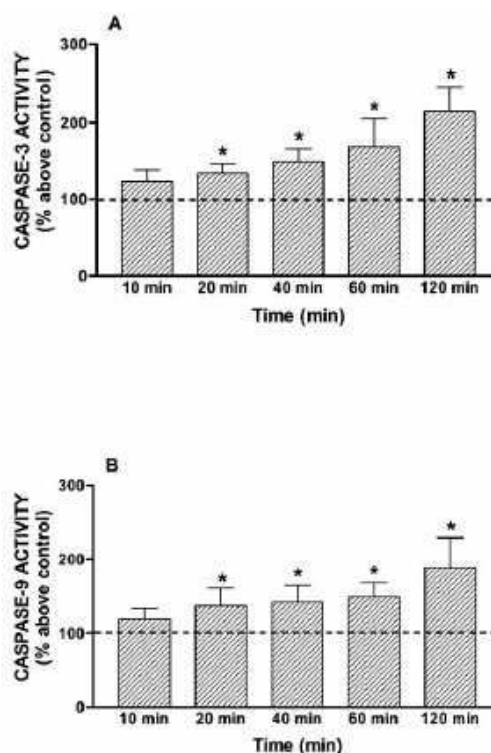


Fig. (3). Time-dependence course of caspase activation induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$ . HL-60 cells were stimulated for various periods of time (10-120 min) with 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Caspase-3 and -9 activities were estimated as described under Materials and Methods. Values are presented as means  $\pm$  S.E.M. of 6-7 separate experiments and expressed as percentage above control (untreated samples). \* $p < 0.05$ , compared to control values.

Our results show that treatment of HL-60 cells with  $\text{H}_2\text{O}_2$  induced a transient increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  due to  $\text{Ca}^{2+}$  release from internal stores. This increase was more sustained in the presence of external  $\text{Ca}^{2+}$ . In addition, dimethyl-BAPTA loading prevents  $\text{H}_2\text{O}_2$ -evoked  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  elevations. Similar results have been shown previously by other authors using different cells [31, 32]. This stimulatory effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$  on



## 4.RESULTADOS/RESULTS

*Oxidative Stress-Induced Caspases are Regulated in Human Myeloid*

*Current Signal Transduction Therapy, 2010, Vol 5, No. 2 185*

Ca<sup>2+</sup> signal was followed by a mitochondrial membrane depolarization and by time-dependent stimulation of caspase-3 (a key downstream effector of apoptosis) and initiator caspase-9 activities. These results are similar than other ones previously obtained in our research group, in human platelets and spermatozoa [33, 34], and others [35].

Ru360 or rises in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> were able to decrease caspase activation mediated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which was able to release Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores. These observations are in agreement with previous studies showing that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can act as regulator of mitochondrial activity [13, 39] and induce Ca<sup>2+</sup> mobilization [40].

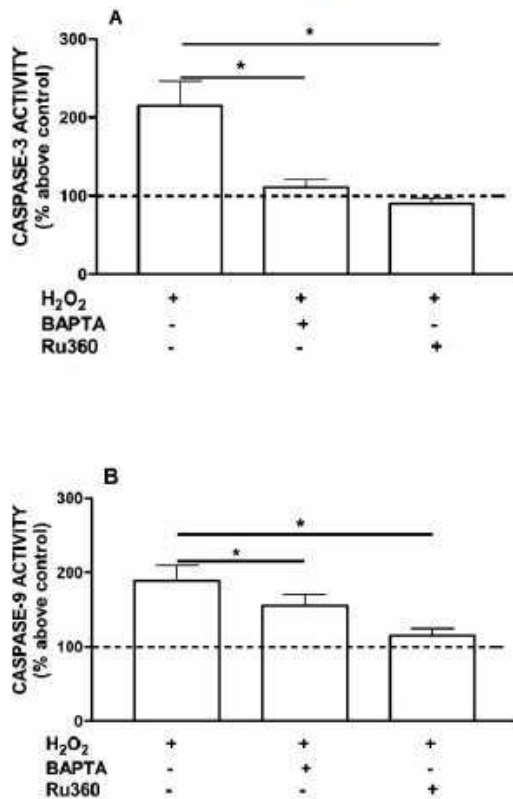


Fig. (4). Effect of Ca<sup>2+</sup> signal on caspase-3 and -9 activation induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dimethyl-BAPTA (10 μM for 30 min) or Ru360 (10 μM for 30 min) pretreated cells were stimulated for 120 minutes with 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Caspase-3 and -9 activities were estimated as described under Materials and Methods. Values are presented as means ± S.E.M. of 6-8 separate experiments and expressed as percentage above control (untreated samples). \**p* < 0,05.

Stored Ca<sup>2+</sup> is crucial for a number of cellular functions, including signal transduction cascades that respond to stress conditions [36]. The filling state of the intracellular Ca<sup>2+</sup> stores has been reported as a candidate to trigger the initiation of apoptotic events [37, 38]. Our findings indicate that the caspase activation caused by depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores is probably due to a mitochondrial membrane depolarization, and subsequent releasing of intramitochondrial apoptosis promoting factors. We provide compelling evidences supporting that mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake evoked by rises in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, induces mitochondrial membrane depolarization (as detected by the decrease in JC-1 fluorescence ratio) and caspase-9 and -3 activation. Our results also show that the blockade of both Ca<sup>2+</sup> uptake into mitochondria with

Our results are in agreement with previous studies obtained by [26], whose data confirmed that Ru360 is a potent inhibitor of the mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake in permeabilized H9c2 rat cardiac myoblast cells. The effect [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> elevation on mitochondrial membrane potential and caspase activation is consistent with evidences showing a interaction between mitochondria and intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and the observation of close physical contacts between both organelles [41, 42]. In fact, there is both structural and functional evidence suggesting the presence of specific and stable interactions between mitochondria and intracellular Ca<sup>2+</sup> stores (e.g. endoplasmic reticulum) which facilitate a rapid flux of Ca<sup>2+</sup> from endoplasmic reticulum to mitochondria [41, 43-46] and these tight endoplasmic reticulum-mitochondria couplings may also serve to modulate Ca<sup>2+</sup> release. In addition, it has been suggested that mitochondria co-localize in small sub-cellular regions where reticulum and mitochondria form close contacts [46]. This has led to the concept of "intracellular synapse" or "quasi-synaptic" Ca<sup>2+</sup> signal transmission between mitochondria and reticulum coined by Hajnoczky's group [42]. The endoplasmic reticulum-mitochondrial interface may be supported by direct links between the organelles or by anchorage of the organelles to cytoskeletal framework [26].

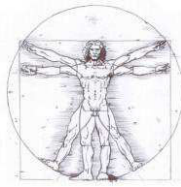
In the present investigation we concluded that the oxidative stress produced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produces a transient increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> due to Ca<sup>2+</sup> release from internal stores in human myeloid cell line HL-60. This Ca<sup>2+</sup> increase leads to mitochondrial membrane depolarization and, finally, caspase-9 and -3 activation.

### AGKNOWLEDGMENTS

This work was supported by MEC-DGI and Junta de Extremadura grants BFU2007-60091 and PRI07-A024, respectively. I. Bejarano was supported by a grant from Junta de Extremadura PRE06070.

### REFERENCES

- [1] Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med* 2005; 258: 479-517.
- [2] Groenendyk J, Michalak M. Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis. *Acta Biochim Pol* 2005; 52: 381-95.
- [3] Stennicke HT, Salvesen GS. Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8. *J Biol Chem* 1997; 272: 25719-23.
- [4] Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 2002; 9: 459-70.
- [5] Hajnoczky G, Davies E, Madesh M. Calcium signaling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 445-54.
- [6] Melov S. Mitochondrial oxidative stress. Physiologic consequences and potential for a role in aging. *Ann NY Acad Sci* 2000; 908: 219-25.
- [7] Tsutsui H, Ide T, Kinugawa S. Mitochondria oxidative stress, DNA damage, and heart failure. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 1737-44.
- [8] Beal MF. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366: 211-23.



## 4. RESULTADOS/RESULTS

- [9] Ghafourifar P, Schenk U, Klein SD, Richter C. Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation. *J Biol Chem* 1999; 274: 31185-8.
- [10] Nicholls DG, Budd SL. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev* 2000; 80: 315-60.
- [11] Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 2001; 495: 12-5.
- [12] Szibor M, Richter C, Ghafourifar P. Redox control of mitochondrial functions. *Antioxid Redox Signal* 2001; 3: 515-23.
- [13] Starkov AA, Polster BM, Fiskum G. Regulation of hydrogen peroxide production by brain mitochondria by calcium and Bax. *J Neurochem* 2002; 83: 220-8.
- [14] Bejarano I, Terrón MP, Paredes SD, Barriga C, Rodríguez AB, Pariente JA. Hydrogen peroxide increases the phagocytic function of human neutrophils by calcium mobilisation. *Mol Cell Biochem* 2007; 296: 77-84.
- [15] Grynkiewicz C, Poenie M, Tsien RY. A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260: 3440-50.
- [16] Granados MP, Salido GM, Pariente JA, González A. Effect of  $H_2O_2$  on CCK-8-evoked changes in mitochondrial activity in isolated mouse pancreatic acinar cells. *Biol Cell* 2005; 97: 847-56.
- [17] Bejarano I, Redondo PC, Espino J, *et al.* Melatonin induces mitochondrial-mediated apoptosis in human myeloid HL-60 cells. *J Pineal Res* 2009; 46: 392-400.
- [18] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
- [19] Demaux N, Distelhorst C. Cell biology. Apoptosis - the calcium connection. *Science* 2003; 300: 65-7.
- [20] Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* 2004; 11: 372-80.
- [21] Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, *et al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91: 479-89.
- [22] Pariente JA, Camello G, Camello PJ, Salido GM. Release of calcium from mitochondrial and nonmitochondrial intracellular stores in mouse pancreatic acinar cells by hydrogen peroxide. *J Membr Biol* 2001; 179: 27-35.
- [23] Redondo PC, Salido GM, Pariente JA, Rosado JA. Dual effect of hydrogen peroxide on store-mediated calcium entry in human platelets. *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 1065-76.
- [24] Rosado JA, Redondo PC, Salido GM, Gómez-Arteta E, Sage SO, Pariente JA. Hydrogen peroxide generation induces pp60src activation in human platelets: evidence of the involvement of this pathway in store-mediated calcium entry. *J Biol Chem* 2004; 279: 1665-75.
- [25] Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287: 817-33.
- [26] Hajnóczky G, Csordas G, Das S, *et al.* Mitochondrial calcium signaling and cell death: Approaches for assessing the role of mitochondrial  $Ca^{2+}$  uptake in apoptosis. *Cell Calcium* 2006; 40: 553-60.
- [27] Colegrove SL, Albrecht MA, Friel DD. Quantitative analysis of mitochondrial  $Ca^{2+}$  uptake and release pathways in sympathetic neurons. Reconstruction of the recovery after depolarization-evoked  $[Ca^{2+}]_i$  elevations. *J Gen Physiol* 2000; 115: 371-88.
- [28] Kovács R, Schuchmann S, Gabriel S, Kann O, Kardos J, Heinemann U. Free radical-mediated cell damage after experimental status epilepticus in hippocampal slice cultures. *J Neurophysiol* 2002; 88: 2909-18.
- [29] Naziroğlu M. Role of selenium on calcium signaling and oxidative stress-induced molecular pathways in epilepsy. *Neurochem Res* 2009; doi:10.1007/s11064-009-0015-8.
- [30] Naziroğlu M. New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. *Neurochem Res* 2007; 32: 1990-2001.
- [31] Zhang L, Yu H, Sun Y, *et al.* Protective effects of salidroside on hydrogen peroxide-induced apoptosis in 5H-5Y5Y human neuroblastoma cells. *Eur J Pharmacol* 2007; 564: 18-25.
- [32] Choi MS, Boise LH, Gottschalk AR, Quintans J, Thompson CB. The role of Bcl-XL in CD40-mediated rescue from anti-mu-induced apoptosis in WEHI-231 B lymphoma cells. *Eur J Immunol* 1995; 25: 1352-7.
- [33] López JJ, Salido GM, Gómez-Arteta E, Rosado JA, Pariente JA. Thrombin induces apoptotic events through the generation of reactive oxygen species in human platelets. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1283-91.
- [34] Bejarano I, Lozano GM, Ortiz A, *et al.* Caspase 3 activation in human spermatozoa in response to hydrogen peroxide and progesterone. *Fertil Steril* 2008; 90: 1340-7. Li\_CSTT.doc
- [35] Lei X, Zhang S, Bohrer A, Ramanadham S. Calcium-independent Phospholipase A2 (iPLA2(beta))-mediated Ceramide Generation Plays a Key Role in the Cross-talk between the Endoplasmic Reticulum (ER) and Mitochondria during ER Stress-induced Insulin-secreting Cell Apoptosis. *J Biol Chem* 2008; 283: 34819-32.
- [36] Meldolesi J, Pozzan T. The endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  store: a view from the lumen. *Trends Biochem Sci* 1998; 23: 10-4.
- [37] Punney Jr JW, Ribeiro CM. Signaling pathways between the plasma membrane and endoplasmic reticulum calcium stores. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 1272-86.
- [38] Pigozzi D, Tombal B, Ducret T, Vacher P, Gaily P. Role of store-dependent influx of  $Ca^{2+}$  and efflux of  $K^{+}$  in apoptosis of CHO cells. *Cell Calcium* 2004; 36: 421-30.
- [39] González A, Granados MP, Salido GM, Pariente JA.  $H_2O_2$ -induced changes in mitochondrial activity in isolated mouse pancreatic acinar cells. *Mol Cell Biochem* 2005; 269: 165-73.
- [40] Granados MP, Salido GM, González A, Pariente JA. Dose-dependent effect of hydrogen peroxide on calcium mobilization in mouse pancreatic acinar cells. *Biochem Cell Biol* 2006; 84: 39-48.
- [41] Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, *et al.* Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial  $Ca^{2+}$  responses. *Science* 1998; 280: 1763-6.
- [42] Csordas G, Thomas AP, Hajnóczky G. Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *EMBO J* 1999; 18: 96-108.
- [43] Camello-Almaraz C, Salido GM, Pariente JA, Camello PJ. Role of mitochondria in  $Ca^{2+}$  oscillations and shape of  $Ca^{2+}$  signals in pancreatic acinar cells. *Biochem Pharmacol* 2002; 63: 283-92.
- [44] Filippin L, Magalhaes PJ, Di Benedetto G, Colella M, Pozzan T. Stable interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum allow rapid accumulation of calcium in a subpopulation of mitochondria. *J Biol Chem* 2003; 278: 39224-34.
- [45] Hajnóczky G, Csordas G, Madesh M, Pacher P. The machinery of local  $Ca^{2+}$  signalling between sarco-endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Physiol* 2000; 529: 69-81.
- [46] Vay L, Hernández-SanMiguel E, Santo-Domingo J, *et al.* Modulation of  $Ca^{2+}$  release and  $Ca^{2+}$  oscillations in HeLa cells and fibroblasts by mitochondrial  $Ca^{2+}$  uniporter stimulation. *J Physiol* 2007; 580: 39-49.



**4.3. *La apoptosis inducida por TNF $\alpha$  en líneas celulares mieloides humanas es dependiente de la generación de ROS intracelular.***



# 4.RESULTADOS/RESULTS



Cell and Tissue Research

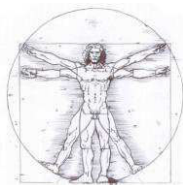


## TNF $\alpha$ -induced apoptosis in human myeloid cell lines is dependent of intracellular ROS generation

Journal:	<i>Cell and Tissue Research</i>
Manuscript ID:	CTR-12-0458
Manuscript Type:	Regular Article
Date Submitted by the Author:	27-Dec-2012
Complete List of Authors:	González-Flores, David; Universidad de Extremadura, Physiology Rodríguez, Ana; Universidad de Extremadura, Physiology Pariante, José; Universidad de Extremadura, Physiology
Keywords:	TNF $\alpha$ , apoptosis, antioxidants, myeloid cell lines, caspase

SCHOLARONE™  
Manuscripts

Review



## 4. RESULTADOS/RESULTS

---

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**TNF $\alpha$ -induced apoptosis in human myeloid cell lines is dependent of intracellular ROS generation**

González-Flores, D., Rodríguez, A.B., Pariente, J.A.

Department of Physiology, Neuroimmunophysiology and Chrononutrition Research Group,

Faculty of Science, University of Extremadura, 06006 Badajoz, Spain.

**Running title:** TNF $\alpha$ -induced apoptosis

**Keywords:** TNF $\alpha$ , apoptosis, antioxidants, myeloid cell lines

To whom correspondence should be addressed:

Prof. J. A. Pariente

Department of Physiology

Faculty of Science

University of Extremadura

06071 Badajoz, SPAIN.

Tel: +34 924289300 ext. 86956

Fax: +34 924289388

E-mail: pariente@unex.es



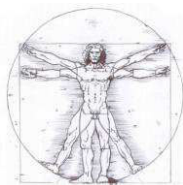
## 4.RESULTADOS/RESULTS

---

### ABSTRACT

The present study is aimed to determine the role of reactive oxygen species (ROS) production and calcium signaling evoked by the tumor necrosis factor-alpha (TNF $\alpha$ ) on apoptosis in the human leukemia HL-60 and K562 cell lines. Our results show that treatment of both cell lines cells with 10 ng/mL TNF $\alpha$  led to a rise in the percentage of apoptotic cells after 6 hours of treatment. We also observed that the administration of 10 ng/mL TNF $\alpha$  increased intracellular ROS production, as well as a time-dependent increase in caspase-8, -3 and -9 activities. Our results also show that the pretreatment with well known antioxidants such as trolox and N-acetyl cysteine (NAC) partially reduced the apoptotic effects caused by the administration of TNF $\alpha$ . Our findings suggest that TNF $\alpha$ -induced apoptosis is dependent on alterations in intracellular ROS generation in human leukemia HL-60 and K562 cells.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



## 4. RESULTADOS/RESULTS

---

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### INTRODUCTION

Apoptosis or programmed cell death involves a number of biochemical events, including the activation of caspases and phosphatidylserine exposure, which lead to specific cell morphology changes and ultimately cell death. Traditionally, two apoptotic pathways have been described: the cell-surface death receptor-dependent extrinsic pathway and the mitochondria-dependent intrinsic pathway (Fadeel and Orrenius 2005). Tumoral necrosis factor, TNF $\alpha$ , is a cytokine produced mainly by activated macrophages and by several other types of cells to a lesser degree. It is involved in systemic inflammation, and it is a member of a group of cytokines which stimulate the acute stage. Additionally, it is capable of inducing different biological responses and it plays a role in inflammation, stress response and apoptosis, where it can induce both pro- and anti-apoptotic signaling. TNF $\alpha$  binds to two cell-surface receptors, TNF-R1 and TNF-R2, which in turn oligomerize and bind the adaptor protein TNF receptor-associated death domain (TRADD), which recruits additional adaptor proteins: receptor-interacting protein (RIP), TNF-R-associated factor 2 (TRAF2) and Fas-associated death domain (FADD). In the apoptotic pathway this complex recruits caspase-8 molecules, which bind to FADD (Ashkenazi and Dixit 1999; Ding and Yin 2004) and are activated in the complex by dimerization, due to their high local concentration (Boatright and Salvesen 2003). Active caspase-8 then activates the effector caspases, primarily through the cleavage of the Bcl-2 family member Bid and the subsequent activation of the mitochondrial pathway, serving as an amplifier of the signal (Scaffidi et al. 1998; Wajant et al. 2003).

Apoptosis can be also stimulated by oxygen reactive species (ROS) in several cell types (Brookes et al. 2004; González et al. 2010; Suzuki et al. 1997; Tan et al. 1998). Recently, it has been reported that ROS can mediate the apoptosis induced by growth factors, such as transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) in human lens epithelial cells (Yao et al. 2007), or classical agonists, such as thrombin in human platelets (López et al. 2007) or progesterone in human spermatozoa (Bejarano et al. 2008). In addition, ROS have been suggested to be important regulators of signaling pathways stimulated by TNF (Han et al. 2006a; Han et al. 2006b; Kaplowitz 2002; Shen and



# 4.RESULTADOS/RESULTS

1 Pervais 2006). In the last two decades, a great deal of work has shown that both  $O_2^-$  and  $H_2O_2$  can  
2 regulate many signaling pathways.  $O_2^-$  and  $H_2O_2$  have different chemical properties and thus can  
3 regulate different signaling pathways. Therefore, the role of ROS in TNF-stimulated apoptosis may  
4 be overstated in some cells, although, in other cells, ROS appear to play an essential role (Han et al.  
5 2009).  
6  
7  
8  
9  
10  
11

12 In the present work we investigated whether ROS play a role in the activation of extrinsic  
13 pathway apoptosis induced by  $TNF\alpha$  in two human leukemia cell lines, such as human  
14 promyelocytic leukemia HL-60 and human myelogenous leukemia K-562 cells.  
15  
16  
17  
18  
19  
20

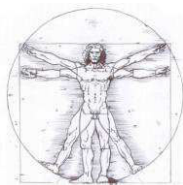
## 21 MATERIALS AND METHODS

### 22 Material

23  
24  
25  
26 HL-60 15-12 cell line (ECACC No 88120805) and K-562 cells were purchased from The  
27 European Collection of Cell Cultures (ECACC) (Dorset, UK). HEPES, cycloheximide (CHX),  
28 trolox, N-acetyl cysteine (NAC), Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, dihydrorhodamine 123,  
29 caspase-3 (AC-DEVD-AMC) and -9 (AC-LEHD-AMC) substrate, and  $TNF\alpha$  were purchased  
30 from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA); Hoechst 33342, ionomycin were purchased from  
31 Calbiochem (San Diego, CA, USA); fetal calf serum (FCS), L-glutamine, penicillin, streptomycin  
32 and RPMI 1640 were from Lonza. All other reagents were of analytical grade.  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43

### 44 Cell culture

45  
46 Human promyelocytic leukemia HL-60 15-12 cells are a variant of HL-60 which is  
47 differentiating towards either neutrophils or monocytes. K562 cells were the first human  
48 immortalised myelogenous leukemia line to be established. K562 cells are of the erythroleukemia  
49 type, and the line is derived from a 53 year old female CML patient in blast crisis (Lozzio and  
50 Lozzio, 1975). Cells (passages 6-12) were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM  
51 L-glutamine, 10 % heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



## 4. RESULTADOS/RESULTS

1 streptomycin and 1.25% DMSO at 37°C under a humidified condition of 95% air and 5% CO<sub>2</sub>.  
2  
3  
4 Cells were routinely plated at a density of  $3 \times 10^5$  cells/mL into fresh flasks and the viability was  
5  
6 >95% in all experiments as assayed by the trypan-blue exclusion method.  
7  
8  
9

### 10 Cell Viability Assay

11  
12 Cell viability was evaluated by the MTT assay based on the ability of viable cells to convert  
13  
14 a water-soluble, yellow tetrazolium salt into a water-insoluble, purple formazan product. The  
15  
16 enzymatic reduction of the tetrazolium salt happens only in living, metabolically active cells but not  
17  
18 in dead cells. Cells were seeded in 96-well plates at a density of  $2 \cdot 10^5$ /well and subsequently  
19  
20 exposed to different treatments. After the treatments, the medium was removed and MTT was added  
21  
22 to each well and then incubated for 90 min at 37°C in a shaking water bath as previously described  
23  
24 (Uğuz et al. 2009). The supernatant was discarded and DMSO was added to dissolve the formazan  
25  
26 crystals. Treatments were carried out in duplicate. Optical density was measured in an automatic  
27  
28 plate reader (Infinite M200; Tecan Austria GmbH, Groedig, Austria) at 490 nm and 650 nm and  
29  
30 presented as percentage of MTT reduction respect to the pretreatment level.  
31  
32  
33  
34  
35  
36

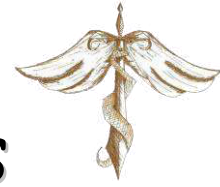
### 37 Intracellular ROS determination

38  
39 Intracellular ROS generation was determined in a suspension of DHR-123 loaded HL-60  
40  
41 and K-562 cells ( $20 \mu\text{M}$  for 20 minutes at 37°C) using a microplate reader as previously described  
42  
43 (Bejarano et al. 2011; Espino et al. 2011). Cells were excited at 488 nm and reading fluorescence  
44  
45 was measured at 543 nm. Intracellular ROS generation changes were monitored, and normalized as  
46  
47 fold increase over the pretreatment level (experimental/control).  
48  
49  
50

### 51 Caspase activity assay

52  
53 To determine caspase activity, stimulated or resting cells were sonicated, and cell lysates  
54  
55 were incubated with 2 mL of substrate solution (20 mM HEPES, 2 mM ethylenediaminetetraacetic  
56  
57 acid (EDTA), 0.1% CHAPS, 5 mM dithiothreitol (DTT), and  $8.25 \mu\text{M}$  of caspase substrate; pH 7.4)  
58  
59  
60





## 4.RESULTADOS/RESULTS

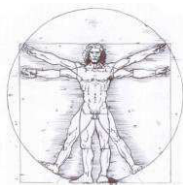
1  
2 for 1 hour at 37°C, as described elsewhere (Bejarano et al. 2009). Substrate cleavage was measured  
3  
4 by using a fluorescence microplate reader with excitation wavelength of 360 nm and emission at  
5  
6 460 nm. The activities of caspase-3, -8 -9 were calculated from the cleavage of the respective  
7  
8 specific fluorogenic substrate (AC-DEVD-AMC for caspase-3, AC-IEPD-AMC for caspase-8 and  
9  
10 AC-LEHD-AMC for caspase-9). Preliminary experiments reported that caspase-3 or -9 substrate  
11  
12 cleaving was not detected in the presence of the inhibitors of caspase-3,-8 or -9, DEVD-CMK,  
13  
14 IEPD-CMK or z-LEHD-FMK, respectively. The data were calculated as fluorescence units per  
15  
16 milligram of protein and were presented as fold increase over pretreatment level (untreated  
17  
18 samples) (experimental/control).  
19  
20

### 21 22 23 Statistical analysis

24  
25 Data are expressed as means  $\pm$  SEM of the numbers of determinations. Analysis of statistical  
26  
27 significance was performed by using the Mann-Whitney's U-test. To compare the different  
28  
29 treatments, statistical significance was calculated by one-way analysis of variance followed by  
30  
31 Tukey's multiple comparison tests.  $P < 0.05$  was considered to indicate a statistically significant  
32  
33 difference.  
34  
35  
36  
37

### 38 39 **RESULTS**

40  
41  
42 The effects of TNF $\alpha$  on the cell viability of HL-60 and K-562 cells are shown in Figure 1.  
43  
44 Cells were stimulated with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  for various periods of time (0-48 hours), and then cell  
45  
46 viability assay was carried out. After 12 hours of treatment, cells treated with TNF $\alpha$  significantly  
47  
48 decreased the cell viability respect to control cells, reaching the lowest cell viability after 48 hours  
49  
50 of treatment ( $55.0 \pm 5.6$  and  $68.2 \pm 6.5$  % in HL-60 and K-562 cells, respectively,  $p < 0.05$ ). No  
51  
52 significant differences on cell viability were assessed between cells treated with TNF $\alpha$  alone and  
53  
54 cells treated with TNF $\alpha$  in combination with CHX, an inhibitor of protein biosynthesis in eukaryotic  
55  
56  
57  
58  
59  
60



## 4. RESULTADOS/RESULTS

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

organisms (Messina et al. 2012), produced by the bacterium *Streptomyces griseus* (data not shown).

Additionally, in order to assess if an intrinsic pathway of apoptosis was implicated in the decrease of cell viability induced by TNF $\alpha$ , we determined the intracellular ROS generation. For this, HL-60 and K-562 cells were treated with 10 ng/mL TNF $\alpha$  and intracellular ROS production was determined. In both cell lines, intracellular ROS production induced by TNF $\alpha$  was significantly higher than control cells since 3 hours of treatment (Figure 2). Our results also show that treatment of both cell lines with 10 ng/mL TNF $\alpha$  increase in a time dependent manner the intracellular ROS generation, as detected by the increase in DHR-123 fluorescence (Figure 2A and 2B).

To examine the effect of TNF $\alpha$  on caspase activation, cells were again treated with 10 ng/mL of TNF $\alpha$  for different periods of time (0-24 hours), and the enzymatic activity of caspase-8, -3 and -9 were determined. Our results show that the administration of 10 ng/mL TNF $\alpha$  produces a time-dependent increase of the caspase-8 activity, in both HL-60 and K-562 cells (Figure 3). However, the pretreatment of HL-60 and K-562 cells with two well-known antioxidant agents, such as trolox (100  $\mu$ M, 30 min) and N-acetyl cysteine (NAC) (1 mM, 1 hour) reduced significantly the caspase-8 activity induced by TNF $\alpha$  during the whole experiment in HL-60 cells (Figure 3A), while in the cell line K-562 (Figure 3B) this inhibitory effect of trolox and NAC was only seen after 6 h of stimulation with TNF $\alpha$ .

Additionally, our results also show that TNF $\alpha$  was able to increase the caspase-3 activity in HL-60 (Figure 4A) and K-562 cells (Figure 4B). The effect of treatments with 10 ng/mL of TNF $\alpha$  on caspase-3 activity in HL-60 was time-dependent, reaching a maximal caspase activity after 24 hours of stimulation ( $2.15 \pm 0.31$  fold-increase;  $P < 0.05$ , Figure 4A). In addition, either pretreatments of HL-60 cells with 100  $\mu$ M trolox for 30 minutes or 1 mM NAC for 1 hour, were able to significantly reduce TNF $\alpha$ -induced caspase-3 activity (Figure 4A). In the case of K-562 cells, the stimulatory effect on caspase-3 activation evoked by TNF $\alpha$  was slower, showing a significant increase in caspase-3 activation after 6 hours of TNF $\alpha$  treatment (Figure 4B). Similarly, when K-562 cells were pretreated with both antioxidants, trolox (100  $\mu$ M, 30 min) and NAC (1



## 4.RESULTADOS/RESULTS

1 mM, 1 hour), the caspase-3 activity was reduced after 6-24 h after treatment with TNF $\alpha$  (Figure 4B).

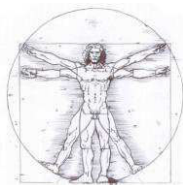
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Finally, caspase-9 is an initiator caspase that is involved in the initial steps of mitochondrial apoptosis (Bejarano et al. 2009). To investigate whether the activation of caspase-3 by TNF $\alpha$  is a mitochondrial apoptosis, we checked the caspase-9 activity in the presence of TNF $\alpha$ . As shown in Figure 5, treatment of HL-60 and K-562 cells with 10 ng/mL of TNF $\alpha$  induced a time-dependent increase of caspase-9 activity, reaching a maximal caspase activity after 24 hours of stimulation ( $1.82 \pm 0.54$  and  $1.75 \pm 0.58$  fold increase in HL-60 and K-562 cells, respectively,  $P < 0.05$ ). Consistent with the results presented above, when both cell lines were loaded with 100  $\mu$ M trolox for 30 minutes, TNF $\alpha$ -induced caspase-9 activity were significantly reduced at the 12 and 24 hours of TNF $\alpha$  treatments. Similar results were obtained when both cell lines were pretreated for 1 hour with 1 mM NAC (Figure 5).

Taken together, these findings strongly suggest that apoptosis mediated by TNF $\alpha$  is dependent of ROS generation in both myeloid cell lines like HL-60 and K-562.

### DISCUSSION

Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) produced by activated macrophages is a cytokine that influences growth, differentiation, and apoptosis processes in most cell types (Goeddel et al. 1986) and plays important roles in virus inactivation responses and inflammation. In a process that is still not well characterized, complex I internalizes and converts into a caspase-8 activating, death inducing complex, complex II, with additional recruitment of FADD and procaspase-8 (Micheau and Tschopp, 2003). The activity of complex II is normally inhibited by c-FLIP, a protease dead caspase-8 homolog that competes for caspase-8 binding to FADD (Imler et al. 1997). Some other investigators have observed caspase-8 activation with different protein inhibitors (Chang et al. 2006; Kreuz et al. 2001; Micheau et al. 2001), and even serum-deprived conditions (Gallardo et al.



## 4. RESULTADOS/RESULTS

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

2003) although the mechanism of the last one remains unclear.

Here, we report that the treatment of two human myeloid cell lines, such as HL-60 and K-562, with TNF $\alpha$  induced apoptosis in absence of CHX. Similar results have been assessed in these cell line and others with different concentrations of CHX and even in absence of CHX (Siripin et al. 2011), including U937 cell lines with a higher concentration of TNF $\alpha$  (20 ng/mL TNF $\alpha$ ) (Kim et al. 2010).

Secondly, our results also show that treatment of human myeloid cell lines HL-60 and K-562 with TNF $\alpha$  induced an increase in intracellular ROS generation. In addition, trolox and N-acetyl cysteine loadings prevent TNF $\alpha$ -evoked ROS production. Similar results have been shown previously by other authors using murine hepatocytes and cultured human umbilical vein EC (HUVEC), where several concentrations of TNF $\alpha$  induced ROS production (Ding and Yin 2004; Sakon et al. 2003). This stimulatory effect of TNF $\alpha$  on ROS production was followed by time-dependent stimulation of caspase-3 (a key downstream effector of apoptosis) and initiator caspases -8 and -9 activities. These results are similar than other ones previously obtained in our research group, in U937 cells (in preparation), and in other groups where 10 ng/mL TNF $\alpha$  induced caspase activation (Corda et al. 2001; Ding et al. 2004).

An increase in intracellular ROS production has been reported as a candidate to trigger the initiation of apoptotic events (Castedo et al. 1996; Jacobson et al. 1994). Our findings indicate that the caspase-3 activation caused by the activation of caspase-8 pathway is probably due to an increase in intracellular ROS generation, and subsequent releasing of intramitochondrial apoptosis promoting factors. We provide compelling evidences supporting that caspase-8 activation, induces ROS generation (as detected by the increase of DHR-123 fluorescence) and caspase-9 and -3 activation. Our results also show that the presence of antioxidants such as trolox and NAC were able to decrease caspase activation mediated by TNF $\alpha$ , which was able to promote caspase-8 activation. These observations are in agreement with previous studies showing that TNF $\alpha$  can act as regulator not only of extrinsic pathway of apoptosis but intrinsic pathway too in hepatocytes



## 4.RESULTADOS/RESULTS

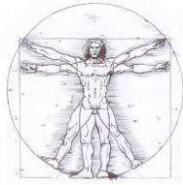
1 (Wullaert et al. 2006; Zhao et al. 2003). Our results are in agreement with previous studies obtained  
2  
3  
4 by Ding and Yin (Ding and Yin 2004), whose data confirmed that trolox is a potent inhibitor of  
5  
6 ROS generation in hepatocytes.  
7

8 As we mentioned, TNF-alpha can trigger not only cell death but cell survival pathway too.  
9  
10 It is well known that TNF-alpha alone does not induce cell death in most cell lines or even apply  
11  
12 TNF-alpha alone in vivo to mice, because TNF-alpha induces NF-kB pathway rather rapidly which  
13  
14 blocks the cell death pathway. The findings that TNF-alpha alone induced cell death in both HL60  
15  
16 and K562 cells are surprising and interesting. Thus, further investigation to elucidate whether NF-  
17  
18 kB pathway is impaired in these two cell lines after TNF-alpha treatment will be carried out.  
19  
20

21 In the present investigation we concluded that the tumor necrosis factor, TNF $\alpha$ , produces an  
22  
23 intracellular ROS generation in humans promyelocytic leukemia and erythroleukemia cell lines HL-  
24  
25 60 and K562, respectively. This intracellular ROS production leads to caspase activation and,  
26  
27 finally, cell death.  
28  
29

### 30 31 32 ACKNOWLEDGEMENTS

33  
34 This work was supported by MICINN-FEDER (BFU 2010-15049).  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



## 4. RESULTADOS/RESULTS

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### REFERENCES

Ashkenazi A, Dixit VM (1999) Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 11: 255–260

Bejarano I, Espino J, Marchena AM, Barriga C, Paredes SD, Rodríguez AB, Pariente JA (2011) Melatonin enhances hydrogen peroxide-induced apoptosis in human promyelocytic leukaemia HL-60 cells. *Mol Cell Biochem* 353: 167-176

Bejarano I, Lozano GM, Ortiz A, Garcia JF, Paredes SD, Rodríguez AB, Pariente JA (2008) Caspase 3 activation in human spermatozoa in response to hydrogen peroxide and progesterone. *Fertil Steril* 90:1340-7

Bejarano I, Redondo PC, Espino J, Rosado JA, Paredes SD, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA, Rodríguez AB (2009) Melatonin induces mitochondrial-mediated apoptosis in human myeloid HL-60 cells. *J Pineal Res* 46:392–400

Boatright KM, Salvesen GS (2003) Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 15: 725–731

Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS (2004) Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 287:817-833

Castedo M, Hirsch T, Susin SA, Zamzami N, Marchetti P, Macho A, Kroemer G (1996) Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during lymphocyte apoptosis. *J Immunol* 157: 512-521



## 4.RESULTADOS/RESULTS

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Chang L, Kamata H, Solinas G, Luo JL, Maeda S, Venuprasad K, Liu YC, Karin M (2006) The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNF $\alpha$ -induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell* 124: 601–613

Corda S, Laplace C, Vicaut E, Duranteau J (2001) Rapid reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to tumor necrosis factor- $\alpha$  is mediated by ceramide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24: 762–768

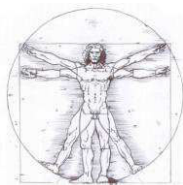
Ding WX, Ni HM, DiFrancesca D, Stolz DB, Yin XM (2004) Bid-dependent generation of oxygen radicals promotes death receptor activation-induced apoptosis in murine hepatocytes. *Hepatology* 40: 403–413

Ding WX, Yin XM (2004) Dissection of the multiple mechanisms of TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in liver injury. *J Cell Mol Med* 8: 445–454

Espino J, Bejarano I, Paredes SD, Barriga C, Rodríguez AB, Pariente JA (2011) Protective effect of melatonin against human leukocyte apoptosis induced by intracellular calcium overload: relation with its antioxidant actions. *J Pineal Res* 51: 195–206

Fadeel B, Orrenius S (2005) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med* 258: 479–517

Gallardo G, López-Blanco F, Ruiz de Galarreta CM, Fanjul LF (2003) HMGCoA reductase inhibition partially mediates tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced apoptosis in human U-937 and HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 300: 397–402



## 4. RESULTADOS/RESULTS

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Goeddel DV, Aggarwal BB, Gray PW, Leung DW, Nedwin GE, Palladino MA, Patton JS, Pennica D, Shepard HM, Sugarman BJ, Wong GHW (1986) Tumor necrosis factors: gene structure and biological activities. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51: 597–609

González, D., Espino, J., Bejarano, I., Rodríguez, A. B., Pariente, J.A. (2010) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced caspase activation is dependent of calcium signal in HL-60 cells. *Curr Signal Transd T* 5 (2): 181-186

Han D, Hanawa N, Saberi B, and Kaplowitz N (2006a) Hydrogen peroxide and redox modulation sensitize primary mouse hepatocytes to TNF-induced apoptosis. *Free Radic Biol Med* 41: 627–639

Han D, Hanawa N, Saberi B, and Kaplowitz N (2006b) Mechanisms of liver injury, III: role of glutathione redox status in liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291: G1–G7

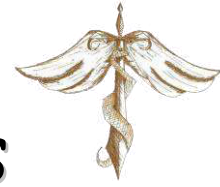
Han D, Ybanez MD, Ahmadi S, Yeh K, Kaplowitz N (2009) Redox regulation of tumor necrosis factor signaling. *Antioxid Redox Signaling* 11(9):2245-63

Irmiler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter, M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388: 190–195

Jacobson MD, Burne JF Raff MC (1994) Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO J* 13: 1899-1910

Kaplowitz N (2002) Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury. *Semin Liver Dis* 22: 137–144





## 4.RESULTADOS/RESULTS

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Kim S, Ohoka N, Okuhira K, Sai K, Nishimaki-Mogami T, Naito M (2010) Modulation of RIP1 ubiquitylation and distribution by MeBS to sensitize cancer cells to tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced apoptosis. *Cancer Sci.* 101(11):2425-9

Kreuz S, Siegmund D, Scheurich P, and Wajant H (2001) NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol* 21: 3964–3973

Lopez JJ, Salido GM, Gómez-Arteta E, Rosado JA, Pariente JA (2007). Thrombin induces apoptotic events through the generation of reactive oxygen species in human platelets. *J Thromb Haemost* 5:1283-91

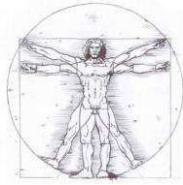
Lozzio CB, Lozzio BB (1975) Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood.* 45 (3): 321-34

Messina S, Frati L and Porcellini A (2012) Oxidative Stress Posttranslationally Regulates the Expression of Ha-Ras and Ki-Ras in Cultured Astrocytes. *Oxid Med Cell Longev* Volume 2012 (2012), doi:10.1155/2012/792705

Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K, Tschopp J (2001) NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol* 21: 5299–5305

Micheau O, Tschopp J (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114: 181–190

Sakon S, Xue X, Takekawa M, Sasazuki T, Okazaki T, Kojima Y, Piao JH, Yagita H, Okumura K, Doi T, Nakano H (2003) NF-kappaB inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate



## 4. RESULTADOS/RESULTS

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *EMBO J* 22: 3898–3909

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 17: 1675–1687

Shen HM and Pervaiz S (2006) TNF receptor superfamily induced cell death: redox-dependent execution. *FASEB J* 20: 1589–1598

Siripin D, Fucharoen S, Tanyong DI (2011) Nitric oxide and caspase 3 mediated cytokine induced apoptosis in acute leukemia. *Asian Pac J Allergy Immunol* 29(1):102-11

Suzuki, Forman HJ, Sevanian A (1997) Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med* 22:269-285

Tan S, Sagara Y, Liu Y, Maher P, Schubert D (1998) The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J Cell Biol* 141:1423-1432

Uğuz AC, Naziroğlu M, Espino J, Bejarano I, González D, Rodríguez AB, Pariente JA (2009) Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and caspase-3 and -9 activities. *J Membr Biol*. 232(1-3): 15-23

Wajant H, Pzenmaier K, Scheurich P (2003) Tumor necrosis factor signalling. *Cell Death Differ* 10: 45–65

Wullaert A, Heyninck K, Beyaert R (2006) Mechanisms of crosstalk between TNF-induced NF- $\kappa$ B and JNK activation in hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 72: 1090–1101



## 4.RESULTADOS/RESULTS

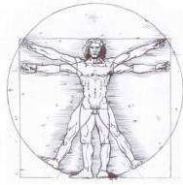
---

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Yao K, Tan J, Gu W, Ye PP, Wang KJ (2007) Reactive oxygen species mediates the apoptosis by transforming growth factor beta(2) in human lens epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 354:278-283

Zhao Y, Ding WX, Qian T, Watkins S, Lemasters JJ, Yin XM (2003) Bid activates multiple mitochondrial apoptotic mechanisms in primary hepatocytes after death receptor engagement. *Gastroenterology* 125: 854–867

For Peer Review



## 4. RESULTADOS/RESULTS

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### Figure captions

Figure 1: Effect of TNF $\alpha$  on cell viability. HL-60 (A) and K-562 (B) cells were treated with 10 ng/mL TNF $\alpha$  for different periods of time (0-48 hours) and after cell viability was determined as indicated in Materials and Methods section. ( $N = 12$ ). \* $p < 0.05$  compared with untreated cells at the same time.

Figure 2: Effects of TNF $\alpha$  on intracellular ROS generation. HL-60 (A) or K-562 (B) cells were stained with dihydrorhodamine 123 (DHR-123) and then cells were incubated in the presence of 10 ng/mL TNF $\alpha$  for different periods of time (3-24 h) and intracellular ROS generation was measured as described in Material and Methods section. The results are presented as fold-increase above the control value (experimental/control). ( $N = 6$ ). \* $p < 0.05$  compared with control.

Figure 3: Effects of TNF $\alpha$  on caspase-8 activity. HL-60 (A) or K-562 (B) cells were preincubated with 100  $\mu$ M Trolox for 30 minutes or 1 mM N-acetyl cysteine (NAC) for 1 hour and then were treated with 10 ng/mL TNF $\alpha$  for 3-24 hours. Caspase-8 activity was measured as indicated in Material and Methods. Results are presented as fold increase above the control value. (experimental/control) ( $N = 6$ ). \* $p < 0.05$  compared with control. # $p < 0.05$  compared with treated cells with TNF $\alpha$  alone.

Figure 4: Effects of TNF $\alpha$  on caspase-3 activity. HL-60 (A) or K-562 (B) cells were preincubated with 100  $\mu$ M Trolox for 30 minutes or 1 mM N-acetyl cysteine (NAC) for 1 hour and then were treated with 10 ng/mL TNF $\alpha$  for 3-24 hours. Caspase-3 activity was measured as indicated in Material and Methods. Results are presented as fold increase above the control value (experimental/control). ( $N = 8$ ). \* $p < 0.05$  compared with control. # $p < 0.05$  compared with cells treated with TNF $\alpha$  alone.



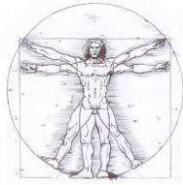
## 4.RESULTADOS/RESULTS

---

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Figure 5: Effects of TNF $\alpha$  on caspase-9 activity. HL-60 (A) or K-562 (B) cells were preincubated with 100  $\mu$ M Trolox for 30 minutes or 1 mM N-acetyl cysteine (NAC) for 1 hour and then were treated with 10 ng/mL TNF $\alpha$  for 3-24 hours. Caspase-9 activity was measured as indicated in Material and Methods. Results are presented as fold increase above the control value. (experimental/control) ( $N = 4$ ). \* $p < 0.05$  compared with control. # $p < 0.05$  compared with treated cells with TNF $\alpha$  alone.

For Peer Review



# 4. RESULTADOS/RESULTS

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

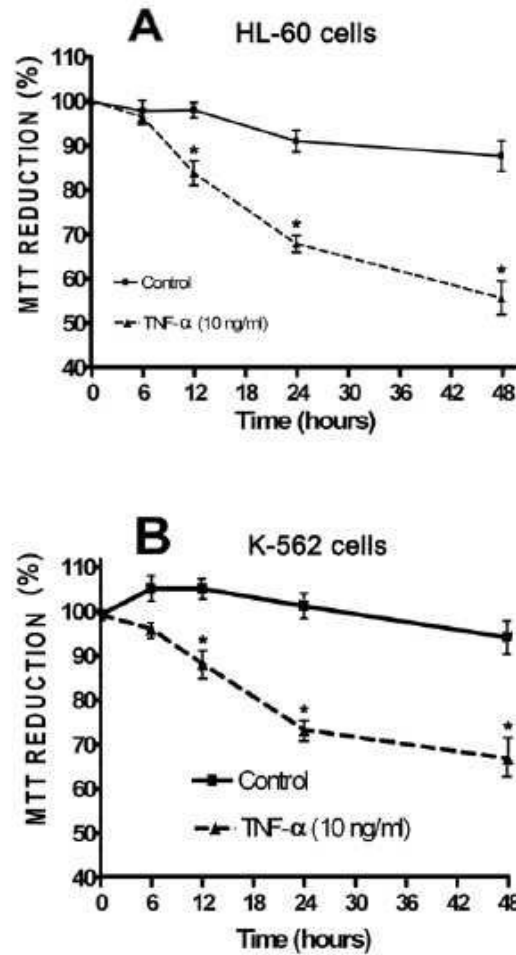


Figure 1: Effect of TNF $\alpha$  on cell viability. HL-60 (A) and K-562 (B) cells were treated with 10 ng/mL TNF $\alpha$  for different periods of time (0-48 hours) and after cell viability was determined as indicated in Materials and Methods section. (N = 12). \*p < 0.05 compared with untreated cells at the same time.

193x337mm (72 x 72 DPI)



# 4.RESULTADOS/RESULTS

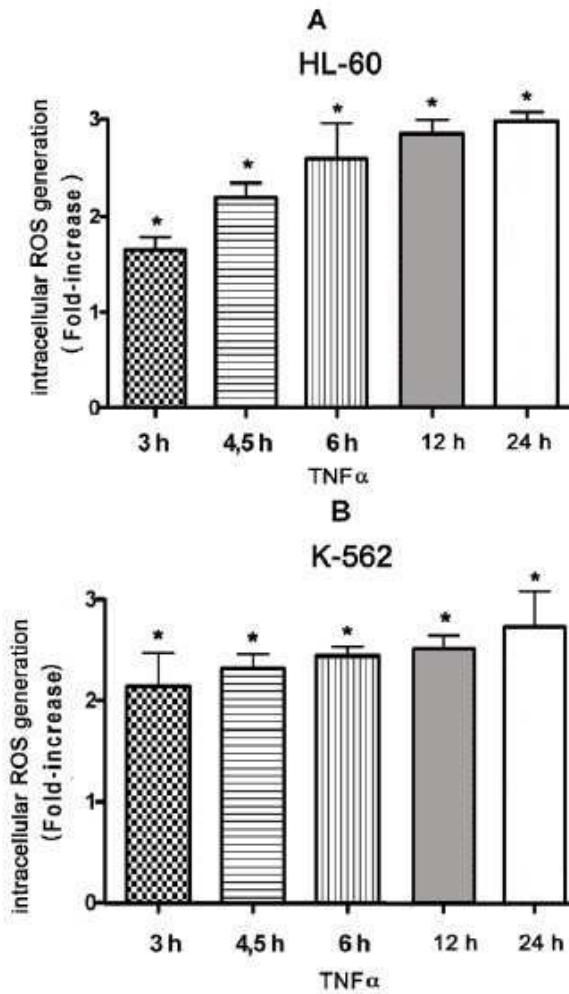
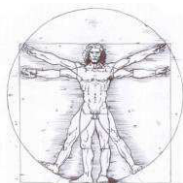


Figure 2: Effects of TNF $\alpha$  on intracellular ROS generation. HL-60 (A) or K-562 (B) cells were stained with dihydrorhodamine 123 (DHR-123) and then cells were incubated in the presence of 10 ng/mL TNF $\alpha$  for different periods of time (3-24 h) and intracellular ROS generation was measured as described in Material and Methods section. The results are presented as fold-increase above the control value (experimental/control). (N = 6). \* $p < 0.05$  compared with control.

200x284mm (72 x 72 DPI)



## 4. RESULTADOS/RESULTS

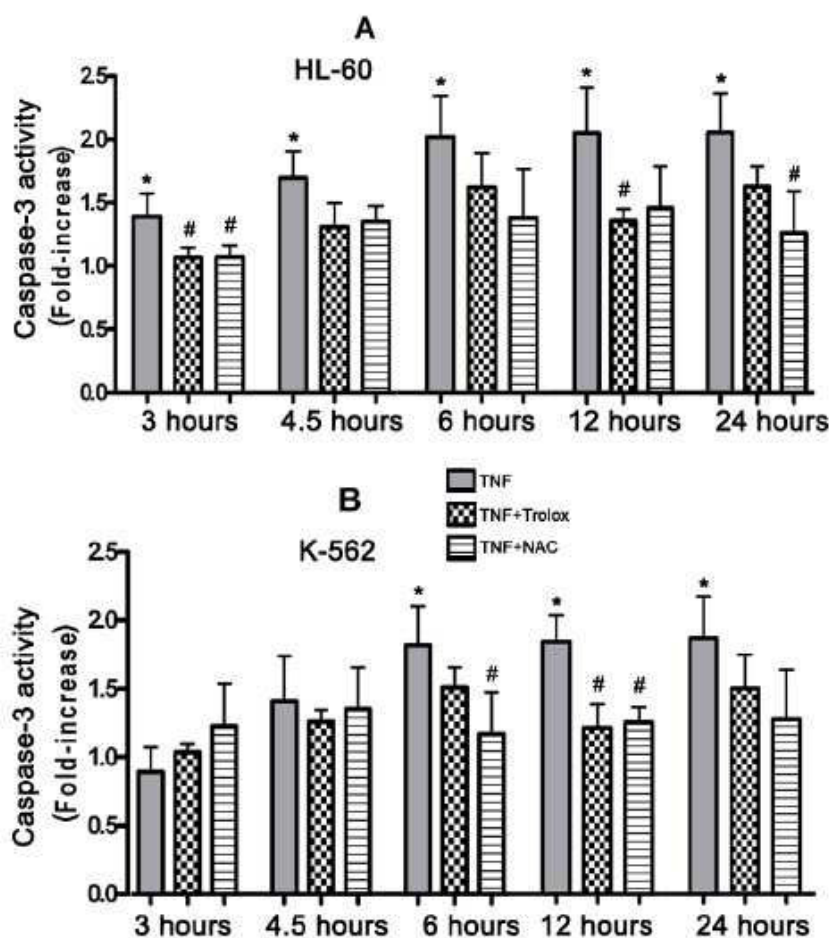
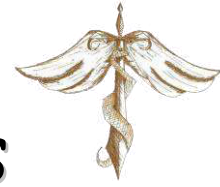


Figure 4: Effects of TNF $\alpha$  on caspase-3 activity. HL-60 (A) or K-562 (B) cells were preincubated with 100  $\mu$ M Trolox for 30 minutes or 1 mM N-acetyl cysteine (NAC) for 1 hour and then were treated with 10 ng/mL TNF $\alpha$  for 3-24 hours. Caspase-3 activity was measured as indicated in Material and Methods. Results are presented as fold increase above the control value (experimental/control). ( $N = 8$ ). \* $p < 0.05$  compared with control. # $p < 0.05$  compared with cells treated with TNF $\alpha$  alone.

255x294mm (72 x 72 DPI)





# 4.RESULTADOS/RESULTS

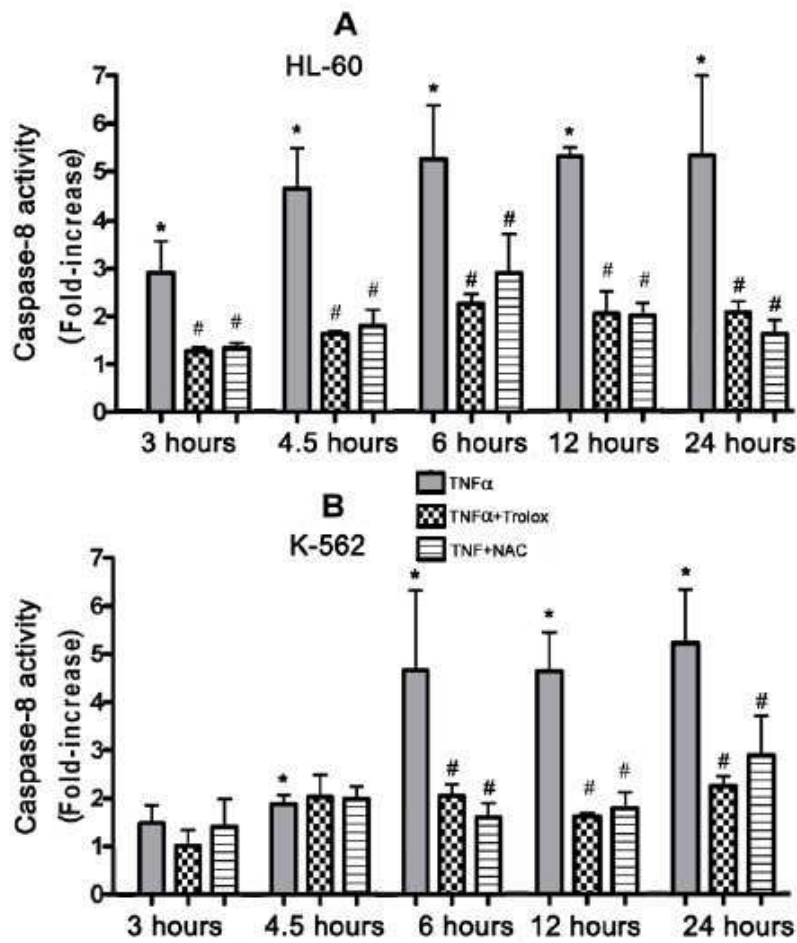
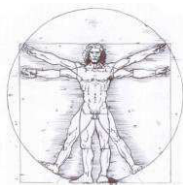


Figure 3: Effects of TNF $\alpha$  on caspase-8 activity. HL-60 (A) or K-562 (B) cells were preincubated with 100  $\mu$ M Trolox for 30 minutes or 1 mM N-acetyl cysteine (NAC) for 1 hour and then were treated with 10 ng/mL TNF $\alpha$  for 3-24 hours. Caspase-8 activity was measured as indicated in Material and Methods. Results are presented as fold increase above the control value, (experimental/control) ( $N = 6$ ). \* $p < 0.05$  compared with control. # $p < 0.05$  compared with treated cells with TNF $\alpha$  alone.

255x299mm (72 x 72 DPI)



## 4. RESULTADOS/RESULTS

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

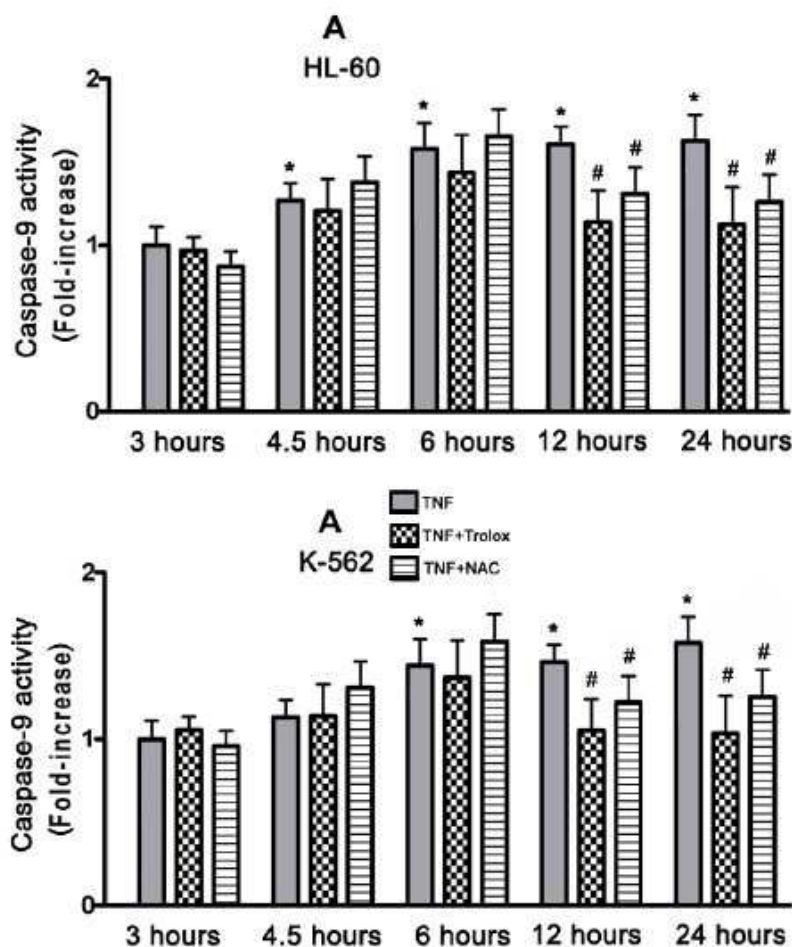


Figure 5: Effects of TNF $\alpha$  on caspase-9 activity. HL-60 (A) or K-562 (B) cells were preincubated with 100  $\mu$ M Trolox for 30 minutes or 1 mM N-acetyl cysteine (NAC) for 1 hour and then were treated with 10 ng/mL TNF $\alpha$  for 3-24 hours. Caspase-9 activity was measured as indicated in Material and Methods. Results are presented as fold increase above the control value. (experimental/control) ( $N = 4$ ). \* $p < 0.05$  compared with control. # $p < 0.05$  compared with treated cells with TNF $\alpha$  alone.

***4.4. La apoptosis inducida por TNF $\alpha$  en una línea celular de linfoma histiocítico humano es dependiente de la generación de ROS y la señalización de calcio.***





## 4.RESULTADOS/RESULTS

---

# TNF $\alpha$ -induced apoptosis in human histiocytic lymphoma cell line is dependent of ROS generation and calcium signaling

González-Flores, D.<sup>1</sup>, De Nicola, M.<sup>2</sup>, Bruni, E.<sup>2</sup>, Caputo, F.<sup>2</sup>, Rodríguez, A.B.<sup>1</sup>, Ghibelli, L.<sup>2</sup>, Pariente, J.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology, Neuroimmunophysiology and Chrononutrition Research Group, Faculty of Science, University of Extremadura, 06006 Badajoz, Spain.

<sup>2</sup>Dipartimento di Biologia, Università di Tor Vergata, Via della Ricerca Scientifica, 00133, Rome, Italy.

**In preparation**

**Running title:** TNF  $\alpha$  -induced apoptosis

**Keywords:** TNF-  $\alpha$  , apoptosis, calcium, antioxidants, nanoparticles, U937 cells

To whom correspondence should be addressed:

Prof. J. A. Pariente

Department of Physiology

Faculty of Science

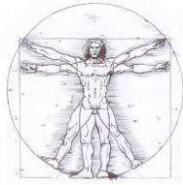
University of Extremadura

06071 Badajoz, SPAIN.

Tel: +34 924289300 ext. 86956

Fax: +34 924289388

E-mail: pariente@unex.es



## 4. RESULTADOS/RESULTS

---

### ABSTRACT

The present study is aimed to determine the role of reactive oxygen species (ROS) production and calcium signaling evoked by the tumor necrosis factor-alpha ( $\text{TNF}\alpha$ ) in combination with cycloheximide (CHX) on apoptosis in the human histiocytic lymphoma cell line U937. Our results show that treatment of U937 cells with 10 ng/mL  $\text{TNF}\alpha$  in combination with 1  $\mu$ g/mL CHX led to several  $\text{Ca}^{2+}$  alterations. These stimulatory effects on calcium signals were followed by intracellular ROS production and mitochondria membrane depolarization, as well as a time-dependent increase in caspase-8 and -9 activities. Our results also show that the pretreatment with well known antioxidants such as trolox and N-acetyl cysteine (NAC) partially reduced the apoptotic effects due to the administration of  $\text{TNF}\alpha$  plus cycloheximide. Furthermore, a novel nanoparticle with antioxidant properties, nanoceria, had a stronger protective effect than trolox or NAC. Our findings suggest that  $\text{TNF}\alpha$  plus cycloheximide-induced apoptosis is dependent on alterations in cytosolic concentration of calcium  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  and ROS generation in human histiocytic U937 cells.



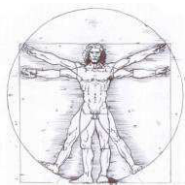
## 4.RESULTADOS/RESULTS

---

### INTRODUCTION

Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) is a cytokine produced mainly by activated macrophages, and in minor quantities by several other types of cells. It is capable of inducing different biological responses and it plays a role in inflammation, stress response and apoptosis, where it can induce both pro- and anti-apoptotic signaling. TNF  $\alpha$  binds to two cell-surface receptors, TNF-R1 and TNF-R2, which in turn oligomerize and bind the adaptor protein TNF receptor-associated death domain (TRADD), which recruits additional adaptor proteins: receptor-interacting protein (RIP), TNF-R-associated factor 2 (TRAF2) and Fas-associated death domain (FADD). In the apoptotic pathway this complex recruits caspase-8 molecules, which bind to FADD [1,2] and are activated in the complex by dimerization, due to their high local concentration [3]. Active caspase-8 then activates the effector caspases, primarily through the cleavage of the Bcl-2 family member Bid and the subsequent activation of the mitochondrial pathway, which serves as an amplifier of the signal [4,5].

On the other hand, calcium is a key regulator of cell survival since the cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ) is an important regulatory factor for a large number of cellular processes such as muscle contraction, metabolism, secretion, cell differentiation and apoptosis.  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  is maintained at about 80-100 nM, a very low level relative to the extracellular fluid ( $[\text{Ca}^{2+}]_o \approx 1.2$  mM). The major mechanism to lower  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  is  $\text{Ca}^{2+}$  extrusion mediated by the plasma membrane and endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  pumps and by the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchangers.  $[\text{Ca}^{2+}]$  in the nuclear matrix ( $[\text{Ca}^{2+}]_n$ ) and in the mitochondrial matrix ( $[\text{Ca}^{2+}]_m$ ) is similar to  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . However, other intracellular organelles maintain a large  $\text{Ca}^{2+}$  concentration gradient versus the cytoplasm. The most important  $\text{Ca}^{2+}$  storage compartment is the sarco-endoplasmic reticulum (ER/SR) in most cells. Additionally, sarco-endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) pumps  $\text{Ca}^{2+}$  into the lumen of ER/SR. The ER/SR provides a compartment from which  $\text{Ca}^{2+}$  can be mobilized to increase  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . However, prolonged changes in  $\text{Ca}^{2+}$  distribution including an elevation in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]_m$ , and  $[\text{Ca}^{2+}]_n$  and a decrease in  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  trigger a variety of cascades that lead to cell death [6]. On the other hand, mitochondria, in addition



## 4. RESULTADOS/RESULTS

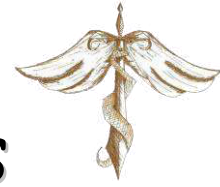
---

to participate in  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, are the major source of reactive oxygen species (ROS) in the cell. Superoxide ( $\text{O}_2^-$ ) is generated by the operation of complexes I and III in the matrix and is converted to hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) by Mn-superoxide dismutase. Apoptosis can be stimulated by ROS in several cell types [7-10]. Recently, it has been reported that ROS can mediate the apoptosis induced by either growth factors, such as transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) in human lens epithelial cells [11], or classical agonists, such as thrombin in human platelets [12] or progesterone in human spermatozoa [13].

Antioxidant therapy is the novel frontier and treat an impressive series of severe human diseases, and the search for adequate antioxidant drugs is fervent. Cerium oxide nanoparticles (nanoceria) are a nanoparticle which is well-tolerated by the organism [14], has anti-inflammatory properties [15], and are neuro- [16] and cardioprotective due to their antioxidant properties [17]. At the cellular level, it generally exerts pro-survival and anti-radical effect [18, 19]. This anti-apoptotic effect only affects the redox-dependent apoptosis and correlates with the amount of  $\text{Ce}^{3+}$  ions and not with oxygen vacancies. Recently, it has been demonstrated that  $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$  redox reactions are responsible for the outstanding biological properties of nanoceria [20]. The cell antioxidant effects of nanoceria may be explained by its antioxidant capability reported in abiotic experiments. In some cell/particle experimental systems, the Fenton effect described in vitro for nanoceria [21] may occur and overrule the nanoceria antioxidant effect [22]. However, the antioxidant effect of nanoceria on TNF-mediated apoptosis is still poorly studied.

Here, we try to elucidate the role of intracellular calcium as well as intracellular ROS generation in TNF $\alpha$ -induced apoptosis in human histiocytic lymphoma cell line U937.





## 4.RESULTADOS/RESULTS

---

### MATERIALS AND METHODS

#### Material

Cycloheximide (CHX), puromycin (PMC), thapsigargin, ethylene glycol-bis(beta-aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-tetraacetate (EGTA) and TNF  $\alpha$  were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA); Hoechst 33342, ionomycin were purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA); fetal calf serum (FCS), L-glutamine, penicillin, streptomycin and RPMI 1640 were from Lonza.

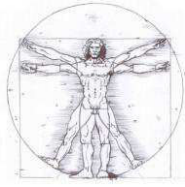
#### Cell culture

U937 are human tumour monocytes stabilized from a histiocytic lymphoma [23]. Cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), and routinely checked for absence of mycoplasma by using a mycoplasma detection kit (Myco-alert TM, Cambrex Bio Science, Milano, Italy). The experiments were performed on cells in the logarithmic phase of growth under condition of  $\geq 98\%$  viability, as assessed by trypan blue exclusion.

#### Evaluation of apoptosis

Apoptosis was quantified as previously described [24]. Briefly, cells were stained with 10  $\mu$ g/mL Hoechst 33342 for 20 minutes. Cells with nuclear apoptotic morphology, detected using a fluorescence microscope were counted (at least 100 cells in at least three independent fields) and the fraction of apoptotic cells among total cells was evaluated.

The typical round morphology of a health cell and the apoptotic nuclear vesiculation, indicating the presence of apoptotic cells, may be assessed. The two main interphase morphologies, budding and cleavage, are distinguishable for the nuclear membrane structure and the peculiar shape of chromatin clumps condensing at the borders, being either a protruding, budding mass in the budding cells, or a



## 4. RESULTADOS/RESULTS

---

nonprotruding crescent in cells in cleavage. Nuclear vesiculation is then completed with separation of the vesicles, by budding or by invagination and sealing of the inner and outer nuclear membrane, respectively, to reach the final fragmented morphology. Budding nuclei have protruding chromatin masses, whereas nuclei in cleavage have chromatin condensed increscent shapes. Budding and cleavage decline at later times to give rise to the final fragmented nuclei [25].

### Intracellular calcium determination

$1 \cdot 10^7$ /ml cells were washed twice in Hank's balanced salt solution (HBSS) + 1 mg/ml Glucose + 650 mM  $\text{CaCl}_2$  and loaded with 1mM Fluo4-AM in the dark at 20 °C for 40 min. After dye removal, cells were resuspended in HBSS + 1 mg/ml Glucose + 650 mM  $\text{CaCl}_2$  at the concentration of  $2 \cdot 10^6$ /ml for 20 min. Then, analyses were performed by flow cytometry using FACSCalibur flow cytometer and data were analyzed with WinMdi 2.9 software and calibrated according to [26].

### Intracellular ROS determination

Intracellular ROS were determined with two different dyes: 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H2DCFDA) and dihydrorhodamine 123 (DHR) [27]. Cells were loaded with 10  $\mu$  M H2DCFDA, by incubation at 37°C in the dark for 20 min. This probe is a non-fluorescent cell-permeable compound; once inside the cell, it is deesterified and turns fluorescent upon oxidation, fluorescence being proportional to ROS production. Intracellular ROS generation was also measured by incubation of cells with 1  $\mu$  M (DHR) for 20 minutes. After loading, cells were then washed two or three times in PBS and analyses were performed by flow cytometry using FACSCalibur flow cytometer and data were analyzed with WinMdi 2.9 software.



## 4.RESULTADOS/RESULTS

---

### Mitochondria membrane potential determination

Mitochondrial membrane potential was detected by staining of cells with 100 nM MitoTracker Red (MTR) for 20 minutes. Cells were then washed with PBS twice and subsequently assayed by flow cytometry using FACSCalibur flow cytometer and data were analyzed with WinMdi 2.9 software.

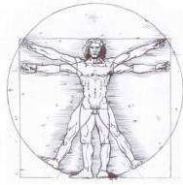
### Statistical analysis

Statistical analysis were performed using Wilcoxon's test between groups, and Friedman's test when comparisons of different times of the same treatment were considered. P values < 0.05 were considered significant. Data are presented as mean  $\pm$  S.E.M.

## RESULTS

Typically, the TNF  $\alpha$  -induced apoptosis needs the presence of cycloheximide (CHX), an inhibitor of protein biosynthesis in eukaryotic organisms, produced by the bacterium *Streptomyces griseus*. For assessing it, we induced apoptosis incubating the U937 cells at 37°C with 10 ng/mL TNF  $\alpha$  in combination with 1  $\mu$  g/mL CHX. After 3 hours of treatment, it was possible to see morfological differences between treated and non-treated cells (Figure 1A and 1B). The maximal apoptosis percentage in cells treated with TNF  $\alpha$  + CHX reached  $56.34 \pm 7.05\%$  (Figure 1C) after 4 hours of treatment, which was significantly higher than non-treated cells ( $7.52 \pm 1.90\%$ ). However, there were no significative differences between control cells and cells which were treated for 3.5 hours either with 1  $\mu$  g/mL CHX ( $5.50 \pm 1.00\%$ ) or 10 ng/mL TNF  $\alpha$  alone ( $8.00 \pm 1.00\%$ ).

Furthermore, we tried to investigate if TNF  $\alpha$  -apoptosis depends on the specific interaction TNF  $\alpha$  -CHX, or if any protein inhibitor could make the same effects. For this, we treated U937 cells with 10 ng/mL TNF  $\alpha$  in combination with 1  $\mu$  g/mL



## 4. RESULTADOS/RESULTS

---

puromycin (PMC), an inhibitor which is a protein synthesis inhibitor by inhibiting translation. It is previously contrasted that PMC trigger intrinsic pathway with higher concentrations ( $10 \mu\text{g/mL}$ ) [28], and directly or indirectly elicit oxidation reactions [23, 29]. After 4 hours of treatment, no significant differences were reported in apoptosis percentage produced by  $\text{TNF}\alpha + \text{CHX}$  ( $56.34 \pm 7.05\%$ ) and  $\text{TNF}\alpha + \text{PMC}$  ( $60.00 \pm 4.95\%$ ) (Fig. 1C).

It has been previously reported that alterations in  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, and particularly a prolonged and sustained elevation in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  initiate the mitochondrial apoptotic pathway [6, 30] and induce endoplasmic reticulum stress that, in turn, leads to apoptosis [31, 32]. As shown in Figure 2A, stimulation of Fluo4-loaded U937 cells with  $10 \text{ ng/mL TNF}\alpha$  plus  $1 \mu\text{g/mL CHX}$  induced a decrease in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  in U937 cells at 2,5 h and eventually an increase at 4,5 h. In addition, U937 cells were loaded with EGTA, or dimethyl BAPTA-AM, extracellular and cytosolic calcium chelators, respectively [33], by incubating at  $37^\circ\text{C}$  for 20 min with  $650 \mu\text{M EGTA}$  or for 30 min at  $37^\circ\text{C}$  with  $10 \mu\text{M dimethyl BAPTA}$ . As expected, these loadings diminished calcium signal in U937 cells. However, when the cells were preincubated with the water soluble derivative of vitamin E trolox ( $100 \mu\text{M}$ ) for 30 min, or  $200 \mu\text{g/mL nanoceria}$  for 40 min,  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  did not decrease, and even increased in the case of nanoceria.

We also investigated the relevance of the calcium homeostasis on  $\text{TNF-}\alpha$ -induced apoptosis by the pre-incubation of U937 cells with EGTA or dimethyl BAPTA-AM. The pretreatment with  $650 \mu\text{M EGTA}$  for 20 min significantly reduced the apoptosis induced by the administration of  $10 \text{ ng/mL TNF}\alpha$  plus  $1 \mu\text{g/mL CHX}$  (Fig. 3A) at all time tested by us. Similar results were obtained when cells were preincubated with  $10 \mu\text{M dimethyl BAPTA}$  for 30 minutes, but the effects were weaker than those caused by EGTA (Figure 3A).

Deregulated increase of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  may develop in cell stress and damage, and many sensors of  $\text{Ca}^{2+}$  alterations activate either cell-protective or pro-apoptotic responses [34]. Calpains are a set of  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive cysteine proteases activated by micromolar (micro-calpains) or millimolar (milli-calpains) cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  levels [35].

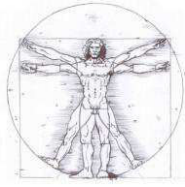


## 4.RESULTADOS/RESULTS

---

$\text{Ca}^{2+}$  alterations may elicit at least two pro-apoptotic signals via calpain activation, activating Bax by direct cleavage or through processing of Bid [36]. In order to elucidate the relevance of calpains, U937 cells were preincubated with 50  $\mu\text{g/mL}$  calpain inhibitor for 45 minutes and then were stimulated with 10  $\text{ng/mL}$   $\text{TNF}\alpha$  in combination with 1  $\mu\text{M}$  CHX. Calpain inhibitor was able to reduce significantly the apoptosis produced by  $\text{TNF}\alpha$  + CHX after 4 hours of treatment ( $37.31 \pm 3.36\%$  versus  $56.34 \pm 7.05\%$ , Figure 3B). Previously, we stated that 50  $\mu\text{g/mL}$  calpain inhibitor alone did not produced an increase in apoptosis compared with control (data not shown). Additionally, we induced a calcium stress in U937 cells using ionomycin (500 nM), an ionophore produced by the bacterium *Streptomyces conglobatus* and a well established activator of cPLA2 [37], in order to study the possible implication of calpains. Ionomycin produced  $27.00 \pm 12.73\%$  and  $41.00 \pm 1.00\%$  of apoptosis after 3 and 4 hours of treatment, respectively. As expected, the preincubation with 50  $\mu\text{g/mL}$  calpain inhibitor for 45 minutes inhibited the effect caused by ionomycin at all time tested by us (Figure 3B). Taken together, these results suggest that calpains participate in  $\text{TNF}\alpha$  + CHX-induced apoptosis.

Additionally, in order to study the possible role of ROS on  $\text{TNF}\alpha$ -induced apoptosis, the effect of two well-known antioxidant agents, such as trolox and N-acetyl cysteine (NAC), on  $\text{TNF}\alpha$  + CHX-induced apoptosis was evaluated. Consequently, U937 cells were preincubated with trolox (100  $\mu\text{M}$ ) for 30 min, or 1 mM NAC for 1 hour. Furthermore, we also preincubated 200  $\mu\text{g/mL}$  nanoceria for 40 min for assessing the effectiveness of this nanoparticle as antioxidant. As it is shown in Figure 4, trolox, NAC and nanoceria reduced the percentage of apoptosis after 2.5 hours of the treatment with 10  $\text{ng/mL}$   $\text{TNF}\alpha$  in addition to 1  $\mu\text{g/mL}$  CHX, suggesting that there is an implication of intracellular ROS generation in  $\text{TNF}\alpha$  + CHX-induced apoptosis. In order to assess if an intrinsic pathway of apoptosis was implicated, we determined the mitochondrial membrane potential as well as intracellular ROS generation. For this, U937 cells were again preincubated with 100  $\mu\text{M}$  trolox for 30 minutes, and then, apoptosis was induced by 10  $\text{ng/mL}$   $\text{TNF}\alpha$  in combination with 1  $\mu\text{g/mL}$  CHX. Our



## 4. RESULTADOS/RESULTS

---

results show that treatment of cells with 10 ng/mL TNF  $\alpha$  plus 1  $\mu$  g/mL CHX induced a mitochondrial depolarization compared to control cells, as determined by a decrease of MTR fluorescence intensity (Figure 5A). In addition, the flow cytometry studies showed that TNF  $\alpha$  + CHX treatment increased the intracellular ROS generation, determined by DHR and H2DCFDA (Fig. 5B and 5C). However, treatments of cells with trolox and nanoceria was able to revert significantly the mitochondrial depolarization and ROS generation induced by the co-treatment of cells with TNF  $\alpha$  and CHX (Fig. 5).

Finally, we checked if TNF  $\alpha$ -mediated apoptosis was a caspase-dependent process pre-incubating the cells with z-VAD (10  $\mu$  M, 1 h), a cell-permeant pan caspase inhibitor that irreversibly binds to the catalytic site of caspase proteases and can inhibit induction of apoptosis. The pre-incubation of U937 cells with z-VAD dramatically reduced percentage of apoptosis induced by 10 ng/mL TNF  $\alpha$  plus 1  $\mu$  g/mL CHX during the whole experiment (Fig. 6A). Alternatively, to examine the effect of TNF  $\alpha$  plus CHX on caspase-8 activation, U937 cells were pre-incubated with a caspase-8 inhibitor (10  $\mu$  M) for 1 h at 37 °C. The effect of treatment with this inhibitor was also able to significantly reduce TNF  $\alpha$ -induced apoptosis after 2 hours of treatment (Figure 6B). Caspase-9 is an initiator caspase that is involved in the initial steps of the mitochondrial apoptosis [38]. To investigate whether the apoptosis by TNF plus CHX is a mitochondrial process, we checked this pre-incubating with a caspase-9 inhibitor (10  $\mu$  M) for 1 h. As it is shown in Figure 6B, when cells were pre-incubated with caspase-9 inhibitor, apoptosis evoked by TNF  $\alpha$  plus CHX was again significantly reduced.

### DISCUSSION

Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) produced by activated macrophages is a cytokine that influences growth, differentiation, and apoptosis processes in most cell types [39] and plays important roles in virus inactivation responses and inflammation. In a process that is still not well characterized, complex I internalizes and converts



## 4.RESULTADOS/RESULTS

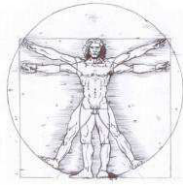
---

into a caspase-8 activating, death inducing complex, complex II, with additional recruitment of FADD and procaspase-8 [40]. The activity of complex II is normally inhibited by c-FLIP, a protease dead caspase-8 homolog that competes for caspase-8 binding to FADD [41]. The above-described results show that the caspase-8 activation pathway which is inhibited by c-FLIP can be turned on by the inhibition of protein synthesis not only with cycloheximide, but with puromycin too. Some other investigators have observed caspase-8 activation with different protein inhibitors [42-44], and even serum-deprived conditions [45] although the mechanism of the last one remains unclear.

Here, we report that the treatment of human histiocytic lymphoma cell line U937 with 10 ng/mL TNF  $\alpha$  in combination with 1  $\mu$  g/mL CHX induced apoptosis. Similar results have been assessed in this cell line with a higher concentration of TNF  $\alpha$  (20 ng/mL TNF  $\alpha$  in combination with 1  $\mu$  g/mL CHX) [46] as well as acute leukemia cell lines HL-60, MV4-11, K-562 and Molt-4 with different concentrations and even in absence of CHX [47].

Secondly, we assessed that the apoptosis induced by is partially dependent of  $[Ca^{2+}]_c$ . Our results agree with the work Cerella et al. ([48]), who had identified a set of sequential  $Ca^{2+}$  changes; two very early ones occurred prior to any other apoptotic alterations, whereas a late change coincided with the appearance of apoptosis. Interestingly, the two pre-apoptotic changes occurred simultaneously in all treated cells, i.e., at fixed times post-treatment, whereas the later one occurred at varying times, i.e., within a wide time range, concomitantly with the other apoptotic events. Once cells had reached the propensity to undergo apoptosis, they abandoned the pro-apoptotic stages in an apparently stochastic way, perhaps needing a further signal that transformed propensity into a molecular signal transduction of apoptosis.

In our work, the TNF  $\alpha$  + CHX-mediated apoptosis was higher in the presence of external calcium. In addition, dimethyl-BAPTA loading reduced TNF  $\alpha$  /CHX-induced apoptosis. Cells treated with TNF  $\alpha$  + CHX showed a reduction in  $[Ca^{2+}]_c$  2,5 hours and 3,5 hours after the treatment; this coincides with the previous phase of apoptosis, where is characterized by high ER/low $[Ca^{2+}]_c$ , which may instead label the



## 4. RESULTADOS/RESULTS

---

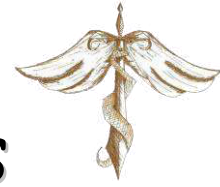
“willingness” to enter apoptosis, and at 4,5 hours, when the apoptosis is occurring,  $[Ca^{2+}]_c$  is increased. Curiously, pretreatment with trolox and nanoceria not only prevented this changes in  $[Ca^{2+}]_c$ , but even increased it slightly. It could be understood by cell as a pro-survival signal. This changes of calcium signal were followed by ROS generation, a mitochondrial depolarization and by the activity of initiator caspase-9. These results are in agreement with Kim et al.([49]), which suggested that cryptotanshinone can sensitize  $TNF\alpha$ -induced apoptosis in human myeloid leukemia KBM-5 cells, which appears through ROS-dependent activation of caspase-8 and p38.

We provide compelling evidences supporting that this increase of calcium signal was followed by an increase in intracellular ROS generation and subsequently, in a mitochondrial membrane depolarization. This depolarization leads to a caspase activation.

In this study nanoceria was non-toxic, decreased ROS generation, and preserved the viability of damaged cells. Our results also show that the antioxidant effect of nanoceria is more potent than other typical antioxidant such as trolox or NAC. These results concord with Celardo et al. [20], where the same cell line U937 was induced to apoptosis with puromycin, hydrogen peroxide and etoposide (VP-16). Nanoceria was also found to scavenge free radicals in murine insulinoma cells treated with hydroquinone [50], in cultured retinal neurons treated with  $H_2O_2$  [51], and normal human colon cells [18]. Novel applications of nanoceria in the growing field of nanomedicine are appearing every day, including tissue engineering and specific drug targeting [22]. This work contributes to show the potential pharmacological effects of nanoceria.

According to this results, a part of the apoptotic signal due to  $TNF\alpha$  in U937 cells leads to the intrinsic pathway of apoptosis, not only extrinsic pathway. According to Ghibelli & Diedrich [36],  $TNF\alpha$  + CHX-induced apoptosis may involve an activation of the pro-apoptotic protein Bax through three different ways. In the first one, the calcium stress leads to an activation of calpains which cleaves Bid and, subsequently, Bax is activated. The second one would be mediated by oxidative stress which may produce a disulfide dimerization. The last one is the Bax activation through





## 4.RESULTADOS/RESULTS

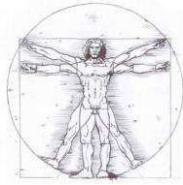
---

the classical extrinsic pathway. This model could explain that the only total inhibition we could see was the pretreatment with z-VAD, because since it is an pancaspase inhibitor, it inhibits caspase-3, the point where both intrinsic and extrinsic pathways converge.

In summary, the results show that intracellular ROS generation and calcium signaling are implicated in TNF- $\alpha$  plus CHX- mediated apoptosis in U937 cells. In addition, we can also show that nanoceria was the most potent antioxidant to revert the effects of this TNF- $\alpha$  plus CHX-mediated apoptosis in human histiocytic lymphoma cell lines.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by MICINN-FEDER (BFU 2010-15049).



## 4. RESULTADOS/RESULTS

---

### REFERENCES

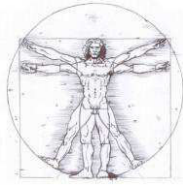
- 1) Ashkenazi A, Dixit VM (1999) Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 11:255–260.
- 2) Ding WX, Yin XM (2004) Dissection of the multiple mechanisms of TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in liver injury. *J Cell Mol Med* 8:445–454.
- 3) Boatright KM, Salvesen GS (2003) Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 15:725–731.
- 4) Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 17:1675–1687.
- 5) Wajant H, Pzenmaier K, Scheurich P (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10:45–65.
- 6) Hajnóczky G, Davies E, Madesh M (2003) Calcium signaling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 304:445-54.
- 7) Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A (1997) Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med* 22:269-285.
- 8) Tan S, Sagara Y, Liu Y, et al. (1998) The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J Cell Biol* 141:1423-1432
- 9) Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, et al. (2004) Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 287:817-833.
- 10) González D, Espino J, Bejarano I, Rodríguez A B, Pariente JA (2010) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced caspase activation is dependent of calcium signal in HL-60 cells. *Curr Signal Transd T* 5(2):181-186.
- 11) Yao K, Tan J, Gu W, et al. (2007) Reactive oxygen species mediates the apoptosis by transforming growth factor beta(2) in human lens epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 354:278-283.
- 12) Lopez JJ, Salido GM, Gómez-Arteta E, et al. (2007) Thrombin induces apoptotic events through the generation of reactive oxygen species in human platelets. *J Thromb Haemost* 5:1283-91.



## 4.RESULTADOS/RESULTS

---

- 13) Bejarano I, Lozano GM, Ortiz A et al. (2008) Caspase 3 activation in human spermatozoa in response to hydrogen peroxide and progesterone. *Fertil Steril* 90:1340-7.
- 14) Lin W, Huang Y. W, Zhou X D, Ma Y (2006) Toxicity of Cerium Oxide Nanoparticles in Human Lung Cancer Cells. *Int J Toxicol* 25:451–457.
- 15) Hirst SM, Karakoti AS, Tyler RD, Sriranganathan N, Seal S, Reilly CM (2009) Anti-inflammatory Properties of Cerium Oxide Nanoparticles. *Small* 5:2848–2856.
- 16) Das M, Patil S, Bhargava NJ, Kang F, Riedel LM, Seal S, Hickman JJ. (2007) Auto-catalytic Ceria Nanoparticles Offer Neuroprotection to Adult Rat Spinal Cord Neurons. *Biomaterials* 28:1918–1925.
- 17) Niu J, Azfer A, Rogers LM, Wang X, Kolattukudy PE (2007) Cardioprotective Effects of Cerium Oxide Nanoparticles in a Transgenic Murine Model of Cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 73:549–559.
- 18) Colon J, Hsieh N, Ferguson A, Kupelian P, Seal S, Jenkins DW, Baker CH (2010) Cerium Oxide Nanoparticles Protect Gastrointestinal Epithelium from Radiation-Induced Damage by Reduction of Reactive Oxygen Species and Upregulation of Superoxide Dismutase 2. *Nanomedicine* 6:698–705.
- 19) Colon J, Herrera L, Smith J, Patil S, Komanski C, Kupelian P, Seal S, Jenkins DW, Baker CH (2009) Protection from Radiation-Induced Pneumonitis Using Cerium Oxide Nanoparticles. *Nanomedicine* 5:225–231.
- 20) Celardo I, De Nicola M, Mandoli C, Pedersen JZ, Traversa E, Ghibelli L (2011) Ce<sup>3+</sup> Ions Determine Redox-Dependent Anti-apoptotic Effect of Cerium Oxide Nanoparticles. *ACS Nano* 5(6):4537–4549.
- 21) Heckert EG, Seal S, Self WT (2008) Fenton-like reaction catalyzed by the rare earth inner transition metal cerium. *Environ Sci Technol* 42:5014-5019.
- 22) Celardo I, Pedersen JZ, Traversa E, Ghibelli L (2011) Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles. *Nanoscale* 3:1411–1420.
- 23) Ghibelli L, Fanelli C, Rotilio G et al. (1998) Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. *FASEB J* 12:479–486.



## 4. RESULTADOS/RESULTS

---

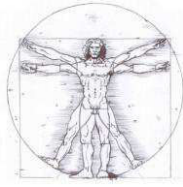
- 24) Ghibelli L, Coppola S, Fanelli C et al. (1999) Glutathione depletion causes cytochrome c release even in the absence of cell commitment to apoptosis. *FASEB J* 13:2031–2036.
- 25) De Nicola M, Cerella C, D'Alessio M, Coppola S, Magrini A, Bergamaschi A, Ghibelli L (2006) The cleavage mode of apoptotic nuclear vesiculation is related to plasma membrane blebbing and depends on actin reorganization. *Ann NY Acad Sci* 1090: 69–78.
- 26) Grynkiewicz C, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-3450.
- 27) Bejarano I, Espino J, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA and Rodríguez AB (2011) Pro-Oxidant Effect of Melatonin in Tumour Leucocytes: Relation with its Cytotoxic and Pro-Apoptotic Effects. *Basic and clinical Pharmacol Toxicol* 108(1):14-20.
- 28) Radogna F, Paternoster L, Albertini MC et al. (2007) Melatonin antagonizes apoptosis via receptor interaction in U937 monocytic cells. *J Pineal Res* 43:154–162.
- 29) Ghibelli L, Coppola S, Rotilio G et al. (1995) Non-oxidative loss of glutathione in apoptosis via GSH extrusion. *Biochem Biophys Res Commun* 216:313–320.
- 30) Demarex N, Distelhorst C (2003) Cell biology. Apoptosis—the calcium connection. *Science* 300:65–67
- 31) Espino J, Bejarano I, Paredes SD, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA, Rodríguez AB (2011) Melatonin is able to delay endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in leukocytes from elderly humans. *Age (Dordr)* 33(4):497-507.
- 32) Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE (2004) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* 11:372–380
- 33) González D, Espino J, Bejarano I, López JJ, Rodríguez AB, Pariente JA (2009) Caspase-3 and -9 are activated in human myeloid HL-60 cells by calcium signal. *Mol Cell Biochem* 333(1-2):151-7.



## 4.RESULTADOS/RESULTS

---

- 34) Cerella C, Diederich M, Ghibelli L, (2010) The dual role of calcium as messenger and stressor in cell damage, death, and survival. *Int J Cell Biol* 2010:546163.
- 35) Yoshimura N, Kikuchi T, Sasaki T, Kitahara A, Hatanaka M, Murachi T (1983) Two distinct Ca<sup>2+</sup> proteases (calpain I and calpain II) purified concurrently by the same method from rat kidney. *J Biol Chem* 258:8883–8889.
- 36) Ghibelli L, Diederich M (2010) Multistep and multitask Bax activation. *Mitochondrion* 10: 604–613
- 37) Radogna F, Sestili P, Martinelli C, Paolillo M, Paternoster L, Albertini MC, Accorsi A, Gualandi G, Ghibelli L (2009) Lipoxygenase-mediated pro-radical effect of melatonin via stimulation of arachidonic acid metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology* 238: 170–177.
- 38) Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479–489.
- 39) Goeddel DV, Aggarwal BB, Gray PW, Leung DW, Nedwin GE, Palladino MA, Patton JS, Pennica P, Shepard HM, Sugarman BJ, et al. (1986) Tumor necrosis factors: gene structure and biological activities. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:597–609.
- 40) Micheau O, Tschopp J (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114:181–190.
- 41) Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, et al. (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388:190–195.
- 42) Chang L, Kamata H, Solinas G, Luo JL, Maeda S, Venuprasad K, Liu YC, and Karin M (2006) The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNF $\alpha$ -induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell* 124:601–613.



## 4. RESULTADOS/RESULTS

---

- 43) Kreuz S, Siegmund D, Scheurich P, Wajant H (2001) NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol* 21:3964–3973.
- 44) Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K, Tschopp J (2001) NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol* 21:5299–5305.
- 45) Gallardo G, López-Blanco F, Ruiz de Galarreta CM, Fanjul LF (2003) HMGC0A reductase inhibition partially mediates tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced apoptosis in human U-937 and HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 300:397–402.
- 46) Kim S, Ohoka N, Okuhira K, Sai K, Nishimaki-Mogami T, Naito M (2010) Modulation of RIP1 ubiquitylation and distribution by MeBS to sensitize cancer cells to tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced apoptosis. *Cancer Sci* 101(11):2425-9.
- 47) Siripin D, Fucharoen S, Tanyong DI (2011) Nitric oxide and caspase 3 mediated cytokine induced apoptosis in acute leukemia. *Asian Pac J Allergy Immunol* 29(1):102-11.
- 48) Cerella C, Mearelli C, Coppola S, D'Alessio M, De Nicola M, Diederich M, Ghibelli L (2007) Sequential phases of Ca<sup>2+</sup> alterations in pre-apoptotic cells. *Apoptosis* 12:2207–2219.
- 49) Kim JH, Jeong SJ, Kwon TR, Yun SM, Jung HJ, Kim M, Lee HJ, Lee MH, Ko SG, Chen CY, Kim SH (2011) Cryptotanshinone enhances TNF  $\alpha$ -induced apoptosis in chronic myeloid leukemia KBM-5 cells. *Apoptosis* 16(7):696-707.
- 50) Tsai YY, Oca-Cossio J, Agering K, Simpson NE, Atkinson MA, Wasserfall CH, Constantinidis I, Sigmund W (2007) Novel synthesis of cerium oxide nanoparticles for free radical scavenging. *Nanomedicine* 2(3):325-32.
- 51) Chen J, Patil S, Seal S, McGinnis JF (2006) Rare earth nanoparticles prevent retinal degeneration induced by intracellular peroxides. *Nat Nanotechnol* 1(2):142-50.



## 4.RESULTADOS/RESULTS

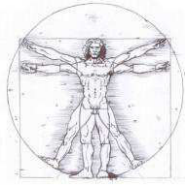
---

### Figure captions

Figure 1: Morphological differences induced by  $\text{TNF } \alpha$  plus cycloheximide (CHX) or puromycin (PMC). U937 cells were stained with  $10 \mu\text{g/mL}$  Hoechst 33342 for 20 minutes and then the fraction of apoptotic cells was evaluated as indicated in Materials and Methods section. A) Non-treated cells. B) Cells were treated with  $10 \text{ ng/mL}$   $\text{TNF } \alpha$  plus  $1 \mu\text{M}$  cycloheximide (CHX) for 3,5 hours. C) Time course of apoptosis induced by  $10 \text{ ng/mL}$   $\text{TNF } \alpha$  plus  $1 \mu\text{g/mL}$  CHX or  $1 \mu\text{g/mL}$  puromycin (PMC). (N = 8). \* $p < 0.05$  compared with control.

Figure 2: Effect of  $\text{TNF } \alpha$  on  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Fluo4-loaded U937 cells were evaluated as indicated in Materials and Methods. A) Cells were pretreated with  $10 \mu\text{M}$  BAPTA-AM or  $650 \mu\text{M}$  for 30 minutes at  $37^\circ\text{C}$ , and then were stimulated with  $10 \text{ ng/mL}$   $\text{TNF } \alpha$  plus  $1 \mu\text{M}$  cycloheximide (CHX) for various periods of time. B) Cells were preincubated with  $100 \mu\text{M}$  Trolox for 30 minutes or  $200 \mu\text{g/mL}$  nanoceria for 40 min at  $37^\circ\text{C}$  and then were treated with  $10 \text{ ng/mL}$   $\text{TNF } \alpha$  and  $1 \mu\text{g/mL}$  CHX. (N = 4). \* $p < 0.05$  compared with control. # $p < 0.05$  compared with  $\text{TNF } \alpha$  + CHX alone.

Figure 3: Implication of calcium signal in  $\text{TNF } \alpha$  plus cycloheximide (CHX)-induced apoptosis. U937 cells were stained with  $10 \mu\text{g/mL}$  Hoechst 33342 for 20 minutes and then the fraction of apoptotic cells was evaluated as indicated in Materials and Methods section. A) Cells were pretreated with  $650 \mu\text{M}$  EGTA for 20 minutes or  $10 \mu\text{M}$  BAPTA-AM for 30 minutes, and then were stimulated with  $10 \text{ ng/mL}$   $\text{TNF } \alpha$  plus  $1 \mu\text{M}$  cycloheximide (CHX) for various periods of time. B) Cells were preincubated with  $50 \mu\text{g/mL}$  calpain inhibitor for 45 minutes and then were treated with  $500 \text{ nM}$  ionomycin or  $10 \text{ ng/mL}$   $\text{TNF } \alpha$  in combination with  $1 \mu\text{M}$  cycloheximide. (N = 4). \* $p < 0.05$  compared with control. # $p < 0.05$  compared with  $\text{TNF } \alpha$  + CHX alone. & $p < 0.05$  compared with ionomycin alone.



## 4. RESULTADOS/RESULTS

---

Figure 4: Effect of antioxidants on TNF  $\alpha$  + CHX-induced apoptosis. U937 cells were stained with 10  $\mu$  g/mL Hoechst 33342 for 20 minutes and then the fraction of apoptotic cells was evaluated as indicated in Materials and Methods section. A) Non-treated cells. B) Cells preincubated with 100  $\mu$ M Trolox for 30 minutes and then treated with 10 ng/mL TNF  $\alpha$  in addition to 1  $\mu$  M cycloheximide (CHX) for various periods of time. C) Cells were preincubated with 100  $\mu$ M Trolox for 30 minutes, 1 mM N-acetyl cysteine (NAC) for 1 hour or 200  $\mu$  g/mL nanoceria for 40 min and then were treated with 10 ng/mL TNF  $\alpha$  and 1  $\mu$  g/mL CHX. (N = 6). \*p<0.05 compared with control. #p<0.05 compared with TNF  $\alpha$  + CHX alone.

Figure 5: Effects of TNF  $\alpha$  plus cycloheximide (CHX) on membrane potential and intracellular ROS generation. A) U937 cells were stained with 100 nM MitoTracker Red (MTR) for 20 minutes and then mitochondrial membrane potential ( $\psi$  m) was measured by flow-cytometry. The results are presented as fold-increase above the control value. B) Cells were stained with 1  $\mu$  M dihydrorhodamine 123 (DHR) for 20 minutes and then ROS generation was measured. The results are presented as fold-increase above the control value. C) U937 cells were stained with 10  $\mu$  M 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H2DCFDA) for 20 minutes and then ROS generation was measured. The results are presented as fold-increase above the control value (experimental/control), (N = 4). \*p<0.05 compared with control. #p<0.05 compared with TNF  $\alpha$  + CHX alone.

Figure 6: Implication of caspase activity in TNF  $\alpha$  + CHX-induced apoptosis. Cells were stained with 10  $\mu$  g/mL Hoechst 33342 for 20 minutes and then the fraction of apoptotic cells was evaluated as indicated in Materials and Methods section. A) Time course of apoptosis produced by the preincubation of 10  $\mu$  M pancaspase inhibitor for 1 hour and then 10 ng/mL TNF  $\alpha$  in addition to 1  $\mu$  g/mL CHX were added. B) Cells were pretreated with 10  $\mu$  M caspase-8 inhibitor or 10  $\mu$  M caspase-9 inhibitor for 1

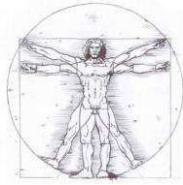




## 4.RESULTADOS/RESULTS

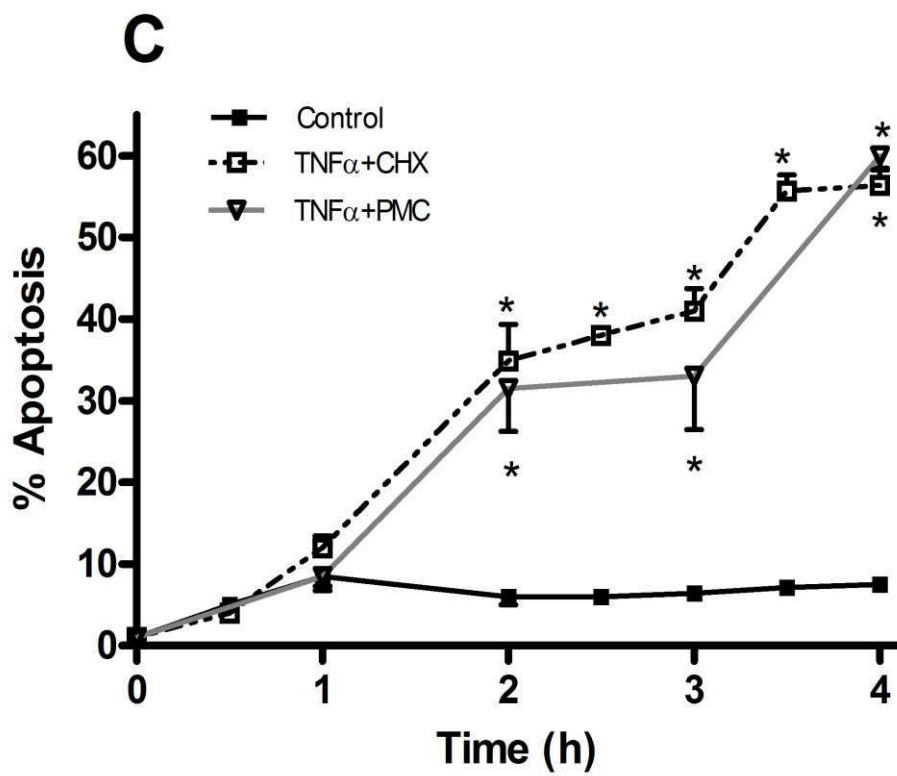
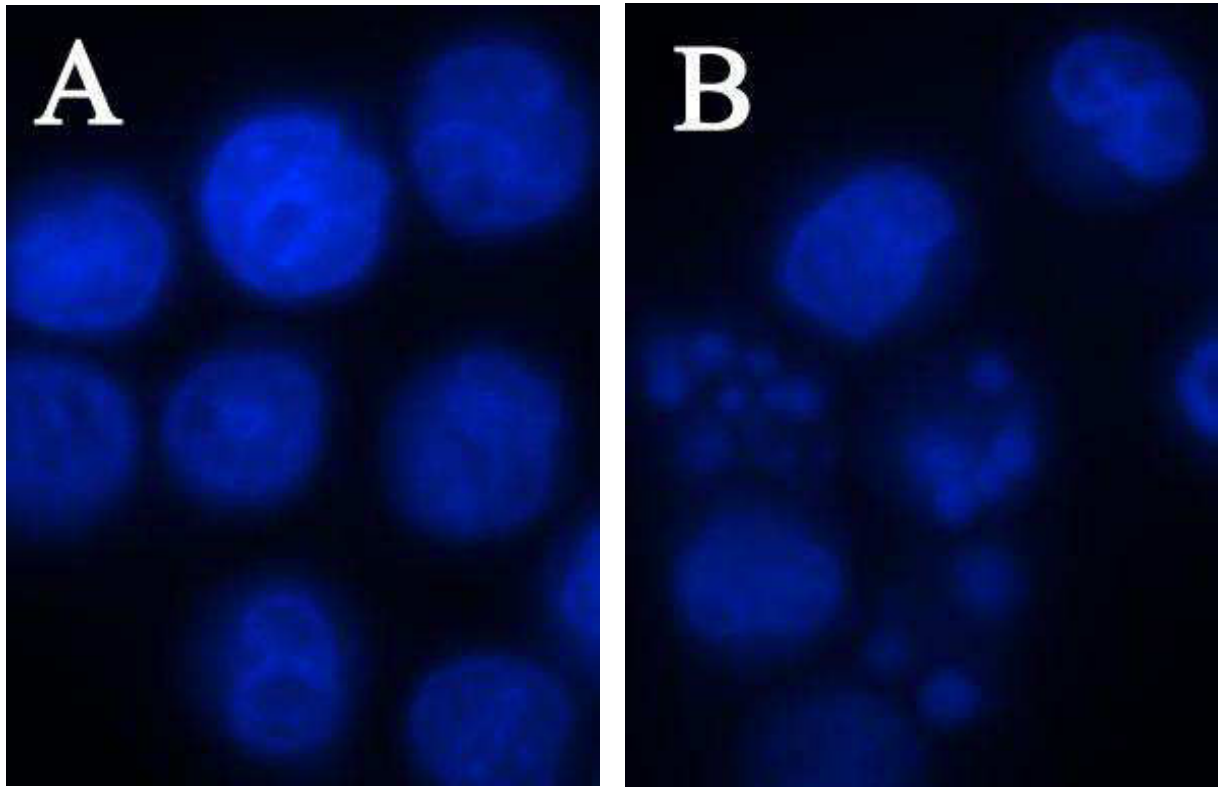
---

hour, and then were treated with 10 ng/mL TNF $\alpha$  in combination with 1  $\mu$ g/mL cycloheximide (CHX). (N = 4). \*p<0.05 compared with control. #p<0.05 compared with TNF + CHX alone.



## 4. RESULTADOS/RESULTS

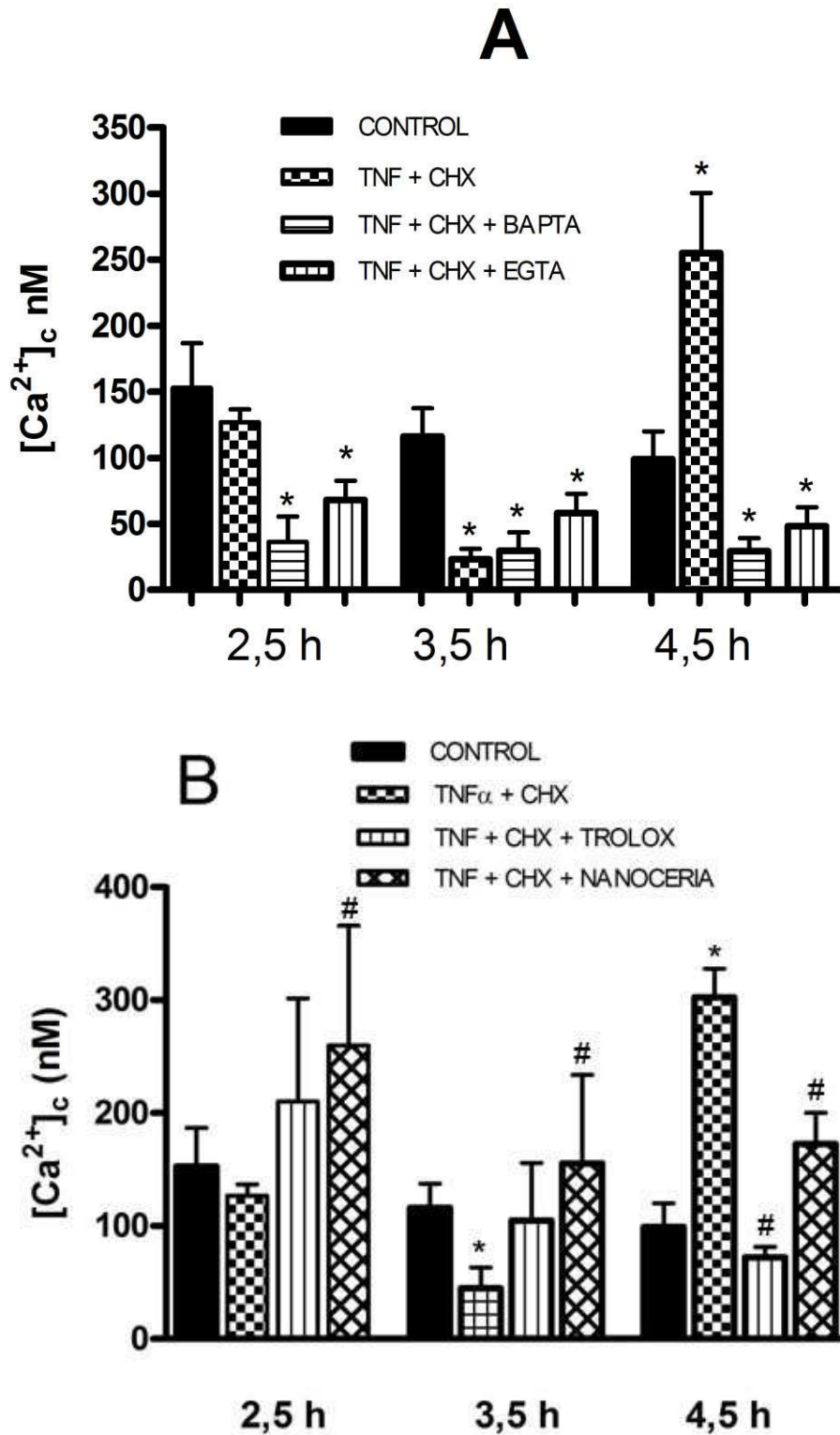
Fig. 1

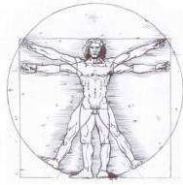




## 4.RESULTADOS/RESULTS

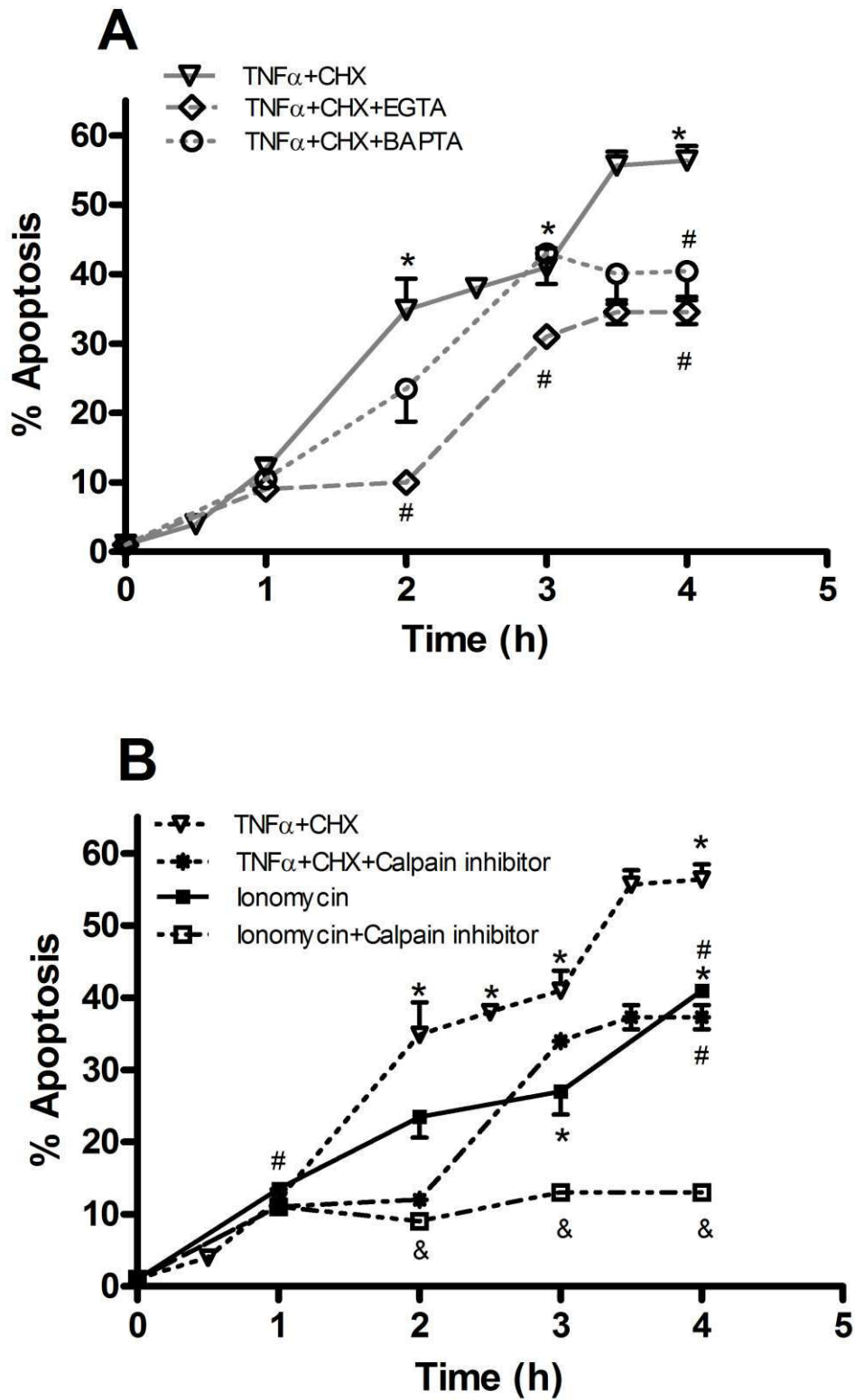
Fig. 2





## 4. RESULTADOS/RESULTS

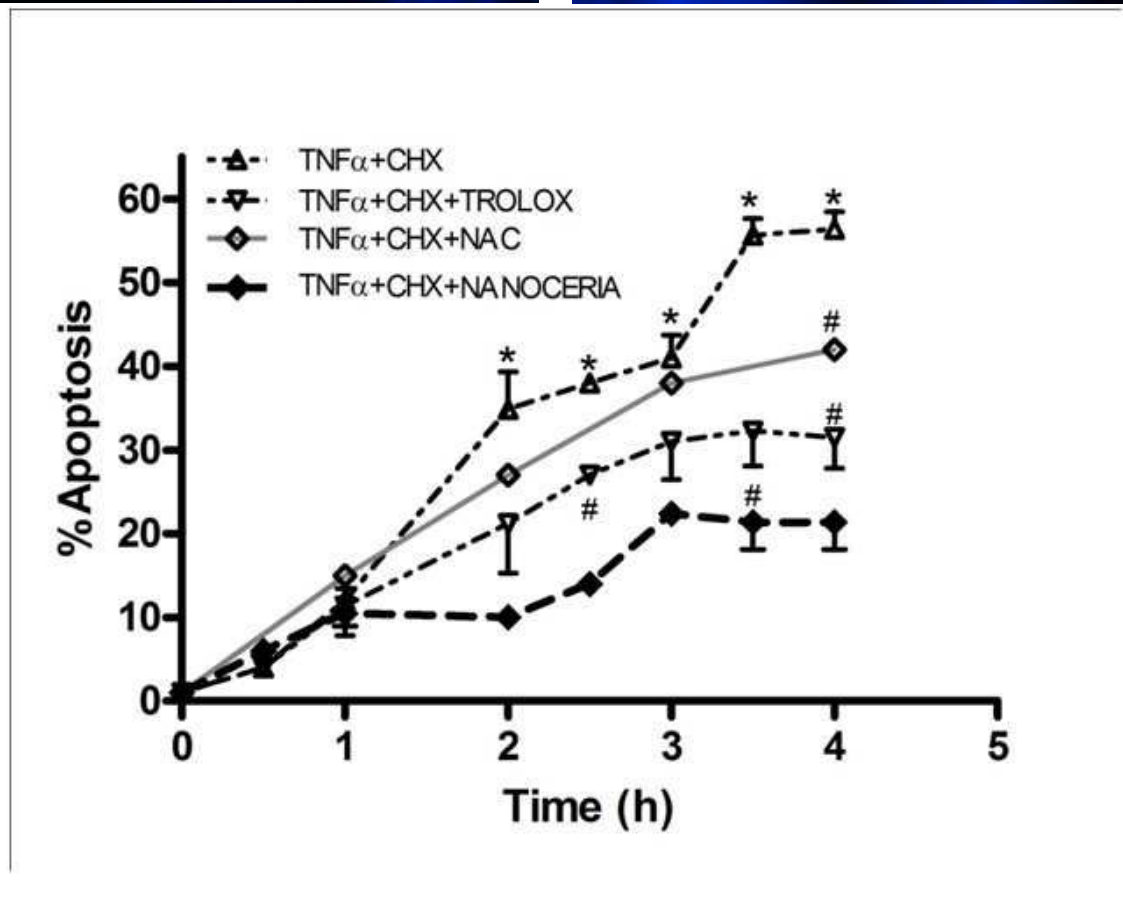
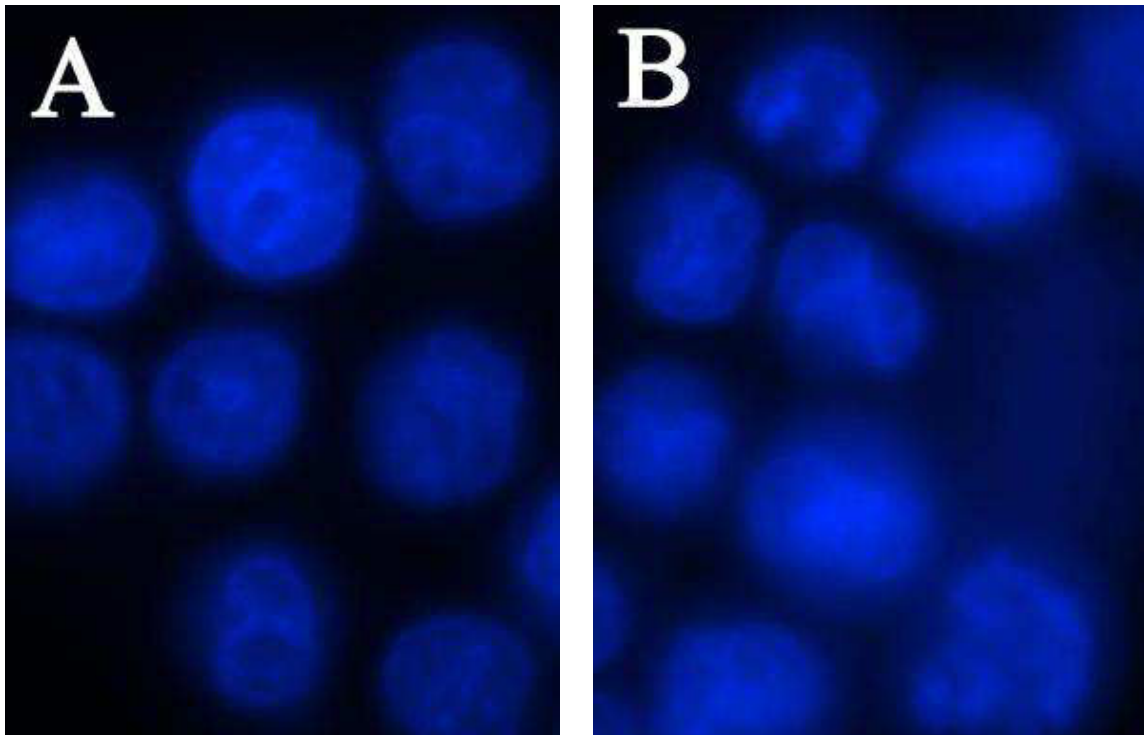
Fig. 3

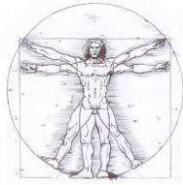




## 4.RESULTADOS/RESULTS

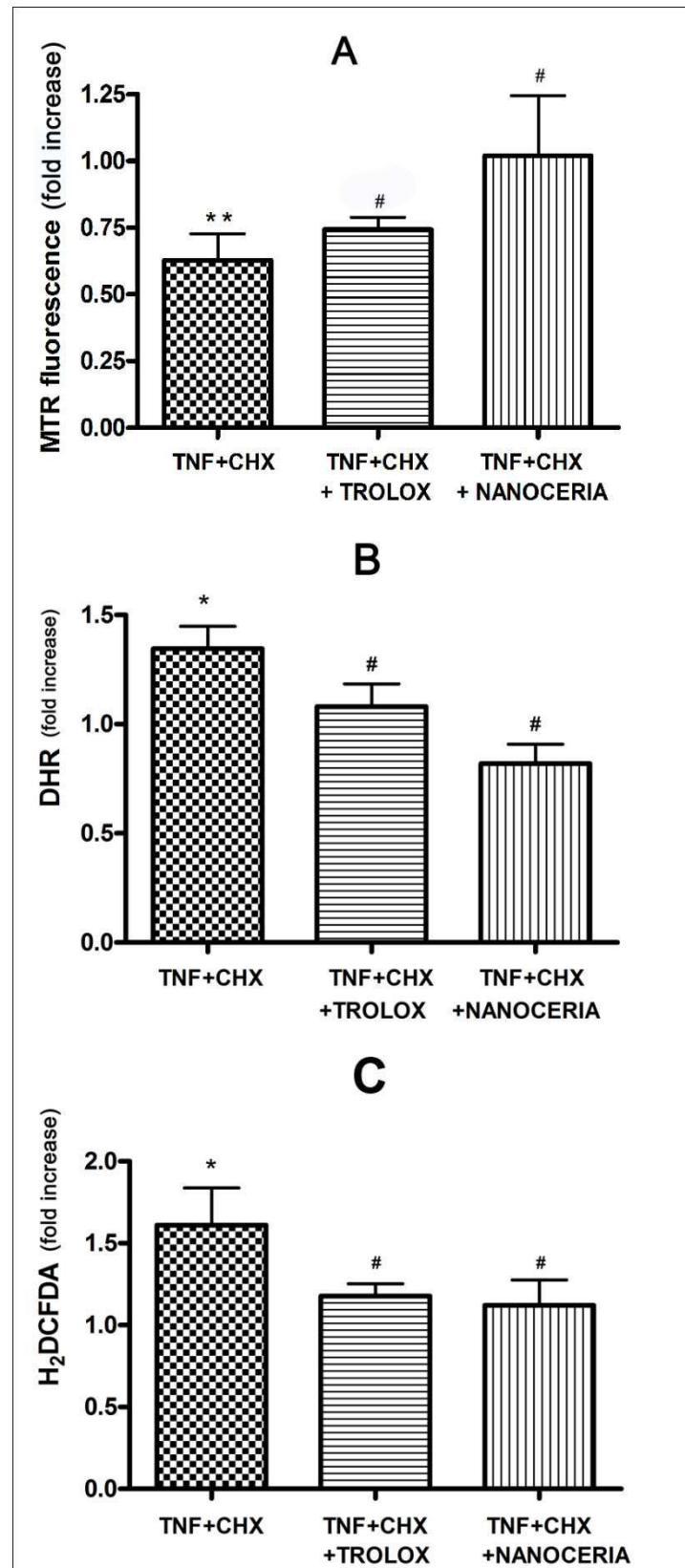
Fig. 4





## 4. RESULTADOS/RESULTS

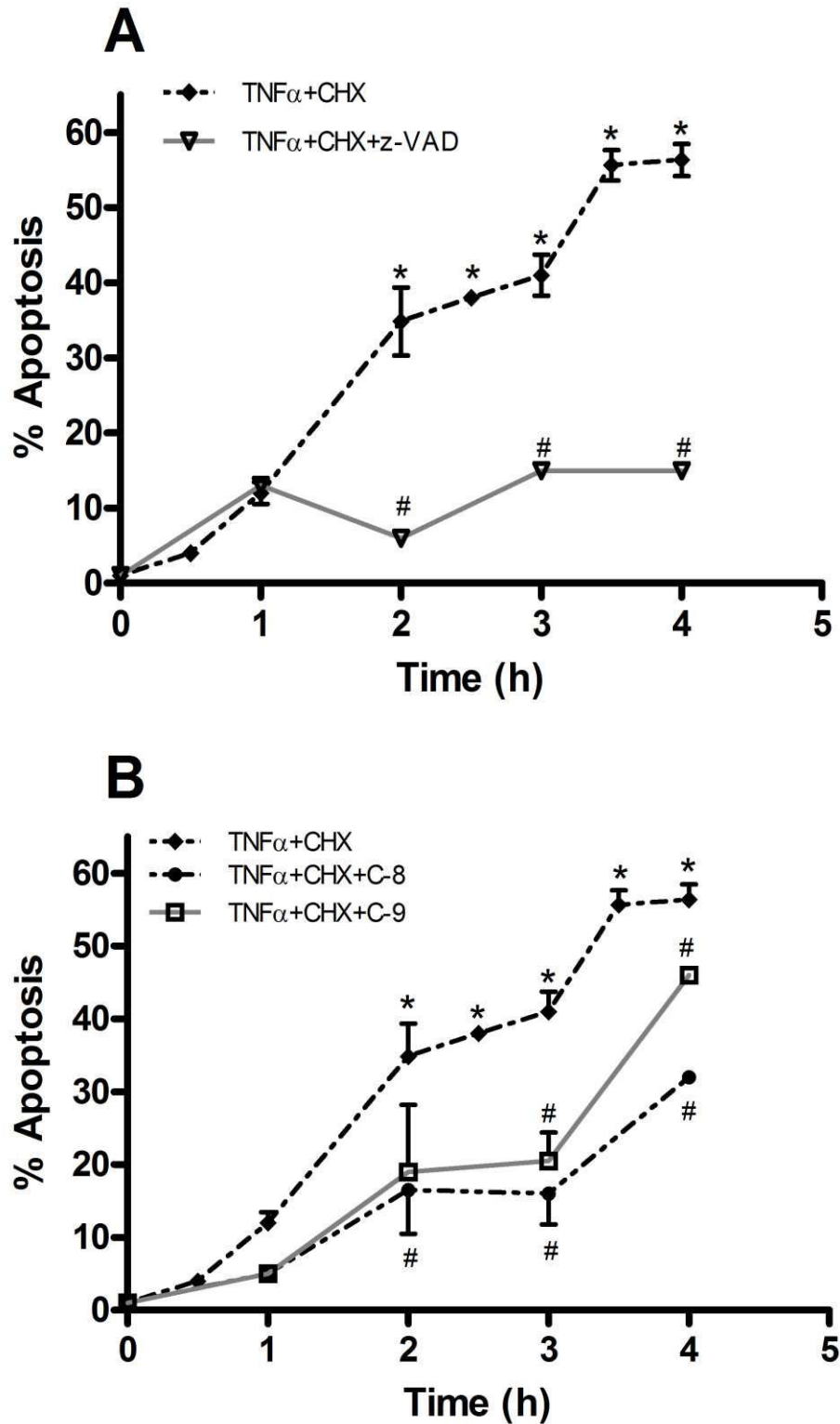
Fig. 5

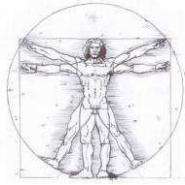




## 4.RESULTADOS/RESULTS

Fig. 6



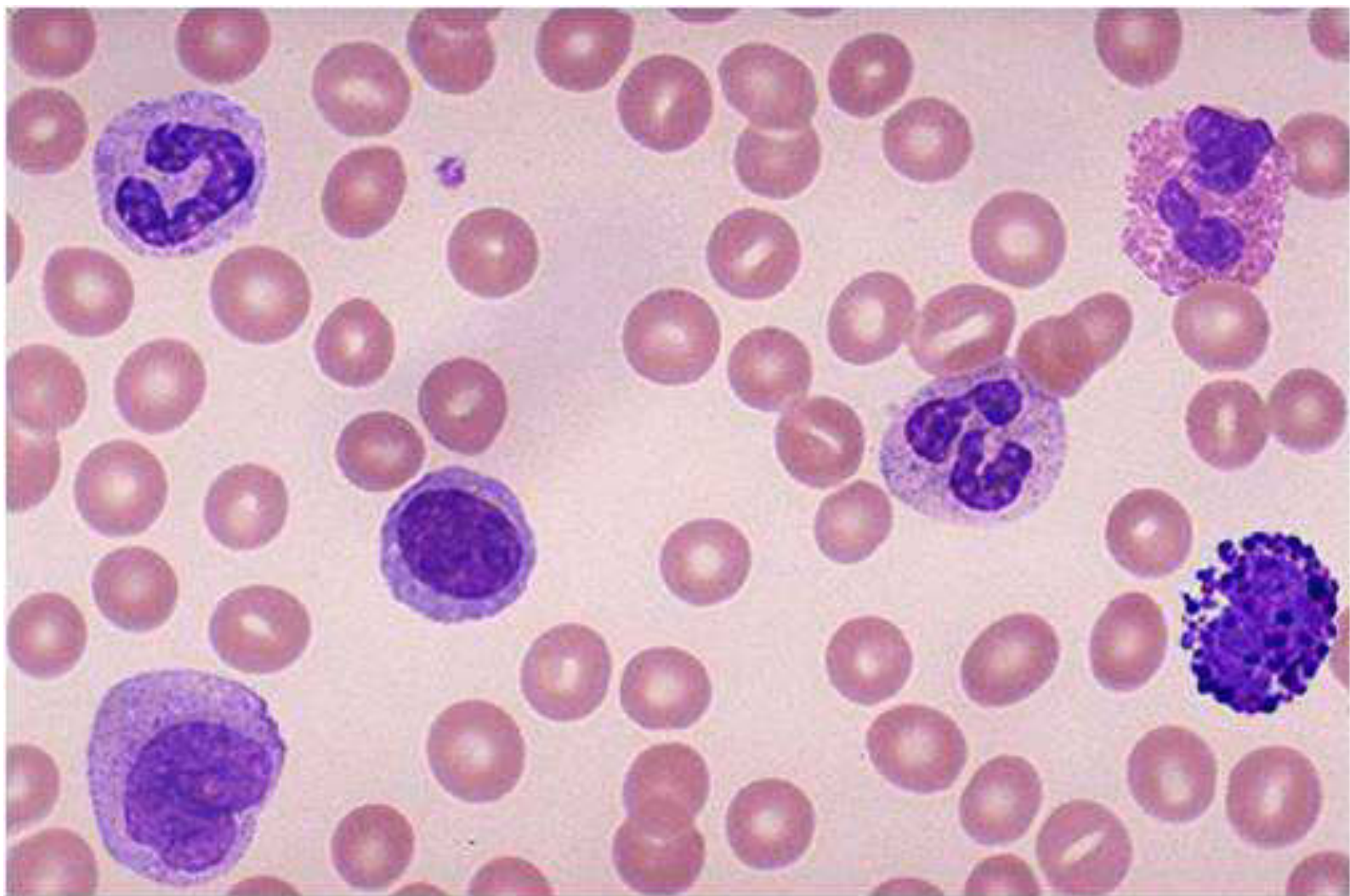


## **4. RESULTADOS/RESULTS**

---



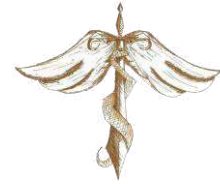
# 5. DISCUSIÓN GENERAL





## 5.DISCUSIÓN GENERAL

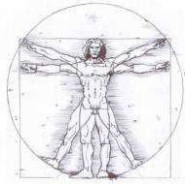
---



La apoptosis es un proceso que en las últimas décadas ha comenzado a ser estudiada en profundidad. Esta importancia no se debe solamente al papel que juega este proceso en el desarrollo embrionario o en la homeostasis tisular, sino también porque sus desequilibrios, tanto por exceso como por defecto, están relacionados con algunas de las enfermedades de mayor calado entre la población mundial, tanto por el número de afectados como por el interés mediático. El defecto de apoptosis está relacionado con enfermedades autoinmunes y cáncer, donde se produce una acumulación excesiva de células. El exceso de apoptosis, por su parte, está relacionado con enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer) y con SIDA, entre otros. Resulta, por tanto, interesante la perspectiva de conocer a fondo el mecanismo apoptótico para un avance en la farmacología de estas enfermedades.

La línea celular HL-60 es una línea celular leucémica que se ha usado tradicionalmente para investigaciones sobre cómo se forman ciertos tipos de células sanguíneas. Las HL-60 proliferan continuamente en cultivo de suspensión con medio nutritivo suplementado con suero bovino fetal, L-glutamina, HEPES y antibióticos. El tiempo de desdoblamiento se encuentra en torno a los 36-48 horas. Esta línea celular fue extraída a partir de una mujer de 36 años con leucemia promielocítica aguda en el Nacional Cancer Institute de Estados Unidos. Las células HL-60 son predominantemente un precursor promielocítico (Gallagher y cols., 1979). El modelo celular HL-60 se ha usado para estudiar el efecto de la topoisomerasa de DNA (topo) II $\alpha$  y II $\beta$  sobre la diferenciación y apoptosis de células (Sugimoto y cols., 1998) y es especialmente útil en estudios de dielectroforésis (Ratanachoo y cols., 2002), los cuales requieren un ambiente acuoso con células redondas y en suspensión. Alternativamente también se han utilizado para estudios de apoptosis y de la homeostasis del calcio intracelular (Fang y cols., 1998).

La línea celular K562 es una línea celular derivada de pacientes con leucemia mieloide crónica, por lo que tienen características eritroides. Esta línea celular es una buena herramienta como modelo de maduración y diferenciación, ya que dependiendo de la droga inductora pueden madurar a células de la línea megacariocítica o eritropoyética. Mueren fácilmente en presencia de células NK (Lozzio & Lozzio, 1979). El tratamiento de las células K562 por un regulador natural como la hemina (uno de los



## 5. DISCUSIÓN GENERAL

---

inductores de la eritropoyesis), el cual es transportado por la hemopexina, da como resultado una acumulación de hemoglobina.

Finalmente, la línea celular U937 es una línea celular humana establecida a partir de un linfoma histiocítico difuso y que muestra muchas características monocíticas. Sirve como modelo *in vitro* para la diferenciación entre monocitos y macrófagos (Sundstrom & Nilsson, 1976). Estas células expresan constitutivamente altos niveles de moléculas HLA de clase I de superficie celular, mientras que la HLA clase II es indetectable e ininducible, tanto a nivel de RNAm como en la superficie celular (Peterlin y cols, 1984).

Alteraciones de la homeostasis del calcio, particularmente un aumento excesivo y prolongado en la  $[Ca^{2+}]_c$  constituyen una señal inicial que precede en el tiempo a otras alteraciones morfológicas y funcionales responsables del desarrollo de daños irreversibles en diferentes tejidos. Recientes estudios experimentales indican que la toxicidad de numerosos agentes oxidantes está mediada por incrementos sostenidos en la  $[Ca^{2+}]_c$  (Hajnóczky y cols., 2003). De todos los orgánulos intracelulares, la mitocondria es considerada una de las fuentes celulares más importantes de agentes oxidantes, debido a su elevado consumo de oxígeno durante el proceso de síntesis de ATP en la cadena respiratoria. Además en los últimos años se ha implicado a la mitocondria como un depósito de calcio intracelular, actuando como amortiguador de la concentración de calcio intracelular y regulando la concentración local de calcio en microdominios celulares. También recientemente se ha implicado a la mitocondria en la regulación de la entrada de calcio desde el medio extracelular. De esta manera, la mitocondria es actualmente considerada como uno de los compartimentos celulares que participan en la homeostasis del calcio.

Uno de nuestros objetivos fue el de estudiar la apoptosis inducida por sobrecargas de calcio intracelular, que pudieran sobrecargar de calcio a la mitocondria, originando un colapso o disrupción mitocondrial. Para ello hemos utilizado tres agentes que son capaces de aumentar la concentración de calcio intracelular, como son el agente oxidante  $H_2O_2$  (Pariente y cols., 2001), el inhibidor del relleno de los depósitos intracelulares de calcio sensible a agonistas taspigargina (Rogers y cols., 1995), y el agonista natural de las células HL-60, el UTP. Durante la realización de esta Tesis



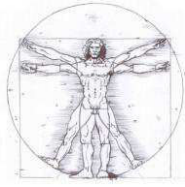
## 5. DISCUSIÓN GENERAL

---

Doctoral hemos podido comprobar que el  $H_2O_2$ , la taspigargina y el UTP producen apoptosis tiempo- y calcio-dependiente en células HL-60, induciendo activación de caspasas -9 y -3 y despolarización mitocondrial. Similares resultados han sido demostrados previamente por nuestro grupo de investigación en células no tumorales, como plaquetas humanas (López y cols., 2008; López y cols., 2009), leucocitos (Espino y cols., 2010), espermatozoides (Bejarano y cols., 2008) y acinos pancreáticos de ratón (Granados y cols., 2006), así como en la línea celular tumoral de páncreas de rata AR42J (Morgado y cols., 2008). Por otro lado, el estudio de calcio en las células U937 permitió identificar el grupo de cambios secuenciales en el calcio intracelular como ya vieron Cerella y cols., (2007). Tres cambios secuencias de calcio en el retículo y citosol se pudieron observar. La primera y segunda respuestas de calcio podrían ser interpretadas como un intento de reparar el daño (un estado de “stand-by”); una vez las células han alcanzado la tendencia a entrar en apoptosis, abandonan las etapas pro-apoptóticas de una manera aparentemente estocástica, quizá necesitando una señal más que transforma la tendencia en una transducción de señal molecular de apoptosis.

Por otra parte, el factor de necrosis tumoral (TNF, caquexina, o caquectiona, y formalmente conocido como factor-alfa de necrosis tumoral o  $TNF\alpha$ ) es una citoquina involucrada en inflamación sistémica y es un miembro de un grupo de citoquinas que estimulan la reacción inmunológica de la fase aguda. Se produce predominantemente por macrófagos activados (M1), aunque puede ser producido por otros tipos celulares como los linfocitos  $CD4+$  y células NK.

El papel principal del TNF es en la regulación de células inmunes. TNF, siendo como es un pirógeno endógeno, es capaz de inducir fiebre, apoptosis, sepsis (a través de la producción de IL1 y IL6), caquexia, inflamación, e inhibir la carcinogénesis y replicación vírica. Se ha visto que la desregulación de la producción de TNF está implicada en una variedad de enfermedades humanas, incluyendo enfermedad de Alzheimer (Swardfager y cols., 2010), cáncer (Locksley y cols., 2001), depresión (Dowlati y cols., 2010) y enfermedad inflamatoria intestinal (Brynskov y cols., 2002). Aunque siguen siendo controvertidos, los estudios sobre depresión y enfermedad inflamatoria intestinal todavía se relacionan con los niveles de TNF (Mickoka-Walus, 2007). El TNF recombinante se usa como inmunoestimulante bajo la denominación común internacional tasonermina. El factor- $\alpha$  de necrosis tumoral puede producirse de



## 5. DISCUSIÓN GENERAL

---

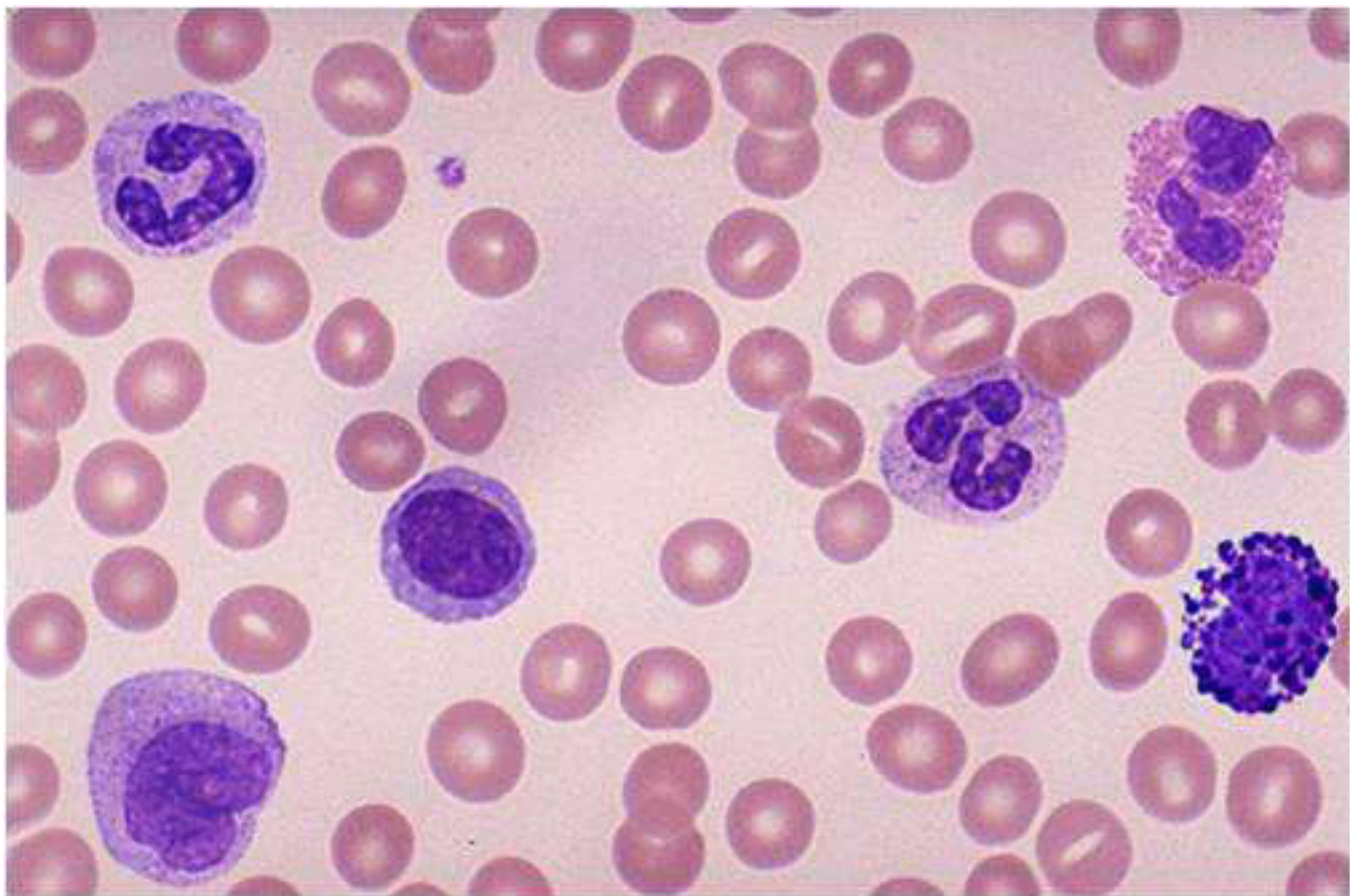
manera ectópica en los alrededores de un tumor e iguala a la hormona paratiroidea, tanto en hipercalcemia secundaria como en cánceres asociados a su producción excesiva. Como todos los miembros que contienen un dominio de muerte de la superfamilia TNFR, el receptor TNF-R1 está implicado en la señalización de muerte (Gaur & Aggarwal, 2003).

En la presente Tesis Doctoral ponemos de manifiesto que el tratamiento con TNF $\alpha$  produce apoptosis en las líneas celulares HL-60, al igual que en la línea celular K-562. En las células U937 fue necesario la presencia de cicloheximida para que la apoptosis tuviera lugar con la misma concentración de TNF $\alpha$ . Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos previamente en diversas líneas celulares (Siripin y cols., 2011; Kim y cols., 2010). Además, cabe preguntarse que quizá no solamente la vía extrínseca de la apoptosis estuviera implicada, sino que se produjera un aumento de las ROS intracelulares. Esta acción prooxidante y estimuladora de la producción intracelular de ROS del TNF $\alpha$  es claramente puesta de manifiesto por nuestros resultados, no solo en las células leucémicas HL-60, sino también en otras dos líneas tumorales de origen hematopoyético humanas, como son las células eritroleucémicas K-562 y las células de linfoma U937. Estas observaciones están de acuerdo con resultados previos donde se demuestra que incubaciones con TNF $\alpha$  producen un aumento de la producción intracelular de ROS en hepatocitos (Wullaert y cols., 2006; Zhao y cols., 2003).

Finalmente, hemos podido evaluar el potencial farmacológico de la nanocería, uno de los miembros de la novedosa gama de nano partículas. Los efectos farmacológicos de la nanocería permanecían sobre todo en la hipótesis, sobre todo apoyado por estudios abióticos, que aseguraban que la nanocería actúa como una máquina redox regenerativa, entrando en ciclo su estado redox mientras transforma el superóxido a peróxido de hidrógeno, y después el peróxido a agua. Esta actividad antioxidante combinada con una aparente falta de toxicidad lo hace una herramienta terapéutica extremadamente prometedora (Celardo y cols., 2011); estudios como los aquí realizados permiten dar un paso más allá y demostrar su valía en un sistema biológico. Concluyendo, las premisas son prometedoras para el uso farmacéutico de la nanocería y poder pasar a pruebas clínicas en un futuro próximo.

# 6. CONCLUSIONES

## <CONCLUSIONS>









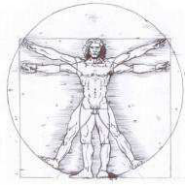
## 6.CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

---



Analizando conjuntamente los resultados obtenidos en la realización de la presente Tesis Doctoral, podemos obtener las siguientes conclusiones:

- Un agonista típico de los receptores de membrana en las células HL-60, como es el UTP, fue capaz de provocar liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos intracelulares. De una manera similar, el tratamiento con taspigargina o con la especie reactiva de oxígeno  $\text{H}_2\text{O}_2$  son capaces de inducir incrementos en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  procedentes de los almacenes intracelulares.
- La señal de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por UTP, taspigargina y  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue capaz de producir despolarización mitocondrial y una estimulación tiempo dependiente de la actividad de la caspasa iniciadora -9 y de la ejecutora -3 en células HL-60.
- El  $\text{TNF}\alpha$  fue capaz de producir apoptosis en las líneas celulares HL-60, K562 y U937, si bien en el caso de la última fue necesario el tratamiento con inhibidores de la síntesis proteica, como la cicloheximida (CHX) o la puromicina (PMC), a bajas concentraciones.
- La señal apoptótica producida por el  $\text{TNF}\alpha$  provocó un aumento de la generación de ROS intracelular, despolarización mitocondrial y aumento en la activación de la caspasa-9 en células HL-60, K562 y U937. De una manera similar, la preincubación con distintos antioxidantes disminuyeron la respuesta despolarizante mitocondrial así como la estimulación de la caspasa-9 inducida por  $\text{TNF}\alpha$ .
- El pretratamiento con nanoceria en células U937 no fue tóxico, y disminuyó la producción de ROS intracelular, la estimulación de las caspasas -3 y -9 y el porcentaje de células apoptóticas de una manera más potente que



## **6.CONCLUSIONES/CONCLUSIONS**

---

cualquiera de los antioxidantes clásicos, como el Trolox o la N-acetil cisteína (NAC).



## 6.CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

---

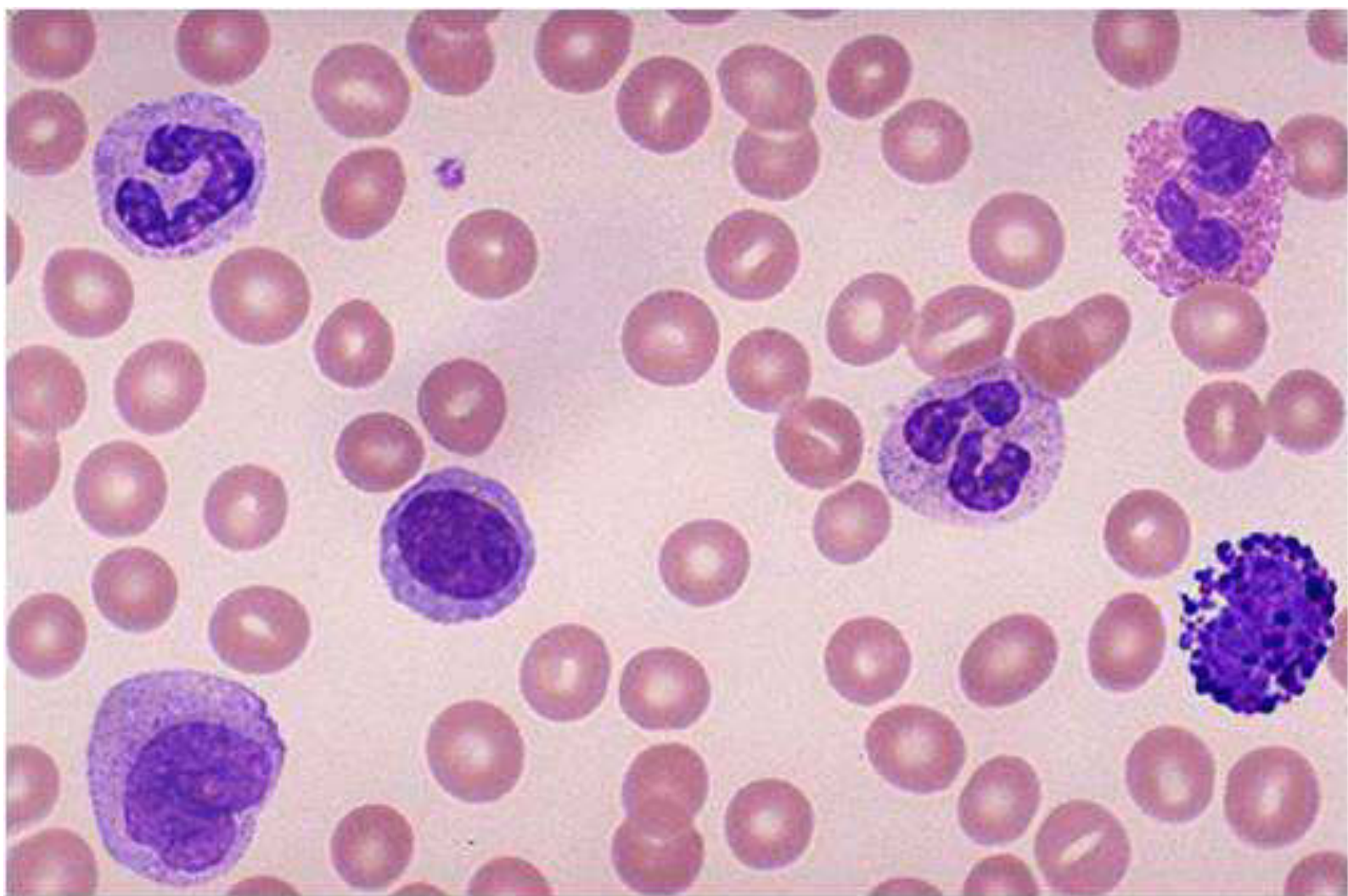


After analysing the results obtained during the making of this Doctoral Thesis, we can draw up the following conclusions:

- A typical agonist of membrane receptors in HL-60 cells, such as UTP, was able to produce calcium release from the intracellular stores. Similarly, treatment with thapsigargin or with the reactive oxygen species  $H_2O_2$  is able to induce an increase in  $[Ca^{2+}]_c$  from intracellular stores.
- $Ca^{2+}$  signal induced by UTP, thapsigargin and  $H_2O_2$  could produce mitochondrial depolarization and a time-dependent stimulation of the caspase -9 and -3 activity in HL-60 cells.
- $TNF\alpha$  was able to produce apoptosis in HL-60, K562 and U937 cell lines, but the treatment with inhibitors of protein synthesis, like cycloheximide (CHX) or puromycin (PMC) at low concentration was needed for the last one.
- Apoptotic signaling produced by  $TNF\alpha$  induced an increase of intracellular ROS generation, mitochondrial depolarization and an increase in caspase-9 activation in HL-60, K562 and U937 cell lines. Similarly, the preincubation with several antioxidants decreased the mitochondrial depolarization as well as the stimulation of caspase-9 induced by  $TNF\alpha$ .
- Pretreatments with nanoceria in U937 cells were non-toxic, and ROS production, caspase -3 and -9 stimulation and percentage of apoptotic cells decreased more strongly than with any other classical antioxidants, such as Trolox or N-acetyl cysteine (NAC).



# 7. BIBLIOGRAFÍA







## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

Abe K, Kurakin A, Mohseni-Maybodi M, Kay B, Khosravi-Far R (2000) The complexity of TNF-related apoptosis-inducing ligand. *Ann N Y Acad Sci*; **926**: 52-63.

Adams, JM y Cory, S (1998) "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival". *Science*; **281**: 1322-1326.

Albano E, Bellomo G, Parola M, Carini R, Dianzani MU (1991) Stimulation of lipid peroxidation increases the intracellular calcium content of isolated hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*; **1091**: 310-6.

Allbritton, NL, Verret, CR, Wolley, RC, Eisen, HN (1988) Calcium ion concentrations and DNA fragmentation in target cell destruction by murine cloned cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*; **167**: 514-527.

Alnemri, ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*; **87**:171.

Alzheimer, A (1907) Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Zeitschr Psychiatr.*; **64**: 146-148.

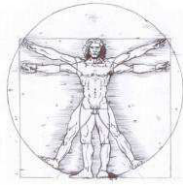
Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **90**: 7915-22.

Amor NB, Pariente JA, Salido GM, Rosado JA, Bartegi A (2006) Thrombin-induced caspases 3 and 9 translocation to the cytoskeleton is independent of changes in cytosolic calcium in human platelets. *Blood Cells Mol Dis*; **36**: 392-401.

Aranda MR (2003) Efecto del ejercicio físico agotador sobre el estrés oxidativo asociado al envejecimiento. Tesis doctoral. Servei public.

Arnaudeau S, Kelley WL, Walsh JV Jr, Demareux N (2001) Mitochondria recycle  $Ca^{2+}$  to the endoplasmic reticulum and prevent the depletion of neighboring endoplasmic reticulum regions. *J Biol Chem*; **276**: 29430-9.

Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, Sharpe JC, Cecconi F, Youle RJ (2003) Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J*; **22**: 4385-99.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

Ashkenazi A, Dixit VM (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*; **281**: 1305-8.

Bacon BR, O'Neill R, Britton RS (1993) Hepatic mitochondrial energy production in rats with chronic iron overload. *Gastroenterology*; **105**: 1134-1140.

Backway KL, McCulloch EA, Chow S, Hedley DW (1997). Relationships between the mitochondrial permeability transition and oxidative stress during are-C toxicity. *Cancer Res*; **57**: 2446-2451.

Baffy G, Miyashita T, Williamson JR, Reed JC (1993) Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3 dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production. *J Biol Chem*; **268**: 6511-6519.

Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P (2005) Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem*; **280**: 18558-18561.

Baumgartner HK, Gerasimenko JV, Thorne C, Ashurst LH, Barrow SL, Chvanov MA, Gillies S, Criddle DN, Tepikin AV, Petersen OH, Sutton R, Watson AJ, Gerasimenko OV (2007) Caspase-8-mediated apoptosis induced by oxidative stress is independent of the intrinsic pathway and dependent on cathepsins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; **293**: 296-307.

Bejarano I, Espino J, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA, Rodríguez AB (2011) Pro-Oxidant Effect of Melatonin in Tumour Leucocytes: Relation with its Cytotoxic and Pro-Apoptotic Effects. *Basic and clinical Pharmacol Toxicol*; **108** (1): 14-20.

Bejarano I, Lozano GM, Ortiz A, García JF, Paredes SD, Rodríguez AB, Pariente JA (2008) Caspase 3 activation in human spermatozoa in response to hydrogen peroxide and progesterone. *Fertil Steril*; **90**: 1340-7.

Ben Amor N, Pariente JA, Salido GM, Bartegi A, Rosado JA (2006) Caspases 3 and 9 are translocated to the cytoskeleton and activated by thrombin in human platelets. Evidence for the involvement of PKC and the actin filament polymerization. *Cell Signal*; **18**: 1252-61.

Bernardi P, Rasola A (2007) Calcium and cell death: the mitochondrial connection. *Subcell Biochem*; **45**: 481-506.

Bernstein G, Blank J., Smrcka AV, Higashijima T, Seis PC, Exton JH, Ross EM (1992) Reconstitution of agonist-stimulated phosphatidylinositol 1,4,5-trisphosphate hydrolysis using purified muscarinic receptor, Gq/11, and phospholipase C-beta 1. *J Biol Chem*; **267**: 8081-8088.

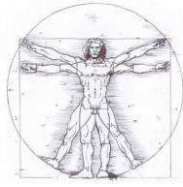




## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

- Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P (1998) Calcium--a life and death signal. *Nature*; **395**: 645-648.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*; **1**: 11-21.
- Blaustein MP, Lederer WJ (1999). Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev*; **79**: 763-854.
- Boatright KM, Salvesen GS (2003) Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*; **15**: 725-31.
- Bradford, MM (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*; **72**: 248–254.
- Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS (2004a) Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*; **287**: C817-C833.
- Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS (2004b) “Calcium calmodulin and hormone secretion”. *Clin Endocrinol*; **23**: 201-218.
- Brown BL, Walker SW, Tomlinson S (1985). Calcium calmodulin and hormone secretion. *Clin Endocrinol*; **23**: 201-218.
- Brüne B (2003). Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON?. *Cell Death Differ*. **10** (8): 864–9.
- Brune B, Von Knethen A, Sandau KB (1999) Nitric oxide (NO): an effector of apoptosisname. *Cell Death and Differentiation*. **6** (10): 969-975.
- Brynskov J, Foegh P, Pedersen G, Ellervik C, Kirkegaard T, Bingham A, Saermark T (2002) Tumour necrosis factor alpha converting enzyme (TACE) activity in the colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut*; **51** (1): 37–43.
- Budd S, Nichols DG (1996) A reevaluation of the role of mitochondria in neuronal Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *J Neurochem*; **66**: 403-411.
- Buonanno A, Fields RD (1999) Gene regulation by patterned electrical activity during neural and skeletal muscle development. *Curr Opin Neurobiol*; **9**: 110-120.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

Cadenas E, Boveris A (1980) Enhancement of hydrogen peroxide formation by protophores and ionophores in antimycin-supplemented mitochondria. *Biochem J*; **188**: 31-37.

Cadenas E, Davies KJ (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*; **29**: 222-30.

Cai S, Lytton J (2004) "The cation/  $\text{Ca}^{2+}$  exchanger superfamily: phylogenetic analysis and structural implications. *Mol Biol Evol*; **2**: 1692-1703.

Camacho P, Lechleiter JD (1995) Calreticulin inhibits repetitive intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  waves. *Cell*; **82**: 765-771.

Camello C (2000). Entrada de calcio, recarga de depósitos intracelulares y función mitocondrial en la señal de calcio de células acinares pancreáticas. Tesis doctoral, Universidad de Extremadura.

Cancela JM, Churchill GC, Galione A (1999). Coordination of agonist-induced  $\text{Ca}^{2+}$ -signalling patterns by NAADP in pancreatic acinar cells. *Nature*; **398**: 74-76.

Carafoli E (1987) Intracellular calcium homeostasis. *Ann Rev Biochem* **56**: 39.

Carafoli E (1992). "Calcium pump of the plasma membrane". *Physiol. Rev.*; **71**: 283-292.

Cascales Angosto M (2003) Bases moleculares de la apoptosis. *Anal Real Acad Nal Farm*; **69**: 36-64.

Castedo M, Hirsch T, Susin SA, Zamzarni N, Marchetti P, Macho A, Kroemer G (1996). Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during lymphocyte apoptosis. *J Immunol*; **157**: 512-521.

Cavallini L, Coassin M, Alexandre A (1995) Two classes of agonist-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  stores in platelets, as identified by their differential sensitivity to 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone and thapsigargin. *Biochem J*; **310**: 449-452.

Celardo I, De Nicola M, Mandoli C, Pedersen JZ, Traversa E, Ghibelli L (2011)  $\text{Ce}^{3+}$  Ions Determine Redox-Dependent Anti-apoptotic Effect of Cerium Oxide Nanoparticles. *ACS Nano*; **5** (6): 4537-4549.

Cerella C, Diederich M, Ghibelli L (2010) The dual role of calcium as messenger and stressor in cell damage, death, and survival. *Int J Cell Biol*; **2010**: 546163.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

Cerella C, Mearrelli C, Coppola S, D'Alessio M, De Nicola M, Diederich M, Ghibelli L (2007) Sequential phases of  $\text{Ca}^{2+}$  alterations in pre-apoptotic cells. *Apoptosis*; **12**: 2207-2219.

Chen JJ, Bertrand H, Yu BP (1995) Inhibition of adenine nucleotide translocator by lipid peroxidation products. *Free Radic Biol Med*; **19**: 583-590.

Chen G, Goeddel DV (2002) TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*; **296** (5573): 1634-5.

Chen M, He H, Zhan S, Krajewski S, Reed JC, Gottlieb RA (2001) Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *J Biol Chem*; **276**: 30724-8.

Cheng AG, Huang T, Stracher A, Kim A, Liu W, Malgrange B, Lefebvre PP, Schulman A, Van de Water TR (1999) Calpain inhibitors protect auditory sensory cells from hypoxia and neurotrophin-withdrawal induced apoptosis. *Brain Res*; **850**: 234-43.

Chiarugi A, Moskowitz MA (2002) PARP-1—a perpetrator of apoptotic cell death?. *Science*; **297** (5579): 259-63.

Chini EN, Dousa TP (1999) Differential effect of glycolytic intermediaries upon cyclic ADP-ribose-inositol 1,4,5-triphosphate-, and nicotinate adenine dinucleotide phosphate-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release systems. *Arch Biochem Biophys*; **370**: 294-299.

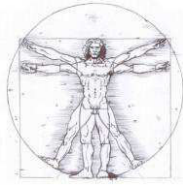
Choi MS, Boise LH, Gottschalk AR, Quintans J, Thompson CB (1995) The role of Bcl-XL in CD40-mediated rescue from anti- $\mu$ -induced apoptosis in WEHI-231 B lymphoma cells. *Eur J Immunol*; **25**: 1352-1357.

Churchill GC, Galione A (2001) NAADP induces  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations via a two-pool mechanism by priming  $\text{IP}_3$ - and cADPR-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  stores. *EMBO J*; **20**: 2666-2671.

Cohen HY, Lavu S, Bitterman KJ, Hekking B, Imahiyerobo TA, Miller C, Frye R, Ploegh H, Kessler BM, Sinclair DA (2004) Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell*; **13**: 627-638.

Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D (1987) Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med*; **107**: 526-45.

Dejean LM, Martinez-Caballero S, Manon S, Kinnally KW (2006). Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins. *Biochim Biophys Acta*; **1762** (2): 191-201.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

Del Bello B, Moretti D, Gamberucci A, Maellaro E (2007) Cross-talk between calpain and caspase-3/-7 in cisplatin-induced apoptosis of melanoma cells: a major role of calpain inhibition in cell death protection and p53 status. *Oncogene*; **26**: 2717-26.

De Nicola M, Cerella C, D'Alessio M, Coppola S, Magrini A, Bergamaschi A, Ghibelli L (2006). The cleavage mode of apoptotic nuclear vesiculation is related to plasma membrane blebbing and depends on actin reorganization. *Ann NY Acad Sci*; **1090**: 69–78.

Dettbarn C, Betto R, Salviati G, Sabbadini R, Palade P (1995) Involvement of ryanodine receptors in sphingosylphosphorylcholine-induced calcium release from brain microsomes. *Brain Res.*; **669**: 79-85.

Devireddy LR, Green MR (2003) Transcriptional program of apoptosis induction following interleukin 2 deprivation: identification of RC3, a calcium/calmodulin binding protein, as a novel proapoptotic factor. *Mol Cell Biol*; **23**: 4532-41.

Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, Lanctôt KL (2010). A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry* **67** (5): 446–457.

El-Daher SS, Eigenthaler M, Walter U, Furuichi T, Miyawaki A, Mikoshiba K, Kakkar VV, Authi KS (1996). Distribution and activation of cAMP- and cGMP-dependent protein kinase highly purified human platelet plasma and intracellular membranes. *Thromb Haemost*; **76**: 1063-1071.

Espino J, Bejarano I, Paredes SD, González D, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA, Rodríguez AB (2010a) Melatonin counteracts alterations in oxidative metabolism and cell viability induced by intracellular calcium overload in human leucocytes: changes with age. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*; **107** (1): 590-7.

Espino J, Bejarano I, Redondo PC, Rosado JA, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA, Rodríguez B (2010) Melatonin reduces apoptosis induced by calcium signaling in human leukocytes: Evidence for the involvement of mitochondria and Bax activation. *J Membr Biol*; **233**: 105-18.

Espino J, Bejarano I, Paredes SD, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA, and. Rodríguez AB (2011) Melatonin is able to delay endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in leukocytes from elderly humans. *Age (Dordr)*; **33** (4): 497–507.

Exton JH, (1997) New developments in phospholipase D. *J Biol Chem*; **272**: 15579-15582.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

Fang M, Zhang H, Xue S (1998) Role of calcium in apoptosis of HL-60 cells induced by harringtonine. *Sci China C Life Sci*; **41**(6): 600-7.

Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J (2005) Caspase Family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin*; **37**: 719-27.

Fan TJ, Xia L, Han YR (2001) Mitochondrion and Apoptosis. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao*; **33**: 7-12.

Fesik SW, Shi Y (2001) Controlling the caspases. *Science*; **294** (5546): 1477-8.

Fill M, Coronado R (1988) Ryanodine receptor channel of sarcoplasmic reticulum. *Trends Neurosci*; **11**: 453-457.

Finkel T, Holbrook N.J (2000) Oxidant, oxidative stress and the biology of aging. *Nature*; **408**: 239-247.

Fladmark KE, Brustugun OT, Mellgren G, Krakstad C, Boe R, Vintermyr OK, Schulman H, Doskeland SO (2002) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II is required for microcystin-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*; **22**: 3003-13.

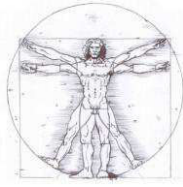
Galione A (1994) Cyclic ADP-ribose, the ADP-ribosyl cyclase pathway and calcium signaling. *Mol Cell Endocrinol*; **98**: 125-131.

Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F, Gallo R (1979) Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood*; **54** (3): 713-33

Gaur U, Aggarwal BB (2003) Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol*; **66** (8): 1403-8.

Gee KR, Brown KA, Chen WN, Bishop-Stewart J, Gray D, Johnson I (2000) Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca<sup>2+</sup>-indicator dyes. *Cell Calcium*; **27** (2): 97-106.

Genova ML, Ventura B, Giuliano G, Bovina C, Formiggini G, Parenti CG, Lenaz G (2001) The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS Lett*; **505**: 364-68.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

Gerasimenko O, Gerasimenko J, (2004) New aspect of nuclear calcium signalling. *J Cell Sci*; **117**: 3087-3094.

Ghibelli L, Coppola S, Fanelli C, Rotilio G, Civitareale P, Scovassi AI, Ciriolo MR (1999) Glutathione depletion causes cytochrome c release even in the absence of cell commitment to apoptosis. *FASEB J*; **13**: 2031–2036.

Ghibelli L, Diedrich M (2010) Multistep and multitask Bax activation. *Mitochondrion* **10**: 604–613

Ghibelli L, Fanelli C, Rotilio G, Lafavia E, Coppola S, Colussi C, Civitareale P, Ciriolo MR (1998) Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. *FASEB J*; **12**: 479–486.

Giacomello M, Drago I, Pizzo P, Pozzan T (2007) Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  as a key regulator of cell life and death. *Cell Death Differ*; **14**: 1267-1274.

Giorgi C, Romagnoli A, Pinton P, Rizzuto R (2008)  $\text{Ca}^{2+}$  signaling, mitochondria and cell death. *Curr Mol Med*; **8**:119-30.

Gogvadze V, Norberg E, Orrenius S, Zhivotovsky B (2010) Involvement of  $\text{Ca}^{2+}$  and ROS in alpha-tocopherol succinate-induced mitochondrial permeabilization. *Int J Cancer*; **127**: 1823-32.

Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J (2003) The calpain system. *Physiol Rev*; **83**: 731-801.

González A, Granados MP, Pariente JA, Salido GM (2006)  $\text{H}_2\text{O}_2$  mobilizes  $\text{Ca}^{2+}$  from agonist- and thapsigargin-sensitive and insensitive intracellular stores and stimulates glutamate secretion in rat hippocampal astrocytes. *Neurochem Res*; **31** (6): 741-50.

González A, Granados MP, Salido GM, Pariente JA, (2003) Changes in mitochondrial activity evoked by cholecystokinin in isolated mouse pancreatic acinar cells. *Cell Signal*; **15**: 1039-48.

Granados MP, Salido GM, González A, Pariente JA. (2006) Dose-dependent effect of hydrogen peroxide on calcium mobilization in mouse pancreatic acinar cells. *Biochem Cell Biol*; **84**: 39-48.

Grover AK, Samson SE, Misquitta CM (1997) Sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  pump isoform SERCA3 is more resistant than SERCA2b to peroxide. *Am. J. Physiol Cell Physiol*; **273**, C420-C425.

Grynkiewicz C, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**: 3440-3450.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

Guerini D (1998) The significance of the isoforms of plasma membrane calcium ATPase. *Cell Tissue Res*; **292**: 191-197.

Hajnóczyk G, Davies E, Madesh M (2003) Calcium signaling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*; **304**: 445-454.

Harwood SM, Yaqoob MM, Allen DA (2005) Caspase and calpain function in cell death: bridging the gap between apoptosis and necrosis. *Ann Clin Biochem*; **42**: 415-431.

Hengartner MO, Horvitz HR (1994). *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *Bcl-2*. *Cell*; **76**: 665-76.

Hensahll DC (2007) Apoptosis signalling pathways in seizure-induced neuronal death and epilepsy. *Biochem Soc Trans*; **35**: 421-3.

Hockenberry D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ (1990) *Bcl-2* is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*; **348**: 334-336.

Hoth M, Fanger CM, Lewis R.S (1997) Mitochondrial regulation of store-operated calcium signalling in T-lymphocytes. *J Cell Biol*; **137**: 633-648.

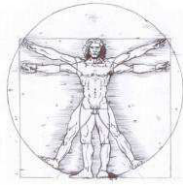
Hu Y, Ding L, Spencer DM, Núñez G (1998) WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation. *J Biol Chem*; **273**: 33489-94.

Hunter DR, Haworth RA (1979) The  $Ca^{2+}$ -induced membrane transition in mitochondria. *Arch Biochem Biophys*; **195**: 453-477.

Ichas F, Jouaville LS, Mazat JP (1997) Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell.*; **89**: 1145-1153.

Iverson SL, Orrenius S (2004) The cardiolipin-cytochrome c interaction and the mitochondrial regulation of apoptosis. *Arch Biochem Biophys*; **423**: 37-46.

Jacobson MD, Burne JF, Raff MC (1994) Programmed cell death and *Bcl-2* protection in the absence of a nucleus. *EMBO J*; **13**: 1899-1910.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

Jardín, I, Ben Amor N, Bartegi A, Pariente JA, Salido GM, Rosado JA (2007) Differential involvement of thrombin receptors in  $\text{Ca}^{2+}$  release from two different intracellular stores in human platelets. *Biochem J*; **401**(1): 167-74.

Jiang S, Chow SC, Nicotera P, Orrenius S (1994) Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signals activate apoptosis in thymocytes: studies using the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase inhibitor thapsigargin. *Exp Cell Res*; **212**: 84-92.

Jiang X, Wang X. (2000) Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to apaf-1. *J Biol Chem*; **275**: 31199-203.

Johnson T.M., Yu Z.X. y Morishita R., (1996). "Reactive oxygen species are downstream mediators of p53 dependent apoptosis". *Natl. Acad. Sci. USA.*; **93**: 1848-1852.

Jouaville LS, Ichas F, Holmuhamedov EL, Camacho P, Lechleiter JD (1995) Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature*; **377**: 438-41.

Juntti-Berggren, L., Larsson, O., Rorsman, P., Ammala, C., Bokvist, K., Wahlander, K., Nicotera, P., Dybukt, J.M., Orrenius, S., Hallberg, A., y Berggren, P. (1993). "Increased activity of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels exposed to serum from patients with type I diabetes". *Science*; **261**: 86-90.

Kaiser, N. y Edelman, I.S. (1977) "Calcium dependence of glucocorticoid-induced lymphocytolysis". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **74**: 638-642.

Kaneko, Y. Y Tsukamoto, A. (1994) "Thapsigargin-induced persistent intracellular calcium pool depletion and apoptosis in human hematoma cells". *Cancer Lett*; **79**: 147-155.

Kelekar, A. y Thompson, C.B. (1998). "Bcl-2 family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis". *Trends Cell. Biol*; **8**: 324-330.

Kerr, JF. (1965). "A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes". *Journal of Pathology and Bacteriology*; **90** (90): 419-35.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics". *Br. J. Cancer*; **26** (4): 239-57.

Kim M.J., Kim E., Ryu S.H. y Suh P.G., (2000). "The mechanism of phospholipase C-gamma 1 regulation". *Exp. Mol. Med.*; **32**: 101-109.





## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

Kim J.R., Lee S.M., Cho S.H., Kim J.H., Kim B.H., Kwon J., Choi C.Y., Kim Y.D. y Lee S.R., (2004). "Oxidation of thioredoxin reductase in HeLa cells stimulated with tumor necrosis factor- $\alpha$ ". *FEBS Lett.*; **567**: 189-196.

Kim S, Ohoka N, Okuhira K, Sai K, Nishimaki-Mogami T, Naito M (2010) Modulation of RIP1 ubiquitylation and distribution by MeBS to sensitize cancer cells to tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced apoptosis. *Cancer Sci.*; **101** (11): 2425-9.

Kim, B.J., Ryu, S.W., Song, B.J. (2006) JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J Biol Chem*; **281**: 21256–21265.

Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor". *EMBO J*; **14**: 5579–88.

Korsmeyer, S.J., Wei, M.C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K.J. y Schlesinger, P.H. (2000) "Pro-apoptotic cascade activates Bid, which oligomerizes Bak or Bax into pores that result in the release of cytochrome c". *Cell Death Differ*; **7**: 1166-1173.

Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schliber, M.J., Fenton, W. Y Reed, J.C. (1993) "Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes". *Cancer Res*; **53**: 4701-4714.

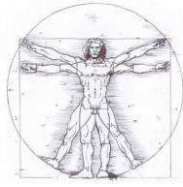
Kroemer G., Reed, J.C. (2000). "Mitochondrial control of cell death". *Nat Med* **6**: 513-519.

LaFerla, F. M. (2002) "Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*; **3**: 862-872.

Lajas A.I., Sierra V., Camello P.J., Salido G.M. y Pariente J.A. (2001). "Vanadate inhibits the calcium extrusion in rat pancreatic acinar cells". *Cell. Signal.*; **13**: 451-456.

Lam, M., Dubyak, G., y Distelhorst, C. W. (1993) "Effect of glucocorticoid treatment on intracellular calcium homeostasis in mouse lymphoma cells". *Mol. Endocrinol*; **7**: 686-693.

Landgraf G., Gellerich F.N. y Wussling M.H., (2004). "Inhibitors of SERCA and mitochondrial Ca-uniporter decrease velocity of calcium waves in rat cardiomyocytes". *Mol. Cell. Biochem.*; **256-257**: 379-386.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

Langhorst M.F., Chawarzmam N. y Guse A. H., (2004). “Ca<sup>2+</sup> release via ryanodine receptors and Ca<sup>2+</sup> entry: major mechanism in NAADP-mediated Ca<sup>2+</sup> signalling in T-lymphocytes”. *Cell Signal.*; **16**: 1283-1289.

Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S., Korsmeyer, S.J. (2002). “Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics”. *Cancer Cell* **2**: 183-192.

Levick, V., Coffey, H., y D’Mello, S. R. (1995) “Opposing effects of thapsigargin on the survival of developing cerebellar granule neurons in cultura. *Brain Res*; **676**: 325-335.

Lilliehook C, Chan S, Choi EK et al (2002) Calsenilin enhances apoptosis by altering endoplasmic reticulum calcium signaling. *Mol Cell Neurosci* **19**: 552-559.

Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*; **94**: 491–501.

Liu Y, Fiskum G, Schubert D (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem*; **80**: 780-7.

Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., y Wang, X. (1996) « Induction of the apoptotic program in cell-free extracts : Requirement for dATP and cytochrome c ». *Cell*; **86**: 147-157.

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology". *Cell* **104** (4): 487–501.

López, J.J., Camello-Almaraz, C., Pariente, J.A., Salido, G.M. y Rosado, J.A. (2005) “Ca<sup>2+</sup> accumulation into acidic organelles mediated by Ca<sup>2+</sup>- and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases in human platelets”. *Biochem J*; **390** (1): 243-252.

López, J.J., Redondo, P.C., Salido, G.M., Pariente, J.A. y Rosado, J.A. (2006) Two distinct Ca<sup>2+</sup> compartments show differential sensitivity to thrombin, ADP and vasopressin in human platelets. *Cell Signal*; **18(3)**: 373-81.

López JJ, Redondo PC, Salido GM, Pariente JA, Rosado JA. (2009) N,N,N',N'-tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine induces apoptosis through the activation of caspases-3 and -8 in human platelets. A role for endoplasmic reticulum stress. *J Thromb Haemost*; **7**: 992-9.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

López JJ, Salido GM, Gómez-Arteta E, Rosado JA, Pariente JA (2007) Thrombin induces apoptotic events through the generation of reactive oxygen species in human platelets. *J Thromb Haemost*; **5**: 1283-91.

López JJ, Salido GM, Pariente JA, Rosado JA (2009) N, N, N',N'-tetrakis(2-pyridilmethyl)ethylenediamine induces apoptosis through the activation of caspases-3 and -8 in human platelets. A role for endoplasmic reticulum stress. *J Thromb Haemost*; **7**: 992-9.

Lozzio, B.B.; Lozzio, C.B. (1979), "Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line", *Leukemia Research* **3** (6): 363–70,

Lozzio, C.B.; Lozzio, B.B. (1975), "Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome", *Blood* **45** (3): 321–34

Lytton J., Li X.F., Dong H., Kraev A., (2002). "K<sup>+</sup>-dependent Na<sup>+</sup>- Ca<sup>2+</sup> exchangers in the brain". *Ann N Y Acad Sci.*; **976**: 382-393.

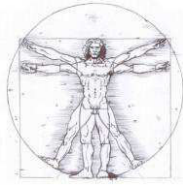
Ly Y. y Camacho P., (2004). "Ca<sup>2+</sup>-dependent redox modulation of SERCA 2b by Erp57". *J. Cell Biol.*; **164**: 35-46.

Macho, A., Hirsh, T., Marzo, I., Marchetti, P., Dallaporta, B., Susin, S. A., Zamzani, N., y Kroemer, G. (1997). Glutathione depletion is an early and calcium elevation is a late event of thymocyte apoptosis". *J. Immunol*; **158**: 4612-4619.

Mancinelli, F., Caraglia, M., Budillon, A., Abbruzzese, A., Bismuto, E. (2006) Molecular dynamics simulation and automated docking of the pro-apoptotic Bax protein and its complex with a peptide designed from the Bax-binding domain of antiapoptotic Ku70. *J Cell Biochem* **99**: 305–318.

Mandic A, Viktorsson K, Strandberg L, Heiden T, Hansson J, Linder S, Shoshan MC (2002) Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*; **22**: 3003-13.

Mao C., Kim S.H., Almenoff J.S., Rudner S.L., Kearney D.M. y Kindman L.A., (1996). "Molecular cloning and characterization of SCaMPER, a sphingolipid Ca<sup>2+</sup> release-mediating protein from endoplasmic reticulum". *Proc. Natl. Acad. Sci.*; **93**: 1993-1996.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, Nagata K, Harding HP, Ron D (2004) CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev*; **18**: 3066-77.

Martin V., Bredoux R., Corvazier E., Van Gorp R., Kovács T., Gelébart P. y Enouf J., (2002). "Three novel sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) 3 isoforms". *J. Biol. Chem.*; **277**: 24442-24452.

Mates J.M., (1999). "ROS: un estímulo inductor común en apoptosis y carcinogénesis". *Encuentros en la biología*; **55**: 1134-1496.

Matsuda T., Arakawa N., Takuma K., Kishida Y., Kawasaki Y., Sakaue M., Takahashi K., Takahashi T., Suzuki T., Ota T., Hamano-Takahashi A., Onishi M., Tanaka Y., Kameo K. y Baba A., (2001). "SEA0400, a novel and selective inhibitor of the  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger, attenuates reperfusion injury in the In Vitro and In Vivo cerebral ischemic models". *Pharmacol.*; **298**: 249-256.

Mattson, M.P., Chan, S.L. (2003) "Calcium orchestrates apoptosis". *Nature Cell Biology*; **5**: 1041 – 1043.

McCleskey, E. W. (1994). "Calcium channels: cellular roles and molecular mechanisms". *Curr. Opinion Neurobiol*; **4**: 304-312.

McConkey DJ, Chow SC, Orrenius S, Jondal M (1990) NK cell-induced cytotoxicity is dependent on a  $\text{Ca}^{2+}$  increase in the target. *FASEB J*; **4**: 2661-2664.

McConkey DJ, Harzell P, Amador-Perez JF, Orrenius SY, Jondal M (1989a) Calcium-dependent killing of immature thymocytes by stimulation via the CD3/T cell receptor complex. *J. Immunol*; **143**: 1801-1806.

McConkey DJ, Nicotera P, Hartzell P, Bellomo G, Wyllie AH, Orrenius S (1989b) Glucocorticoids activate a suicide process in thymocytes through an elevation of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. *Arch Biochem Biophys*; **269**: 365-370.

McConkey DJ, Orrenius S (1997) The role of calcium in the regulation of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*; **239**: 357-366.

McPherson P.S. y Campbell K.P., (1993). The ryanodine receptor/  $\text{Ca}^{2+}$  release channel. *J Biol Chem*; **268**: 13765-13768.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

Meyer Zu Heringdorf D, (2004) Lysophospholipi receptor-dependent and -independent calcium signaling. *J Cell Biochem*; **92**: 937-948.

Mikocka-Walus AA, Turnbull DA, Moulding NT, Wilson IG, Andrews JM, Holtmann GJ (2007). Controversies surrounding the comorbidity of depression and anxiety in inflammatory bowel disease patients: a literature review. *Inflammatory Bowel Diseases* **13** (2): 225–234.

Mikoshiha K (1993) 1,4,5-trisphosphate receptor. *Trends Pharmacol Sci*; **14**: 86-89.

Mogami H, Gardner J, Gerasimenko OV, Camello P, Petersen OH, Tepikin AV (1999) Calcium binding capacity of the cytosol and endoplasmic reticulum of mouse pancreatic acinar cells. *J Physiol*; **518**: 463-467.

Mohan S, Bustamam A, Abdelwahab SI, Al-Zubairi AS, Aspollah M, Abdullah R, Elhassan MM, Ibrahim MY, Syam S (2010) Typhonium flagelliforme induces apoptosis in CEMss cells via activation of caspase-9, PARP cleavage and cytochrome c release: Its activation coupled with G0/G1 phase cell cycle arrest. *J ethnopharmacol*; **13** (3): 592-600.

Monkawa T, Miyawaki A, Sugiyama T, Yoneshima H, Yamamoto-Hino M, Furuichi T, Saruta T, Hasegawa M, Mikoshiha K (1995) Heterotetrameric complex formation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subunits. *J Biol Chem*; **270**: 14700-14704.

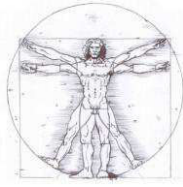
Morgado S, Granados MP, Bejarano I, López JJ, Salido GM, González A, Pariente JA (2008) Role of intracellular calcium on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pancreatic acinar AR42J cells. *J Appl Biomed*; **6**: 215-28.

Muller FL, Roberts AG, Bowman MK, Kramer DM (2003) Architecture of the Qo site of the cytochrome bc1 complex probed by superoxide production. *Biochemistry*; **42**: 6493-9.

Nakagama T, Ueda Y, Yamada H, Shores EW, Singer A, June CH (1992) In vivo calcium elevations in thymocytes with T cell receptors that are specific for self ligando. *Science*; **257**: 96-99.

Nakagawa T, Yuan J (2000) Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol*; **150**: 887-894.

Nakamura K, Bossy-Wetzel E, Burns K, Fadel MP, Lozyk M, Goping IS, Opas M, Bleackley C, Green DR, Michalak M (2000). Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *J Cell Biol* **150**:731-740.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

Negre-Salvayre A, Hirtz C, Carrera G, Cazenave R, Trole M, Salvayre R, Penicaud L, Casteilla L (1997) A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J*; **11**:809-815.

Neher, E. y Augustine, G. J. (1992) "Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells". *J Physiol*; **450**: 273-301.

Newcomb (1998) Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis. *Oncogene*; **17**: 1069-78.

Nicoll D.A., Longoni S., Philipson K.D., (1990). "Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na<sup>+</sup>- Ca<sup>2+</sup> exchanger". *Science*; **250**: 562-565.

Nicoll D.A., Hryshko L.V., Matsuoka S., Frank J.S., Philipson K.D., (1996). "Mutation of amino acid residues in the putative transmembrane segments of the cardiac sarcolemmal Na<sup>+</sup>- Ca<sup>2+</sup> exchanger". *J Biol Chem.*; **271**: 13385-13391.

Nicotera P, Orrenius S (1998) The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium*; **23**: 173-80.

Nigam S.K., Goldberg A.L., Ho S., Rohde M.F., Bush K.T. y Sherman M.Y., (1994). "A set of endoplasmic reticulum proteins possessing properties of molecular chaperones includes Ca<sup>2+</sup>-binding proteins and members of the thioredoxin superfamily". *J. Biol. Chem.*; **269**: 1744-1749.

Nomura, M., Shimizu, S., Sugiyama, T., Narita, M., Ito, T., Matsuda, H., Tsujimoto, Y. (2003) 14-3-3 interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax. *J. Biol. Chem.* **278**: 2058-2065.

Norberg E, Gogvadze V, Ott M, Horn M, Uhlén P, Orrenius S, Zhivotovsky B (2008) An increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> is required for the activation of mitochondrial calpain to release AIF during cell death. *Cell Death Differ*; **15**: 1857-64.

Norberg E, Gogvadze V, Vakifahmetoglu H, Orrenius S, Zhivotovsky B (2010) Oxidative modification sensitizes mitochondrial apoptosis-inducing factor to calpain-mediated processing. *Free Radic Biol Med*; **48**: 791-7.

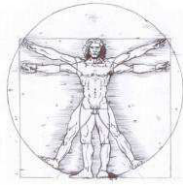
Okuda, M., Lee, H.C., Kumar, C., y Chance, B. (1992) "Comparison of the effect of a mitochondrial uncoupler, 2,4-dinitrophenol and adrenalina on oxygen radical production in the isolated perfused rat liver. *Acta Physiol Scand*; **145**: 159-168.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

- O'Rourke MG, Ellem KA (2000). "John Kerr and apoptosis". *Med. J. Aust*; **173** (11–12): 616–7.
- Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*; **4**: 552-65.
- Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S (2002) Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci USA*; **99**: 1259-63.
- Ott M, Zhivotovsky B, Orrenius S (2007) Role of cardiolipin in cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*; **14**: 1243-7.
- Ozawa, T. (1999). "Ryanodine-sensitive calcium release mechanism of rat pancreatic acinar cells is modulated by calmodulin". *Biochem. Biophys. Acta.*; **1452**: 254-262.
- Pan Z, Damron D, Nieminen AL, Bhat MB, Ma J (2000) Depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> by caffeine and ryanodine induces apoptosis of chinese hamster ovary cells transfected with ryanodine receptor. *J Biol Chem*; **275**: 19978-84.
- Pandol y Schoeffield-Payne M.S., (1987). "The agonist-sensitive calcium pool in the pancreatic acinar cells". *J. Biol. Chem.*; **262**: 16963-16968.
- Pariente J.A., Camello C., Camello P.J., y Salido G.M. (2001). "Release of calcium from mitochondrial and nonmitochondrial intracellular stores in pancreatic acinar cells by hydrogen peroxide". *J. Membr. Biol.*; **179** (1): 27-35.
- Pariente J.A., Lajas A.I., Pozo M.J., Camello P.J. y Salido G.M. (1999). "Oxidizing effect of vanadate on calcium mobilization and amylase release in rat pancreatic acinar cells". *Biochem Pharmacol.*; **58**: 77-84.
- Pariente J.A., Redondo P.C., Granados M.P., Lajas A.I., González A., Rosado J.A. y Salido G.M. (2003). "Calcium signalling in non-excitabile cells". *E. C. Qua. L.*; **1**: 29-43.
- Park M.T., Kim M.J., Kang Y.H., Choi S.Y., Lee J.H., Choi J.A., Kang C.M., Cho C.K., Kang S., Bae S., Lee Y.S., Chung H.Y. y Lee S.J., (2004). "Phytosphingosine in combination with ionizing radiation enhances apoptotic cell death in radiation-resistant cancer cells through ROS-dependent and -independent AIF release". *Blood*; **105** (4):1724-33.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

Patterson, R.L., Van Rossum, D. B., Barrow, R.K. y Snyder, S.H. (2004) "RACK1 binds to inositol 1,4,5-triphosphate receptors and mediates  $\text{Ca}^{2+}$  release". Proc. Natl. Acad. Sci.; **101**: 2328-2332.

Pedersen P.L. y Carafoli E., (1987). "Ion motive ATPase". I. Ubiquity, properties and significance for cell function". Trends Biochem. Sci.; **12**: 146-150.

Peterlin BM, Gonwa TA, Stobo JD (1984) Expression of HLA-DR by a human monocyte cell line is under transcriptional control. J Mol Cell Immunol; **1**: 191.

Petersen O.H. y Cancela J. M., (2000). "Attraction or repulsión by local  $\text{Ca}^{2+}$  signals". Curr. Biol.; **10**: R311-R314.

Pinton P, Ferrari D, Rapizzi E, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R (2001) The  $\text{Ca}^{2+}$  concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. EMBO J **20**:2690-2701.

Ratanachoo, K., Gascoyne, P.R.C. and Ruchirawat, M. (2002). Detection of cellular responses to toxicants by dielectrophoresis. BBA. **1564**: 449-458

Putney, J.W. (1986) "A model for receptor-regulated calcium entry". Cell Calcium; **7**: 1-12.

Reembold C. M., (1992). "Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle". Hsion.; **20**: 129-137.

Richter, C. (1993) "Pro-oxidants and mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ : Their relationship to apoptosis and oncogenesis". FEBS Lett; **325**: 104-107.

Rizzuto R, Brini M, Murgia M, Pozzan T (1993) Microdomains with high  $\text{Ca}^{2+}$  close to IP<sub>3</sub>-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. Science; **262**: 744-7.

Rogers TB, Inesi G, Wade R, Lederer WJ (1995). "Use of thapsigargin to study  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in cardiac cells". Biosci. Rep. **15** (5): 341-9

Roos, W.P., Kaina, B. (2006) DNA damage-induced cell death by apoptosis. Trends Mol. Med. **12**: 440-450.

Rosado JA, Lopez JJ, Gomez-Arteta E, Redondo PC, Salido GM, Pariente JA. (2006) Early caspase-3 activation independent of apoptosis is required for cellular function. J Cell Physiol; **209** (1):142-52.





## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

Rosado JA, López JJ, Harper AG, Harper MT, Redondo PC, Pariente JA, Sage SO, Salido GM (2004) Two pathways for store-mediated calcium entry differentially dependent on the actin cytoskeleton in human platelets. *J Biol Chem*; **279**: 29231-5.

Rosado J.A, Redondo PC, Sage SO, Pariente JA, Salido GM (2005a) Store-operated  $Ca^{2+}$  entry: vesicle fusion or reversible trafficking and de novo conformational coupling? *J Cell Physiol*; **205** (2):262-9.

Rosado JA, Redondo PC, Salido GM, Sage SO, Pariente JA (2005b) Cleavage of SNAP-25 and VAMP-2 impairs store-operated  $Ca^{2+}$  entry in mouse pancreatic acinar cells. *Am J Physiol Cell Physiol*; **288**(1):C214-21.

Rosado JA, Sage SO (2000) Regulation of plasma membrane  $Ca^{2+}$ -ATPase by small GTPases and phosphoinositides in human platelets. *J Biol Chem*; **275**: 19529-19535.

Rotonda J, Nicholson DW, Fazil KM, Gallant M, Gareau Y, Labelle M, Peterson EP, Rasper DM, Ruel R, Vaillancourt JP, Thornberry NA, Becker JW (1996) The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol*; **3**: 619-25.

Sage SO (1992). Three routes for receptor-mediated  $Ca^{2+}$  entry. *Curr Biol*; **2**: 312-314.

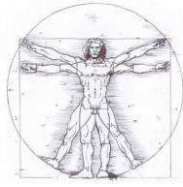
Salvesen GS, Dixit VM. (1997) Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*; **91**: 443-6.

Sargeant P, Sage SO (1994) Calcium signalling in platelet and other nonexcitable cells. *Pharmac Ther*; **64**: 395-443.

Santella L, Kyojuka K, Genazzani AA, De Riso L, Carafoli E (2000) Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate-induced  $Ca^{2+}$  release. Interactions among distinct  $Ca^{2+}$  mobilizing mechanisms in starfish oocytes. *J Biol Chem*; **275**: 8301-8306.

Sato C, Hamada K, Ogura T, Miyazawa A, Iwasaki K, Hiroaki Y, Tani K, Terauchi A, Fujiyoshi Y, Mikoshiba K (2004) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor contains multiple cavities and L-shaped ligand-binding domains. *J Mol Biol*; **336**: 155-164.

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* **17**: 1675-1687.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, Korsmeyer SJ (2003) BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ : a control point for apoptosis. *Science*; **300**: 135-9.

Sharma V, Delgado M, Ganea D (2006) Granzyme B, a New Player in Activation-Induced Cell Death, Is Down-Regulated by Vasoactive Intestinal Peptide in Th2 but Not Th1 Effectors. *Journal of Immunology*; **176**: 97-110.

Shi Y (2002) Apoptosome: The cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure*; **10**: 285-8.

Shind DW, Pan A, Kim EK, Lee JM, Bhat MB, Parness J, Kim o H, Ma J (2003) A retrograde signal from calsequestrin for the regulation of store-operated  $Ca^{2+}$  entry in skeletal muscle. *J Biol Chem*; **278**: 3286-3292.

Siripin D, Fucharoen S, Tanyong DI (2011) Nitric oxide and caspase 3 mediated cytokine induced apoptosis in acute leukemia. *Asian Pac J Allergy Immunol*; **29** (1):102-11.

Smith CA, Williams GT, Kingston R, Jenkinson EJ, Owen JJ (1989) Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature*; **337**(6203):181-4.

Springer JE, Azbill RD, Nottingham SA, Kennedy SE (2000) Calcineurin-mediated BAD dephosphorylation activates the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *J Neurosci*; **20**: 7246-51.

Starkov, A.A. y Fiskum, G. (2003) "Regulation of brain mitochondrial  $H_2O_2$  production by membrana potencial and NAD(P)H redox state. *J Neurochem*; **86**: 1101-1107.

Streb H., Irvine R.F., Berridge M.J., Schulz I., (1983). "Release of  $Ca^{2+}$  from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature*; **203**: 67-69.

Strehler E.E. y Zacharias D.A. (2001). "Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps". *Physiol. Rev.*; **81**: 21-50.

Sudhof T.C., Newton C.L., Archer B.T., Ushkaryov V. Y Mignery G.A., (1991). "Structure of a novel  $IP_3$  receptor". *EMBO J.*; **10**: 3199-3206.

Sugimoto, K, K. Yamada, M. Egashira, Y. yazaki, H. Hirai, A. Kikuchi and K. Oshimi, (1998). "Temporal and Spatial Distribution of DNA Topoisomerase II Alters During Proliferation, Differentiation, and Apoptosis in HL-60 Cells". *Blood*, **91**:4, 1407-1417.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

Sundstrom C, Nilsson K (1976) Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937) *Int J Cancer*; **17**: 565.

Suzuki, Y.J., Forman, H.J. y Sevanian, A. (1997) Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* **22**, 269-285.

Swardfager W, Lanctôt K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N (2010). "A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease". *Biol Psychiatry* **68** (10): 930–941.

Takahashi A., Masuda A., Sun M., Centone V.E. y Herman B., (2004). "Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2 dependent alterations in mitochondrial pH (pH<sub>m</sub>)". *Brain Res. Bull.*; **62**: 497-504.

Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW. (1997). "A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis". *J Biol Chem.*; **272** (29):17907-11.

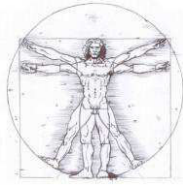
Trubiani, O., Recchioni, R., Moroni, F., Pizzicannella, J., Caputi, S. y Di Primio, R. (2005) Melatonin provokes cell death in human B-lymphoma cells by mitochondrial-dependent apoptotic pathway activation. *J. Pineal Res*; **39**: 425-431.

Tsien R.W., Lipscombe D., Madison D., Bley K. y Fox A., (1995). "Reflections on Ca<sup>2+</sup>-channel diversity". *Trends in neurosciences.*; **18**: 52-54.

Tsuruta, F., Sunayama, J., Mori, Y., Hattori, S., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., Yoshioka, K., Masuyama, N., Gotoh, Y. (2004) JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J*; **23**: 1889–1899.

Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*; **552**: 335-44.

Uğuz AC, Naziroğlu M, Espino J, Bejarano I, González D, Rodríguez AB, Pariente JA (2009) Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and caspase-3 and -9 activities. *J Membr Biol*; **232** (1-3): 15-23.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

Umansky V., Rocha M., Beitzkreutz R., Hehner S.P., Bueur M., Erbe N., Dröge W. y Ushmorov A., (2000). "Glutathione is a factor of resistance of Jurkat leukemia cells to nitric oxide-mediated apoptosis". *J. Cell. Biochem.*; **78**: 578-587.

Verkhatsky A (2007) Calcium and cell death. *Subcell Biochem*; **45**: 465-80.

Vermassen E., Fissore R.A., Nadif Kasri N., Vanderheyden V., Callewaert G., Missiaen L., Parys J.B. y De Smedt H., (2004). "Regulation of the phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by protein kinase C". *Biochem Biophys Res. Commun.*; **319**: 888-893.

Vindis C, Elbaz M, Escargueil-Blanc I, Augé N, Heniquez A, Thiers JC, Nègre-Salvayre A y Salvayre R (2005) Two distinct calcium-dependent mitochondrial pathways are involved in oxidized LDL-induced apoptosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; **25**: 639-45.

Wajant H (2002). "The Fas signaling pathway: more than a paradigm". *Science* **296** (5573): 1635–6.

Wallach D, Kovalenko AV, Varfolomeev EE, Boldin MP. (1998) Death-inducing functions of ligands of the tumor necrosis factor family: a Sanhedrin verdict. *Curr Opin Immunol*; **10**: 279-88.

Wictome M., Henderson I., Lee A.G. y East J.M. (1992). "Mechanism of inhibition of calcium pump of sarcoplasmic reticulum by thapsigargin". *Biochem. J.*; **283**: 525-529.

Wilson H.L. y Galione A., (1998). "Differential regulation of nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate and cADP-ribose production by cAMP and cGMP". *Biochem J.*; **331**: 837-843.

Wyllie, A.H. (1980) "Glucocorticoid induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation". *Nature*; **284**: 555-6.

Wood DE, Newcomb EW (1999) Caspase-dependent activation of calpain during drug-induced apoptosis. *J Biol Chem*; **274**: 8309-15.

Wood DE, Newcomb EW (2000) Cleavage of Bax enhances its cell death function. *Exp Cell Res*; **256**: 375-82.

Woods N.M., Cuthbertson K.R. y Cobbold P.H., (1986). "Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes". *Nature* Vol; **319**: 600-602.

Wright SC, Schellenberger U, Ji L, Wang H, Larrick JW (1997) Calmodulin-dependent protein kinase II mediates signal transduction in apoptosis. *FASEB J*; **11**: 843-9.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

Wullaert A, Heyninck K, Beyaert R (2006) Mechanisms of crosstalk between TNF-induced NF-kappaB and JNK activation in hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **72**: 1090–1101.

Wuytack, F., Raeymaekers, L., De Smedt, H, Eggermont, J. A., Missiaen, L., Van Den Bosch, L., De Jaegere, S., Verboomen, H., Plessers, L. Y Casteels, R. (1992). “Ca<sup>2+</sup>-transport ATPases and their regulation in muscle and brain”. *Ann. N. Y. Acad Sci.*; **671**: 82-91.

Wuytack F., Raeymaekers L. y Missiaen L., (2003). “PMR1/SPCA Ca<sup>2+</sup> pumps and the role of the Golgi apparatus as a Ca<sup>2+</sup> store”. *Pflugers Arch.* Vol; **446**: 148-153.

Yim Y., Sannerud R., Flatmark T. y Saraste J., (2003). “Colocalization of Ca<sup>2+</sup>-ATPase and GRP94 with p58 and the effects of thapsigargin on protein recycling suggest the participation of the pre-Golgi intermediate compartment in intracellular Ca<sup>2+</sup> storage”. *Eur. J. Cell Biol.*; **81**: 469-483.

Yokouchi, M., Hiramatsu, N., Hayakawa, K., Okamura, M., Du. S., Kasai, A., Takano, Y., Shitamura, A., Shimada, T., Yao, J. y Kitamura, M. (2008) “Involvement of selective reactive oxygen species upstream of proapoptotic branches of unfolded protein response”. *J Biol Chem.*; **283** (7): 4252-60.

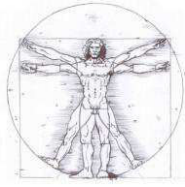
Yoshimori T, Yamamoto A, Moriyama Y, Futai M, Tashiro Y (1991) Bafilomycin A<sub>1</sub>, a specific inhibitor of vascular-type H<sup>+</sup>-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J Biol Chem*; **266**: 17707-17712.

Yuan JY, Shaham S, Ledoux S, Ellis MH, Horvitz RH (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 b converting enzyme. *Cell*; **75**: 641-52.

Zamzani N, Kroemer G (2001) The mitochondrion in apoptosis: how Pandora’s box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol*; **2**: 67-71.

Zhang Y, Marcillat O, Giulivi C, Ernster L, Davies KJ (1990) The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J Biol Chem*; **265**: 16330–6.

Zhao Y, Ding WX, Qian T, Watkins S, Lemasters JJ, Yin XM (2003) Bid activates multiple mitochondrial apoptotic mechanisms in primary hepatocytes after death receptor engagement. *Gastroenterology*; **125**: 854–867.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

Zhu W, Cowie, A, Wasfy GW, Penn LZ, Leber B, Andrews DW (1996) Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal patially distinct pathways for apoptosis in different cell types. *EMBO J*; **15**: 4130-4141.

ZhuGe R, Fogarty KE, Baker SP, McCarron JG, Tuft RA, Lifshitz LM, WalshJr JV, (2004) Ca<sup>2+</sup> spark sites in smooth muscle cells are numerous and differ in number of ryanodine receptors, BK channels and coupling ratio between them. *Am J Physiol*; **287** (6): C1577-88.

Zuppini A, Navazio L, Mariani P (2004) Endoplasmic reticulum stress-induced programmed cell death in soybean cells. *J Cell Sci*; **117**: 2591-8.