



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Instituto de Fisiología Experimental

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas



Alteraciones hepatocelulares inducidas por estrés oxidativo: bases moleculares y papel de las cascadas de señalización.

Autor: Lic. Biot. Leonardo Martín Pérez

Tesis para optar al título de *Doctor en Ciencias Biológicas*

Director: Dr. Marcelo Gabriel Roma

Co-Director: Dr. Enrique Juan Sánchez Pozzi

*“Todos somos científicos cuando
somos niños, pero al crecer, sólo
algunos conservan un poco de
esa curiosidad que es la madre
de la ciencia”*

*Juan Aguilar.
Biólogo teórico*

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Marcelo G. Roma y al Dr. Enrique J. Sánchez Pozzi por brindarme la posibilidad de realizar este trabajo, por su constante preocupación y apoyo durante el transcurso del mismo, por su calidad humana, por confiar en mi criterio y por haberme permitido trabajar con libertad, extendiendo su amistad más allá de los límites del laboratorio.

A todos los integrantes del Instituto de Fisiología Experimental, por los gratos momentos compartidos tanto dentro como fuera del ámbito laboral, por demostrarme constantemente su preocupación, por ayudarme en forma desinteresada en la labor diaria y por su incontable apoyo.

A todos los profesionales del Área Química Analítica, por aconsejarme en mis emprendimientos, por incitarme a la búsqueda del conocimiento e inducirme en la tarea docente, por darme la libertad suficiente para dejarme aprender mucho más allá de la docencia, y ofrecerme su incondicional amistad.

A mis amigos, a todos aquellos que de una u otra manera siempre han estado a mi lado compartiendo momentos indispensables e inolvidables de mi vida, soportando mis manías, mis buenos y malos momentos, por entenderme y preocuparse, comprenderme y ayudarme, por ser sinceros, austeros e ilimitadamente fieles.

A mis queridos padres, Marta y Andrés, a mi increíble hermano Lisandro, y a mi adorada familia, por apoyarme, comprenderme y acompañarme siempre, soportando y resistiendo cada paso de mi vida, cuidándome con cautela y alentándome en mis derrotas y en mis glorias con la misma increíble fuerza de los primeros pasos, artífices principales de mi presente, ya que sin ellos, nada de esto hubiera sido posible.

A todos ellos, les expreso mi más cálida y sincera gratitud...

Parte de los resultados que se describen en este trabajo de tesis fueron publicados como artículos originales en las siguientes revistas científicas:

- **Pérez LM**, Milkiewicz P, Elias E, Coleman R, Sánchez Pozzi EJ, Roma MG. (2006). Oxidative stress induces internalization of the bile salt export pump, Bsep, and bile salt secretory failure in isolated rat hepatocyte couplets: a role for Protein Kinase C and prevention by Protein Kinase A. *Toxicol. Sci.* 91 (1): 150-158 (ISSN: 1096-0929; Editorial: Oxford University Press, Gran Bretaña).
- **Pérez LM**, Milkiewicz P, Ahmed-Choudhury J, Elias E, Ochoa JE, Sánchez Pozzi EJ, Coleman R, Roma MG. (2006). Oxidative stress induces actin-cytoskeletal and tight-junctional alterations in hepatocytes by a Ca^{2+} -dependent, PKC-mediated mechanism: protective effect of PKA. *Free Rad. Biol. Med.* 40 (11): 2005-2017 (ISSN: 0891-5849, Editorial: Elsevier Science, EE.UU.).

Parte de los resultados que se describen en este trabajo de tesis han sido dados a conocer previamente en las siguientes reuniones científicas y publicados en forma de resúmenes en las revistas científicas indicadas a continuación:

- **Pérez LM**, Ochoa JE, Sánchez Pozzi EJ, Roma MG. Radicales libres del oxígeno (RLOs) como moléculas de señalización hepatocelular: PKC media la desorganización de actina inducida por *tert*-butilhidroperóxido (*t*BOOH) sin modificar la producción de RLO. *XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Noviembre 19-22, 2003. Medicina* 63 (5/2): 574, 2003. (ISSN:0025-7680; Editorial: Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Argentina).
- **Pérez LM**, Ochoa JE, Basiglio CL, Sánchez Pozzi EJ, Roma MG. Reactive oxygen species (ROS) as signaling molecules in hepatocytes: PKC mediates *tert*-butylhydroperoxide (*t*BOOH)-induced actin cytoskeletal disorganization without affecting *t*BOOH-induced ROS formation. *12th Biennial Meeting of the International Association for the Study of the Liver (IASL). Salvador (Bahía), Brasil, Marzo 2004. Liver Int.* 24 (4): 27, 2004. (ISSN:1478-3223; Editorial: Blackwell Publishing Inc., Gran Bretaña).
- **Pérez LM**, Ochoa JE, Basiglio CL, Sánchez Pozzi EJ, Roma MG. Reactive oxygen species (ROS) as signaling molecules in hepatocytes: *tert*-butyl hydroperoxide (*t*BOOH) induces actin cytoskeleton disorganization by a PKC-mediated, Ca^{2+} -dependent

mechanism. *12th Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International (SFRR)*. Buenos Aires, Mayo 5-9, 2004. *Free Rad. Biol. Med.* 36 (1): S112, 2004. (ISSN:0891-5849; Editorial: Elsevier Science Limited, EE.UU.).

- **Pérez LM**, Ochoa JE, Sánchez Pozzi EJ, Roma MG. *tert*-Butilhidroperóxido (tBOOH) induce estrés oxidativo (EO) en hepatocitos por un mecanismo Ca^{2+} -calmodulina dependiente, vía formación de poros de transición de permeabilidad mitocondrial. *Congreso Conjunto de Sociedades Biomédicas, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Noviembre 16-20, 2004. Medicina* 64 (Supl. II): 186-187. Buenos Aires, 2004. (ISSN:0025-7680; Editorial: Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Argentina).
- **Pérez LM**, Ochoa JE, Sánchez Pozzi EJ, Roma MG. Ca^{2+} elevation exacerbates oxidative stress (OS)-induced hepatocellular damage by facilitating formation of mitochondrial permeability transition pore (MPTP), via Ca^{2+} -calmodulin (Ca-CM). *XXV Congreso de Gastreenterologia e Endoscopia Digestiva, Vilamoura, Portugal. Junio 8-11, 2005. GE-Jornal Português de Gastreenterologia* 12 (3): 85, 2005. (ISSN:0872-8178; Editorial: Sociedade Portuguesa de Gastreenterologia, Portugal).
- Roma MG, **Pérez LM**, Ochoa JE, Sánchez Pozzi EJ. Las elevaciones de calcio intracelular exacerbaban el daño hepatocelular inducido por estrés oxidativo facilitando la formación de poros de transición de permeabilidad mitocondrial vía calcio-calmodulina. *XIII Congreso Argentino de Hepatología, Buenos Aires, Argentina. Junio 10-13, 2005. Acta Gastroenterológica Latinoamericana* 35 (Supl. II): S60. Buenos Aires, 2005. (ISSN:0300-9033; Editorial: Sociedad Argentina de Gastroenterología, Argentina).
- **Pérez LM**, Ochoa JE, Sánchez Pozzi EJ, Roma MG. Ca^{2+} -calmodulina (CM) facilita la formación de poros de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPM) inducidos por estrés oxidativo vía activación de proteína quinasa II (PKII). *50^o Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Nov. 29 - Dic. 2, 2005. Medicina* 65 (Supl. II): 89-90. Buenos Aires, 2005. (ISSN:0025-7680; Editorial: Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Argentina).
- **Pérez LM**, Ochoa JE, Sánchez Pozzi EJ, Roma MG. Calcium-dependent protein kinases in oxidative stress-induced mitochondrial permeability transition. *31st FEBS Congress – Molecules in Health and Diseases. Estambul, Turquía, Junio 24-29, 2006. FEBS Journal* 273 (1): 148 (pp-265), 2006. (ISSN: 1742-464X; Editorial: Blackwell Publishing Inc., Gran Bretaña).

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS	V
RESUMEN	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Estrés oxidativo	1
1.1.1. Generalidades	1
1.1.2. Sistemas pro y antioxidantes endógenos	2
1.2. Mecanismos fisiológicos de generación de estrés oxidativo	5
1.2.1. Generación de estrés oxidativo de origen mitocondrial	5
1.2.2. Enzimas redox como fuente de estrés oxidativo	6
1.2.3. Otras fuentes endógenas de estrés oxidativo	6
1.3. Estrés oxidativo y transducción de señales	7
1.3.1. Alteración de la homeostasis de Ca ²⁺ inducida por estrés oxidativo	8
1.3.2. Activación de moduladores de señal inducida por estrés oxidativo en hepatocitos	9
1.4. Mecanismos de daño hepatocelular por estrés oxidativo	11
1.4.1. Formación de poros de transición de permeabilidad mitocondrial	11
1.4.1.1. Componentes del PTPM	12
1.4.1.2. Regulación del PTPM	14
1.4.2. Lipoperoxidación de membranas	17
1.4.3. Alteración del citoesqueleto de actina	18
1.4.4. Alteración de las uniones estrechas paracelulares	20
1.4.5. Alteración de proteínas	21
1.4.6. Genotoxicidad	22
1.5. Importancia fisiopatológica del estrés oxidativo en hepatopatías	23
1.6. Métodos experimentales para el estudio del estrés oxidativo	24
1.6.1. Quinonas redox	24
1.6.2. <i>tert</i> - Butil hidroperóxido (tBOOH)	25
1.7. Mecanismos fisiológicos de formación de bilis	27
1.7.1. Generalidades	27
1.7.2. Transporte hepatocelular de sales biliares (SB)	27
1.7.3. Papel de las uniones estrechas intercelulares	29
1.7.4. Efectos de las alteraciones sobre el citoesqueleto de actina	30
1.7.5. Efectos del estrés oxidativo sobre los mecanismos de secreción biliar	31

2.	OBJETIVOS	32
2.1.	Objetivos generales	32
2.2.	Objetivos particulares	32
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1.	Reactivos químicos	33
3.2.	Animales de experimentación	33
3.3.	Aislamiento de hepatocitos	33
3.4.	Tratamientos	34
3.5.	Métodos analíticos	36
3.5.1.	Determinación de la viabilidad hepatocelular	36
3.5.1.1.	Ensayo de exclusión de azul tripán	36
3.5.1.2.	Determinación de la liberación de LDH al medio	36
3.5.2.	Determinación del contenido celular de ATP	37
3.5.3.	Determinación del glutation total (GSht) y oxidado (GSSG)	37
3.5.4.	Evaluación del estrés oxidativo inducido por tBOOH	38
3.5.5.	Medición de la concentración intracelular de Ca ²⁺ ([Ca ²⁺] _i)	39
3.5.6.	Medición del potencial de permeabilidad de membrana mitocondrial (Δψ _m) en hepatocitos intactos	39
3.6.	Aislamiento, enriquecimiento y cultivo de duplas aisladas de hepatocitos de rata (DAHR)	40
3.6.1.	Determinación de la función canalicular	41
3.6.2.	Estudios de localización de F-actina, ZO-1 y Bsep	43
3.7.	Evaluación del “blebbing” de la membrana plasmática	43
3.8.	Determinación de PKCα en membranas celulares	44
3.9.	Análisis de imágenes	44
3.10.	Análisis estadísticos	45
4.	RESULTADOS	46
4.1.	Caracterización del estrés oxidativo inducido por tert-butil hidroperóxido (tBOOH)	46
4.2.	Activación de PKC inducida por tBOOH	48
4.3.	Efecto de tBOOH sobre la función secretora de sales biliares	48
4.4.	Efecto de tBOOH sobre la integridad del citoesqueleto de actina	49
4.4.1.	Estudios de “blebbing”	49
4.4.2.	Integridad celular de F-actina	50
4.5.	Mediación de PKC en las alteraciones inducidas por tBOOH sobre el citoesqueleto de actina	51

4.6.	Rol contrarregulatorio de PKA sobre las alteraciones al citoesqueleto de actina inducidas por tBOOH	52
4.7.	Reversión del “blebbing” inducido por tBOOH por inhibición de PKC o activación de PKA	55
4.8.	Prevención de la alteración de la integridad de las uniones paracelulares inducida por tBOOH por inhibición de PKC y activación de PKA	55
4.8.1.	Cambios en la distribución de ZO-1	56
4.8.2.	Pruebas funcionales de la integridad de barrera de las uniones estrechas paracelulares	57
4.9.	Prevención de la internalización de Bsep inducida por tBOOH por inhibición de PKC y activación de PKA	59
4.9.1.	Cambios en la distribución intracelular de Bsep	59
4.9.2.	Actividad de transporte de Bsep	61
4.9.3.	Reversión de las alteraciones de la actividad de transporte de Bsep inducidas por tBOOH	63
4.10.	Efecto de los moduladores de señalización sobre la generación de estrés oxidativo y el aumento en los niveles de Ca²⁺ inducidos por tBOOH	63
4.11.	Efecto de los moduladores de señalización sobre el componente de estrés oxidativo de origen mitocondrial inducido por tBOOH	65
4.11.1.	Dosis-dependencia de la generación de PTPM inducida por tBOOH y su efecto sobre los niveles de lipoperoxidación	66
4.11.2.	Papel del Ca ²⁺ en la generación de estrés oxidativo de origen mitocondrial inducido por tBOOH	67
4.12.	Mediadores involucrados en el efecto facilitador del Ca²⁺ en la generación de estrés oxidativo de origen mitocondrial inducido por tBOOH	68
4.12.1.	Proteína quinasa C (PKC)	69
4.12.2.	Calpaínas	69
4.12.3.	Calmodulina (CaM)	70
4.13.	Mediadores del efecto facilitador de CaM en la generación de estrés oxidativo de origen mitocondrial inducido por tBOOH	72
4.13.1.	Calcineurina	72
4.13.2.	Proteína quinasa II dependiente de CaM (CaMKII)	73
5.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	75

5.1.	Caracterización del estrés oxidativo inducido por tBOOH en células hepáticas	75
5.2.	Alteraciones de la organización y la función secretora hepatocanalicular inducidas por tBOOH	76
5.3.	Modulación por PKC de los daños a la organización y la función hepatocanalicular inducidos por tBOOH	78
5.4.	Regulación del estrés oxidativo de origen mitocondrial por señalización intracelular	82
	BIBLIOGRAFÍA	88

ABREVIATURAS

ANT	translocador de nucleótidos de adenina
ASB	albúmina sérica bovina
AVc	acumulación en la vacuola canalicular
BAPTA/AM	1,2- <i>bis</i> -(<i>o</i> -aminofenoxi)-eteno- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetato tetrakis-(acetometil éster)
CaM	calmodulina
CaMKII	proteína quinasa de tipo II dependiente de CaM
CaMKIV	proteína quinasa de tipo IV dependiente de CaM
CaMKV	proteína quinasa de tipo V dependiente de CaM
CCCP	cianuro de carbonilo 3-clorofenilhidrazona
CLF	colil-lisil-fluoresceína
CMZ	calmidazolium
CsA	ciclosporina A
c.s.p.	cantidad suficiente para
CYP-450	citocromo P-450
CyP-D	ciclofilina D
DAHR	duplas aisladas de hepatocitos de rata
DB-AMPC	N ⁶ ,2'- <i>O</i> -dibutiriladenosina 3':5'-monofosfato sódico cíclico
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DCFH-DA	diacetato de 2',7'-diclorofluorescina
DMSO	dimetil sulfóxido
DPPD	<i>N,N'</i> -difeníl- <i>p</i> -fenilendiamina
EE	error estándar
EGTA	ácido etilén glicol-bis(2-aminoetiléter)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacético
SP	estaurosporina
F	intensidad de fluorescencia
FITC	faloidina marcada con isotiocianato de fluoresceína
Fura-2/AM	Fura-2 pentakis(acetometil) éster
GSH	glutation
GSHt	glutation total
GSSG	glutation oxidado
H7	1-(5-isoquinolinilsulfonil)-2-metil-piperazina
HK II	hexoquinasa
<i>i.p.</i>	intra peritoneal

LDH	lactato deshidrogenasa
LPO	lipoperoxidación
L-15	medio de cultivo Leibovitz-15
MARCKS	substratos de quinasa C miristoilados ricos en alanina
MDA	malondialdehído
mtCK	creatina quinasa mitocondrial
PBS	buffer fosfato salino
PBR	receptor de benzodiazepinas
PKA	proteína quinasa A
PKC	proteína quinasa C
PTPM	poros de transición de permeabilidad mitocondrial
ρ/v	peso en volumen
R	relación de intensidades de fluorescencia
R.E.	retículo endoplasmático
ROS	radicales libres del oxígeno
RVc	retención en la vacuola canalicular
S.F.	solución fisiológica
SSA	ácido sulfosalicílico
rpm	revoluciones por minuto
TBARS	substancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
<i>t</i> BOOH	<i>tert</i> -butil hidroperóxido
TCA	ácido tricloroacético
TEA	tri-etanolamina
TFP	trifluoperazina
TMRM	tetra-metil-rodamina metil-éster
VDAC	canal aniónico dependiente de voltaje
v/v	volumen en volumen
$\Delta\psi_m$	potencial de membrana mitocondrial

RESUMEN

Numerosas patologías hepáticas poseen un componente oxidativo como parte de su mecanismo de daño tisular. El estrés oxidativo eleva los niveles citosólicos de Ca^{2+} y puede, potencialmente, activar una serie de eventos de señalización induciendo cambios morfológicos y funcionales que conducen, en última instancia, a la muerte celular. La comprensión de estos procesos es de suma importancia, ya que puede promover el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas con capacidad para prevenir, o mejor aún, revertir los daños al tejido hepático inducidos por estrés oxidativo. En este trabajo de tesis, se demostró la participación de proteína quinasa C (PKC) dependiente de Ca^{2+} en la disfunción biliar, y en la desorganización del citoesqueleto de actina y de las uniones estrechas, inducidos por el pro-oxidante modelo *tert*-butil hidroperóxido ($t\text{BOOH}$), utilizando el modelo de duplas aisladas de hepatocitos de rata. $t\text{BOOH}$ (100 μM , 15 min) elevó los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS), indicado por el aumento en la lipoperoxidación (+186%, $p < 0,05$) y la producción ROS-dependiente de 2',7'-diclorofluoresceína (+36%, $p < 0,05$). A su vez, generó un aumento en la concentración citosólica de Ca^{2+} (+100%, $p < 0,05$), y estimuló la translocación a membrana de la isoforma dependiente de Ca^{2+} de PKC PKC α como parámetro de su activación (+79%, $p < 0,05$). También, se observó una reducción en el número de duplas capaces de acumular y de retener (aprox. -50% en ambos parámetros, $p < 0,05$) en su vacuola canalicular el análogo fluorescente de sal biliar colil-lisil fluoresceína (CLF). Estos eventos se acompañaron de internalización de la bomba exportadora de sales biliares Bsep, redistribución de la proteína asociada a uniones estrechas ZO-1, desorganización de F-actina y formación de protrusiones de membrana (+285%, $p < 0,01$), este último un marcador precoz del daño estructural al citoesqueleto. Todos estos eventos fueron completamente prevenidos por el quelante de Ca^{2+} intracelular BAPTA/AM (20 μM), los inhibidores panespecíficos de PKC H7 (100 μM) y SP (10 μM), el inhibidor de isoformas de PKC dependientes de Ca^{2+} Gö6976 (2 μM) y el activador de PKA DB-AMPc (500 μM); PKA frecuentemente contrarregula los efectos de PKC. Por otro lado, una dosis mayor de $t\text{BOOH}$ (500 μM , 15 min) indujo despolarización mitocondrial (aprox. +80%, $p < 0,01$), fenómeno asociado a la apertura de poros de transición de permeabilidad (PTPM), y aumento en la producción de ROS de origen mitocondrial (+1000% en los niveles de lipoperoxidación, $p < 0,01$). Estos eventos fueron prevenidos (aprox. -30%, $p < 0,05$) por el quelante de Ca^{2+} intracelular BAPTA/AM (50 μM), por los inhibidores de CaM W7 (100 μM) o trifluoperazina (TFP, 10 μM) y por el inhibidor de CaMKII KN-62 (10 μM); el nivel de prevención alcanzado fue similar al obtenido con el bloqueante de PTPM CsA (5 μM), indicando que la exacerbación del daño hepatocelular oxidativo, vía formación de PTPM, se encuentra mediada por la vía citosólica de señalización Ca^{2+} -CaM-CaMKII. En conclusión, estos resultados indican que los ROS pueden ejercer efectos deletéreos en el hepatocito activando cascadas de transducción de señal, y no sólo actuando como efectores directos del daño oxidativo.

1. INTRODUCCIÓN

*“En el campo de la observación,
la oportunidad sólo favorece
a la mente preparada.”*

*Louis Pasteur (1822-1895).
Químico y biólogo francés.*

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ESTRÉS OXIDATIVO

1.1.1. Generalidades

El estrés oxidativo se define como el resultado de un desbalance entre diferentes agentes pro-oxidantes y los sistemas de defensa naturales de un organismo (antioxidantes), situación que genera, a menudo de manera irreversible, daño a la integridad celular (Fig. 1).

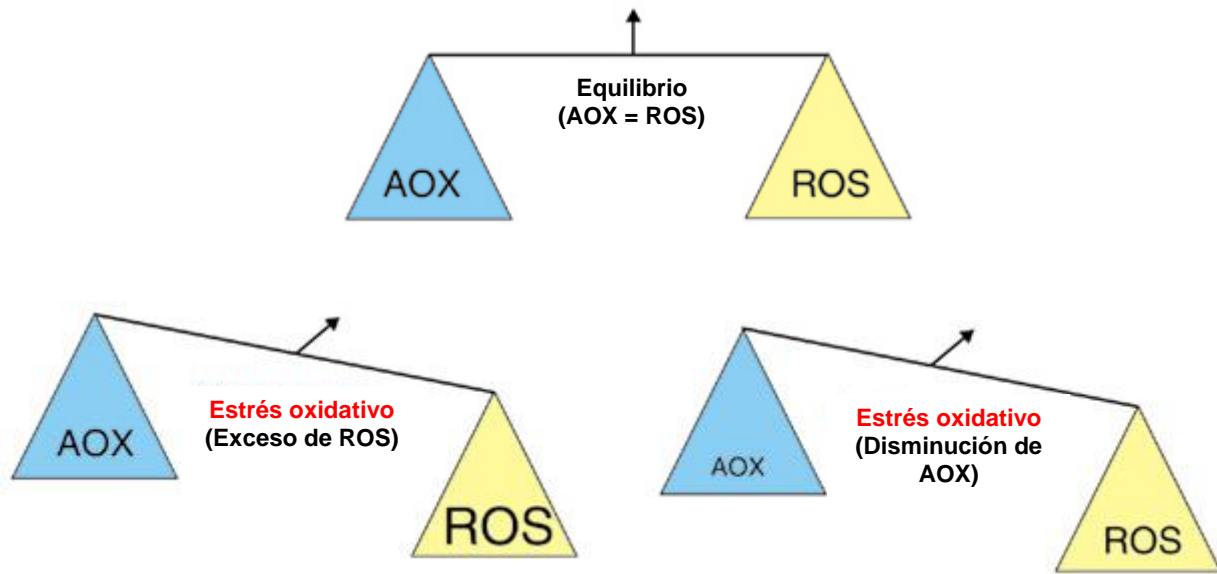


Figura 1. Definición de estrés oxidativo. AOX = reservas antioxidantes; ROS = radicales libres del oxígeno.

En condiciones fisiológicas normales, la utilización del oxígeno como parte del metabolismo aeróbico de las células genera metabolitos reactivos que, de no ser debidamente neutralizados por los sistemas antioxidantes endógenos, pueden ser potencialmente dañinos. Algunas de estas especies tienen funciones fisiológicas (por ej., en la respuesta inmune), y su producción es un factor importante en diversas funciones celulares, mientras se mantengan en niveles limitados (Gamaley y Kluybin, 1999). Sin embargo, la regulación de su generación es fundamental para evitar patologías, ya que el aumento excesivo en los niveles de radicales libres del oxígeno (ROS) siempre se acompaña de lesión tisular. Esta situación de estrés oxidativo no balanceado puede darse por una disminución de las defensas antioxidantes (por ej., por acción de un xenobiótico) o por un incremento en la generación de especies reactivas (por ej., en presencia de toxinas oxidantes *per se*, o que, al metabolizarse generan radicales) (Gutteridge y Halliwell, 1999). Asimismo, el estrés oxidativo tiene una contribución significativa en el desarrollo de un elevado número de patologías, como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la artritis reumatoidea y en el fenómeno de isquemia-reperfusión en trasplante de órganos. En este último caso, se verifica la *paradoja del oxígeno*, donde el aporte de oxígeno restituido durante la reperfusión no disminuye el daño tisular sino que lo

incrementa, participando en dicho fenómeno reacciones de oxidación de proteínas y lipoperoxidación (Gutteridge y Halliwell, 1999). El grado de daño celular como consecuencia del estrés oxidativo parece incrementarse en los organismos a medida que envejecen, lo cuál ha llevado a postular que el estrés oxidativo sería un factor primario en el envejecimiento o senescencia (Lenaz, 1998; Finkel y Holbrook, 2000). Finalmente, en el campo de la hepatología, el estrés oxidativo parece ser un factor fundamental en la progresión a cirrosis de la esteatohepatitis tanto alcohólica como no alcohólica, en el síndrome colestásico y en patologías que cursan con acumulación de metales pesados (ver ítem 1.5 para más detalles).

1.1.2. Sistemas pro y antioxidantes endógenos

Las especies reactivas del oxígeno son moléculas químicas con capacidad de actuar como agentes oxidantes y/o ser fácilmente convertidas a radicales libres (moléculas inestables con un electrón desapareado que las hace altamente reactivas). Entre las especies que se generan principalmente a nivel fisiológico, se encuentran el anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), el radical hidroxilo (HO^{\bullet}), el oxígeno singlete (1O_2) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Finkel, 1998). Estos radicales libres pueden reaccionar en el medio ambiente en donde se generan con una variedad de sustratos biológicos (lípidos, proteínas, ADN, glucosa, componentes de la membrana celular, factores de transcripción, etc.) y, a su vez, actuar como segundos mensajeros intracelulares a nivel molecular, pudiendo potencialmente afectar el desarrollo de varias patologías (Finkel, 1998) (Fig. 2).

Para protegerse del efecto tóxico de estos pro-oxidantes endógenos derivados del oxígeno, las células han desarrollado sistemas de defensa que regulan la producción de especies reactivas, entre los cuáles se encuentran antioxidantes (por ej., vitaminas A, C y E), oligoelementos, y proteínas (enzimas) capaces de degradar los sustratos oxidados. La importancia antioxidante de estas biomoléculas depende de la especie reactiva sobre la que actúan, dónde y cómo se genera ésta, así como del daño que produce (Fig. 2). Los antioxidantes pueden actuar en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tener más de un mecanismo de acción (Gutteridge y Halliwell, 1999). Entre las reservas antioxidantes que se sintetizan en las células animales podemos mencionar:

a) *La familia de las superóxido dismutasas (SOD)*. Esta familia está constituida por metaloenzimas que convierten el $O_2^{\bullet -}$ a H_2O_2 . Se encuentra virtualmente en todos los organismos aeróbicos y, fundamentalmente, se compone de cuatro tipos de enzimas: CuZnSOD, CuSOD, FeSOD y MnSOD.

b) *Las enzimas catalasa y peroxidasa*. Estas enzimas transforman el H_2O_2 en agua y están ampliamente distribuidas en bacterias aeróbicas, plantas y animales. La *glutathion peroxidasa*

(GPx) utiliza el glutatión reducido (GSH) como sustrato. (Spector, 1991; Halliwell y Gutteridge, 1998; Gamaley y Klyubin, 1999).

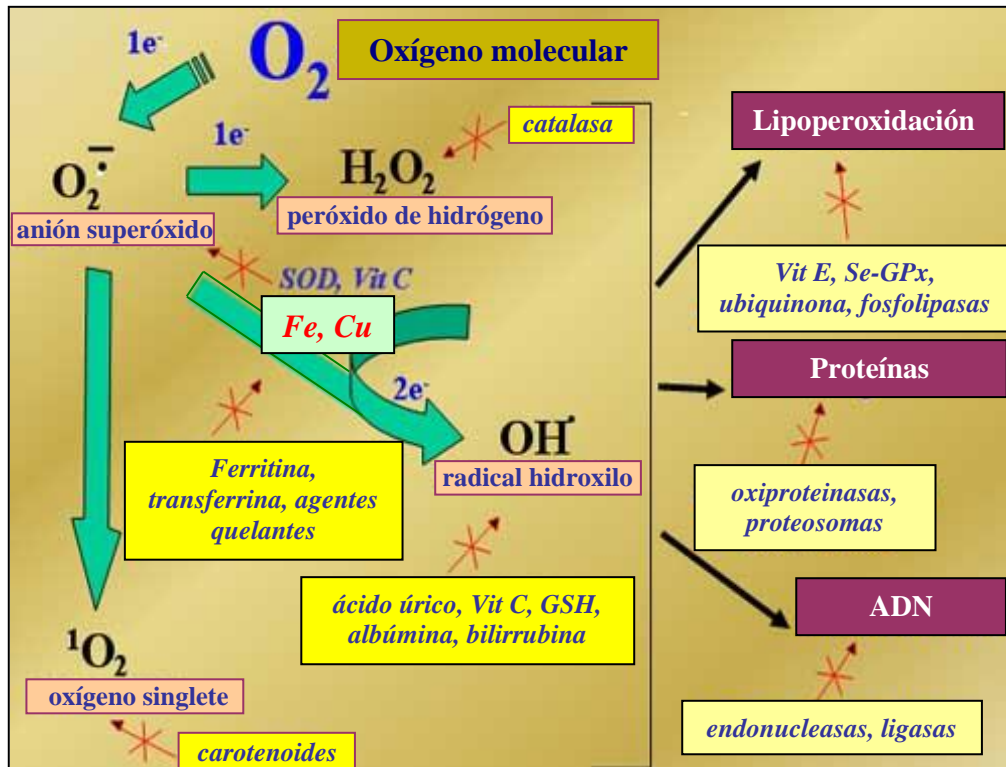


Figura 2. Balance entre agentes oxidantes y reservas antioxidantes.

En los fluidos extracelulares, no se encuentran catalasas ni peroxidasas, y la SOD se encuentra en cantidades muy pequeñas. Sin embargo, la lista de reductores extracelulares es amplia, e incluye a proteínas con capacidad de prevenir reacciones catalizadas por iones metálicos, como el hierro y el cobre (Stocker y Frei, 1991; Gutteridge y Halliwell, 1999). Entre estos agentes antioxidantes se encuentran:

- Ceruloplasmina*: tiene actividad ferroxidasa y se une a cobre e inhibe reacciones de tipo Fenton (ver ítem 1.2.3.).
- Transferrina* y *lactoferrina*: se unen al hierro e inhiben reacciones de tipo Haber Weiss (ver ítem 1.2.3.).
- Haptoglobina* y *Hemopexina*: participan en la inhibición de la peroxidación lipídica catalizada por la hemoglobina.
- Albumina*: tiene función poco clara, se une al hierro y al cobre pero no inhibe las reacciones Fenton (ver ítem 1.2.3) (Halliwell y Gutteridge, 1998).

Entre los agentes antioxidantes intracelulares de bajo peso molecular de mayor importancia se encuentran:

a) *El tripéptido glutatión (GSH)*. En su forma reducida, es el antioxidante intracelular que se encuentra en mayor concentración. Actúa como cofactor de la GPx para detoxificar H_2O_2 (Fig. 3), pero también puede eliminar radicales libres por vías no enzimáticas. Luego de su oxidación como consecuencia de estas reacciones, su estado reducido es regenerado por acción de la glutatión reductasa, conformando el denominado “ciclo del GSH” (Fig. 3). Además de su función redox, el GSH está involucrado en otros procesos fisiológicos, como el mantenimiento de la comunicación entre células y el transporte intracelular de cobre. Es además cofactor enzimático en diversas vías metabólicas. Finalmente, participa en la regulación del estado redox de puentes disulfuros en proteínas, junto con otras moléculas como la tioredoxina y la glutarredoxina. (Spector, 1991; Taylor *et al*, 1996; Halliwell y Gutteridge, 1998; Dalton *et al*, 1999; Gamaley y Klyubin, 1999).

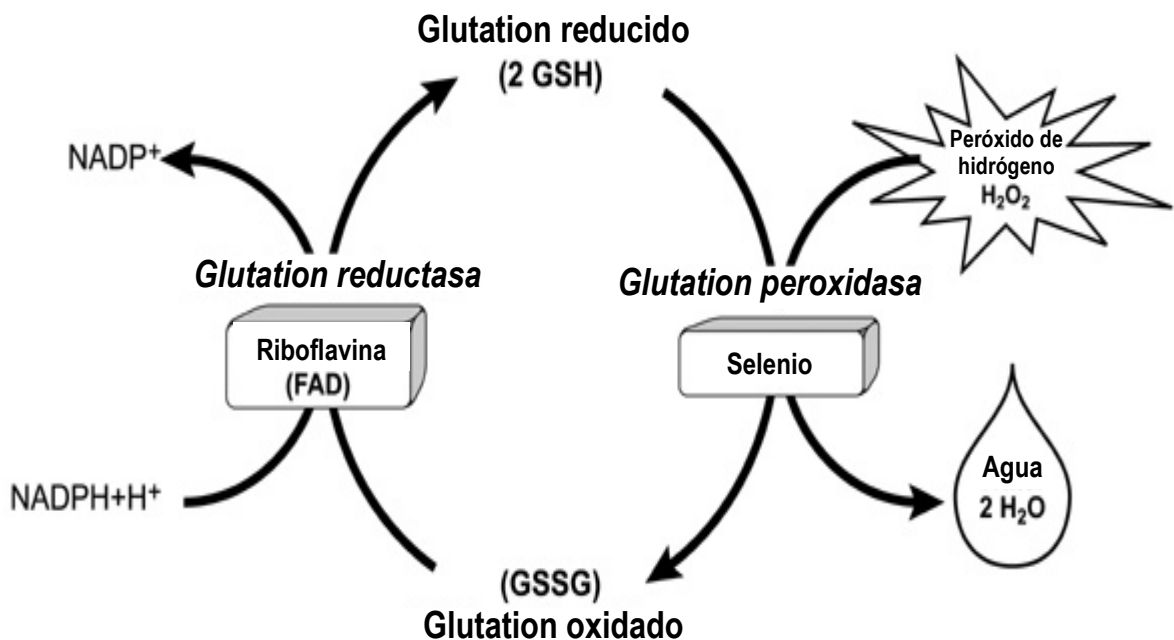


Figura 3. Ciclo del glutatión (GSH).

- b) *Bilirrubina y ácido úrico*. Se han propuesto como antioxidantes al unirse a metales e impedir reacciones de tipo Fenton (ver ítem 1.2.3).
- c) *Aminoácidos*, con capacidad para secuestrar iones metálicos y con susceptibilidad para oxidarse en presencia de H_2O_2 y bicarbonato (Stadtman y Berlett, 1991).
- d) *Melatonina*. Esta molécula atrapa al radical HO^\bullet , además de estimular enzimas antioxidantes importantes como SOD, GPx y glutatión reductasa. Se considera actualmente como un importante antioxidante, ya que se ha mostrado su efectividad, en dosis farmacológicas, para reducir el daño ocasionado por agentes tóxicos que inducen estrés oxidativo (Reiter *et al*, 1997).

Los antioxidantes derivados de la dieta complementan las funciones de las defensas endógenas celulares. Entre los más importantes están los *carotenoides*, el *α -tocoferol* y el *ácido ascórbico*. Los dos primeros son antioxidantes liposolubles que protegen las membranas celulares del daño peroxidativo, mientras que el ácido ascórbico es un antioxidante hidrosoluble con capacidad de neutralizar especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en el citosol, además de actuar como cofactor de diferentes enzimas involucradas en reacciones bioquímicas que reducen metales de transición (por ej., hierro y cobre), entre otras. Existen evidencias que, en ciertas enfermedades que producen estrés oxidativo, hay disminución de los niveles de ácido ascórbico (vitamina C), como por ejemplo en la artritis reumatoidea (Spector, 1991; Stocker y Frei, 1991; Halliwell, 1999). Este antioxidante tiene funciones paradójicas, ya que puede funcionar como agente pro-oxidante en presencia de hierro o cobre (Spector, 1991; Stocker y Frei, 1991).

1.2. MECANISMOS FISIOLÓGICOS DE GENERACIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO

Todas las células de un organismo se encuentran permanentemente expuestas a un nivel basal de estrés oxidativo, el cual es controlado por sus reservas antioxidantes. Este ataque oxidativo constitutivo ocurre como consecuencia del aporte de electrones de dos fuentes fundamentales: la cadena de transporte de electrones mitocondrial y los citocromos existentes en el retículo endoplasmático (R.E.). Otras fuentes endógenas de radicales libres son los metales de transición (por ej. cobre, hierro), los macrófagos y algunos sistemas enzimáticos como ciclooxigenasas, lipooxigenasas y xantina oxidasa (Finkel, 1998; Lenaz, 1998).

1.2.1. Generación de estrés oxidativo de origen mitocondrial

La generación de ROS por la mitocondria es un evento continuo y fisiológico. Dependiendo del tejido, las condiciones respiratorias y el sustrato usado, entre un 0,02-2% del O_2 total consumido por la mitocondria resulta en la generación del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) *in vitro* (Boveris, 1977). El proceso se debe a la reducción monoelectrónica del O_2 en las enzimas NADH:coenzima Q, succinato:coenzima Q y coenzima QH_2 :citocromo *c* oxido-reductasas (complejos I, II y III, respectivamente) de la cadena respiratoria. Estos complejos respiratorios están localizados en la membrana mitocondrial interna, produciéndose $O_2^{\bullet-}$ tanto en la matriz mitocondrial (complejos I y II), como en el espacio intermembrana (complejo III) (St-Pierre *et al*, 2002; Turrens, 2003). Evidencias recientes sugieren que la generación de $O_2^{\bullet-}$ también es promovida por deshidrogenasas solubles de la matriz, tales como las enzimas piruvato y α -cetoglutarato deshidrogenasa (Starkov *et al*, 2004).

1.2.2. Enzimas redox como fuente de estrés oxidativo

El R.E. contiene enzimas del citocromo P-450 (CYP-450) que catalizan reacciones de oxidación de fase I, en donde el sustrato es oxidado a expensas del oxígeno molecular. En el hígado, esta organela es particularmente rica en CYP-450, siendo los electrones requeridos para su actividad donados por el NADPH, vía la enzima NADPH-CYP-450 reductasa. La forma reducida de esta enzima puede reducir el oxígeno para dar $O_2^{\bullet -}$ (Gutteridge y Halliwell, 1999).

Otras fuentes de $O_2^{\bullet -}$ y de H_2O_2 son ciertas enzimas oxidativas, como la xantina oxidasa, las NADPH/NADH oxidasas, la acil-CoA oxidasa, y pequeñas moléculas auto-oxidables como las catecolaminas y las quinonas (Dalton *et al*, 1999; Gamaley y Kluybin, 1999).

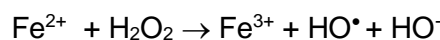
1.2.3. Otras fuentes endógenas de estrés oxidativo

Diariamente, bajo condiciones fisiológicas normales, el 3% de la hemoglobina total se convierte en su forma oxidada. La autooxidación de la hemoglobina resulta en la generación de $O_2^{\bullet -}$ (Stocker y Frei, 1991).

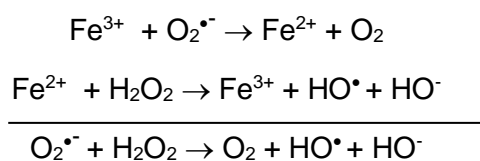
Las células fagocíticas del sistema inmunológico también generan una importante cantidad de H_2O_2 mediante la enzima NADPH oxidasa, que se encuentra unida a sus membranas. Aunque las células no fagocíticas también generan H_2O_2 mediante una NADPH oxidasa, esta enzima difiere de la anterior tanto estructural como genéticamente, siendo su tasa de generación de peróxido apenas del 1% del generado por las células fagocíticas (Gamaley y Kluybin, 1999). Por otro lado, en el plasma sanguíneo se genera continuamente H_2O_2 a partir de la oxidación del GSH y/o del ascorbato (Spector, 1991; Halliwell *et al*, 2000; Long y Halliwell, 2000).

El $O_2^{\bullet -}$ es convertido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), mediante la reacción de Fenton con complejos de bajo peso molecular de hierro (II) y cobre generando radicales hidroxilo (HO^{\bullet}). El proceso neto de producción de HO^{\bullet} a partir de $O_2^{\bullet -}$ y de H_2O_2 es la reacción Haber-Weiss, en la cual los iones metálicos actúan como catalizadores (Stadtman y Berlett, 1991; Dalton *et al*, 1999).

Reacción de Fenton:



Reacción de Haber-Weiss:



Otra especie reactiva es el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), que se genera cuando los electrones que han sido excitados por la luz pasan su energía de excitación a uno de los electrones desapareados del O_2 . También puede formarse durante la dismutación del $\text{O}_2^{\bullet-}$, en la reacción de Haber-Weiss o por la descomposición del H_2O_2 . El $^1\text{O}_2$ causa modificaciones en los aminoácidos y provoca daños a las membranas celulares y al ADN (Finkel, 1998).

1.3. ESTRÉS OXIDATIVO Y TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Convencionalmente, los agentes oxidantes han sido vistos como productos tóxicos derivados del metabolismo celular. Sin embargo, un número creciente de evidencias experimentales sugieren que, en bajas concentraciones, juegan un importante papel regulatorio, actuando como moléculas de señalización transduccional. De esta manera, participan en un elevado número de procesos celulares, como el crecimiento y la adaptación a respuestas medioambientales (Finkel, 1998; Halliwell y Gutteridge, 1998). Su papel regulatorio predomina a niveles bajos de exposición (por cortos períodos de tiempo), mientras que su efecto tóxico se manifiesta a niveles elevados y sostenidos en el tiempo (Halliwell *et al*, 2000). Algunas de las respuestas fisiológicas reguladas por ROS, tanto en la mitocondria como en el citosol, involucran cambios asociados con el reestablecimiento de la homeostasis celular, tales como la activación/inactivación de genes que codifican para factores de transcripción, la inducción de enzimas de defensa antioxidante, la alteración de proteínas estructurales, la activación de vías de señalización mediadas por proteína quinasas y la modificación de señales iónicas, en especial, elevación de los niveles de Ca^{2+} (Halliwell y Gutteridge, 1998; Gamaley y Klyubin, 1999). Por su importancia temática en el marco de este trabajo de tesis, abordaremos con mayor detalle los últimos dos.

1.3.1. Alteración de la homeostasis de Ca^{2+} inducida por estrés oxidativo

En condiciones normales, los niveles intracelulares de Ca^{2+} se mantienen en un rango de concentración de aproximadamente 100 nM, es decir, unas 10.000 veces inferior a su concentración en el medio extracelular. Un aumento de Ca^{2+} intracelular sostenido durante algunos minutos es suficiente para provocar alteraciones metabólicas, eléctricas y estructurales que conducen a la muerte celular. Estas alteraciones parecen estar mediadas por la sobreactivación de un gran número de enzimas dependientes de Ca^{2+} , como proteína quinasa C (PKC), proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII), fosfolipasas, proteasas, fosfatasas, oxidasas y endonucleasas (Orrenius *et al*, 1989; Hannan y Maxwell, 1995). El mantenimiento de los niveles adecuados de Ca^{2+} es el resultado de la acción coordinada de diferentes sistemas de transporte localizados sobre la membrana plasmática y

las membranas de diferentes orgánulos subcelulares (R.E. y mitocondrias), así como de la unión específica del Ca^{2+} a diferentes proteínas citosólicas (por ej., calmodulina).

Desde hace varios años, se ha asociado la lesión celular provocada por diferentes agentes oxidantes con un incremento significativo de los niveles intracelulares de Ca^{2+} (Orrenius *et al*, 1989). Por ejemplo, en hepatocitos aislados, se ha demostrado que el estrés oxidativo inducido por los agentes pro-oxidantes menadiona o *tert*-butil hidroperóxido (*t*BOOH) provoca liberación de Ca^{2+} desde el R.E. y la mitocondria (Thor *et al*, 1982; Bellomo *et al*, 1982). Para explicar este fenómeno, se ha propuesto que el estrés oxidativo disminuye la actividad de los sistemas intracelulares de translocación de Ca^{2+} , ocasionando un aumento incontrolado del mismo en el citosol de las células (Orrenius *et al*, 1989). Este efecto estaría mediado por la oxidación de grupos sulfhidrilos ($-\text{SH}$) en las ATPasas dependientes de Ca^{2+} localizadas en R.E. y en membrana plasmática, provocando una inhibición de su actividad como enzimas transportadoras. Esto disminuye la capacidad del R.E. para eliminar el Ca^{2+} del citosol, y de la membrana plasmática para exportarlo de la célula. La incapacidad para mantener bajo el nivel de Ca^{2+} intracelular provoca la activación de enzimas degradativas dependientes de Ca^{2+} (caspasas, fosfolipasas, endonucleasas), y desencadena fenómenos bioquímicos responsables de la lesión celular irreversible y la muerte celular asociada con la pérdida de la impermeabilidad de la membrana plasmática (Orrenius *et al*, 1989, Nicotera *et al*, 1992).

Resultados recientes sugieren que el incremento de Ca^{2+} citosólico inducido por estrés oxidativo se encuentra relacionado con una despolarización temprana de la membrana mitocondrial observada en muchos fenómenos de lesión y muerte celular (necrosis o apoptosis) (Hannan y Maxwell, 1995). Esta despolarización se debe a un conjunto de cambios estructurales de la membrana mitocondrial denominados colectivamente *transición de permeabilidad mitocondrial*. Estos cambios involucran la apertura de un poro que atraviesa la membrana interna y externa mitocondrial, denominado *poro de transición de permeabilidad mitocondrial* (PTPM) (Gunter y Pfeiffer, 1990). Esto facilita el pasaje de iones y otros solutos de bajo peso molecular ($<$ de 1500 Da) a través de la membrana de la mitocondria, provocando un aumento del tamaño de la organela por hinchazón coloidosmótica ("*swelling*") y desacople de la fosforilación oxidativa por colapso de su potencial de membrana (ver ítem 1.4.1 para más detalles). Se ha sugerido que dicha transición depende de cambios en el estado cíclico de acilación/desacilación de fosfolípidos de la membrana mitocondrial interna provocados por la activación, dependiente de Ca^{2+} , de la fosfolipasa A_2 , ya que estudios realizados con inhibidores de esta enzima mostraron una reversión del fenómeno de permeabilidad (Brockemeier *et al*, 1985). Por otro lado, también se ha postulado que esta transición genera un incremento sostenido de la captación mitocondrial de Ca^{2+} , la cual es dependiente del potencial transmembrana, que llegaría a abolir o reducir dicho potencial (Swann *et al*, 1991). A su vez, la

oxidación de los nucleótidos de piridina intramitocondriales (NADH y NADPH) resulta en un eflujo acelerado de Ca^{2+} desde la mitocondria (Swann *et al*, 1991). Dicha situación conduciría a un fenómeno de reciclaje de Ca^{2+} a través de la membrana mitocondrial, acompañado de la pérdida de la capacidad homeostática de dicho orgánulo y de una desenergización de su membrana.

Estos trabajos han permitido entender el modo en que el Ca^{2+} y los ROS se encuentran relacionados entre sí para producir efectos deletéreos. Por un lado, el estrés oxidativo estimula la liberación específica de Ca^{2+} desde la mitocondria y, por otro, una aceleración del ciclo de liberación/captación de Ca^{2+} por la mitocondria es capaz de incrementar la generación de ROS (Richter *et al*, 1996).

1.3.2. Activación de moduladores de señal inducida por estrés oxidativo en hepatocitos

Evidencias recientes sugieren que los ROS funcionan como segundos mensajeros celulares, ya que un considerable número de procesos celulares fisiológicos y fisiopatológicos parecen estar sujetos a regulación redox (Kamata e Hirata, 1999). Se ha demostrado que las especies reactivas del oxígeno inducen cambios a corto y largo plazo en la función hepatocelular, afectando a los mecanismos de transducción de señales. Esto puede ocurrir a través de la modificación del estado de fosforilación de los blancos relevantes para la función celular y por alteraciones en la actividad de los factores de transcripción (Cesaratto *et al*, 2004; Poli *et al*, 2004).

De los múltiples caminos de señalización que se encuentran activados en condiciones de estrés oxidativo, la cascada dependiente de proteína quinasa C (PKC) parece jugar un rol fundamental. La hipótesis de un papel central de PKC en el daño oxidativo hepatocelular se ve sustentada por evidencias indirectas que indican que un moderado estrés oxidativo, tal como el ocasionado por bajas dosis de tetracloruro de carbono o menadiona, induce activación de PKC, un proceso en parte mediado por modificación de su estructura enzimática, así como por la formación de productos de lipoperoxidación que actúan como activadores endógenos de la enzima (Kamata e Hirata, 1999). Esta proteína posee propiedades estructurales únicas que la hacen susceptible a activación por modificación oxidativa (Kamata e Hirata, 1999). El dominio N-terminal contiene un motivo de unión a zinc especialmente rico en residuos de cisteína que son susceptibles a la oxidación por ROS. Cuando estos residuos se oxidan, la función autoinhibitoria de este dominio regulador se ve comprometida, estimulando la actividad celular de PKC. Además, bajo condiciones pro-oxidantes, ocurre la fosforilación de residuos de tirosina en PKC que provoca un aumento de su actividad enzimática. Por otro lado, la formación de hidroperóxidos derivados de la peroxidación lipídica, un evento temprano en condiciones de estrés oxidativo, estimulan la actividad de PKC. Finalmente, bajo estas condiciones, ocurren elevaciones de Ca^{2+} citosólico que pueden activar a las isoenzimas denominadas clásicas de

PKC (isoformas α y β_2 en hepatocitos). Por lo tanto, no es sorprendente que PKC se encuentre involucrada en un número creciente de alteraciones hepatocelulares que ocurren bajo condiciones de estrés oxidativo, tales como la apoptosis inducida por sales biliares (Jones *et al*, 1997), o la peroxidación lipídica y daño a la membrana inducido por compuestos pro-oxidantes tales como *tert*-butil hidroperóxido (*t*BOOH), H_2O_2 y sales biliares (von Ruecker *et al*, 1989; Borgognone *et al*, 2005).

La activación de PKC se ha visto involucrada en una serie de alteraciones a nivel de las estructuras hepatocelulares que intervienen en la secreción biliar. Se ha observado que moduladores hormonales capaces de activar PKC, tales como vasopresina y ésteres de forbol, inducen alteraciones morfológicas y funcionales a nivel de la membrana canalicular similares a las ocasionadas por agentes productores de estrés oxidativo (Roma *et al*, 1998), siendo estas alteraciones mediadas por isoenzimas de PKC activadas por Ca^{2+} (Roma *et al*, 1999). Además, esta activación provoca la formación de ampollas de membrana asociadas con un reordenamiento del citoesqueleto de actina, acompañado de un impedimento en la capacidad de duplas de hepatocitos para secretar apicalmente la sal biliar fluorescente colil-lisil-fluoresceína (CLF) (Roma *et al*, 1998). Estos resultados concuerdan con estudios más recientes, en donde se muestra que la activación de isoformas de PKC dependientes de Ca^{2+} impide la secreción de sales biliares en hígado aislado y perfundido, fenómeno debido en parte a una internalización de la bomba exportadora de sales biliares *bile salt export pump* (Bsep) (Kubitz *et al*, 2004).

1.4. MECANISMOS DE DAÑO HEPATOCELULAR POR ESTRÉS OXIDATIVO

A continuación, se describen con mayor detalle algunos de los mecanismos fisiopatológicos de generación de daño oxidativo que conducen a alteraciones morfológicas y funcionales del hepatocito, tales como disfunción mitocondrial (secundaria a la formación de poros de transición de permeabilidad mitocondrial), lipoperoxidación de membranas, desorganización del citoesqueleto de actina y de las uniones estrechas paracelulares, alteración de proteínas (por ej., enzimas, transportadores, etc.) y daños al ADN, los cuales conducen finalmente a la muerte hepatocelular por necrosis y/o apoptosis (Poli, 1993).

1.4.1. Formación de poros de transición de permeabilidad mitocondrial

Las mitocondrias son orgánulos citoplasmáticos especializados en la transformación de la energía de oxidación en energía quimioosmótica, que se traduce en la síntesis de ATP a partir de ADP. Además de proporcionar la energía necesaria para que las células lleven a cabo sus múltiples funciones, en los últimos años se ha puesto de manifiesto su papel fisiopatológico, particularmente en la inducción de muerte celular por apoptosis y necrosis (Lenaz, 1998; Kowaltowski *et al*, 2001). Estas dos modalidades de muerte celular se distinguen claramente una de otra por sus características morfológicas y bioquímicas. A pesar de que el proceso apoptótico y los factores que lo desencadenan no son del todo conocidos, hoy se piensa que la apoptosis y la necrosis representan dos extremos de un proceso continuo, denominado *necroapoptosis*, ya que ambos tipos de muerte ocurren simultáneamente en tejidos expuestos al mismo estímulo.

Se ha demostrado que el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPM) juega un rol fundamental en ambas formas de muerte celular (Kroemer y Reed, 2000; Kowaltowski *et al*, 2001; Kim *et al*, 2003). Si el proceso del PTPM es general, afectando a la mayoría de las mitocondrias en la célula y comprometiendo la vía glicolítica, los niveles de ATP celular disminuyen, favoreciéndose la muerte celular necrótica. En cambio, si el proceso progresa de manera más lenta, donde la glicólisis es capaz de mantener los niveles de ATP, se produce un colapso del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), hinchamiento de la mitocondria (“*swelling*”), permeabilización o ruptura de la membrana externa y liberación no regulada de proteínas del espacio intermembrana (citocromo *c*, Smac/DIABLO), dando lugar a la muerte por apoptosis (Kim *et al*, 2003). El requisito de niveles preservados de ATP para que se produzca la muerte celular por apoptosis se explica por el hecho que los cambios morfológicos propios de este tipo de muerte celular (formación de “*blebs*” con migración de organelas a los mismos y generación de cuerpos apoptóticos) son energéticamente desfavorables, requiriendo ATP para su implementación (Richter *et al*, 1996).

El proceso irreversible de transición de permeabilidad mitocondrial, con formación del PTPM, se caracteriza por un incremento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna a solutos de tamaño menor o igual a 1500 Da (Hunter *et al*, 1976). La apertura de este canal no específico permite un equilibrio entre los iones de la matriz y del espacio intermembrana mitocondrial, disipando el gradiente de protones y desacoplando la cadena respiratoria. Tal desacople produce una exacerbación de la fuga de electrones mitocondriales al citosol, con consecuente producción de estrés oxidativo de origen mitocondrial. Además, se produce un hinchamiento (“*swelling*”) de la mitocondria, debido a una hiperosmolaridad de la matriz (Kroemer y Reed, 2000; Kowaltowski *et al*, 2001). Como la membrana interna está invaginada en forma de crestas y posee mayor superficie que la membrana externa, la expansión de la matriz puede provocar la permeabilización y/o la ruptura de la membrana externa, liberando las proteínas del espacio intermembrana mitocondrial (Green *et al*, 2002). La caracterización bioquímica de la mitocondria ha permitido la identificación de este poro dependiente de Ca^{2+} y de voltaje que controla la permeabilidad mitocondrial (Bernardi *et al*, 1994). Este complejo multiproteico se localiza en los lugares de unión entre la membrana mitocondrial interna y externa, permitiendo así la comunicación entre la matriz mitocondrial y el citosol cuando se produce la apertura del poro (Kroemer y Reed, 2000).

1.4.1.1. Componentes del PTPM

No se conoce en su totalidad la composición del poro mitocondrial, aunque se han descrito diversos componentes. El núcleo del poro está constituido por el translocador de nucleótidos de adenina (ANT), el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), la ciclofilina D (CyP-D) y diferentes proteínas que se asocian a esta unidad básica, como el receptor de benzodiazepinas, la creatina quinasa, la hexoquinasa, la proteína apoptótica Bax y la enzima glicerol quinasa (Fig. 4) (Kroemer y Reed, 2000; Crompton *et al*, 2002). A continuación describimos en detalle sus principales componentes:

i. ANT: muchos de los agentes que provocan la apertura del poro son ligandos del ANT. Este transportador antiporte anclado en la membrana interna, que intercambia ADP/ATP, es esencial para mantener la carga energética en el citosol. Normalmente, el ANT está cerrado, pero cuando es ocupado por un sustrato transportable, modifica su conformación, cambiando la orientación del lugar de unión ADP/ATP de la matriz mitocondrial (estado *m*) al citosol (estado *c*). Los ligandos que se unen al ANT en el estado *m* inhiben el PTPM, mientras que los que se unen en el estado *c* lo inducen (Halestrap *et al*, 1990). Pero el ANT, por sí sólo, no provoca el PTPM, ya que requiere de la colaboración de otros componentes como VDAC o Bax.

ii. **VDAC**: es la proteína más abundante de la membrana externa mitocondrial, constituyendo un canal que permite el paso de solutos de hasta 5 kDa hacia los sistemas de transporte específicos de la membrana interna. La formación de los complejos VDAC-ANT mantiene los puntos de unión entre la membrana mitocondrial interna y externa, y son imprescindibles para un metabolismo energético celular eficaz. Este complejo es capaz de reclutar toda una serie de quinasas (hexoquinasa, glicerol quinasa, creatina quinasa), las cuales utilizan como sustrato el ATP producido en la matriz mitocondrial. También el receptor de benzodiazepinas (PBR) interacciona con VDAC. Esta proteína se encuentra en la membrana mitocondrial externa, encargándose del transporte de colesterol de la membrana externa a la interna, la regulación de la síntesis de esteroides y del transporte de porfirina (Castedo *et al*, 2002). La sobre-expresión celular de PBR y el uso de agonistas farmacológicos han demostrado su papel como regulador en la apoptosis, aunque se desconoce su mecanismo de acción (Casellas *et al*, 2002). Ensayos de reconstrucción y permeabilización de VDAC en liposomas han mostrado que, en el desarrollo del PTPM, participan también otros complejos (Shimizu *et al*, 1999).

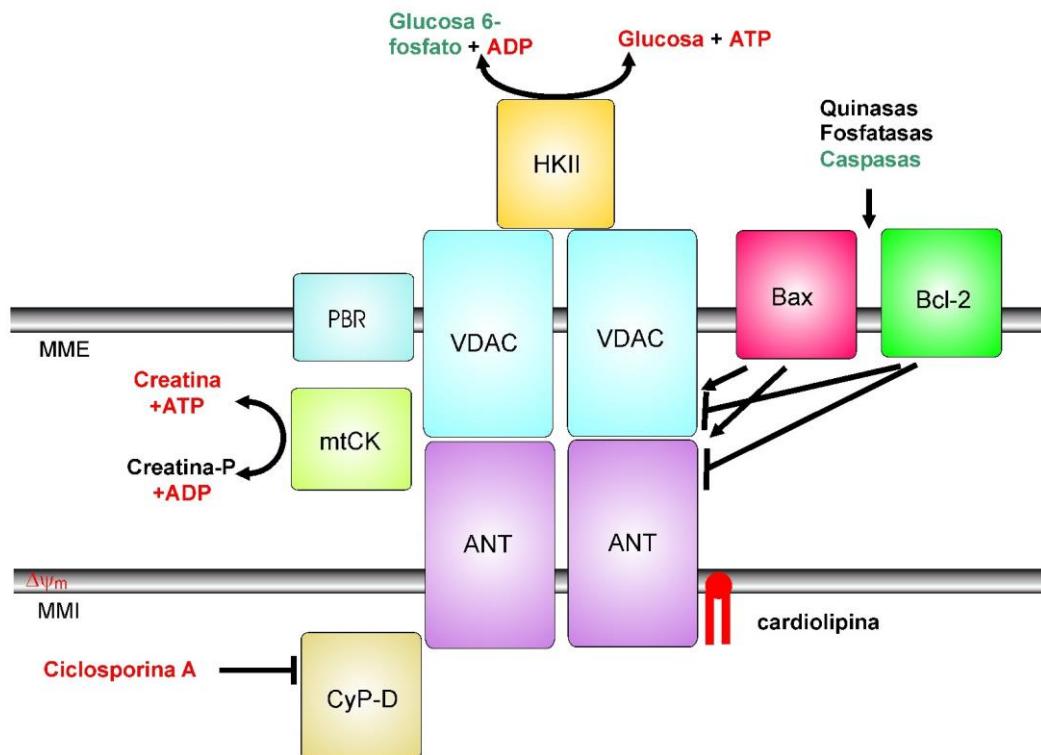


Figura 4. Componentes y reguladores del PTPM. ANT, translocador de nucleótidos de adenina; VDAC, canal aniónico dependiente de voltaje; CyP-D, ciclofilina D; PBR, receptor de benzodiazepinas; mtCK, creatina quinasa mitocondrial; HK II, hexoquinasa; Bax/Bcl-2, proteínas pro- y anti-apoptóticas de la familia Bcl-2.

iii. **CyP-D**: es una chaperona con actividad peptidil-prolil-*cis-trans* isomerasa que está localizada en la matriz mitocondrial. La función celular de la CyP-D es controvertida, pero su actividad

catalítica la involucra en el plegamiento y cambio conformacional de ciertas proteínas mitocondriales (Matouschek *et al*, 1995). Su integración en el complejo VDAC-ANT se estableció mediante cromatografía de afinidad y, dado que la CyP-D reside en la matriz mitocondrial, la unión sólo puede ser vía ANT. Posteriormente, la reconstrucción del complejo VDAC-ANT-CyP-D en liposomas reprodujo los efectos observados en mitocondrias intactas durante el PTPM (Crompton *et al*, 1998). Se ha observado que la ciclosporina A (CsA) inhibe la apertura del poro al unirse al centro activo de la CyP-D, bloqueando así su interacción con ANT. Sin embargo, en algunos tipos celulares de origen neuronal, la CsA tan solo es capaz de provocar una inhibición transitoria de la apertura del poro, indicando la existencia de una vía independiente de la CyP-D para el PTPM (Andreyev *et al*, 1999). Células que sobre-expresan CyP-D son menos sensibles al daño mediado por estrés oxidativo, manteniendo la funcionalidad mitocondrial (Lin *et al*, 2002), sugiriendo que la CyP-D interacciona con las proteínas del poro evitando que se produzcan modificaciones en sus componentes debido a la acción de los radicales libres (Kim *et al*, 2003).

1.4.1.2. Regulación del PTPM

Existen diferentes factores que regulan la apertura del PTPM, siendo el ion Ca^{2+} uno de sus principales moduladores. La mitocondria está implicada en la homeostasis de Ca^{2+} intracelular, ya que actúa como un reservorio para el Ca^{2+} , procediendo a su acumulación en casos de excesos de este catión citosólico, o a su extrusión en casos de demanda del mismo. La mayoría de los agentes apoptóticos provocan un aumento de Ca^{2+} en el citosol que, al acumularse en la mitocondria, disminuye el potencial de membrana, provocando la generación de ROS, despolarización de la membrana mitocondrial, formación de PTPM con liberación de citocromo *c* y Smac/DIABLO, y posterior muerte celular por apoptosis (Kruman *et al*, 1998). La permeabilidad de transición mitocondrial no parecería ser un resultado de la apertura de PTPM preformados, sino el ensamblado de PTPM ocasionado por cambios en el estado redox mitocondrial inducidos por Ca^{2+} , los cuales producen alteraciones conformacionales de proteínas pre-existentes en la membrana mitocondrial, tales como ANT; la modificación oxidativa de grupos sulfhidrilo críticos en ANT en mitocondrias sobrecargadas con Ca^{2+} podrían modificar la afinidad de esta proteína por CyP-D para conformar el PTPM (Kanno *et al*, 2004). Los mecanismos por los cuales el Ca^{2+} *per se* induce estrés oxidativo mitocondrial no son totalmente conocidos. Grijalva y col. reportaron que la unión de Ca^{2+} a la cara interior de la membrana mitocondrial interna conduce a la formación de agregados de cardiolipina que incrementan la liberación de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial, promoviendo así la formación de PTPM (Grijalva *et al*, 1999). Además, el Ca^{2+} puede modular directamente el estado de apertura del PTPM una vez ensamblado, tal como lo indican experimentos

mostrando que el Ca^{2+} es necesario aún después de ocurrida la oxidación de grupos sulfhidrilos (Bernardi *et al*, 1992).

Otra característica clave de la regulación del PTPM es su control por el gradiente electroquímico de protones mitocondrial ($\Delta\mu\text{H}^+m$) y por el gradiente eléctrico mitocondrial ($\Delta\psi m$). Aunque ambos son dependientes entre sí, pueden regular el poro de manera independiente. En efecto, la protonación de la membrana mitocondrial interna favorece la conformación cerrada del poro, de modo que, a pH 6,8 o menor, el mismo permanecerá cerrado independientemente de los cambios en el $\Delta\psi m$. En cambio, a pH por encima de 7, se favorecería la conformación cerrada cuando el $\Delta\psi m$ es elevado y la conformación abierta en condiciones de despolarización (Bernardi, 1992). Este último mecanismo de regulación, sin embargo, no parece ser funcional en condiciones en las cuales el PTPM es generado principalmente por la inducción de estrés oxidativo en la mitocondria, al menos en hepatocitos. En efecto, el colapso del $\Delta\psi m$ inducido por desacoplantes de la fosforilación oxidativa no induce “swelling” mitocondrial, sino que, por el contrario, estabiliza a la mitocondria expuesta a agentes pro-oxidantes (Aronis *et al*, 2002).

Proteínas de la familia Bcl-2, también han sido consideradas reguladores del PTPM. Los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL) se encuentran anclados en diferentes membranas (mitocondria, R.E. y núcleo) a través de su dominio hidrofóbico carboxilo-terminal, mientras que los factores pro-apoptóticos de esta misma familia (Bax, Bad, Bid, Bak y Bim) residen principalmente en citosol; estos últimos translocan a la mitocondria, intercalándose en la membrana mitocondrial externa para iniciar el proceso apoptótico, ya sea formando canales de manera autónoma (Eskes *et al*, 1998) o colaborando con componentes del poro mitocondrial (Kroemer y Red, 2000; Wei *et al*, 2001). Recientemente, se ha descrito que Bax y Bcl-2 regulan el PTPM a través de su interacción con ANT, y que son capaces de modificar su función como transportador antiporte de ADP/ATP (Fig. 5) (Kroemer y Reed, 2000; Belzacq *et al*, 2003). Por otro lado, Bcl-2 aumenta la permeabilidad del R.E. para el Ca^{2+} , reduciendo su acumulación en la mitocondria y previniendo así la activación del poro (Murphy *et al*, 2001). Un aumento en los niveles de Ca^{2+} activa además proteínas de la familia de las calpaínas, cisteínas proteasas dependientes de Ca^{2+} asociadas con la muerte celular apoptótica, permitiendo que Bax interactúe con componentes del PTPM para favorecer la liberación de citocromo *c* (Fig. 5) (Narita *et al*, 1998; Hajnóczky *et al*, 2000; Kroemer y Red, 2000). El Ca^{2+} también activa a la proteína calcineurina, una serina/treonina fosfatasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina que desfosforila a Bad, facilitando su translocación a la mitocondria, en donde ejerce efectos regulatorios sobre la muerte celular apoptótica vinculados con la formación de PTPM (Fig. 5) (Wang *et al*, 1999; Hajnóczky *et al*, 2000).

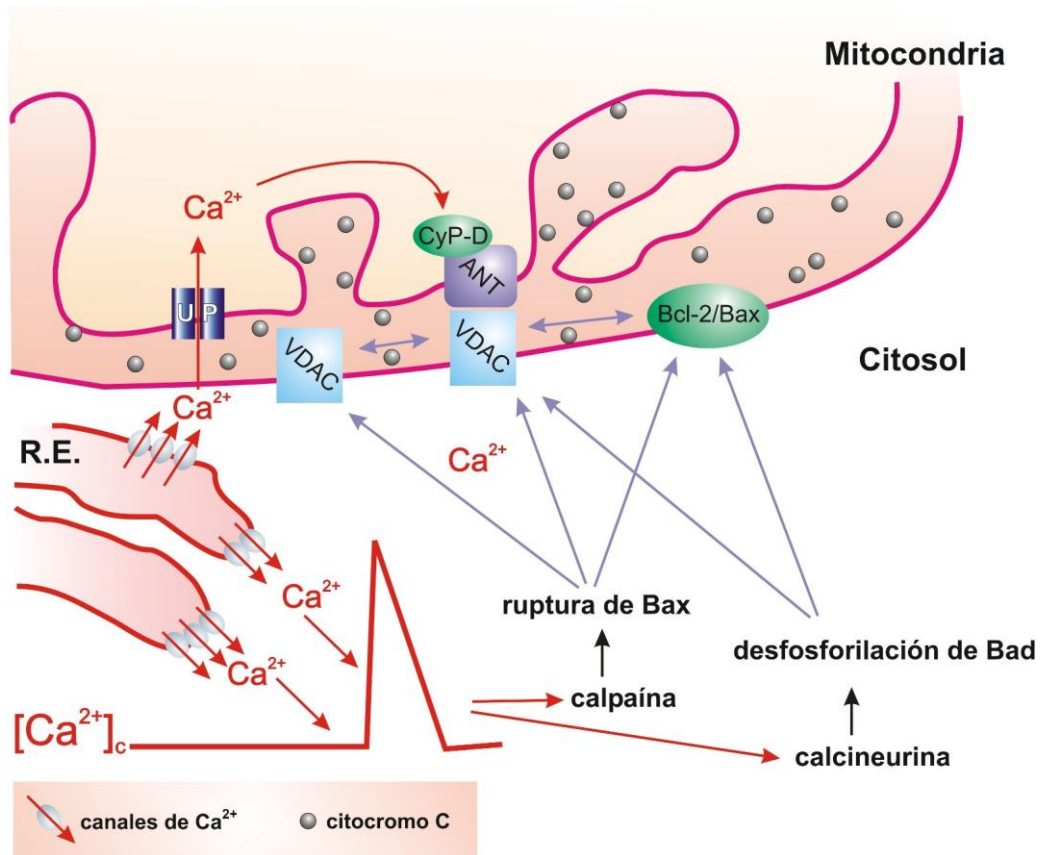


Figura 5. Algunos de los mecanismos dependientes de Ca^{2+} que promueven la formación del PTPM y la liberación de componentes pro-apoptóticos desde la mitocondria. UP, transportador mitocondrial de Ca^{2+} ; CyP-D, ciclofilina D; ANT, translocador de nucleótidos de adenina; VDAC, canal aniónico dependiente de voltaje; Bcl-2/Bax, proteínas anti- y pro-apoptóticas de la familia Bcl-2.

La membrana mitocondrial tiene una composición lipídica peculiar, por poseer bajos niveles de colesterol y por ser la única membrana eucariota que contiene cardiolipina. Este fosfolípido determina la inserción de Bid en la membrana mitocondrial, desde donde ejerce sus efectos regulatorios de la muerte celular apoptótica (Kroemer y Reed, 2000; Lutter *et al*, 2000). Recientemente, se ha demostrado que la producción endógena de ROS por parte de la mitocondria favorece la liberación de citocromo c al peroxidar la cardiolipina (Petrosillo *et al*, 2003). Por otro lado, las propiedades dinámicas de la bicapa están vinculadas al PTPM, ya que se ha descrito que la formación del poro depende de la fluidez de la membrana mitocondrial (Ricchelli *et al*, 1999). En relación con esto, la inserción de Bax aumenta la difusión de los lípidos en la bicapa lipídica mitocondrial (Epand *et al*, 2003).

La formación de PTPM es sensible al estado redox celular. Varios compuestos inducen la expresión de enzimas de la cadena respiratoria, incrementando la producción de ROS y provocando la muerte celular vía PTPM (Chandra *et al*, 2002). Los productos derivados de la peroxidación lipídica inducen PTPM tanto *in vitro* como *in vivo* (Moncada *et al*, 2002). Los

radicales libres son capaces de generar el PTPM al oxidar los tioles de las proteínas del poro (Chernyak *et al*, 1996; Kroemer y Reed, 2000; Kowaltowski *et al*, 2001). Por ejemplo, se ha observado que el anión superóxido provoca la formación del PTPM, independientemente de Bax y Bak, al interactuar con VDAC (Madesh *et al*, 2001). Se establece así un círculo vicioso donde los ROS inducen la formación de PTPM y los electrones que fugan al citosol como consecuencia de ello exacerban el estrés oxidativo inicial, llevando finalmente a la muerte celular por necroapoptosis.

Otro regulador del PTPM es la ceramida generada en la membrana plasmática por acción de las esfingomielinasas (a partir de esfingomielina) o de la ceramida sintasa. Este esfingolípido reduce la concentración umbral de Ca^{2+} necesario para la formación del poro (Szalai *et al*, 1999). Además, estudios en mitocondrias aisladas de hígado de rata han mostrado que la ceramida es capaz de inducir directamente la apertura del poro debido a su interacción con el complejo III de la cadena respiratoria que provoca la generación de ROS (García-Ruiz *et al*, 1997). El gangliósido GD3, derivado de la ceramida, es un potente inductor del PTPM independiente de Ca^{2+} , tanto en mitocondrias aisladas como *in situ* (Scorrano *et al*, 1999; Garcia-Ruiz *et al*, 2000) y este efecto es inhibido por Bcl-2 (Rippo *et al*, 2000). Por otro lado, ácidos grasos saturados como el palmitato, que se acumulan en la isquemia de corazón, provocan la apertura de PTPM en mitocondrias aisladas, al interactuar con ANT (Kroemer *et al*, 1998). La activación de fosfolipasas dependientes de Ca^{2+} de la matriz mitocondrial también puede contribuir con la apertura del PTPM, ya que los productos de la hidrólisis de fosfolípidos promueven la transición mitocondrial, e inhibidores de fosfolipasas, como la trifluoperazina, la previenen (Nieminen *et al*, 1995).

1.4.2. Lipoperoxidación de membranas

La mayoría de las macromoléculas biológicas pueden ser oxidadas por radicales libres del oxígeno (ROS). Sin embargo, las biomoléculas más lábiles son los lípidos (Halliwell y Chirico, 1993). La lipoperoxidación (LPO) es un proceso cuyo mecanismo, medición e interpretación han sido ampliamente estudiados (Halliwell y Chirico, 1993). Se ha precisado que, en los sistemas biológicos, esta reacción puede ocurrir bajo control enzimático o no enzimático, siendo esta última forma la que ocurre en condiciones de estrés oxidativo y el daño celular (Romero *et al*, 1998).

La LPO es particularmente disruptiva de la integridad de membranas, ya que se desarrolla como una reacción en cadena auto-catalítica que se inicia cuando los ROS atacan un ácido graso polinsaturado (AGP) y le arrebatan un átomo de hidrógeno al grupo metileno adyacente al doble enlace, para formar el radical acilo graso. Rápidamente, esta molécula adiciona oxígeno y se transforma en un radical peroxilo, que actúa como transportador de la reacción en

cadena atacando a otros AGPs e iniciando nuevas reacciones en cadena. Este mecanismo se facilita con la presencia de iones de metales de transición (Morrisey y O'Brien, 1998) y por los dobles enlaces contenidos en la cadena de los AGPs (Halliwell y Chirico, 1993). Los productos finales de la LPO son lípidos peroxidados que, al degradarse, originan nuevos radicales libres y una amplia variedad de compuestos citotóxicos, como el 4-hidroxinonenal (4-HNE) y el malondialdehído (MDA). Estos últimos se utilizan frecuentemente como marcadores para evaluar la magnitud del daño peroxidativo (Morrisey y O'Brien, 1998; Romero *et al*, 1998). Las consecuencias del daño en la estructura molecular de los AGPs son más evidentes cuando estos lípidos forman parte de las membranas celulares o subcelulares, ya que se altera su cohesión, fluidez, permeabilidad y función metabólica (Yu, 1994; Bandyopadhyay *et al*, 1999). Las membranas biológicas son ricas en AGPs susceptibles de ser oxidados por la cascada peroxidativa. Este proceso lleva a un incremento de la permeabilidad de la membrana plasmática y, finalmente, a la muerte celular. Se ha reportado que la LPO ocurre durante la progresión de la injuria celular provocada por diferentes hepatotoxinas y compuestos hepatotóxicos (por ej., CCl₄, metales pesados, acumulación de sales biliares, etc.), revelando su importancia como causa de daño celular en condiciones de estrés oxidativo (Comporti, 1985; Sokol *et al* 1993).

1.4.3. Alteración del citoesqueleto de actina

El citoesqueleto de actina es una red dinámica de polímeros de actina (actina filamentosa o “*F-actina*”), asociados a una gran variedad de proteínas que, conjuntamente con ella, conforman el citoesqueleto celular (principalmente microfilamentos intermedios y microtúbulos) (ver Fig. 6). Sus principales funciones fisiológicas están relacionadas con la motilidad celular y los cambios de forma de la célula durante el ciclo celular. Sin embargo, también participa en la organización del citoplasma para generar fuerzas mecánicas dentro de la célula en respuesta a diversas señales extracelulares (particularmente durante modificaciones del volumen celular), siendo además esencial para algunas actividades contráctiles, el control de interacciones célula-célula (vía paracelular y la adhesión molecular) y el transporte intracelular mediado por vesículas (transcitosis) (Small *et al*, 1999). En células no polarizadas (o en células aisladas de epitelios polarizados, que han perdido su polaridad durante el aislamiento), la actina conforma un anillo en el área circundante de la membrana plasmática (Fig. 6 A). En epitelios polarizados como el hepático, o en hepatocitos aislados que se han mantenido parcialmente unidos luego del aislamiento, como es el caso de la dupla de hepatocitos que se muestra en la Fig. 6 B, la actina tiene, en cambio, una distribución polarizada, disponiéndose como un anillo alrededor del polo canalicular. Esta disposición posibilita que cumpla funciones tanto contráctil del canalículo biliar como reguladora de la apertura de las uniones estrechas intercelulares. En

efecto, la interrupción de la integridad del citoesqueleto de actina con inhibidores de la dinámica de asociación/disociación de los monómeros de actina afecta tanto la frecuencia de contractilidad de la vacuola canalicular central (Watanabe *et al*, 1985) como la permeabilidad paracelular hepática (Elias *et al*, 1980).

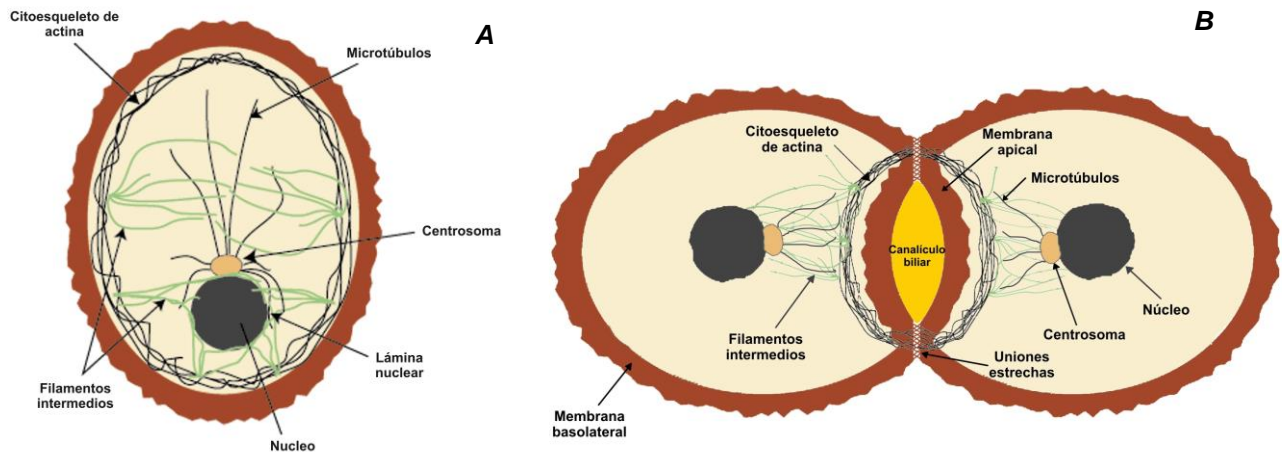


Figura 6. Distribución del citoesqueleto de actina en hepatocitos aislados (A) y en duplas de hepatocitos (B).

En diferentes tipos celulares, la integridad del citoesqueleto de actina es uno de los blancos primarios de ataque por las especies reactivas del oxígeno. El estrés oxidativo induce profundas alteraciones en la red de microfilamentos, iniciando un proceso de fragmentación de la F-actina. El mecanismo de este proceso no está suficientemente aclarado, pero involucraría disminución del contenido de ATP, oxidación de grupos sulfidrilos de los residuos de cisteína de la actina y entrecruzamientos entre los filamentos (Huot *et al*, 1996; Dalle-Donne *et al*, 2001). Una de las consecuencias morfológicas de este daño oxidativo es la formación de múltiples protrusiones (“blebs”) en la superficie de la membrana plasmática. La ruptura de “blebs” causa la pérdida del gradiente iónico y la liberación al espacio circundante de componentes intracelulares esenciales para el normal funcionamiento celular, conduciendo a la muerte celular por necrosis (Dalle-Donne *et al*, 2001). Otro de los mecanismos propuestos para explicar estas anomalías morfológicas asociadas al estrés oxidativo es la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} provocada bajo estas condiciones. El aumento en la concentración de Ca^{2+} promueve la disociación de los microfilamentos de actina de la α -actinina, una proteína que sirve como intermediaria en la asociación de los microfilamentos con las proteínas que unen actina en la membrana plasmática (Jewell *et al*, 1982). El Ca^{2+} puede activar también ciertas proteasas (calpaínas) que modifican a las proteínas que unen actina, eliminando el anclaje de la membrana plasmática al citoesqueleto y permitiendo así la formación de las protrusiones (Miyoshi *et al*, 1996).

Se ha observado que el tratamiento de varios tipos celulares, hepatocitos entre ellos, con distintos agentes pro-oxidantes genera la formación de “*blebs*” de membrana, que puede ser prevenida por la adición al medio extracelular de diferentes agentes reductores (por ej., ditiotreitól o β -mecaptoetanol) (Dalle-Donne *et al*, 2001).

1.4.4. Alteración de las uniones estrechas paracelulares

Las células que conforman un epitelio están conectadas entre sí a través de uniones estrechas intercelulares (“*tight junctions*”). Estas estructuras, junto con una serie de proteínas reguladoras de su función, constituyen la denominada *zonula occludens* intercelular. Éstas actúan como barreras que impiden el paso indiscriminado de sustancias a través de la vía paracelular, manteniendo la diferenciación en la composición del fluido apical del basolateral. Su función de barrera también previene la difusión lateral de lípidos y proteínas de membranas, posibilitando el mantenimiento de la polaridad celular. La eficacia de esta barrera biológica depende de la integridad de las uniones intercelulares (Powell, 1981). Para el caso de epitelios secretores como el hepático, las uniones intercelulares posibilitan que se establezca un gradiente osmótico entre el plasma y la bilis, permitiendo que se establezca un flujo acuoso unidireccional en el sentido plasma-bilis, generando el flujo biliar (Anderson, 1993).

La *zonula occludens* esta conformada por diferentes proteínas ancladas en las membranas de dos células adyacentes (Fig. 7) (Gonzalez-Mariscal *et al*, 2003). La ocludina, claudina-1 y *junctional adhesion molecule-1* (JAM-1) son proteínas transmembrana que contribuyen directamente a su función de barrera. Otras proteínas, tales como ZO-1 o cingulina, conforman puntos de anclado para el citoesqueleto de actina, contribuyendo a la regulación de la vía paracelular por cambios dinámicos del mismo. Finalmente, algunas de estas proteínas cumplen un papel regulatorio de la expresión génica. Por ej., ZO-1 une al factor de transcripción ZONAB, el cual incentiva la proliferación de células epiteliales, impidiendo que ejerza su efecto en el núcleo celular; esto posibilita la inhibición por contacto de la proliferación celular, necesaria para modelar la arquitectura normal del epitelio (Balda *et al*, 2003).

Los agentes oxidantes pueden originar alteraciones a nivel de la barrera paracelular de epitelios secretores y, por ende, de su función secretora, modificando la permeabilidad y el transporte de solutos y electrolitos (Grisham *et al*, 1990). Por ejemplo, se ha demostrado en duplas aisladas de hepatocitos que niveles bajos de estrés oxidativo causan alteraciones hepatocanales tempranas, relevantes para la formación de bilis, que involucran daños en la permeabilidad de las uniones estrechas (Ahmed-Choudhury *et al*, 1998; Stone *et al*, 1994).

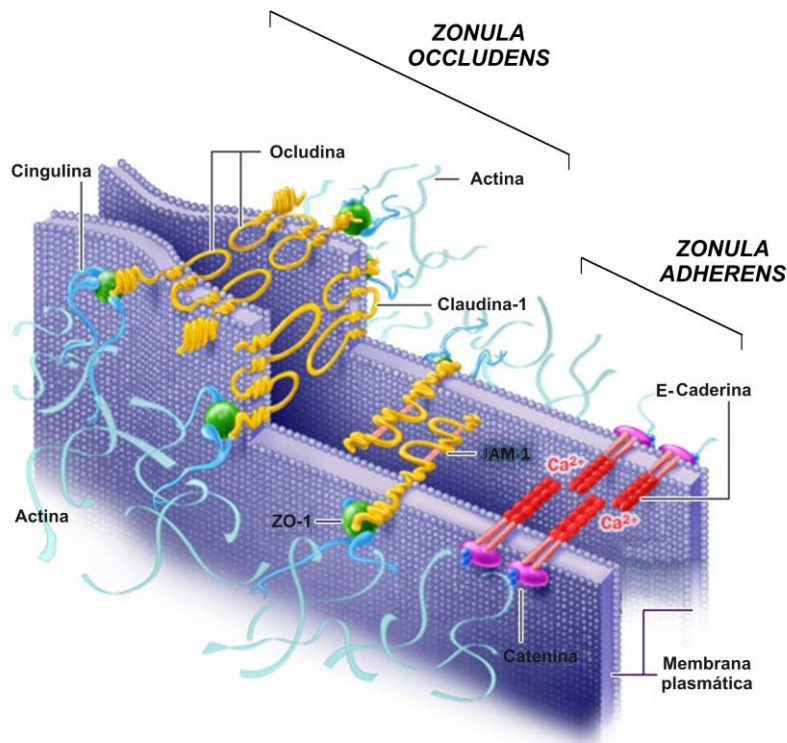


Figura 7. Uniones intercelulares (ver detalles en el texto).

El estrés oxidativo está asociado con un incremento en la fosforilación de residuos de tirosina de las proteínas celulares, lo cual puede desestabilizar y alterar la barrera transepitelial. La modificación de estos residuos afecta tanto a las uniones adherentes como a las uniones estrechas. En estos procesos de fosforilación/defosforilación de tirosinas participa la proteína quinasa C (PKC), provocando cambios en la permeabilidad paracelular (Stuart y Nigam, 1995; Rao *et al*, 1997). En concordancia con esto, se ha comprobado en duplas de hepatocitos aislados que la activación de PKC por administración de vasopresina o, más específicamente, por ésteres de forbol, induce apertura de la vía paracelular (Nathanson *et al*, 1992; Roma *et al*, 1998).

1.4.5. Alteración de proteínas

Las proteínas, péptidos y aminoácidos constituyen un blanco importante para las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. Se ha observado que la presencia de cantidades significativas de aminoácidos aromáticos o sulfurados en una estructura proteica la tornan más vulnerable a la acción de los radicales libres (Berlett y Stadtman, 1997). Por ejemplo, la inactivación oxidativa de residuos de metionina en las proteínas contribuye a la inhibición de la función proteica y a la pérdida de su actividad (Friguet, 2006). Estudios realizados *in vitro* indican que las proteínas sufren alteraciones localizadas en los sitios ligados a metales de

transición. Estos sitios son particularmente susceptibles debido a la facilidad con que los metales ligados reaccionan con el peróxido de hidrógeno para formar iones hidroxilo que, posteriormente, atacan a los aminoácidos adyacentes (Halliwell *et al*, 2000). Los productos del daño oxidativo de proteínas son frecuentemente amino ácidos hidroxilados y carbonilados que, habitualmente, se utilizan para la determinación del grado de oxidación proteico (Levine *et al*, 1994). Generalmente, las proteínas oxidadas son menos activas y termoestables, exponen sus residuos hidrofóbicos, y son degradadas en el citosol (Friguet, 2006).

Un ejemplo de los cambios que puede desencadenar el estrés oxidativo en su acción sobre las proteínas son los que sufre la enzima Ca^{2+} -ATPasa, encargada de mantener el gradiente de iones Ca^{2+} . Esta enzima contiene grupos tioles que pueden ser inactivados por las especies reactivas del oxígeno. Cuando ello ocurre, se pierde la actividad catalítica de la enzima, modificándose la homeostasis del Ca^{2+} en las células. El incremento en la concentración intracelular de este ion produce la activación de proteasas, que atacan al citoesqueleto, y a otras proteínas estructurales o funcionales (Kehrer, 1993). De hecho, el incremento de Ca^{2+} se considera como una de las principales causas de alteración metabólica ocasionadas por el estrés oxidativo (Bandyopadhyay *et al*, 1999).

1.4.6. Genotoxicidad

El ADN también constituye un blanco de ataque por parte de las especies reactivas. El estrés oxidativo puede activar endonucleasas capaces de romper la estructura de la molécula de ADN y así llevar a su fragmentación. La activación de estas enzimas es esencialmente causada por un incremento en los niveles de Ca^{2+} que, a su vez, puede estimular otros procesos que dañen al ADN. Por ejemplo, puede activar la topoisomerasa II, de modo de hacerla capaz de cortar las hebras del ADN pero no religarlas (Orrenius *et al*, 1992).

Los radicales libres también pueden atacar directamente a la molécula de ADN. El radical hidroxilo es capaz de generar lesiones en esta molécula, ya que reacciona con la desoxirribosa, provocando la pérdida de la base y la fragmentación del ADN. Alternativamente, puede reaccionar con la timina, produciendo lesiones que, al ser reparadas por las enzimas de reparación, genere cortes simple hebra en la molécula de ADN que puedan llevar a una desnaturalización localizada de la misma haciéndola más susceptible al ataque por radicales libres (Teebor *et al*, 1988).

El ADN mitocondrial también se encuentra expuesto a un flujo constante y elevado de radicales libres provenientes de la cadena respiratoria. Este ADN carece de histonas en su estructura, lo cual le resta estabilidad y lo hace particularmente susceptible al daño oxidativo. Además, se ha observado que sus mecanismos de reparación son menos eficientes (Bandyopadhyay *et al*, 1999).

En general, dentro del espectro de alteraciones que puede sufrir el ADN, se describen la oxidación de desoxirribosas, la ruptura y entrecruzamientos de cadenas, y la modificación de bases nitrogenadas. Sin embargo, estas alteraciones serán significativas en la medida que sean intensas y capaces de eludir los sistemas de reparación antes de que ocurra la replicación (Bandyopadhyay *et al*, 1999).

1.5. IMPORTANCIA FISIOPATOLÓGICA DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN HEPATOPATÍAS

La participación del estrés oxidativo en diferentes patologías hepáticas es un tema de amplio debate en el presente, documentándose un número creciente de evidencias de su papel en trastornos hepáticos, algunos de alta incidencia poblacional. Por ej., se ha demostrado la existencia de daño oxidativo en patologías conducentes a una excesiva acumulación hepatocelular de compuestos potencialmente pro-oxidantes, tales como aluminio, hierro (hemocromatosis, porfiria cutánea tarda, talasemia mayor, cirrosis alcohólica), cobre (intoxicación con Cu^{2+} , enfermedad de Wilson) o sales biliares (en hepatopatías de origen colestásico) (Poli, 1993; Sokol *et al*, 1993). También, se ha postulado un papel fisiopatológico del estrés oxidativo en isquemia hepática post-transplante (secundaria a cirrosis o a tumores con compromiso circulatorio) y en el alcoholismo, donde se ha observado una marcada disminución de las reservas antioxidantes y un aumento de la producción de radicales libres de origen tanto mitocondrial como del retículo endoplásmico (Poli, 1993; Albano, 2006). En relación con este último, el alcohol induce la síntesis de CYP2E1, una isoenzima del CYP-450 que libera electrones al citosol por desacople funcional con el sustrato, representando una fuente sustancial de estrés oxidativo en el hígado alcohólico. Existen también evidencias de aumento del estrés oxidativo hepático en pacientes con enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA), una entidad clínico-histológica de etiología multifactorial cuyos mecanismos aún no se conocen totalmente (Weltman *et al*, 1998; Angulo, 2002; Chitturi y George, 2003; Leclercq, 2004), que se asocia a condiciones de obesidad (entre el 69 y 100% de los casos), diabetes *mellitus* tipo 2 e hiperlipidemia (James y Day, 1998; Lyn Patrick, 2002). La EHGNA es una patología similar a la inducida por alcohol, pero en ausencia de consumo significativo de éste. Clínicamente, puede presentarse como una esteatosis asintomática y aquiescente o, en la minoría de los casos, progresar hacia esteatohepatitis, fibrosis y, finalmente, cirrosis (James y Day, 1998; Lyn Patrick, 2002). Entre uno de sus factores de progresión claves, se encuentra el estrés oxidativo, tanto de origen mitocondrial (por sobrecarga de la cadena respiratoria de electrones provenientes de la β -oxidación de ácidos grasos) como de origen retículo-endoplasmático (por inducción de síntesis de CYP2E1 por ácidos grasos) (Sanyal, 2005). Las defensas antioxidantes endógenas también se encuentran disminuidas, contribuyendo al desbalance redox (Leclercq, 2004).

1.6. MÉTODOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO

Para estudiar los procesos de daño oxidativo que ocurren en el hígado y en hepatocitos aislados, se utilizan frecuentemente compuestos exógenos que pueden generar estrés oxidativo a través de diferentes mecanismos. Algunos de estos compuestos son capaces de generar especies reactivas del oxígeno en forma directa (por ej., quinonas), mientras que otros pueden afectar el balance antioxidante de manera tal de que las células sean menos eficientes al enfrentarse a los agentes pro-oxidantes (por ej., el paracetamol) (Kon *et al*, 2004; Jaeschke, 2005). Dado que estos últimos requieren que se establezcan bloqueos de síntesis de sistemas enzimáticos no-oxidantes, su instalación es lenta y, por lo tanto, se reservan para estudios en donde se evalúan efectos crónicos del estrés oxidativo.

Entre los modelos agudos de estrés oxidativo, se destaca el empleo de compuestos químicos capaces de generar, una vez administrados y metabolizados, radicales libres del oxígeno. Entre ellos se encuentra la menadiona, una quinona que sufre un ciclo de reducción-reoxidación conducente a la formación final de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 , seguida del consumo de glutatión y nucleótidos de piridina (catalizado por la glutatión peroxidasa) (Thor *et al*, 1982). Por otra parte, también se dispone de un número de hidroperóxidos sintéticos, tales como el *tert*-butilhidroperóxido (*t*BOOH) o el cumeno-hidroperóxido, cuyo metabolismo, mediado principalmente por CYP-450, conduce a la formación de radicales libres alcoxilo y peroxilo de alta reactividad hacia membranas y otros componentes celulares (Ahmed-Chuodhury *et al*, 1998).

1.6.1. Quinonas redox

Estas moléculas son capaces de alterar el balance pro-oxidante/antioxidante en favor del primero. El metabolismo de las quinonas puede ocurrir por reacciones de reducción que involucran uno o dos electrones. En las reacciones monoelectrónicas catalizadas por las enzimas NADPH-CYP-450 reductasa, NADH-citocromo b_5 reductasa o NADH-ubiquinona oxidoreductasa, se forma el radical semiquinona que puede auto-oxidarse en presencia del oxígeno molecular regenerándose la quinona parental y reduciendo al oxígeno a radical superóxido (Fig. 8). De esta manera, la quinona entra en un “ciclo redox” que resulta en la formación de grandes cantidades de anión superóxido, altamente reactivo (Bellomo y Orrenius, 1985). Alternativamente, puede ocurrir una reducción de una quinona que involucre dos electrones a expensas del NADH o NADPH. Esta reacción es catalizada por una DT-diaforasa, llevando a la formación de hidroquinonas. No hay producción de intermediarios semiquinonas, siendo la hidroquinona menos reactiva y más fácilmente excretada por la célula, razón por la que se ha postulado que la DT-diaforasa jugaría un rol protector fundamental en la prevención de la toxicidad de las quinonas redox (Thor *et al*, 1982).

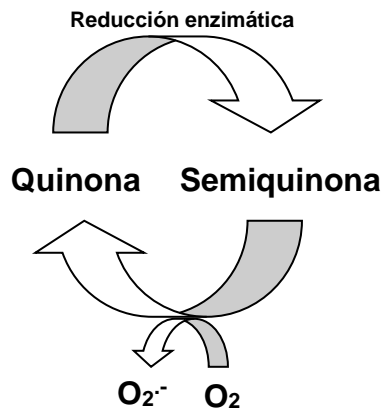


Figura 8. Ciclo redox de una quinona.

En hepatocitos aislados, la contribución relativa de estas dos vías es determinada por la concentración de la quinona. A bajas concentraciones, modula la actividad de las quinonas reductasas, mientras que, a altas concentraciones, se inhibe la reacción catalizada por la DT-diaforasa (Chen y Liu, 1992).

La menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) es la quinona redox más frecuentemente utilizada para la generación de estrés oxidativo en hepatocitos (Chai *et al*, 1991; Stone *et al*, 1996). Sin embargo, además de generar ROS, la menadiona induce arilación de proteínas, por lo cual su efecto puede no ser específico. Para subsanar esta desventaja, se ha sugerido como alternativa el uso de quinonas redox no arilantes, tales como la 2,3-dimetoxi-1,4-naftoquinona (DMNQ) (Stone *et al*, 1996).

1.6.2. *tert*-Butil hidroperóxido (*t*BOOH)

El hidroperóxido orgánico lipofílico, *tert*-butil hidroperóxido (*t*BOOH), es un agente oxidante de grupos tioles que se utiliza frecuentemente como inductor de estrés oxidativo (Fig. 9). Esta molécula es un análogo de cadena corta de los hidroperóxidos lipídicos formados por la peroxidación de ácidos grasos insaturados durante el ataque oxidativo, la isquemia/repercusión e, incluso, el metabolismo celular normal (Lemasters y Nieminen, 1997).

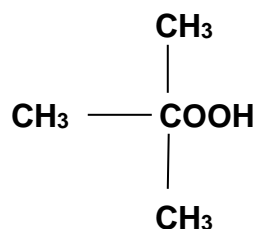
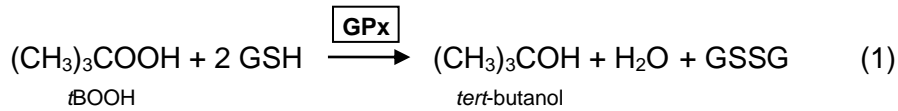


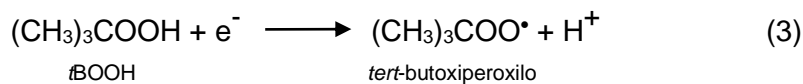
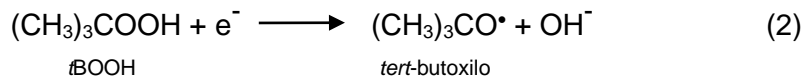
Figura 9. Estructura química del *tert*-butil hidroperóxido (*t*BOOH).

El *t*BOOH ha sido utilizado ampliamente en diversas investigaciones como compuesto modelo para estudiar el efecto de los hidroperóxidos en los sistemas biológicos, ya que difunde libremente las membranas celulares.

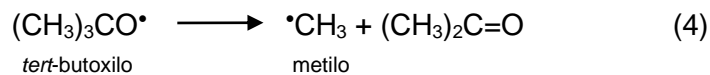
Este compuesto es reducido con transferencia de 2 e⁻ a su forma alcohólica (*t*-butanol), en una reacción enzimática catalizada por la enzima glutatión peroxidasa (GPx), utilizando glutatión (GSH) como dador de electrones (Lotscher *et al*, 1979) (ecuación 1).



A su vez, el tBOOH es convertido por transferencia de 1 e⁻ a los radicales libres alcoxilo (*tert*-butoxilo, tBO•) y peroxilo (*tert*-butilperoxilo, tBOO•), vía reacciones de enzimas redox que involucran al CYP-450 (Davies, 1989), o a través de su reducción en la cadena de transporte mitocondrial (Kennedy *et al*, 1992; O'Donnell y Burkitt, 1994) (ecuaciones 2 y 3, respectivamente).



A su vez, el radical *tert*-butoxilo puede escindirse, formando radicales metilo (ecuación 4).



La metabolización de tBOOH por el CYP-450 parece ser la fuente más importante de radicales alcoxilo y peroxilo en el hepatocito intacto, como lo demuestra el hecho que los inhibidores de CYP-450 suprimen la peroxidación lipídica inducida por este agente pro-oxidante (Jewell *et al*, 1986). Por su parte, la formación de ROS a nivel mitocondrial por la reducción de tBOOH en la cadena mitocondrial, aunque de importancia menor en un contexto de integridad celular preservada, explicaría el daño oxidativo que este peróxido sintético posee cuando se administra a mitocondrias intactas (Imberti *et al*, 1993; Kakkar *et al*, 1996; Adonis *et al*, 2003).

Estos radicales libres pueden reaccionar con el GSH intracelular formando GSSG (glutatión oxidado), provocando la disminución del GSH, la peroxidación lipídica de membranas celulares, y varios otros eventos deletéreos (respuestas cito- y geno-tóxicas) que llevan a la muerte celular, ya sea por fenómenos apoptóticos o necróticos (Latour *et al*, 1995; Haidara *et al*, 2002).

1.7. MECANISMOS FISIOLÓGICOS DE FORMACIÓN DE BILIS

1.7.1. Generalidades

La formación de la bilis es un proceso osmótico, cuya fuerza impulsora está dada por la secreción activa al canalículo de compuestos osmóticamente activos seguida del transporte pasivo de agua (Sperber, 1959). Una diversidad de compuestos endógenos y exógenos se transportan a la bilis a través de los hepatocitos, quienes, para llevar adelante esta función, necesitan mantener su polaridad estructural. Para posibilitar un transporte sectorizado en el sentido plasma-bilis, estas células expresan diferentes sistemas de transporte en sus dominios de membrana sinusoidal (basolateral) o canalicular (apical) (Müller y Jansen, 1997). Estos transportadores juegan un rol clave en el transporte vectorial de solutos y agua desde el plasma a la bilis, contribuyendo así a la formación de la misma, así como también a la excreción de muchos xenobióticos (Müller y Jansen, 1998).

Para que un soluto sea capaz de promover el transporte primario de agua desde la sangre sinusoidal a la luz canalicular, éste debe ser secretado activamente y concentrado en el espacio canalicular. Una vez secretado, este soluto puede promover el movimiento de agua a través de las rutas paracelular y transcelular; este último camino se halla facilitado por la existencia de canales de agua (aquaporinas) en los dominios de membrana basolateral y canalicular del hepatocito (Müller y Jansen, 1998; Carreras *et al*, 2003).

De los solutos presentes en la bilis, sólo tres parecen cumplir con los requisitos antes mencionados para ser fuerzas impulsoras primarias de la formación de bilis, a saber: las sales biliares (SB), el anión HCO_3^- y el glutatión, en sus formas tanto reducida (GSH) como oxidada (GSSG). Las SB contribuyen a la fracción del flujo biliar denominada dependiente de SB, mientras que el HCO_3^- y el GSH serían responsables, al menos en parte, de la formación de la fracción de flujo biliar independiente de SB (Trauner y Boyer, 2003).

1.7.2. Transporte hepatocelular de sales biliares (SB)

La secreción de SB representa la principal fuerza impulsora para la formación de la bilis. La primera etapa del transporte hepatobiliar de SB es su captación desde el plasma sinusoidal al hepatocito, seguida de su transporte intracelular hacia el polo secretor y, finalmente, su transporte a través de la membrana canalicular para posibilitar su secreción biliar (Kullak-Ublick *et al*, 2000) (Fig. 10). La captación hepatocelular de SB a través de la membrana basolateral (sinusoidal) ocurre en contra de un gradiente de concentración, y es facilitada predominantemente por un sistema de transporte activo secundario dependiente de Na^+ mediado por el polipéptido transportador de taurocolato (Ntcp/NTCP) (Meier *et al*, 1997). La fuerza impulsora para este transporte es aportada por la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, ubicada en la membrana basolateral hepática. Ntcp/NTCP es el responsable del transporte de más del 80%

de las SB amidadas conjugadas con taurina o glicina (las principales SB circulantes) y sólo de un 40% de las SB no conjugadas (Kouzuki *et al*, 1998).

Además de este co-transporte SB/Na⁺, existen otras vías de transporte de SB independientes de Na⁺ presentes en la membrana plasmática basolateral de los hepatocitos. Una de ellas está mediada por un conjunto de proteínas estructuralmente similares entre sí que transportan aniones orgánicos, colectivamente denominadas “*organic anion transporting polypeptide*” (Oatp/OATP) (Hagenbuch *et al*, 1994). Este sistema de transporte es multiespecífico, ya que transporta otros aniones orgánicos endógenos y exógenos, como la bilirrubina. La fuerza impulsora para este sistema de transporte no ha sido aún establecida, pero puede involucrar el intercambio con HCO³⁻ o GSH.

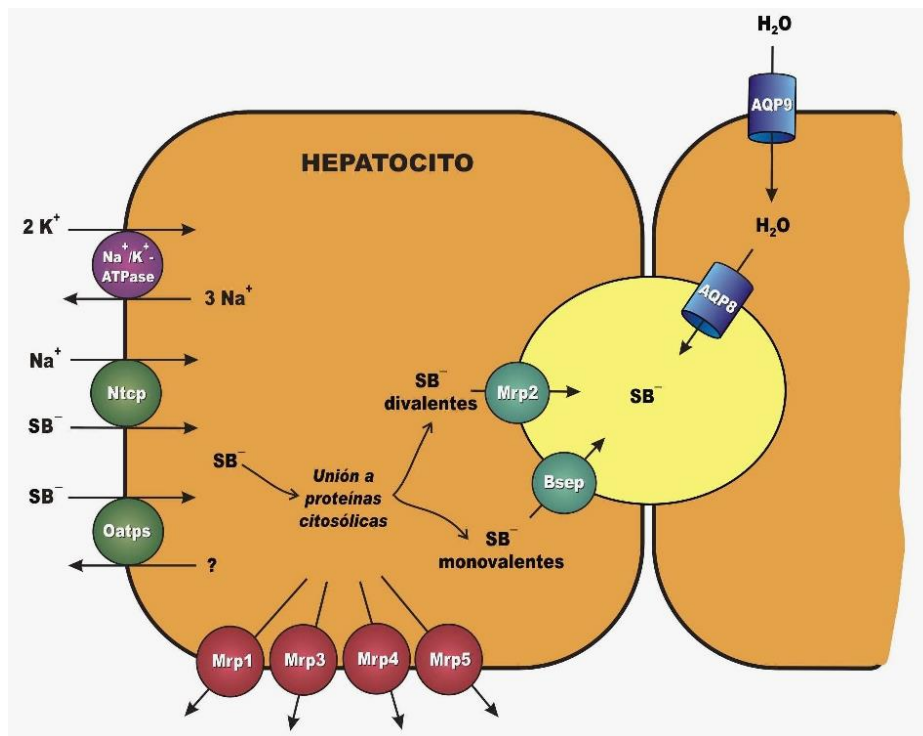


Figura 10. Transporte hepatocelular de sales biliares (SB) (ver detalles en el texto).

Una vez que las SB cruzan la membrana sinusoidal, ya sea libres o unidas a proteínas citosólicas, deben alcanzar el polo canalicular del hepatocito. En condiciones fisiológicas, la mayor parte de las SB captadas se encuentra unida a proteínas de unión intracelular, tales como la ligandina (una glutatión S-transferasa) y la 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenada; la unión a estas proteínas minimiza el reflujó de SB a través de la membrana sinusoidal, posibilitando su difusión hacia el polo secretor canalicular y disminuyendo la toxicidad intracelular asociada a las SB (Kullak-Ublick *et al*, 2000).

Finalmente, las SB son secretadas a través de la membrana plasmática canalicular hacia la bilis, donde se encuentran a una concentración muy superior a la plasmática y hepática. Este

paso representa la etapa limitante en la velocidad del transporte global de sangre a bilis (Deroubaix *et al*, 1989). La secreción canalicular de las SB está mediada predominantemente por un sistema de transporte dependiente de ATP conocido como bomba exportadora de sales biliares ("*bile salt export pump*", Bsep/BSEP), una proteína de 160 KDa capaz de transportar aniones orgánicos de una manera dependiente de ATP, vinculada a la subfamilia de proteínas canaliculares de resistencia a multidrogas ("*multidrug resistant protein*", Mdr/MDR), pertenecientes, a su vez, a la superfamilia de los transportadores "*ATP-binding cassette*" (ABC). (Müller y Jansen, 1997). Por su parte, las SB bipolares divalentes (sulfatadas y glucuronizadas) son secretadas a la bilis por un segundo sistema de transporte dependiente de ATP a través de otro transportador perteneciente a la superfamilia ABC, la proteína asociada a la resistencia a multidrogas 2 ("*multidrug resistance associated protein 2*", Mrp2/MRP2) (Müller y Jansen, 1998). Este transportador media además la secreción biliar de diferentes aniones orgánicos, incluyendo glutatión S-conjugados (por ej., leucotrieno C₄ o bromosulfoftaleína), glucuronidos (por ej., de bilirrubina y estrógenos), y glutatión oxidado (GSSG) (Konig *et al*, 1999).

Además de Ntcp y Oatp, la membrana basolateral también posee varios transportadores pertenecientes a la familia Mrp, a saber: Mrp1, Mrp3, Mrp4 y Mrp5 (ver Fig. 10). Estos transportadores dependientes de ATP retornan a sangre las SB captadas. Aunque normalmente se expresan a niveles muy bajos en hígados normales, son sobreexpresados en colestasis para compensar la reducida expresión de Mrp2/Bsep que ocurre concomitantemente en estas patologías; esto posibilita el eflujo de SB a plasma, permitiendo su excreción renal alternativa (Bodo *et al*, 2003).

1.7.3. Papel de las uniones estrechas intercelulares

El transporte vectorizado de solutos desde los compartimentos citoplasmáticos a la bilis es posibilitado fundamentalmente por la disposición polarizada de los sistemas de transporte específicos ubicados en las membranas de los hepatocitos. Si tenemos en cuenta que la generación del flujo biliar depende del establecimiento y mantenimiento eficaz de estos gradientes concentrativos para posibilitar flujos osmóticos (ver ítem 1.7.1), podemos concluir que la conservación de un espacio hermético en el lugar donde estos gradientes se forman, esto es en el canalículo biliar, resulta indispensable para impedir la disipación de estos gradientes, ocasionado por la retrodifusión a plasma de los solutos que lo conforman por la vía paracelular.

Estas propiedades dependen fundamentalmente de la integridad estructural y funcional de las uniones estrechas, las cuales forman una especie de cinturón hermético entre hepatocitos vecinos conformando la *zonula occludens*, que separa al canalículo biliar del espacio de Disse

(Anderson, 1993). Las uniones estrechas del hepatocito son intermedias entre “*tight*” y “*leaky*”, esto es, permeables al agua y a pequeños solutos, pero no a moléculas más grandes, como las SB y la sacarosa. La *zonula occludens* también discrimina el pasaje de solutos por su carga. En efecto, las uniones estrechas poseen carga negativa, una característica que optimiza la retención en el espacio canalicular de solutos aniónicos, como las SB y otros aniones orgánicos. Además de su función de barrera, las uniones estrechas inhiben la difusión lateral de los sistemas de transporte de membrana, que deben situarse específicamente en la membrana sinusoidal o canalicular, para mantener la polaridad celular (Fanning *et al*, 1999).

Estas importantes funciones de las uniones estrechas la posicionan como un blanco potencial para la acción de agentes colestásicos. En efecto, ocurren alteraciones de la integridad funcional de las uniones estrechas en varias condiciones colestásicas, incluyendo ligadura del conducto biliar o secundarias a la administración de estrógenos, ciclosporina A, acetaminofeno, α -naftilisotiocianato y litocolato, o su conjugado con taurina taurolitocolato (Boyer, 1983).

1.7.4. Efectos de las alteraciones sobre el citoesqueleto de actina

Los hepatocitos poseen un citoesqueleto muy desarrollado compuesto, principalmente, por filamentos de F-actina, proteínas de unión a actina, filamentos intermedios y miosina II (ver ítem 1.4.4). Estas proteínas se encuentran asociadas a la membrana canalicular, así como también a las uniones estrechas, formando una robusta red interconectada alrededor del canalículo biliar (Dalle-Donne *et al*, 2001; Phillips *et al*, 1983). La integridad funcional de estas estructuras es esencial para que los hepatocitos secreten y retengan material pre-acumulado en la bilis canalicular. De hecho, se ha postulado que uno de los mecanismos hepatocelulares involucrados en la colestasis es la disfunción del citoesqueleto (Phillips *et al*, 1983). Esto ha sido corroborado experimentalmente, ya que la disrupción del citoesqueleto de actina provocada por el tratamiento con faloidina o citocalasina D resulta en una disminución del flujo biliar (Kawahara *et al*, 1989). Se han sugerido diferentes mecanismos que explican este efecto colestásico. Un patomecanismo posible es la alteración de la contractibilidad canalicular, ya que la actina ubicada en las proximidades del canalículo biliar posee una función contráctil, y el peristaltismo resultante propulsaría la bilis a lo largo de los conductos biliares (Phillips *et al*, 1983). Otro mecanismo posible es el arresto del transporte vesicular, responsable del tráfico vectorizado de lípidos y proteínas que mantienen la polaridad hepatocelular. En efecto, se ha demostrado que, durante el establecimiento de la polaridad hepatocelular, la citocalasina D bloquea la inserción apical de transportadores, sugiriendo que la actina se encuentra involucrada en el tráfico vesicular de constituyentes canaliculares al polo apical del hepatocito (Roma *et al*, 2000). Finalmente, la pérdida de integridad del citoesqueleto de actina se asocia a

un incremento en la permeabilidad de las uniones estrechas intercelulares del epitelio hepático, sugiriendo una relación causal entre ambas (Elias *et al*, 1980; Roma *et al*, 1998). Dado que la disrupción del citoesqueleto de actina es una alteración común en colestasis (Thibault *et al*, 1992), éste patomecanismo puede cumplir un papel fundamental en una gran variedad de síndromes colestásicos. Por ej., se ha reportado, en un modelo de colestasis obstructiva, una asociación entre la redistribución de la actina y las alteraciones en la localización de proteínas reguladoras de las uniones estrechas asociadas a actina, tales como ZO-1 (Song *et al*, 1996 a), evidenciándose, a su vez, una redistribución de proteínas canaliculares de la membrana sinusoidal (Song *et al*, 1996 b).

1.7.5. Efectos del estrés oxidativo sobre los mecanismos de secreción biliar

El impacto del estrés oxidativo sobre los sistemas hepatocelulares involucrados en la función secretora biliar ha sido poco estudiado. Se ha descrito que el agente pro-oxidante tBOOH interfiere con varios aspectos del proceso de formación de bilis, incluso a niveles suficientemente bajos como para no afectar la viabilidad celular. En efecto, la administración de bajas dosis de tBOOH al hígado aislado y perfundido, incapaces de producir liberación de la enzima citosólica lactato deshidrogenasa (LDH), produjo una disminución del flujo biliar, debida a una reducción en la excreción de SB endógenas y a una aumentada permeabilidad paracelular (Ballatori y Truong, 1989); este último efecto fue reproducido en duplas de hepatocitos aisladas, utilizando como agentes pro-oxidante tanto tBOOH (Ahmed-Choudhury *et al*, 1998) como quinonas redox (Stone *et al*, 1994; Stone *et al*, 1996). Estos cambios fueron acompañados de un aumento en los niveles intracelulares de GSSG, con incrementado eflujo del mismo, tanto al perfusato como a la bilis (Ballatori y Truong, 1989). Se ha propuesto que la formación intracelular aumentada de GSSG y la disminución de la excreción biliar de SB están causalmente relacionados, ya que el GSSG bloquea el sistema de transporte de taurocolato en membranas canaliculares aisladas (Griffiths *et al*, 1987). Existen, sin embargo, otros factores diferentes al GSSG, ya que tBOOH fue capaz de inhibir el transporte canalicular del análogo de SB fluorescente, colil-lisil-fluoresceína (CLF) en duplas de hepatocitos aisladas a dosis que no aumentaron los niveles celulares de GSSG (Ahmed-Choudhury *et al*, 1998), de modo que los procesos de captación, transporte y/o secreción de SB tienen que haber sido afectados de manera intrínseca, aunque la naturaleza precisa de estas alteraciones permanece sin aclararse (Ahmed-Choudhury *et al*, 1998).

2. OBJETIVOS

*“Es mas fácil desintegrar
un átomo que un prejuicio.”*

*Albert Einstein (1879-1955).
Físico y matemático alemán*

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos generales

- Caracterizar las alteraciones estructurales y funcionales inducidas por el estrés oxidativo sobre el sistema secretor hepatobiliar, así como la participación de mecanismos de transducción de señales en dichas modificaciones.
- Una vez corroborada la mediación de desbalances de señalización celular en el daño oxidativo hepatocelular, indagar posibles estrategias de prevención y/o reversión de dicha injuria basadas en el restablecimiento de éste balance, utilizando para ello moduladores de señalización apropiados.

2.2. Objetivos particulares

Establecer la participación de cascadas de señalización dependientes de Ca^{2+} en las alteraciones morfológico-funcionales sobre el sistema hepatobiliar y disfunción mitocondrial inducidas por estrés oxidativo. Para ello se indagará si:

1. El daño oxidativo es capaz de inducir cambios en la actividad, cantidad y distribución intracelular de PKC, y si los están relacionados con un incremento en los niveles de Ca^{2+} citosólico.
2. En caso positivo, corroborar la hipótesis que las elevaciones de Ca^{2+} citosólico pueden mediar, vía activación de PKC, las alteraciones morfológico-funcionales del sistema hepatobiliar inducidas por estrés oxidativo (alteraciones del citoesqueleto de actina, desorganizaciones de las uniones estrechas intercelulares, internalización de transportadores canaliculares), utilizando para ello el modelo de duplas aisladas de hepatocitos de rata.
3. Estudiar la posible relación causal de estos mecanismos con la facilitación por Ca^{2+} de la generación de estrés oxidativo de origen mitocondrial, caracterizando posibles mediadores de señalización causantes de dicho efecto.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

“Nada puedes enseñar a un hombre; sólo ayudarle a encontrarlo por sí mismo”

*Galileo Galilei (1564-1642).
Físico, astrónomo y filósofo italiano.*

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos químicos

La colil-lisil-fluoresceína (CLF) fue cedida gentilmente por el Dr. Charles O. Mills (Birmingham, Inglaterra). La colagenasa tipo A (de *Clostridium histolyticum*), albúmina sérica bovina (ASB), azul tripán, digitonina, el medio de cultivo Leibovitz-15 (L-15), dimetilsulfóxido (DMSO), KN-62, W7, la faloidina marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC), N⁶,2'-O-dibutiriladenosina 3':5'-monofosfato sódico cíclico (dibutiril-AMPc, DB-AMPc), el ácido etilén glicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), Tritón X-100, KT5720, 1-(5-isoquinolinilsulfonil)-2-metil-piperazina (H7), Gö6976, estaurosporina (SP), el cianuro de carbonilo 3-clorofenilhidrazona (CCCP), leupeptina y *tert*-butil hidroperóxido (tBOOH) fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.). El 1,2-*bis*-(*o*-aminofenoxi)-eteno-N,N,N',N'-tetraacetato tetrakis-(acetometil éster) (BAPTA/AM), N,N'-difenil-*p*-fenilendiamina (DPPD), trifluoperazina (TFP), ciclosporina A (CsA), tetra-metil-rodamina metil-éster (TMRM), Fura-2 pentakis-(acetometil éster) (Fura-2/AM) y N-acetil-L-leucil-L-leucil-L-norleucina (ALLN) fueron obtenidos de Fluka Chemika (Steiheim, Suiza). El diacetato de 2',7'-diclorofluorescina (DCFH-DA) fue provisto por Molecular Probes (Eugene, OR, EE.UU.). Todos los otros reactivos utilizados fueron de grado analítico.

3.2. Animales de experimentación

Para todos los ensayos, se utilizaron ratas Wistar macho adultas de 120-130 días de edad (300-350 g), criadas en nuestro bioterio (Instituto de Fisiología Experimental, CONICET). Antes de su utilización, los animales se mantuvieron con una dieta estándar y agua *ad libitum*, a temperatura (21-23 °C) y humedad ambiente controlada (45-50%), bajo un ciclo constante luz-oscuridad de 12 hs cada uno. Todos los animales recibieron cuidado humanitario de acuerdo a los criterios delineados en la *Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio* ("Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", National Institutes of Health, EE.UU., publicación N° 25-28, revisada en 1996).

3.3. Aislamiento de hepatocitos

Los hepatocitos fueron aislados de hígados de rata mediante la técnica de perfusión con colagenasa, utilizando una modificación del método de Berry y Friend (1969). Brevemente, bajo anestesia con pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso corporal, *i.p.*), se administró heparina en la vena cava inferior (1500 U/kg de peso corporal) y se introdujo un catéter 14G (Abbocath-T, Venisystem, Abbocath Ireland Ltd., Sligo, Irlanda) en la vena portal. El hígado fue perfundido por vía portal durante 10 min con un medio no recirculante, consistente en una solución Hanks'

oxigenada (95% O₂/5% CO₂) libre de Ca²⁺, pH = 7,47-7,50, suplementada con HEPES (3 g/l) y EGTA (0,24 g/l), cambiándose luego el medio de perfusión a uno conteniendo la misma solución sin EGTA, suplementada con MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 2,5 mM y colagenasa tipo IV (4300 U/l), durante 5 min. Finalmente, se removieron los hígados, y las células se aislaron por disociación mecánica a través de la agitación suave con una varilla de vidrio durante 3-4 min. Los hepatocitos fueron posteriormente purificados de células no-parenquimatosas por centrifugación a baja velocidad (50 x g, 2 min), seguida de 3 lavados consecutivos con solución Hanks´ oxigenada conteniendo CaCl₂ 2,5 mM y Tris 5 mM. La preparación resultante consistió de ~ 400-600 x 10⁶ hepatocitos por hígado de elevada viabilidad (> 90%), según arrojó el ensayo de exclusión de azul tripán (Baur *et al*, 1975).

3.4. Tratamientos

Los hepatocitos se resuspendieron en buffer Krebs-Ringer-HEPES, pH = 7,4, suplementado con D-glucosa 0,5 % y ASB 3 %, hasta alcanzar una densidad final de 2 x 10⁶ cél/ml (salvo casos indicados expresamente). La suspensión se mantuvo en hielo no más de 30 min antes de ser usada.

Los hepatocitos se pre-incubaron con una serie de moduladores de señalización para determinar el papel respectivo de PKA, PKC, y las cascadas de señalización dependientes de Ca²⁺ y Ca²⁺/calmodulina (CaM) en los efectos deletéreos causados por el tratamiento con el agente pro-oxidante tBOOH. Los compuestos ensayados, sus efectos biológicos, la concentración final empleada, y el volumen y clase de vehículo utilizado para la disolución se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos empleados en este estudio.

Tratamiento	Efecto biológico/molecular	Concentración final en placa (µM)	Vehículo	Volumen agregado (µl)
Estudios de inhibición de PKC				
H7	Inhibidor de PKC/PKA	100	Sln.salina	10
Estaurosporina (SP)	Inhibidor de PKC	10	DMSO	10
Gö6976	Inhibidor de PKCs "clásicas" (dependientes de Ca ²⁺)	2	DMSO	2
Estudios de secuestro de Ca²⁺ intracelular				
BAPTA/AM	Quelante de Ca ²⁺ intracelular	20 ó 50	DMSO	2 ó 5

Tratamiento	Efecto biológico/molecular	Concentración final en placa (μM)	Vehículo	Volumen agregado (μl)
Estudios de activación de PKA				
DB-AMPC	Activador de PKA	500	DMSO	10
KT5720	Inhibidor de PKA	5	DMSO	2
Estudios de inhibición de CaM				
W7	Antagonista de CaM	100	DMSO	20
TFP	Inhibidor de CaM	10	DMSO	10
Estudios de inhibición de CaMKII				
KN-62	Inhibidor de CaMKII	10	DMSO	10
Estudios de inhibición de calcineurina				
FK506	Inhibidor de calcineurina	1	DMSO	10
Estudios de inhibición de calpaínas				
Leupeptina	Inhibidor de calpaínas	100	DMSO	10
ALLN	Inhibidor de calpaínas	50	DMSO	10
Estudios de inhibición de PTPM				
CsA	Inhibidor de PTPM	5	DMSO	10

Nota. En los estudios de inhibición de PKC, calcineurina, calpaínas, PTPM, CaMKII o de secuestro de Ca^{2+} , los hepatocitos se pre-trataron con los antagonistas indicados anteriormente durante 15 min a 37°C , antes de agregar al medio de incubación tBOOH (100 μM ó 500 μM) y mantenerlo durante 15 min. En los estudios de activación de PKA, las células se pre-trataron durante 15 min con KT5720 (5 μM) o su vehículo (DMSO). Luego, se pre-trataron durante 15 min con DB-AMPC (500 μM). Posteriormente, se agregó tBOOH , y se lo dejó actuar durante otro período de 15 min. Abreviaciones: BAPTA/AM, 1,2-bis-(*o*-aminofenoxi)-eteno-*N,N,N',N'*-tetraacetato tetrakis-(acetometil éster); DB-AMPC, dibutiril-AMP cíclico; H7, 1-(5-isoquinolinilsulfonil)-2-metil-piperazina; PKA, proteína quinasa A; PKC, proteína quinasa C; TFP, trifluoperazina; CsA, ciclosporina A; ALLN, N-acetil-L-leucil-L-leucil-L-norleucina.

Los hepatocitos se pre-incubaron con los moduladores de señalización indicados en la Tabla 1 durante 15 min y se expusieron luego al tratamiento con diferentes concentraciones de

tBOOH (100 y 500 μM) durante un período similar. Los moduladores de señalización se mantuvieron en el medio de incubación durante todo el tratamiento.

3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.5.1. Determinación de la viabilidad hepatocelular

Al final del período de incubación con tBOOH, se tomaron diferentes alícuotas de hepatocitos para la determinación de la viabilidad celular a través del ensayo de exclusión de azul tripán y de la cuantificación de la liberación de la enzima citosólica lactato deshidrogenasa (LDH).

3.5.1.1. Ensayo de exclusión de azul tripán

Este método se fundamenta en que las células no viables, habiendo perdido la integridad de las membranas celulares, no son capaces de excluir el colorante, quedando teñidas de color azul. En cambio, las células viables, que mantienen intacta las propiedades de barrera de su membrana plasmática, pueden excluir el colorante, observándose blancas y brillantes al microscopio de luz (Baur *et al*, 1975).

Para llevar a cabo este ensayo, se tomaron 5 μl de la suspensión celular y se agregaron a 150 μl de azul tripán (1,3 g/l), disueltos en solución Hanks' suplementada con HEPES. La viabilidad se calculó como el porcentaje de hepatocitos capaces de excluir el colorante del cuerpo celular, referido a los valores obtenidos en las células controles no expuestas a tBOOH.

3.5.1.2. Determinación de la liberación de LDH al medio

La pérdida de la propiedad de funcionar como barrera de la membrana plasmática hepatocelular es un evento clave en la necrosis celular. Para evaluar la integridad de la membrana plasmática ante la exposición al agente pro-oxidante tBOOH, se evaluó la liberación al medio de incubación de la enzima citosólica LDH (EC 1.1.1.27). El método se basa en la siguiente reacción:



El cofactor de esta reacción, NADH, absorbe luz a 340 nm, mientras que su producto de oxidación, NAD⁺, es ópticamente inerte a esta longitud de onda. Así, a medida que la reacción procede, la pendiente de la caída de absorbancia puede considerarse proporcional a la actividad LDH.

Para esta determinación, se tomaron 25 μ l del sobrenadante resultante de centrifugar una suspensión celular (2×10^6 cél/ml) a 40 g durante 2 min, y se adicionaron a 1 ml del buffer de reacción conteniendo NADH, provisto por un kit comercial (Wiener Lab, Rosario). La velocidad de oxidación de NADH fue determinada espectrofotométricamente (Perkin Elmer UV/Vis Spectrometer Lambda2S, Überlingen, Alemania).

Se reservó una alícuota de la suspensión celular para la determinación del contenido total de LDH. Para tal fin, las células fueron tratadas con Tritón X-100 (0,1 % v/v), seguido de una centrifugación a alta velocidad (9000 g, 2 min), para posibilitar la liberación del contenido total de LDH.

3.5.2. Determinación del contenido celular de ATP

El contenido de ATP se determinó a través del método de luciferina-luciferasa (Lyman y DeVincenzo, 1967). Brevemente, se incubó una suspensión de duplas de hepatocitos conteniendo 1×10^5 cél/ml a 37 °C durante 4,5 hs antes del tratamiento con tBOOH (100 μ M y 500 μ M, 15 min), o su vehículo (DMSO) en los controles. Luego, se eliminó el medio L-15, debido a que se encontró que interviene con el ensayo de ATP, posiblemente por su contenido en metionina, cisteína o rojo fenol. Las células se resuspendieron en buffer Hanks´ y fueron permeabilizadas mediante el agregado de Na₄EDTA (9 mM) en ácido perclórico (14 %) durante 15 min a 4 °C. Luego de centrifugar la suspensión resultante a 2200 g, se tomaron 2 ml y se neutralizaron con 1 ml de una solución consistente en KOH 1M y NaHCO₃ 1M (4 °C). Se eliminó el precipitado formado por el proceso de neutralización mediante centrifugación (5 min a 2200 g, 4 °C). Se adicionaron 20 μ l del sobrenadante resultante (o de una solución testigo de ATP 1 mM) a una solución conteniendo 2 ml de buffer sulfato (Tris 20 mM más MgSO₄ 6 mM) y 0,5 ml de luciferina/luciferasa (Sigma Aldrich, Poole, Inglaterra). La luminiscencia emitida se registró utilizando un lector de microplacas Beckman Coulter DTX 880 (Beckman Fullerton, California, EE.UU.). Los valores obtenidos del testigo se utilizaron para calcular el contenido de ATP de las muestras.

3.5.3. Determinación del glutation total (GSht) y oxidado (GSSG)

Luego del tratamiento de los hepatocitos con los agentes estudiados, las células fueron centrifugadas a baja velocidad y resuspendidas en buffer Hanks´. El contenido de GSht y GSSG de la suspensión celular se determinó de acuerdo al método de Tietze modificado por Griffith (Tietze, 1969; Griffith, 1980). Brevemente, a 400 μ l del sobrenadante de un sonificado (3 pulsos de 5 seg, amplitud 7,5, en hielo) de la suspensión de hepatocitos (50×10^6 cél/ml) se le adicionaron 200 μ l de ácido sulfosalicílico (SSA) 10%. Luego de centrifugarlo durante 5 min a 10.000 rpm, se separó una fracción de 2 μ l del sobrenadante para la medición de GSH total. A

la fracción restante se le adicionó 2-vinilpiridina y trietanolamina (TEA), y se la mantuvo a 30 °C por una hora, agitándola en vórtex periódicamente. Luego de esta incubación, se tomó una fracción de 20 µl para la medición del contenido de GSSG. Las muestras (tanto para GSht como GSSG) se suplementaron con 700 µl de NADPH, 100 µl de DTNB y se llevaron a un volumen final de 1 ml con solución fisiológica. En un baño termostatzado a 30 °C, se le adicionó a cada preparado 0,5 U de la enzima glutation reductasa, y se procedió a medir la cinética del consumo de NADPH a 412 nm durante 90 seg, a intervalos de 0,1 seg, utilizando un espectrofotómetro (Perkin Elmer UV/Vis Spectrometer Lambda2S, Überlingen, Alemania). Se obtuvieron los valores de pendiente de las rectas y se determinó la relación GSSG/GSht. En todos los ensayos, se procesó, en forma paralela, un testigo de GSH de 50 µg/ml.

3.5.4. Evaluación del estrés oxidativo inducido por tBOOH

La producción de radicales libres del oxígeno (ROS) en presencia de diferentes concentraciones de tBOOH se determinó indirectamente, midiendo la generación de productos de peroxidación lipídica y, en forma directa, cuantificando la producción de ROS por fluorimetría, utilizando diacetato de 2',7'-diclorofluorescina (DCFH-DA) como sonda fluorescente.

La peroxidación lipídica se determinó utilizando una modificación del método clásico de cuantificación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Buege y Aust, 1978). Brevemente, a 0,2 ml de una suspensión celular conteniendo 10^6 cél/ml se le adicionaron 0,5 ml de ácido tricloroacético (10% v/v) y 50 µl del antioxidante DPPD (60 µM). Al sobrenadante resultante, se le agregó 1 ml de ácido tiobarbitúrico (0,7% p/v), y se calentó en un baño de glicerina a 100 °C durante 15 min. Después de enfriarlo y centrifugarlo (1000 g durante 10 min), se midió la absorbancia a 532 nm (Perkin Elmer UV/Vis Spectrometer Lambda2S, Überlingen, Alemania). Una curva estándar utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano, el cuál es convertido mol a mol en malondialdehído (MDA), se efectuó rutinariamente. El contenido de proteínas en las distintas alícuotas de la suspensión celular utilizadas para los ensayos se determinó por el método tradicional de Lowry (Lowry *et al*, 1951). Los TBARS se expresaron como nmoles equivalentes de MDA por mg de proteína.

La formación de ROS se cuantificó en forma directa utilizando a la 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) como fluoróforo. El compuesto no fluorescente diacetato de 2',7'-diclorofluorescina (DCFH-DA), agregado al medio de incubación, atraviesa libremente la membrana hepatocelular, siendo metabolizado por esterasas no específicas y oxidado a DCF por los ROS intracelulares (Kurose *et al*, 1997). Para llevar a cabo este estudio, alícuotas de una suspensión de hepatocitos (2×10^6 cél/ml) se pre-cargaron con DCFH-DA 8 µM durante 30 min. Luego de este período, se lavaron las células dos veces para eliminar el exceso de fluoróforo y,

finalmente, se resuspendieron en el medio de incubación conteniendo *t*BOOH (100 μ M ó 500 μ M) durante 15 min. La formación del producto oxidado, DCF, se detectó fluorométricamente, utilizando longitudes de onda de excitación y emisión de 488 nm y 525 nm, respectivamente (Shimadzu RF-5301 PC, Shimadzu Corp., Japón).

3.5.5. Medición de la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)

El efecto en los niveles intracelulares de Ca^{2+} de los distintos pre-tratamientos efectuados a los hepatocitos fue ensayado 15 min después de la administración de *t*BOOH, utilizando Fura-2/AM como sonda fluorescente. Para este fin, se resuspendieron 2×10^6 hepatocitos en 3 ml de solución buffer PBS (pH = 7,4), conteniendo CaCl_2 3 mM a 37 °C, y luego se les adicionó Fura-2/AM 10 μ M. Las intensidades de fluorescencia (F) se midieron utilizando alternadamente longitudes de onda de excitación de 340 y 380 nm, y de emisión de 510 nm (3 nm de ancho de banda), en un espectrofluorómetro Shimadzu RF-5301 PC (Shimadzu Corp., Japón). La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se calculó de la relación (R) de intensidades de fluorescencia de Fura-2/AM 340 nm/380 nm, de acuerdo a la siguiente ecuación (Grynkiewicz *et al*, 1985):

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d [(R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)] (F_{380 \min} / F_{380 \max})$$

donde K_d es la constante de disociación del complejo, Fura-2/ Ca^{2+} (135 nM), R_{\max} y R_{\min} son los valores de R medidos secuencialmente ante la adición de digitonina 100 μ g/ml a las células cargadas con Fura-2, antes y después de quelar el Ca^{2+} con una solución de EGTA/Tris 5 mM (pH 8,7), respectivamente.

3.5.6. Medición del potencial de permeabilidad de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) en hepatocitos intactos

Puesto que la formación del PTPM resulta en la disipación del potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), los cambios en el mismo son un parámetro subrogado de PTPM, posibilitando así su cuantificación. Para monitorear el cambio en el $\Delta\psi_m$, se pre-cargaron hepatocitos aislados de ratas Wistar macho adultas con tetra-metil-rodamina metil éster (TMRM) 8 μ M en solución buffer Krebs-Henseleit, a 37 °C, durante 10 min. Este fluoróforo catiónico permeable a membranas se acumula electroforéticamente en la mitocondria en proporción al $\Delta\psi$ de la organela (Ehrenberg *et al*, 1988). Una vez pre-cargadas las células (5×10^5 cél/ml) con TMRM, se procedió a pre-tratarlas con los distintos moduladores de señal detallados anteriormente. Luego de 15 min, las células fueron tratadas con *t*BOOH (100 μ M ó 500 μ M) durante el mismo período de tiempo. El sobrenadante fue eliminado para remover el exceso de TMRM, y las células fueron llevadas a su volumen original con buffer Krebs-Henseleit. Las intensidades de fluorescencia (F) se midieron utilizando alternadamente

longitudes de onda de excitación de 546 y 573 nm, y de emisión de 590 nm (3 nm de ancho de banda), en un espectrofluorómetro Shimadzu RF-5301 PC (Shimadzu Corp., Japón). El $\Delta\psi m$ se calculó a partir de la relación de intensidades de fluorescencia 573 nm/546 nm (R), de acuerdo a lo informado por Scaduto y Grotyohann (1999). Para su estimación, se tuvo en cuenta los valores de fluorescencia obtenidos a través de la despolarización completa causada por el tratamiento con cianuro de carbonilo 3-clorofenilhidrazona, CCCP (10 μ M; 15 min), refiriéndose el valor obtenido a este valor máximo, considerado 100%.

La pre-incubación con TMRM también fue útil para visualizar la formación de PTPM mediante un microscopio de fluorescencia (Axiovert 25 CLF, Carl Zeiss, Alemania). Para este propósito, se cultivaron hepatocitos aislados resuspendidos en medio L-15 en placas de Petri plásticas de 35-mm, a una densidad de $5,5 \times 10^5$ cél/ml, durante aproximadamente 2,5 hs para permitir su adherencia. Luego de este período, las células se cargaron con TMRM 500 nM durante 15 min, a 37 °C. Posteriormente, se removió el medio de cultivo para eliminar el exceso de fluoróforo, y se reemplazó con medio nuevo. Los especímenes se examinaron bajo luz fluorescente (excitación 535 nm, emisión 590 nm).

3.6. Aislamiento, enriquecimiento y cultivo de duplas aisladas de hepatocitos de rata (DAHR)

Las duplas aisladas de hepatocitos se obtuvieron a partir de la perfusión *in situ* de hígados de rata, de acuerdo al método de doble perfusión con colagenasa (Gibco, Paisley, Inglaterra), previamente descrito por Wilton y col. (1991). Este método consiste en digerir, de manera incompleta, el hígado de rata, limitando el tiempo de perfusión *in situ* con colagenasa a 4,5 min y reduciendo la concentración de la misma (0,03 % p/v). La cantidad de células obtenidas se incrementa al incubar el resto del tejido hepático durante 7 min con 30 ml de la solución de colagenasa descrita anteriormente, en un baño de agua a 37 °C. Luego de filtrar la suspensión a través de una malla de nylon, se dejaron decantar las células durante 5 min a 0 °C, lavándose tres veces con medio L-15 fresco.

La suspensión celular obtenida contuvo ~25% de duplas de hepatocitos con una alta viabilidad (> 90%), determinada mediante exclusión del colorante azul tripán. Esta preparación inicial, conteniendo poblaciones variables de agregados hepatocitarios, fue luego enriquecida en duplas mediante elutriación, según la técnica descrita por Wilton y col. (1991). Esta técnica se utiliza para separar células en función de su velocidad de sedimentación cambiando solamente la velocidad de flujo del medio, mientras que la viscosidad y la velocidad del rotor se mantienen constantes (Saunders y Soll, 1989). Tanto la cámara como el flujo de líquido deben mantenerse a temperatura ambiente (21 °C) durante todo el estudio. Esto ayuda a conservar la integridad de las células, manteniendo su fluidez de membrana.

Para la centrifugación elutriacional, se utilizó una cámara estándar de elutriación montada sobre un rotor JE-6B (Beckman Ltd, High Wycombe, Inglaterra) en una centrífuga Beckman-Coulter Avanti J2-S. Las células se separaron manteniendo la velocidad del rotor a 1100 rpm e incrementando secuencialmente el flujo del medio de elutriación en la cámara utilizando una bomba peristáltica.

Las células se cargaron en la cámara de separación a una velocidad de 8 ml/min. Una vez cargadas, se incrementó el flujo obteniéndose fracciones de 100 ml a partir de los 25 ml/min hasta 90 ml/min, que fueron mantenidas en hielo. Las células elutriadas se sedimentaron por centrifugación a 85 g durante 5 min, resuspendiéndose finalmente en 4 ml de medio L-15.

La preparación resultante tuvo ~75% de duplas con igual viabilidad que la preparación inicial. Estas duplas de hepatocitos fueron cultivadas a 37 °C ($0,5 \times 10^5$ cél/ml) durante 4,5 a 5 hs en placas plásticas de cultivo de 35 mm conteniendo 2 ml de medio de cultivo Leibovitz-15 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.), adicionado con 50 µg/ml de estreptomicina y 50 U/ml de penicilina. Este tiempo es necesario y suficiente para que las duplas restablezcan la polaridad de sus membranas celulares, restituyan sus uniones estrechas intercelulares y la organización de su citoesqueleto, y adquieran una capacidad máxima para transportar y acumular en sus vacuolas canaliculares el análogo fluorescente de sales biliares colil-lisil-fluoresceína (CLF) (Wilton *et al*, 1993).

3.6.1. Determinación de la función canalicular

La alteración en la función canalicular ante el pre-tratamiento con diferentes concentraciones de t BOOH (0-175 µM; 15 min) se evaluó mediante la determinación de la proporción de duplas aisladas de hepatocitos de rata (> 50) capaces de acumular en la vacuola canalicular (AVc) el análogo fluorescente de sales biliares CLF (Fig. 11). Este compuesto tiene un comportamiento similar en cuanto a los parámetros cinéticos de captación y secreción a lo observado con la sal biliar natural colilglicina, que es excretada a la bilis canalicular principalmente por la bomba transportadora de sales biliares (Bsep) (Mills *et al*, 1999).

Para llevar a cabo estos experimentos, se adicionó CLF (2 µmol/l) a cada placa posteriormente al tratamiento con t BOOH, y se la incubó a 37 °C durante 15 min (Mills *et al*, 1997). Luego de este período de tiempo, se removió la sal biliar fluorescente del medio de cultivo mediante el lavado con L-15 (2 veces), determinándose inmediatamente la acumulación canalicular de CLF, utilizando para ello un microscopio invertido de fluorescencia (Axiovert 25 CLF, Carl Zeiss, Alemania).

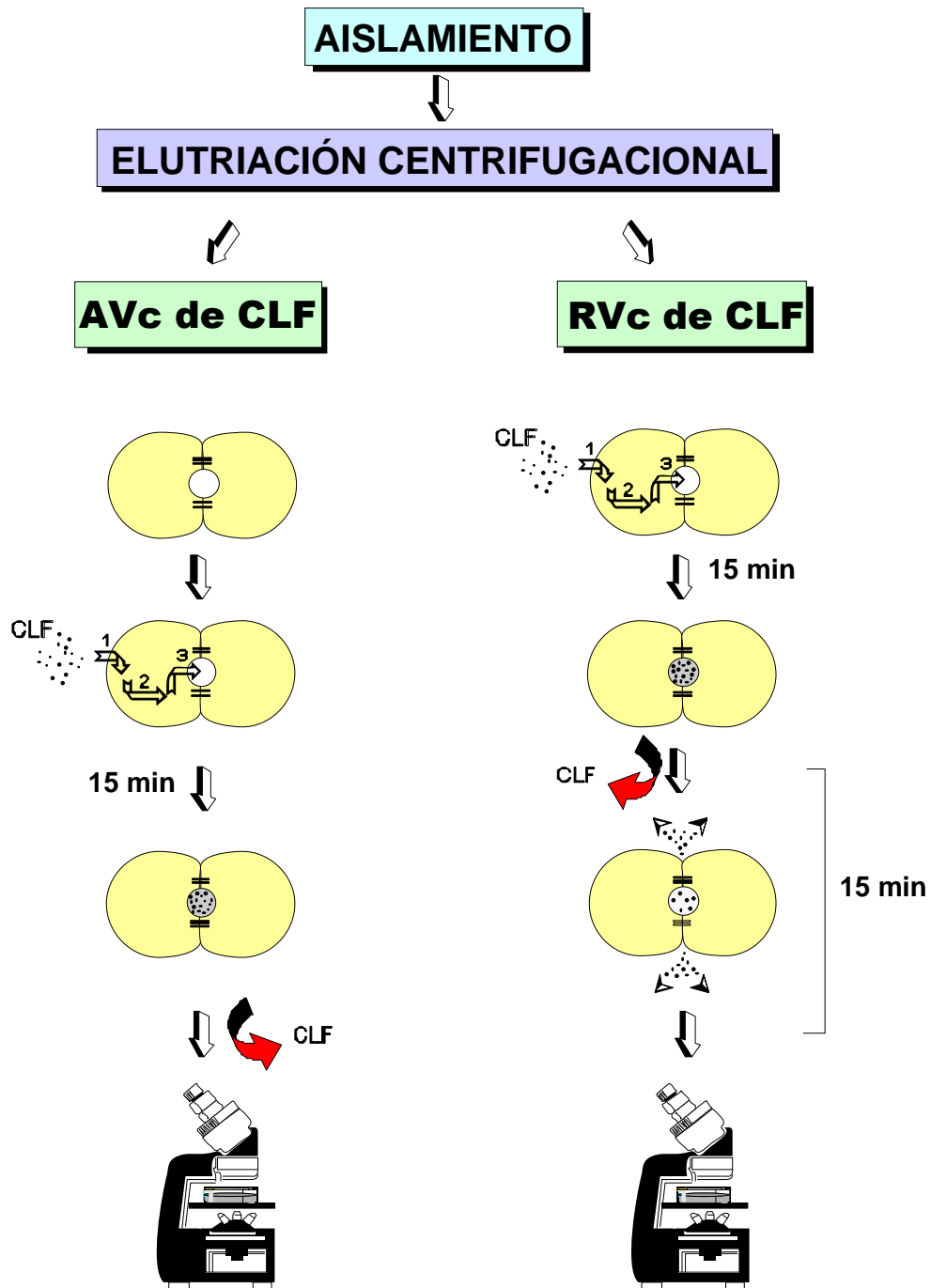


Figura 11. Acumulación (AVc) y retención (RVc) del análogo fluorescente de sales biliares CLF en la vacuola canalicular de duplas de hepatocitos aisladas. Para evaluar la capacidad de acumulación, se incuban duplas de hepatocitos previamente tratadas con CLF durante 15 min, y se observa al microscopio de fluorescencia la cantidad de fluoróforo acumulado en la vacuola canalicular. 1, fase de captación; 2, fase de transporte; 3, fase de secreción. Para evaluar la capacidad de retención, se pre-cargan las duplas con CLF durante 15 min. Posteriormente se remueve el fluoróforo del medio extracelular y se realizan los diferentes tratamientos. Finalmente, se cuantifica la proporción de duplas que han acumulado en sus vacuolas canaliculares suficiente cantidad de CLF para hacerse visible por microscopía de fluorescencia.

Para llevar a cabo los estudios de retención en la vacuola canalicular (RVC), se incubaron las duplas de hepatocitos con CLF durante 15 min para permitir su acumulación. Luego de dos lavados con L-15 para eliminar el exceso de fluoróforo, las células se trataron durante 15 min con tBOOH (100 μ M) o su vehículo (DMSO) en los controles. Posteriormente se determinó el porcentaje de células que retuvieron CLF en su vacuola canalicular utilizando un microscopio de fluorescencia (Axiovert 25 CLF, Carl Zeiss, Alemania).

3.6.2. Estudios de localización de F-actina, ZO-1 y Bsep

Para realizar estos estudios, las células se fijaron en un portaobjeto con paraformaldehído al 3% en PBS durante 15 min a temperatura ambiente. Luego de tres lavados con PBS, se permeabilizaron con un buffer consistente en 0,2% de Tritón X-100, suplementado con ASB al 0,3% p/v durante 10 min.

El marcado fluorescente de actina se llevó a cabo utilizando una modificación del método descrito por Knutton y col. (1989), modificado por Wilton y col. (1994), consistente en la marcación de los filamentos de F-actina con faloidina-FITC (5 μ g/ml en PBS). Las células, previamente fijadas y permeabilizadas, fueron tratadas por 20 min, y luego lavadas con PBS.

Para realizar el inmunomarcado de ZO-1, se incubaron duplas de hepatocitos, previamente fijadas y permeabilizadas, con un anticuerpo anti-ZO-1 de conejo (1:100; Zymed, San Francisco, CA, EE.UU.) durante una noche, seguida de una posterior incubación de 40 min con anticuerpos anti-IgG de conejo marcados con FITC (1:100).

Para llevar a cabo el inmunomarcado de Bsep, se incubaron duplas de hepatocitos, previamente fijadas y permeabilizadas, con suero de cabra suplementado con 1,5% de ASB en PBS durante 30 min, a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se incubaron durante 40 min con un anticuerpo anti-Bsep de conejo (1:250; cedido por el Dr. Michael Müller), seguido de una posterior incubación de 40 min con un suero de cabra conteniendo anticuerpos anti-IgG de conejo marcados con FITC (1:100).

Una vez realizadas las marcaciones indicadas, los especímenes se examinaron utilizando un microscopio confocal (Zeiss Pascal LSM 5, Carl Zeiss, Alemania).

3.7. Evaluación del “blebbing” de la membrana plasmática

Las protuberancias en la superficie de los hepatocitos (“blebbing”) se identificaron por microscopía de luz utilizando un microscopio invertido (Axiovert 25 CLF, Carl Zeiss, Alemania), y se expresaron como el porcentaje de células ($n > 30$) exhibiendo al menos una protrusión (“bleb”) en su superficie celular. En el caso de las duplas, se designó como positiva a aquella en donde al menos una de ambas células mostrara alguna protuberancia en su membrana (Nicotera *et al*, 1987; Stone *et al*, 1994).

3.8. Determinación de PKC α en membranas celulares

La activación de PKC esta asociada con su translocación desde el citosol a las membranas celulares (Newton, 2001). Por este motivo, se determinó, mediante el análisis por *Western blotting*, la cantidad de la isoforma clásica dependiente de Ca²⁺ de PKC, PKC α , en fracciones de membranas celulares totales, como indicador de su activación.

Para obtener las fracciones de membranas celulares totales, se centrifugaron hepatocitos (2 x 10⁶ cél/ml), y se resuspendieron en la mitad de su volumen inicial utilizando un buffer consistente en sacarosa 0,3 M conteniendo 0,1 mM de fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF) y 0,1 mM de leupeptina. Las células se sonicaron y se centrifugaron a baja velocidad para obtener sobrenadantes post-nucleares. Estas fracciones post-nucleares fueron sometidas a centrifugación durante 60 min a 200.000 g, obteniéndose la fracción de membranas celulares totales (Carreras *et al*, 2003). Las proteínas totales en esta fracción se determinaron de acuerdo al método de Lowry (Lowry *et al*, 1951), utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

Para el análisis por *Western blotting* de PKC α , alícuotas de fracciones de membranas celulares totales conteniendo cantidades iguales de proteínas totales fueron sometidas a electroforesis en un gel de dodecil-sulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%, y transferidas a membranas de difluoruro de polivinilo (NEN Life Science Products, Inc., Boston, MA, EE.UU.). Después de bloquear las membranas en PBS/0,3% Tween 20 conteniendo leche al 5% y lavarlas, se incubaron toda la noche a 4 °C con un anticuerpo primario anti-PKC α humana obtenido en ratón (1:1000, BD Transduction laboratories, BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.). Luego, las membranas fueron lavadas e incubadas durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (1:5000). Las bandas proteicas se detectaron utilizando un kit comercial de quimioluminiscencia (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Inglaterra). Las autoradiografías se obtuvieron por exposición de las membranas a películas Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY, EE.UU.). Las bandas fueron evaluadas por densitometría, utilizando el programa Gel-Pro 32 (Gel-Pro Analyzer, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EE.UU.).

3.9. Análisis de imágenes

Las microfotografías de fluorescencia se analizaron utilizando el software Openlab Digital Imaging (Improvision, Warwick Science Park, Coventry, Inglaterra), para cuantificar la intensidad total de fluorescencia en las duplas de hepatocitos en la región canalicular (para Bsep) o en la región pericanalicular (para ZO-1 y F-actina). Midiendo la distribución de F-actina en las duplas controles, se determinó un ancho promedio de la región pericanalicular en función de la longitud total de la dupla. Este valor promedio se aplicó a las duplas tratadas, en

donde se consideró solamente el valor de fluorescencia en esa área como de origen pericanalicular (Roma *et al*, 1998).

3.10. Análisis estadísticos

Los resultados fueron expresados como la media aritmética \pm error estándar (EE). Cuando se necesitaron realizar estudios paramétricos de los datos, se recurrió al análisis de los mismos mediante el ensayo *t* no-apareado de Student para la comparación entre dos grupos. Cuando se comparó más de dos grupos, se utilizó el ensayo de Kruskal-Wallis (ANOVA en rangos), seguido del ensayo de Dunn para comparaciones múltiples, si el ANOVA alcanzaba significancia estadística entre los grupos. Los valores de *p* menores que 0,05 fueron considerados significativos.

4. RESULTADOS

*“La ciencia es el simple sentido
común llevado al máximo:
observación cuidadosa y
rigor ante las falacias lógicas.”*

*Thomas Henry Huxley (1825-1895).
Naturalista evolucionista inglés.*

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización del estrés oxidativo inducido por *tert*-butil hidroperóxido (*t*BOOH)

Inicialmente, se llevó a cabo la caracterización de nuestro modelo de estudio, el cual utiliza *tert*-butil hidroperóxido como agente pro-oxidante. Para ello, evaluamos el efecto del tratamiento de hepatocitos aislados de rata con *t*BOOH a dos concentraciones (100 μ M y 500 μ M; 15 min). La magnitud del daño oxidativo se estimó en términos de la alteración en la integridad celular, modificaciones del estado redox y de los niveles de Ca^{2+} , y por medición directa e indirecta de la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS). Como se puede observar en la Tabla 2, a una dosis baja de *t*BOOH (100 μ M), no se registró impacto alguno sobre la viabilidad hepatocelular, liberación de LDH o contenido celular de ATP, ni se alteraron significativamente los niveles de GSH total (GSht) o la relación GSSG/GSht con respecto al grupo control (hepatocitos tratados con DMSO, vehículo de *t*BOOH, durante el mismo período de tiempo). Sin embargo, se observó un incremento significativo en la formación de ROS, indicado por un aumento de la generación del compuesto fluorescente 2'-7'-diclorofluoresceína a partir de su derivado reducido, no fluorescente, diacetato de 2'-7'-diclorofluorescina. Esto fue confirmado por un método alternativo independiente, consistente en la medición de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), como un parámetro vinculado con la peroxidación lipídica. A pesar de generar niveles bajos de estrés oxidativo, sin alteración de la viabilidad celular ni la liberación de LDH, *t*BOOH 100 μ M fue capaz de duplicar los niveles citosólicos de Ca^{2+} libre (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de *t*BOOH sobre la integridad celular, estado redox y niveles de Ca^{2+} .

	DMSO ^a	<i>t</i> BOOH 100 μ M ^b	<i>t</i> BOOH 500 μ M ^b	<i>n</i>
Viabilidad celular (% de células totales) ^c	96 \pm 3	93 \pm 4	62 \pm 3 ^{**}	5
Liberación de LDH (% del contenido celular total) ^d	31,8 \pm 2,1	32,0 \pm 0,4	41,7 \pm 3,0 ^{**}	5
Contenido de ATP celular (μ mol/10 ⁶ células) ^e	48 \pm 6	44 \pm 5	43 \pm 3	4
GSht (nmoles/10 ⁶ células)	27,0 \pm 2,2	25,8 \pm 2,8	17,4 \pm 1,1 ^{**}	4
% GSSG/GSht	3,1 \pm 0,1	3,2 \pm 0,3	4,1 \pm 0,2 ^{**}	4
Formación de ROS (unidades arbitrarias de fluorescencia) ^g	426 \pm 32	580 \pm 40 [*]	627 \pm 47 [*]	8

Generación de TBARS (nmoles de MDA/mg de proteína) ^h	0,7 ± 0,2	2,0 ± 0,4 *	7,7 ± 0,4 **	9
Ca ²⁺ citosólico libre (nM) ⁱ	119 ± 11	238 ± 11 *	3029 ± 474 **	5

^a Las células fueron pre-tratadas durante 15 min con el solvente de *tert*-butil hidroperóxido (*t*BOOH), DMSO (controles).

^b Las células fueron pre-tratadas durante 15 min con *t*BOOH 100 µM o 500 µM.

^c La viabilidad de los hepatocitos se determinó por el ensayo de exclusión de azul tripán (ver Materiales y Métodos para más detalles).

^d La actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) se determinó espectrofotométricamente, a través de la medición del consumo de NADH (ver Materiales y Métodos para más detalles).

^e El contenido de ATP se midió por el método de luciferina-luciferasa (ver Materiales y Métodos para más detalles).

^f El contenido de glutatión celular total (GSht) y oxidado (GSSG) se determinó por el método de Tietze, modificado por Griffith (ver Materiales y Métodos para más detalles).

^g La formación de ROS se determinó midiendo la producción intracelular del compuesto 2',7'-diclorofluoresceína a partir de su compuesto parental reducido no-fluorescente, diacetato de 2',7'-diclorofluorescina (ver Materiales y Métodos para más detalles).

^h La peroxidación lipídica se evaluó utilizando una modificación del método clásico de obtención de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (ver Materiales y Métodos para más detalles).

ⁱ El Ca²⁺ citosólico libre se determinó utilizando Fura-2/AM como sonda fluorescente (ver Materiales y Métodos para más detalles).

* $p < 0,05$ vs. células tratadas con DMSO (controles); # $p < 0,05$ vs. células tratadas con *t*BOOH 100 µM.

Por el contrario, el tratamiento con *t*BOOH a una concentración 5 veces superior (500 µM) alteró significativamente la integridad celular (% de viabilidad y liberación de LDH), sugiriendo que, a esa concentración, el daño oxidativo es capaz de provocar la muerte hepatocelular. A su vez, se comprobó una disminución del contenido de GSht y un correspondiente aumento de la relación GSSG/GSht, propios del establecimiento de un grado mayor de estrés oxidativo respecto al alcanzado con *t*BOOH 100 µM. Este hecho se vio claramente evidenciado en los niveles de lipoperoxidación (generación de TBARS) alcanzados con *t*BOOH 500 µM respecto a la dosis menor. La formación de especies reactivas del oxígeno (formación de ROS) también aumentó respecto a *t*BOOH 100 µM, aunque no alcanzó significación estadística. Si bien, a *t*BOOH 100 µM se pudo observar un aumento de 100% en la concentración de Ca²⁺ citosólico, este efecto se potenció a 500 µM. Notablemente, a esta concentración elevada de *t*BOOH, tampoco se pudo determinar una disminución en el contenido celular de ATP.

4.2. Activación de PKC inducida por tBOOH

Debido a que el tBOOH induce elevaciones de Ca^{2+} citosólico (ver Tabla 2) y que las isoformas denominadas clásicas de PKC requieren Ca^{2+} para su activación, nos propusimos evaluar, como parte de los objetivos de esta tesis, si tBOOH es capaz de activar PKC. La activación de PKC se encuentra asociada con su translocación desde el citosol a las membranas celulares (Newton, 2001). Por lo tanto, evaluamos, como indicador de su actividad, la cantidad de la isoforma de PKC dependiente de Ca^{2+} PKC α en fracciones de membranas celulares totales, a través del análisis por *Western blotting* (Fig. 12).

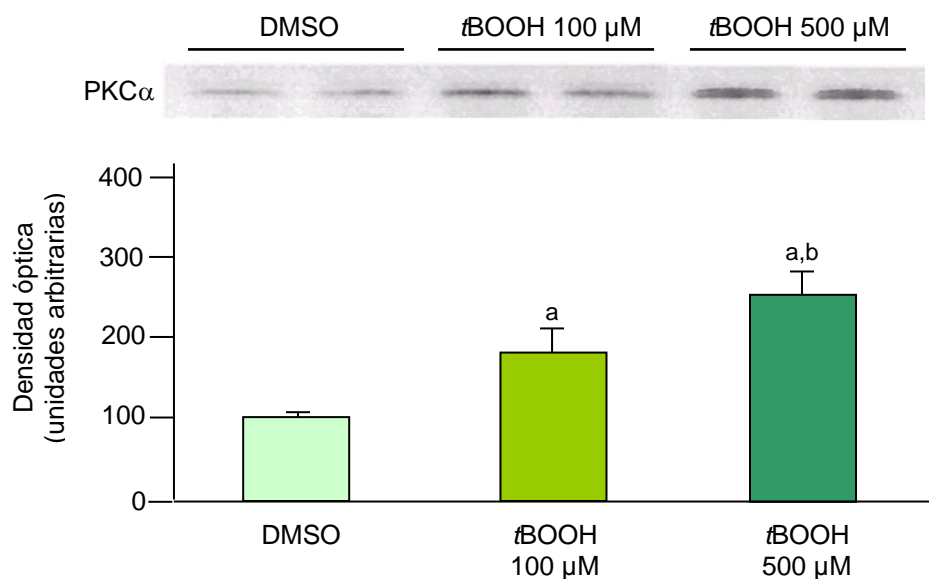


Figura 12. (Arriba) *Western blotting* representativo del contenido de PKC α en membranas totales de hepatocitos tratadas con el vehículo de tBOOH (DMSO) y de hepatocitos tratadas con tBOOH (100 μM y 500 μM). (Abajo) Densitometría de las bandas inmunoreactivas de PKC α mostradas arriba. Los valores informados son las medias aritméticas \pm EE y están expresados como unidades arbitrarias obtenidas al adjudicarle un valor de 100 a la banda menos intensa de cada uno de tres ensayos individuales, conteniendo dos bandas por grupo ($n = 6$). ^a, $p < 0,05$ comparado con el grupo DMSO; ^b, $p < 0,05$ comparado con el grupo tBOOH 100 μM .

Como se puede observar en la Fig. 12, tBOOH provocó un incremento (+79% a 100 μM y +150% a 500 μM) en la cantidad de la isoforma PKC α en membranas celulares totales, indicativo de su activación. Estos resultados nos permiten sustentar la hipótesis que PKC se encuentre involucrada en el daño celular inducido por estrés oxidativo.

4.3. Efecto de tBOOH sobre la función secretora de sales biliares

Entre los efectos deletéreos ocasionados por tBOOH, se ha descrito una disminución en la capacidad de duplas aisladas de hepatocitos de rata para acumular sales biliares en su vacuola canalicular (Ahmed-Choudhury *et al*, 1998). Para confirmar este efecto en nuestro modelo experimental, y con el objetivo de llevar a cabo estudios funcionales, se realizó una curva dosis-respuesta a distintas concentraciones de tBOOH, evaluándose en cada caso la

capacidad de las duplas de acumular el análogo de sal biliar fluorescente CLF (ensayo de AVc de CLF).

Como se muestra en la Fig. 13, las células expuestas a concentraciones crecientes de t BOOH mostraron alteraciones funcionales dosis-dependiente en la capacidad para secretar a nivel canalicular la sal biliar fluorescente. A una concentración de t BOOH 100 μ M, se observó una disminución de aproximadamente el 50% en la capacidad de las duplas para acumular CLF. Esta alteración es de naturaleza puramente funcional ya que, a esa concentración, t BOOH no afectó la viabilidad celular, el estado energético ni la integridad celular (ver Tabla 2), motivo por el cuál se continuó con los estudios funcionales tratando a los hepatocitos con esta concentración pre-necrótica de t BOOH.

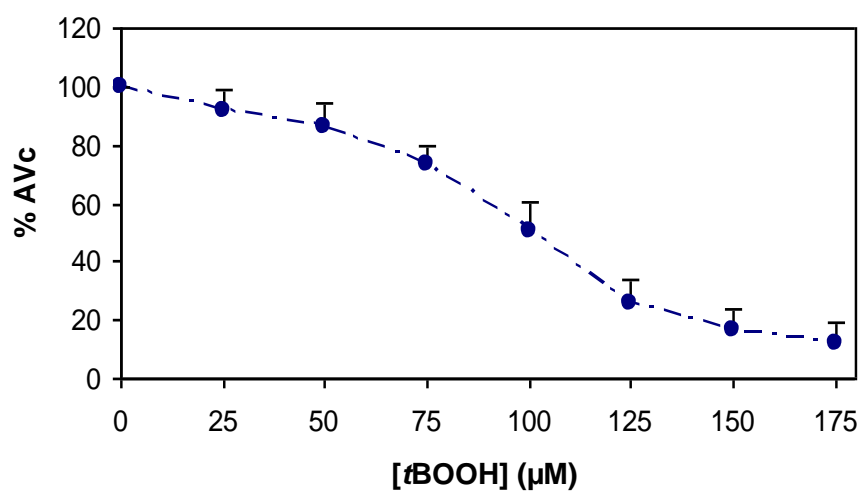


Figura 13. Efecto del tratamiento con diferentes concentraciones de t BOOH sobre la acumulación del análogo de sal biliar fluorescente CLF en duplas aisladas de hepatocitos de rata. Para ello, las duplas fueron pre-tratadas con t BOOH a las diferentes concentraciones indicadas en el gráfico durante 15 min, y luego expuestas a CLF durante otros 15 min. La AVc de CLF, se expresó como el porcentaje total de duplas de hepatocitos presentes en el campo que mostraron acumulación de CLF en su vacuola canalicular después de los tratamientos, referidos al valor control (100%). Se analizaron >50 células en cada grupo ($n = 5$). Los valores informados representan las medias aritméticas \pm EE. AVc, acumulación en la vacuola canalicular.

4.4. Efecto de t BOOH sobre la integridad del citoesqueleto de actina

4.4.1. Estudios de “blebbing”

La formación de protrusiones de membrana (“blebs”) es un marcador preliminar de la alteración del citoesqueleto de actina (Gores *et al*, 1990). Como puede verse en la Fig. 14 A, las células controles expuestas sólo al solvente de t BOOH, DMSO, mostraron un nivel bajo de “blebbing” basal (< 18%), principalmente consistente de ampollas simples y pequeñas en la superficie celular, comparable con valores reportados en la literatura (Nicotera *et al*, 1986; Stone *et al*, 1994; Ahmed-Choudhury *et al*, 1998; Roma *et al*, 1998); este “blebbing” basal sería probablemente debido al daño de membrana o las alteraciones metabólicas sufridas durante el

proceso de aislamiento (digestión excesiva por altos niveles locales de colagenasa, deficiencia transitoria del suministro de oxígeno, etc.). Contrariamente, el tratamiento con t BOOH indujo una formación generalizada de ampollas de membranas, fácilmente visibles al microscopio óptico como múltiples protuberancias distribuidas a lo largo de toda la superficie del hepatocito (“blebbing” de tipo 2) (Fig. 14 B), de manera tal que a concentraciones de t BOOH 500 μ M virtualmente todos los hepatocitos expusieron “blebs” en sus membranas plasmáticas.

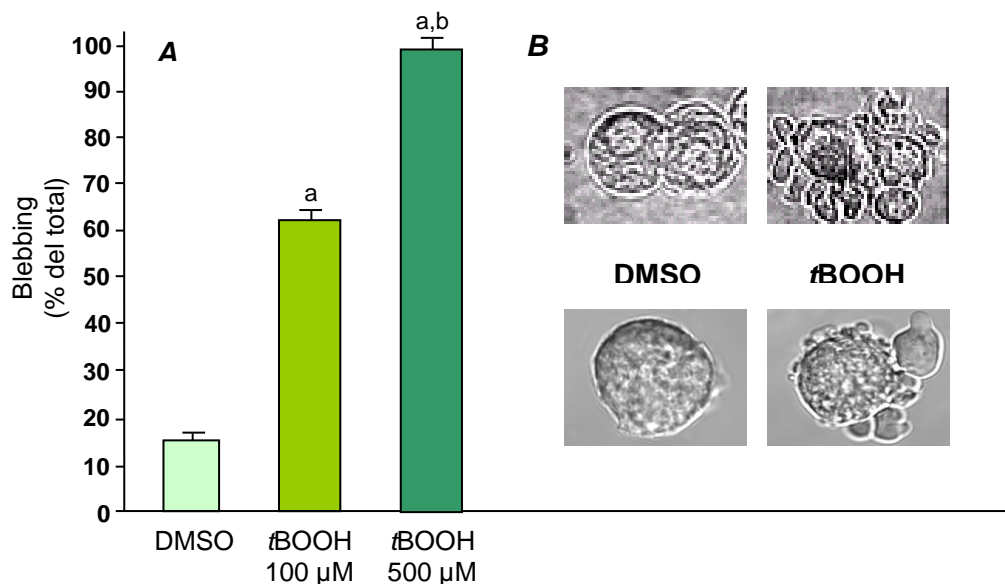


Figura 14. (A) Incremento en la formación de ampollas de membrana inducido por t BOOH. Las células se trataron durante 15 min con t BOOH (100 μ M y 500 μ M) o con su vehículo (DMSO) en los controles. El “blebbing” se encuentra expresado como el porcentaje de células totales presentes en el campo que presentaron al menos una protuberancia en su membrana plasmática. Se analizaron más de 50 células de cada grupo en 5 ensayos independientes. Los valores representan la media aritmética \pm EE. ^a, significativamente diferente del control (DMSO) ($p < 0,05$); ^b, significativamente diferente de t BOOH (100 μ M). **(B)** Imágenes representativas de contraste de fase que muestran la extensa formación de ampollas de membranas inducida por t BOOH, tanto en duplas de hepatocitos (panel superior) como en células aisladas (panel inferior).

4.4.2. Integridad celular de F-actina

Se estudiaron los cambios estructurales del citoesqueleto de actina inducidos por t BOOH en un modelo hepatocelular no polarizado (hepatocitos aislados) y en un modelo polarizado (duplas de hepatocitos), estos últimos conducentes a estudiar las alteraciones en su distribución subcelular en un sistema que conserva la disposición del citoesqueleto de actina del epitelio original.

Para los estudios siguientes, se utilizó solamente la concentración 100 μ M de t BOOH, ya que a ese valor no se produjeron cambios en la viabilidad, y tanto el estado energético como la integridad celular permanecieron conservados.

Como puede observarse en la Fig. 15 A, el tratamiento con t BOOH (100 μ M) en el hepatocito aislado genera cambios en la continuidad del anillo de actina, asociados con la

formación de protrusiones en la superficie de la membrana plasmática. También pudo evidenciarse una disminución en su espesor, indicada por una apreciable menor intensidad del anillo de actina. Por su parte, en un célula polarizada tratada con t BOOH, se observa una extensa redistribución de F-actina hacia el cuerpo celular y hacia la región de la membrana plasmática, que se encuentra en condiciones normales localizado en la zona pericanalicular, formando un denso cinturón debajo de la membrana canalicular (Fig. 15 B).

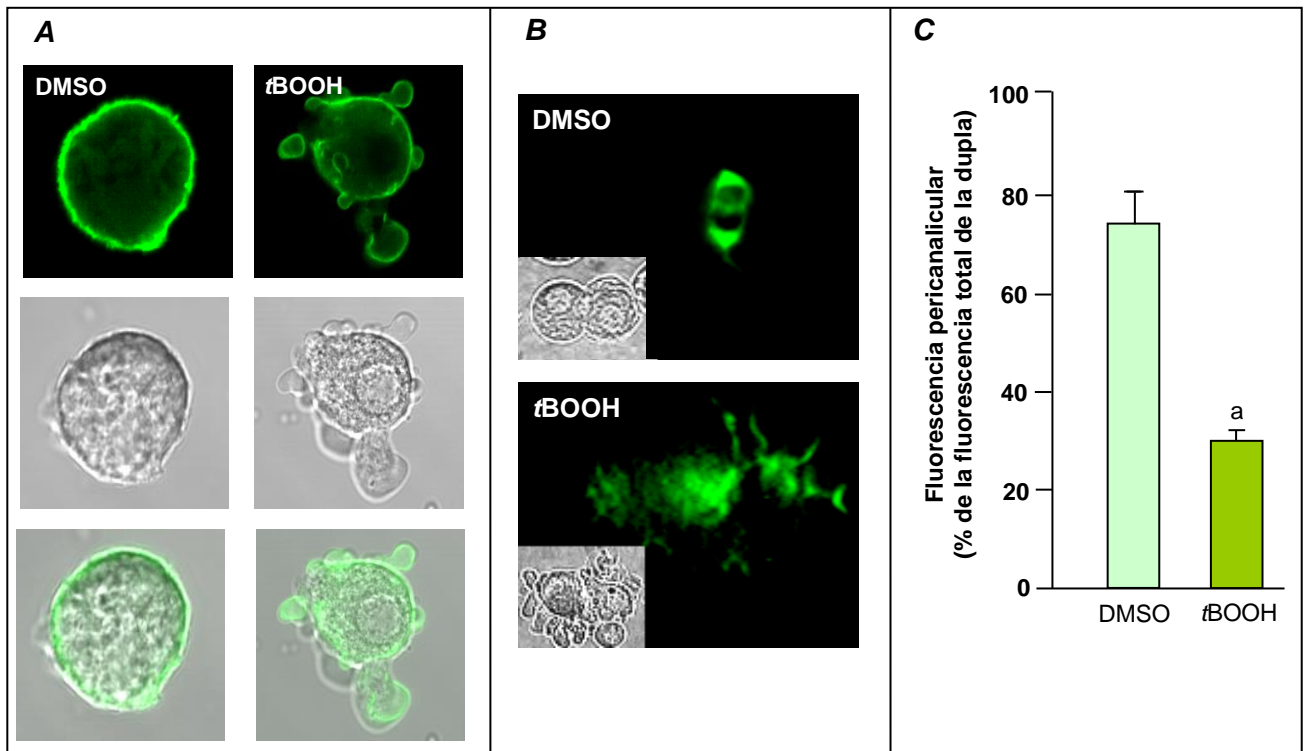


Figura 15. Redistribución del anillo de F-actina frente al tratamiento con t BOOH (100 μ M) en (A) hepatocitos aislados y en (B) duplas aisladas de hepatocitos. Puede observarse la intensa formación de ampollas de membrana descrita anteriormente. (C) Cuantificación mediante análisis de imágenes de la relación de intensidades de fluorescencia pericanalicular-total de F-actina en duplas controles y tratadas con t BOOH (100 μ M). El número de duplas analizadas fue >25, y se obtuvieron de un mínimo de 2 preparados. Los valores informados son las medias aritméticas \pm EE. ^a, significativamente diferente del grupo control DMSO ($p < 0,05$).

4.5. Mediación de PKC en las alteraciones inducidas por t BOOH sobre el citoesqueleto de actina

Como se demostró en el ítem 4.2, el estrés oxidativo inducido por t BOOH es capaz de provocar la activación de PKC α , una isoforma clásica de PKC dependiente de Ca²⁺. Para evaluar si esta proteína se encuentra involucrada en el daño hepatocelular inducido por estrés oxidativo, se analizó si diferentes agentes capaces de contrarrestar los efectos de PKC podrían prevenir las alteraciones al citoesqueleto de actina inducidas por t BOOH.

En la Fig. 16 A, puede observarse claramente cómo el pre-tratamiento de duplas aisladas de hepatocitos con los inhibidores panespecíficos de PKC H7 y SP previene totalmente la

formación de ampollas de membrana inducida por $t\text{BOOH}$. Estos inhibidores mostraron cierto efecto preventivo aún sobre el “*blebbing*” basal que se genera debido al daño oxidativo producido por la re-oxigenación después de la hipoxia parcial temporaria que sufren los hepatocitos durante el proceso del aislamiento celular. Similarmente, en la Fig. 17 A, se observa cómo la redistribución de F-actina inducida por $t\text{BOOH}$ fue totalmente prevenida por la inhibición de PKC.

Debido a que $t\text{BOOH}$ induce elevaciones de Ca^{2+} citosólico (ver Tabla 2), y visto que se requiere de la acción sinérgica del Ca^{2+} para la activación de las isoformas clásicas de PKC (Nishizuka, 1986), analizamos si la activación mediada por Ca^{2+} de estas isoenzimas de PKC estaban involucradas en el daño estructural provocado por $t\text{BOOH}$. Tanto el quelante de Ca^{2+} intracelular BAPTA/AM como el inhibidor específico de isoformas de PKC dependientes de Ca^{2+} Gö6976 previnieron completamente la formación de protrusiones (Fig. 16 B) y la redistribución de F-actina (Fig. 17 A) inducidas por $t\text{BOOH}$. Por el contrario, ninguno de estos inhibidores tuvo efecto alguno cuando se administraron solos, en ausencia de $t\text{BOOH}$.

4.6. Rol contrarregulatorio de PKA sobre las alteraciones al citoesqueleto de actina inducidas por $t\text{BOOH}$

Los caminos de señalización mediados por PKC y PKA a menudo se contrabalancean uno con el otro para regular respuestas celulares (Yoshimasa *et al*, 1987; Houslay, 1991). Por lo tanto, analizamos si la activación de PKA inducida por el análogo permeable del AMPc DB-AMPc era capaz de prevenir las modificaciones al citoesqueleto de actina inducidas por $t\text{BOOH}$. Como se muestra en las Figs. 16 C y 17 A, el pre-tratamiento con DB-AMPc previno completamente la formación de protrusiones de membrana y la redistribución de F-actina en duplas aisladas de hepatocitos. El efecto preventivo del DB-AMPc se encuentra mediado por la activación de PKA, tal como lo indica la falta de protección que se observa cuando se pre-administró el inhibidor de PKA KT5720.

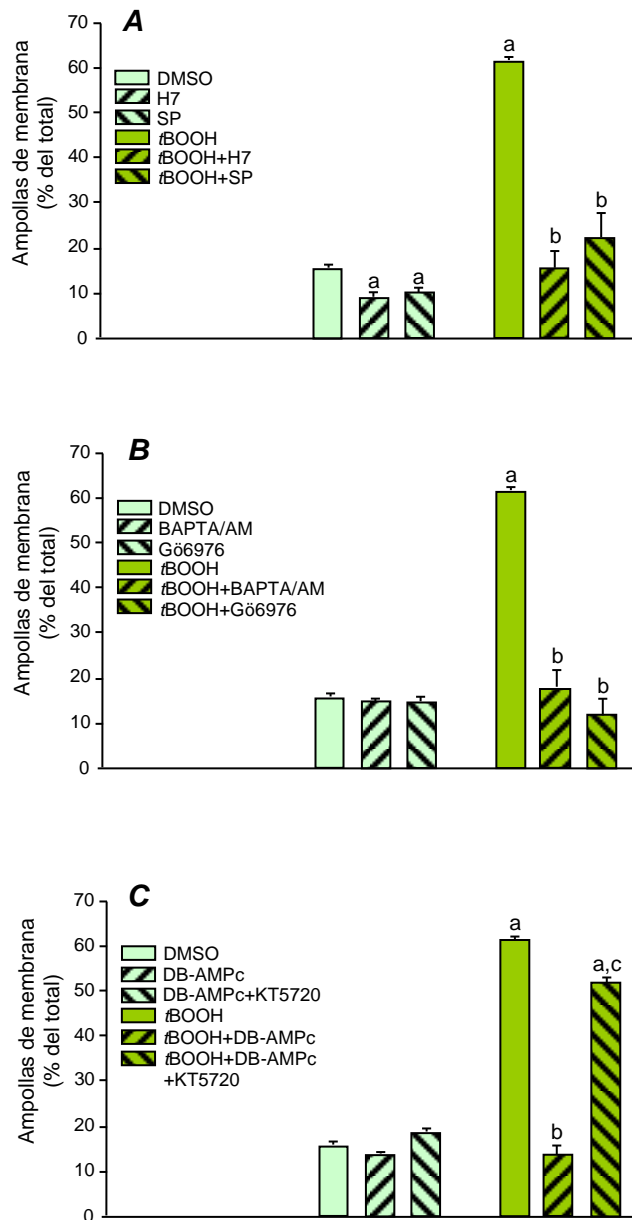
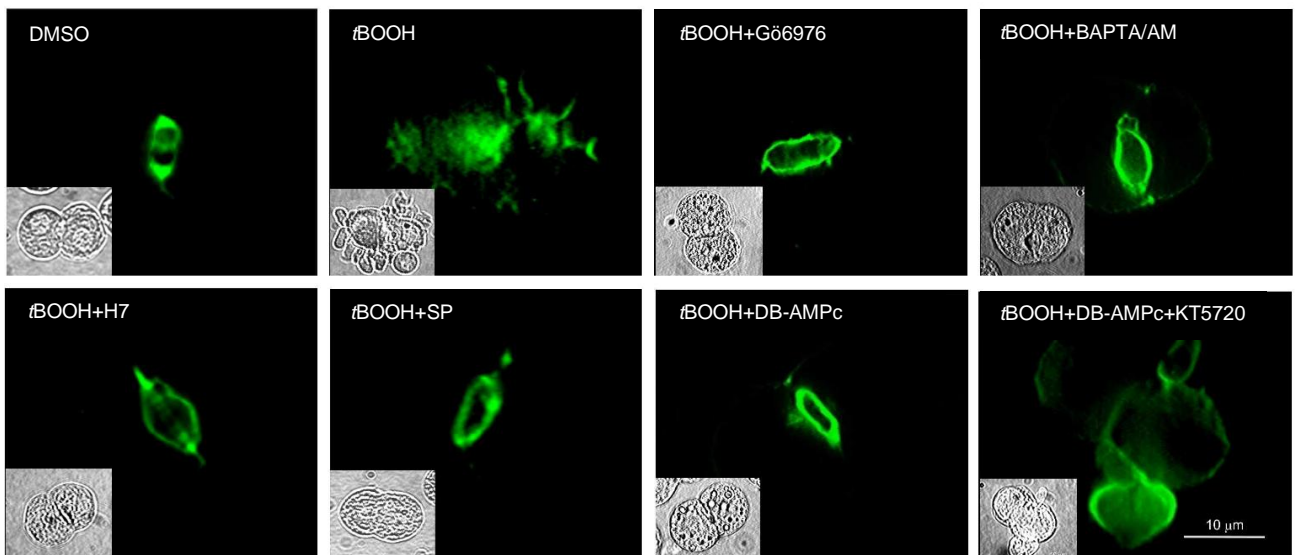


Figura 16. Incremento en la formación de ampollas de membrana inducida por tBOOH (100 μ M), en ausencia o en presencia de **(A)** los inhibidores de PKC H7 (100 μ M) y SP (10 μ M), **(B)** el quelante de Ca²⁺ intracelular BAPTA/AM (20 μ M) y el inhibidor de isoformas de PKC dependientes de Ca²⁺ Gö6976 (2 μ M), y **(C)** el activador de PKA DB-AMPC (500 μ M), este último con y sin pre-tratamiento con el inhibidor de PKA KT5720 (5 μ M). Las duplas fueron pre-tratadas durante 15 min con los moduladores de señalización, o sólo con sus vehículos en los controles, y subsecuentemente expuestas a tBOOH 100 μ M durante otro período de 15 min. El “blebbing” se informó como el porcentaje de duplas totales presentes en el campo que presentaban al menos una ampolla en su membrana plasmática. Se analizaron >50 células en cada ensayo independiente, de un total de 5 preparados. Los valores informados son las medias aritméticas \pm EE. ^a, significativamente diferente del grupo control (DMSO) ($p < 0,05$); ^b, significativamente diferente del grupo tBOOH ($p < 0,05$); ^c, significativamente diferente del grupo tBOOH+DB-AMPC ($p < 0,05$).

A



B

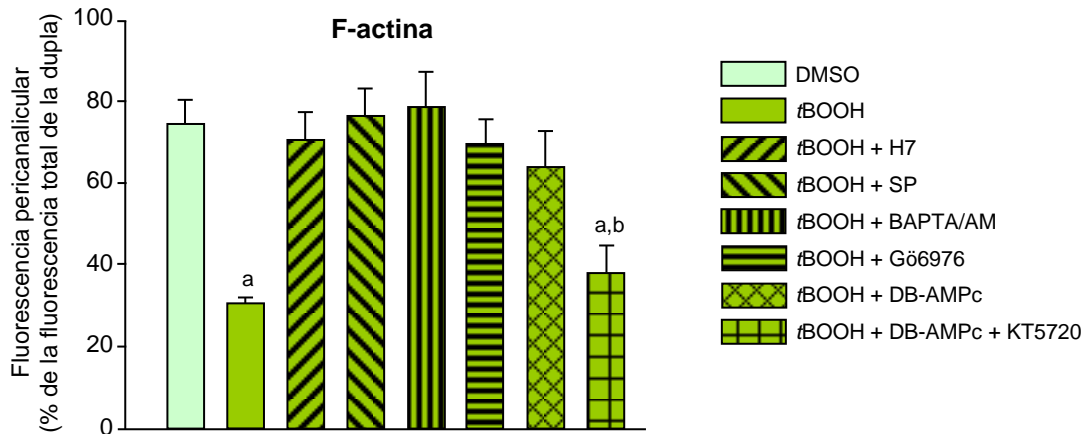


Figura 17. (A) Imágenes de fluorescencia representativas de la localización de F-actina, evaluadas por marcado con FITC-faloidina, y **(B)** cuantificación por análisis de imágenes de la relación de intensidades de fluorescencia F-actina total-pericanalicular en duplas controles (DMSO) y tratadas con tBOOH (100 µM), en ausencia o en presencia de los inhibidores panespecíficos de PKC H7 (100 µM) y SP (10 µM), el quelante de Ca²⁺ intracelular BAPTA/AM (20 µM) y el inhibidor de isoformas de PKC dependientes de Ca²⁺ Gö6976 (2 µM), o el activador de PKA DB-AMPc (500 µM), este último con y sin pre-tratamiento con el inhibidor de PKA KT5720 (5 µM). Las fotos pequeñas muestran la topología de las duplas visualizadas por contraste de fases. Nótese que la F-actina, la cual forma un cinturón alrededor de la vacuola canalicular en las células controles, se redistribuye (particularmente en las áreas donde se forman “blebs”) después de la exposición a tBOOH, y que ésta desorganización es prevenida por los inhibidores de PKC, por el agente quelante de Ca²⁺, y por DB-AMPc. Este último compuesto actuaría vía activación de PKA, ya que su inhibidor KT5720 anula el efecto protector. El número de duplas analizadas fue >25, y fueron tomadas de un mínimo de 2 preparados. Los valores informados son las medias aritméticas ± EE. ^a, significativamente diferente del valor control (DMSO) ($p < 0,05$). ^b, significativamente diferente de grupo tBOOH + DB-AMPc ($p < 0,05$).

4.7. Reversión del “blebbing” inducido por tBOOH por inhibición de PKC o activación de PKA

En la Fig. 18, se puede ver la progresión temporal de la reversión en la formación de protrusiones de membrana inducida por tBOOH provocada por el tratamiento subsiguiente con H7, Gö6976 o DB-AMPc. Como puede apreciarse, los patrones de recuperación obtenidos con estos compuestos son similares, alcanzando prácticamente valores basales a partir de los 40 min en adelante. Los ensayos controles, realizados adicionando DMSO a las duplas de hepatocitos pre-tratadas con tBOOH, no mostraron atenuación espontánea del “blebbing” durante el período de tiempo en que se llevó a cabo el experimento. Los moduladores de señalización estudiados no tuvieron efectos independientes sobre el “blebbing” basal (Fig. 18, gráfico superior).

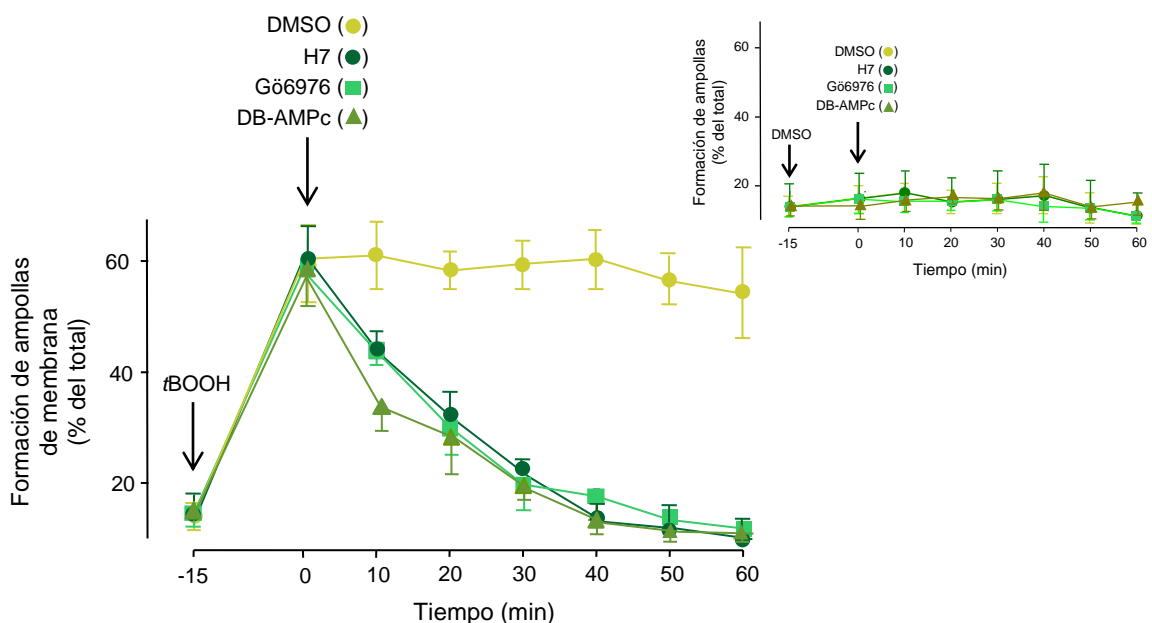


Figura 18. Reversión de la formación de protrusiones de membrana inducida por tBOOH (100 μ M) por el inhibidor panespecífico de PKC H7 (100 μ M), el inhibidor de isoformas Ca^{2+} -dependientes de PKC Gö6976 (2 μ M), o el análogo permeable de AMPc DB-AMPc (500 μ M). Las células fueron pre-incubadas con tBOOH durante 15 min, evaluándose el “blebbing” cada 10 min después de la adición de los moduladores de señalización. La formación de ampollas se expresó como el porcentaje de duplas presentes en el campo que mostraron al menos un “bleb” en su membrana plasmática. Se analizaron >50 células por cada ensayo ($n = 5$). El “blebbing” basal permaneció prácticamente inalterado a lo largo de la experiencia cuando se agregó indistintamente DMSO o los moduladores (inhibidores/activadores) utilizados, sin la administración de tBOOH (gráfico superior derecho). Los valores informados son las medias aritméticas \pm EE.

4.8. Prevención de la alteración de la integridad de las uniones paracelulares inducida por tBOOH por inhibición de PKC y activación de PKA

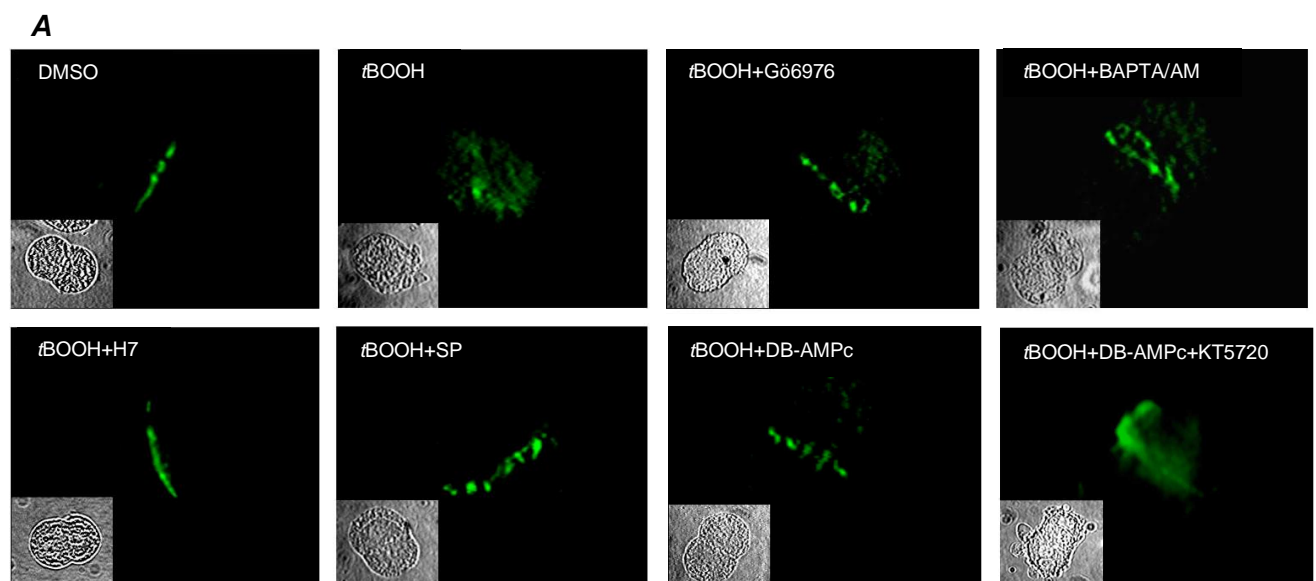
Como se ha mencionado anteriormente, niveles bajos de estrés oxidativo causan alteraciones hepatocanaliculares tempranas en duplas aisladas de hepatocitos relevantes para la formación de bilis, que involucran daños en la permeabilidad de las uniones estrechas

(Ahmed-Choudhury *et al*, 1998; Stone *et al*, 1994). En concordancia con esto, se ha comprobado, también en duplas de hepatocitos aislados, que la activación de PKC induce la apertura de la vía paracelular (Nathanson *et al*, 1992; Roma *et al*, 1998). Debido a que el estrés oxidativo generado por t BOOH induce la activación de PKC (ver ítem 4.2.), se estudió la relación existente entre este último y las alteraciones a la integridad de las uniones estrechas.

4.8.1. Cambios en la distribución de ZO-1

Como se observa en la Fig. 19 A, ZO-1 muestra una localización anormal en las duplas tratadas con t BOOH. En estas células, la cantidad de ZO-1 en la zona pericanalicular fue muy baja, observándose una redistribución de la fluorescencia hacia zonas fuera de esta región. Esta redistribución se vio completamente prevenida por los inhibidores de PKC H7 y SP, el quelante de Ca^{2+} intracelular BAPTA/AM, el inhibidor de isoformas de PKC dependientes de Ca^{2+} Gö6976, y el análogo permeable de AMPc DB-AMPc. Este último efecto fue contrarrestado por el pre-tratamiento con el inhibidor de PKA KT5720, indicando que sería esta proteína quinasa la que media los efectos de AMPc. Ninguno de los moduladores de señalización utilizados, cuando se administraron individualmente, mostraron efectos independientes en la localización de ZO-1.

En la Fig. 19 B se muestra una evaluación cuantitativa de la fluorescencia en el área pericanalicular. Estos resultados coinciden con lo mostrado en las microfotografías ilustrativas de la Fig. 19 A, en donde se aprecia cómo t BOOH induce una reducción en la relación de intensidades de fluorescencia pericanalicular-total, indicativa de una redistribución desde la zona pericanalicular hacia el resto del cuerpo celular. La inhibición de PKC, el secuestro de Ca^{2+} y la activación de PKA previnieron totalmente este efecto.



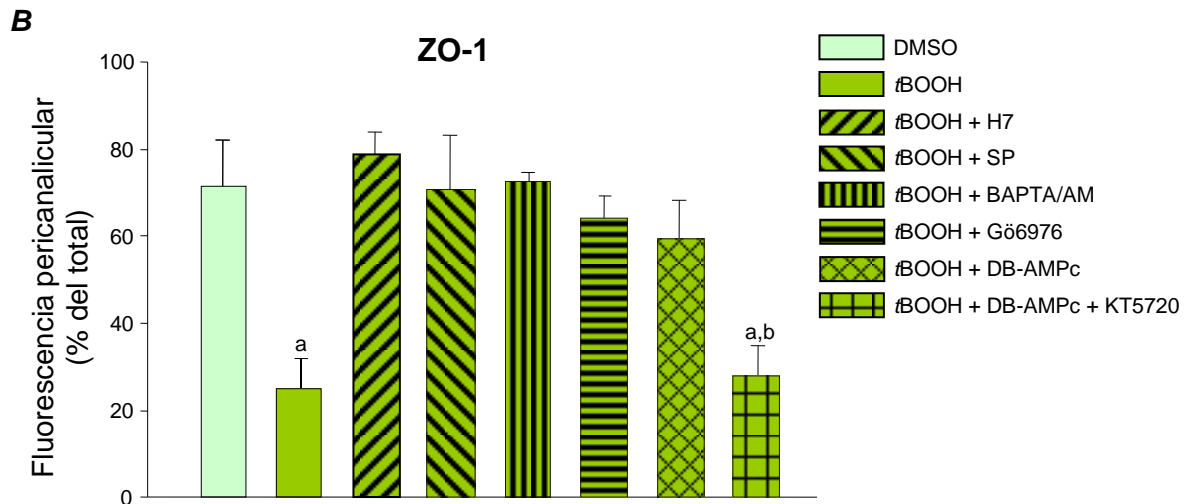


Figura 19. (A) Imágenes de inmunofluorescencia representativas de la localización de ZO-1, evaluadas por doble inmunotinción, y **(B)** cuantificación por análisis de imágenes de la relación de intensidades de fluorescencia de ZO-1 total-pericanalicular en duplas controles (DMSO) y tratadas con tBOOH (100 μ M), en ausencia o en presencia de los inhibidores panespecíficos de PKC H7 (100 μ M) y SP (10 μ M), el quelante de Ca^{2+} intracelular BAPTA/AM (20 μ M), el inhibidor de isoformas de PKC dependientes de Ca^{2+} Gö6976 (2 μ M) o el activador de PKA DB-AMPc (500 μ M), este último con y sin pre-tratamiento con el inhibidor de PKA KT5720 (5 μ M). Las fotos pequeñas muestran la topología de las duplas, visualizada por contraste de fases. Nótese que ZO-1 muestra una localización pericanalicular en las células controles, y que sufre una redistribución fuera de esta región después de la exposición a tBOOH. Esta desorganización es prevenida por los inhibidores de PKC, por el agente quelante de Ca^{2+} y por DB-AMPc. Este último actuaría vía activación de PKA, ya que KT5720, un inhibidor de esa quinasa, anula el efecto protector. El número de duplas analizadas fue >25, y fueron tomadas de un mínimo de 2 preparados. Los valores informados son las medias aritméticas \pm EE. ^a, significativamente diferente del valor control (DMSO) ($p < 0,05$); ^b, significativamente diferente del grupo tBOOH + DB-AMPc ($p < 0,05$).

4.8.2. Pruebas funcionales de la integridad de barrera de las uniones estrechas paracelulares

Para evaluar la función de barrera de las uniones estrechas paracelulares, se determinó el porcentaje de duplas de hepatocitos aisladas capaces de retener en su vacuola canalicular el análogo fluorescente de sales biliares CLF (prueba de retención en la vacuola canalicular, RVC) (Roma *et al*, 1997). Bajo condiciones normales, el porcentaje de duplas exhibiendo RVC de CLF fue de $69 \pm 3\%$. Como se muestra en la Fig. 20, este valor se redujo significativamente ante la administración de tBOOH, indicando que la función de barrera de las uniones estrechas se vio seriamente afectada, provocando la fuga paracelular de los constituyentes biliares al medio extracelular. Esta caída en el valor de RVC de CLF se previno completamente por el pre-tratamiento con los inhibidores panespecíficos de PKC H7 y SP (Fig. 20 A), el inhibidor de isoformas de PKC dependientes de Ca^{2+} Gö6976, el agente quelante de Ca^{2+} BAPTA/AM (Fig. 20 B) y el análogo permeable de AMPc DB-AMPc (Fig. 20 C). El efecto protector de DB-AMPc fue prevenido totalmente por el pre-tratamiento con el inhibidor selectivo de PKA KT5720,

poniéndose de manifiesto la participación de PKA en este proceso. Agregados individualmente, los moduladores de señalización no mostraron efecto alguno.

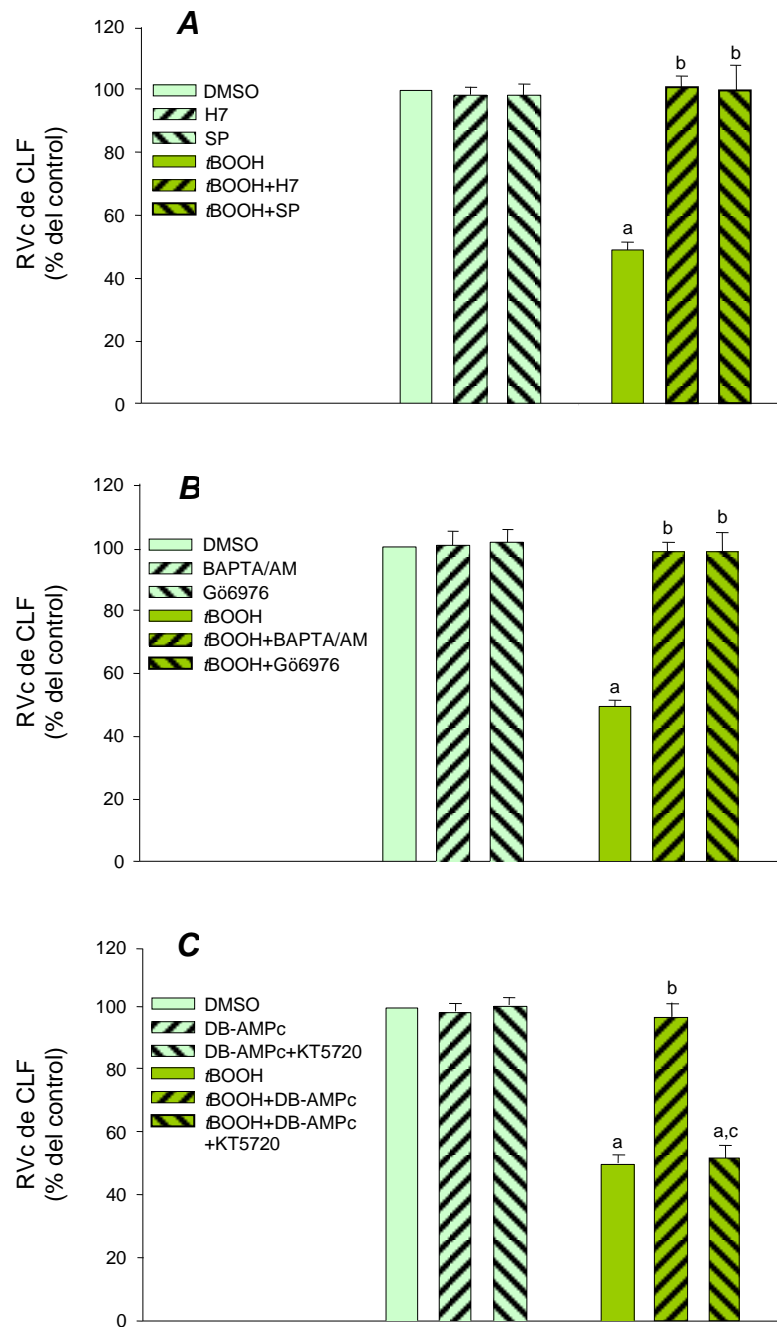


Figura 20. Disminución de la RVc de CLF inducida por tBOOH (100 µM), en ausencia o en presencia de **(A)** los inhibidores panespecíficos de PKC H7 (100 µM) y SP (10 µM), **(B)** el quelante de Ca²⁺ intracelular BAPTA/AM (20 µM) y el inhibidor de isoformas de PKC dependientes de Ca²⁺ Gö6976 (2 µM), y **(C)** el activador de PKA DB-AMPC (500 µM), este último con y sin pre-tratamiento con el inhibidor de PKA KT5720 (5 µM). Las duplas fueron pre-cargadas con CLF durante 15 min, luego se las trató durante 15 min con los moduladores de señalización o sus vehículos en las células controles y, finalmente, fueron expuestas a tBOOH durante otros 15 min. La RVc de CLF se expresó como el porcentaje total de duplas de hepatocitos presentes en el campo que mostraron acumulación en su vacuola canalicular del análogo fluorescente de sal biliar después de los tratamientos, referidos al valor control (100%). Se analizaron >50 células en cada grupo (n = 5). Los valores informados representan las medias aritméticas

± EE. ^a, significativamente diferente del grupo control (DMSO) ($p < 0,05$); ^b, significativamente diferente del grupo tBOOH ($p < 0,05$); ^c, significativamente diferente del grupo tBOOH + DB-AMPC ($p < 0,05$).

4.9. Prevención de la internalización de Bsep inducida por tBOOH por inhibición de PKC y activación de PKA

Se ha demostrado que el estrés oxidativo inducido por la administración aguda de agentes pro-oxidantes, tales como tBOOH (Ahmed-Choudhury *et al*, 1998) o menadiona (Stone *et al*, 1994), además de producir alteraciones al citoesqueleto de actina, inducen fallas en el sistema de secreción de sales biliares en duplas de hepatocitos aisladas. Estos efectos fueron mimetizados por vasopresina, una hormona que activa isoformas de PKC dependientes de Ca^{2+} en células hepáticas (Roma *et al*, 1998). Por otra parte, se ha descrito que la desorganización del citoesqueleto de actina produce internalización del transportador canalicular Mrp2 (Rost *et al*, 1999). Tomados colectivamente, estos indicios previos sugieren que los tres eventos, a saber: el estrés oxidativo, las alteraciones al citoesqueleto de actina y la internalización del transportador de sales biliares Bsep pueden estar causalmente relacionados. Para confirmar esta posibilidad, se evaluaron los cambios en la distribución de Bsep frente al daño oxidativo inducido por tBOOH y su prevención por inhibidores de Ca^{2+} /PKC.

4.9.1. Cambios en la distribución intracelular de Bsep

En las microfotografías de fluorescencia mostradas en la Fig. 21 A, se observa la distribución típica de Bsep en duplas de hepatocitos controles y expuestas a tBOOH. Se puede apreciar que, en las células controles, Bsep se encuentra principalmente expresada en la membrana canalicular, mientras que, en las duplas tratadas con tBOOH, se produce una internalización de Bsep en vesículas intracelulares distribuidas en el cuerpo celular. Esta redistribución fue completamente prevenida por los inhibidores panespecíficos de PKC H7 y SP, el inhibidor de isoformas de PKC dependientes de Ca^{2+} Gö6976, el agente quelante de Ca^{2+} BAPTA/AM y el análogo permeable de AMPc DB-AMPC (Fig. 21 A). El efecto protector de DB-AMPC se anuló totalmente por el pre-tratamiento con el inhibidor selectivo de PKA KT5720, sustentando la mediación de PKA en este último efecto. Ninguno de estos moduladores de señalización mostró efectos independientes en la localización de Bsep. Una evaluación cuantitativa de la fluorescencia asociada a Bsep se muestra en al Fig. 21 B. Estos resultados se correlacionan totalmente con la descripción cualitativa de las microfotografías representativas. Se puede apreciar cómo la redistribución de Bsep desde la región canalicular hacia el cuerpo celular inducida por tBOOH provoca una disminución de la fluorescencia asociada, la cual es prevenida completamente por inhibición de PKC (isoformas clásicas dependientes de Ca^{2+}), secuestro de Ca^{2+} y activación de PKA.

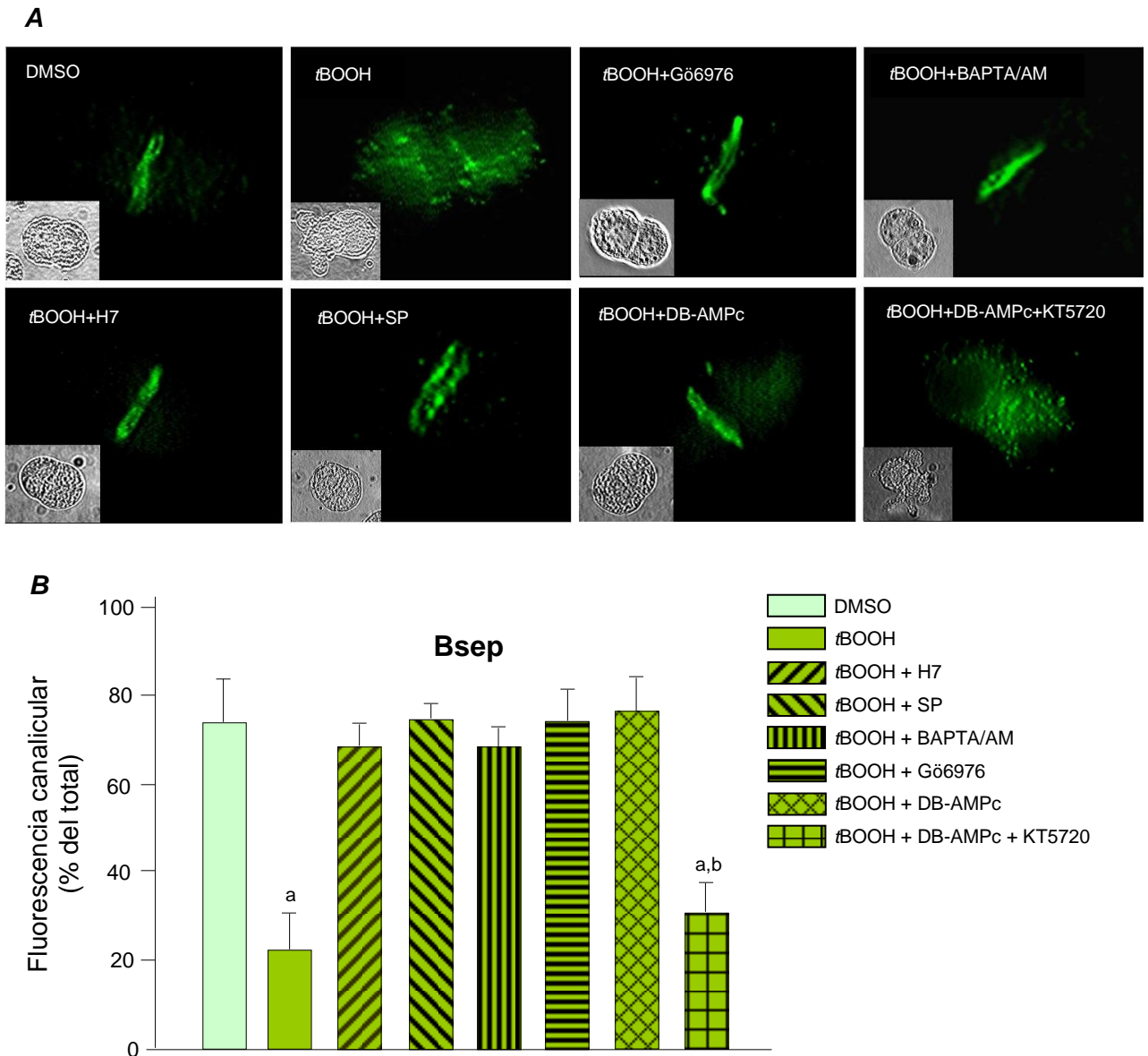
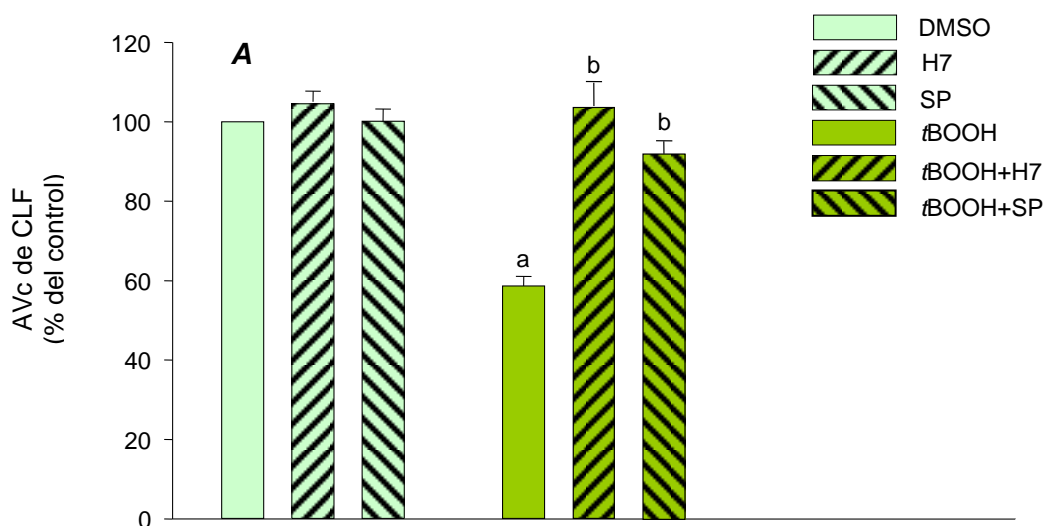


Figura 21. (A) Imágenes de inmunofluorescencia representativas de la localización de Bsep, evaluadas por doble inmunomarcado, y **(B)** cuantificación por análisis de imágenes de la relación de intensidades de fluorescencia de Bsep total-canalicular en duplas controles (DMSO) y tratadas con tBOOH (100 μ M), en ausencia o en presencia de los inhibidores panespecíficos de PKC H7 (100 μ M) y SP (10 μ M), el quelante de Ca²⁺ intracelular BAPTA/AM (20 μ M) y el inhibidor de isoformas de PKC dependientes de Ca²⁺ Gö6976 (2 μ M), o el activador de PKA DB-AMPc (500 μ M), con y sin pre-tratamiento con el inhibidor de PKA KT5720 (5 μ M). Las fotos pequeñas muestran la topología de las duplas visualizadas por contraste de fases. Nótese que Bsep muestra una localización predominantemente canalicular en las células controles, sufriendo una extensa internalización desde la membrana canalicular hacia estructuras pseudo-vesiculares ubicadas en el interior del cuerpo celular después de la exposición a tBOOH; esto fue acompañado por la ya descrita formación de protrusiones de membrana. Ambos fenómenos fueron completamente prevenidos por los inhibidores de PKC, por el agente quelante de Ca²⁺ y por DB-AMPc. Este último, ejercería sus efectos vía activación de PKA, ya que su inhibidor KT5720 anula el efecto protector. El número de duplas analizadas fue >25, tomadas de un mínimo de 2 preparados. Los valores informados son las medias aritméticas \pm EE. ^a, significativamente diferente del valor control (DMSO) ($p < 0,05$); ^b, significativamente diferente del grupo tBOOH + DB-AMPc ($p < 0,05$).

4.9.2. Actividad de transporte de Bsep

La función secretora de Bsep se evaluó a través de la determinación de la proporción de duplas de hepatocitos aisladas capaces de acumular en su vacuola canalicular el análogo fluorescente de sales biliares CLF (prueba de acumulación en la vacuola canalicular, AVc) (Ahmed-Choudhury *et al*, 1998; Roma *et al*, 1998). Esta sal biliar fluorescente no es transportada por otros transportadores canaliculares alternativos de sales biliares como Mrp2 (Mills *et al*, 1999) (la cual transporta sales biliares bipolares como las conjugadas con ácido glucurónico o sulfato), y puede, por lo tanto, considerarse un sustrato selectivo de Bsep.

En condiciones controles, el porcentaje de duplas exhibiendo AVc de CLF fue de $72 \pm 2\%$. Como se muestra en la Fig. 22, este valor se redujo significativamente ante la administración de t BOOH, indicando que la actividad de transporte de Bsep se vio seriamente afectada. Esta caída en el valor de AVc de CLF se previno completamente por el pre-tratamiento con los inhibidores panespecíficos de PKC H7 y SP (Fig. 22 A), el inhibidor de isoformas de PKC dependientes de Ca^{2+} Gö6976, el agente quelante de Ca^{2+} BAPTA/AM (Fig. 22 B) y el análogo permeable de AMPc DB-AMPc (Fig. 22 C). El efecto protector de DB-AMPc se vio contrarrestado totalmente por el pre-tratamiento con el inhibidor selectivo de PKA KT5720, poniéndose así de manifiesto la participación de PKA. Agregados individualmente, los moduladores de señalización no mostraron efecto alguno.



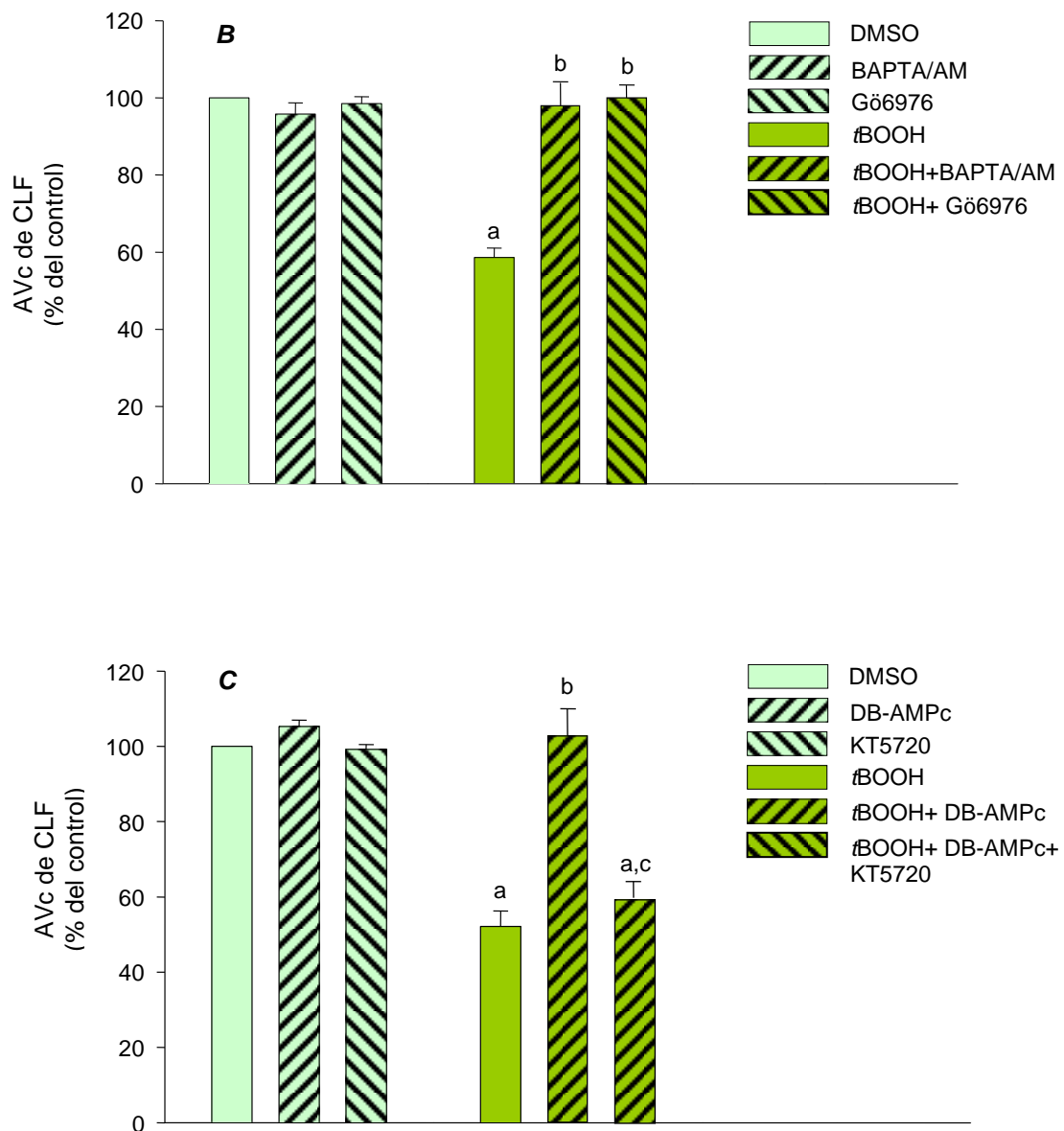


Figura 22. Disminución de la AVc de CLF inducida por tBOOH (100 μ M), en ausencia o en presencia de **(A)** los inhibidores panespecíficos de PKC H7 (100 μ M) y SP (10 μ M), **(B)** el quelante de Ca^{2+} intracelular BAPTA/AM (20 μ M) y el inhibidor de isoformas de PKC dependientes de Ca^{2+} Gö6976 (2 μ M), y **(C)** el activador de PKA DB-AMPc (500 μ M), este último con y sin pre-tratamiento con el inhibidor de PKA KT5720 (5 μ M). Las duplas se pre-trataron durante 15 min con los moduladores de señalización, o con sus vehículos en las células controles. Luego, las células fueron expuestas a tBOOH durante otro periodo de 15 min. Finalmente, se las expuso a CLF durante un periodo adicional de 15 min. La AVc de CLF se expresó como el porcentaje total de duplas de hepatocitos presentes en el campo que mostraron acumulación de CLF en su vacuola canalicular después de los tratamientos, referidos al valor control (100%). Se analizaron >50 células en cada grupo ($n = 5$). Los valores informados representan las medias aritméticas \pm EE. ^a, significativamente diferente del grupo control (DMSO) ($p < 0,05$); ^b, significativamente diferente del grupo tBOOH ($p < 0,05$); ^c, significativamente diferente del grupo tBOOH + DB-AMPc ($p < 0,05$).

4.9.3. Reversión en las alteraciones de la actividad de transporte de Bsep inducidas por tBOOH

En la Fig. 23, puede observarse la reversión de la disminución de la AVc de CLF inducida por tBOOH, provocada por el tratamiento subsiguiente con H7, Gö6976 o DB-AMPc. Los patrones de recuperación obtenidos con estos compuestos son similares, alcanzándose prácticamente valores basales a partir de los 40-50 min en adelante. Los ensayos controles, realizados adicionando sucesivamente DMSO a las duplas de hepatocitos pre-tratadas con tBOOH, no mostraron recuperación espontánea de la AVc de CLF durante el período de tiempo en que se llevó a cabo el experimento.

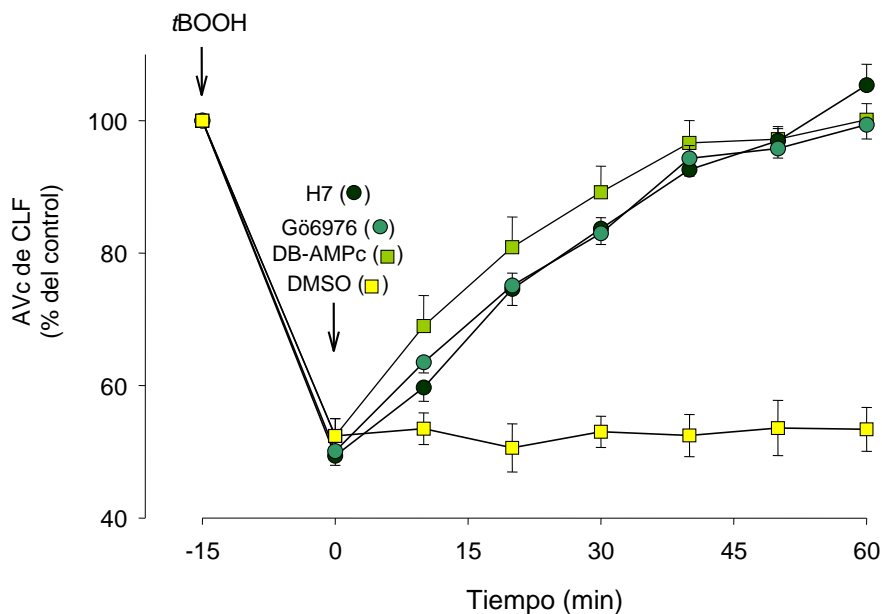


Figura 23. Reversión de la injuria hepatocelular inducida por tBOOH (100 μ M) por el inhibidor panespecífico de PKC H7 (100 μ M), el inhibidor de isoformas de PKC dependientes de Ca^{2+} Gö6976 (2 μ M) o el análogo permeable de AMPc DB-AMPc (500 μ M). Las células fueron pre-incubadas con tBOOH durante un período de 15 min, después del cual se agregó CLF y se permitió su acumulación durante otro período de 15 min. Luego, se removió el tBOOH e, inmediatamente, se agregaron los moduladores de señalización ensayados. El porcentaje de acumulación canalicular de CLF (AVc de CLF) se midió cada 10 min durante un período total de 60 min, expresándose como el porcentaje de duplas presentes en el campo que mostraban al análogo de sal biliar fluorescente en su vacuola canalicular, referido a los valores controles. Se analizaron >50 células por cada ensayo ($n = 5$). Los valores informados son las medias aritméticas \pm EE.

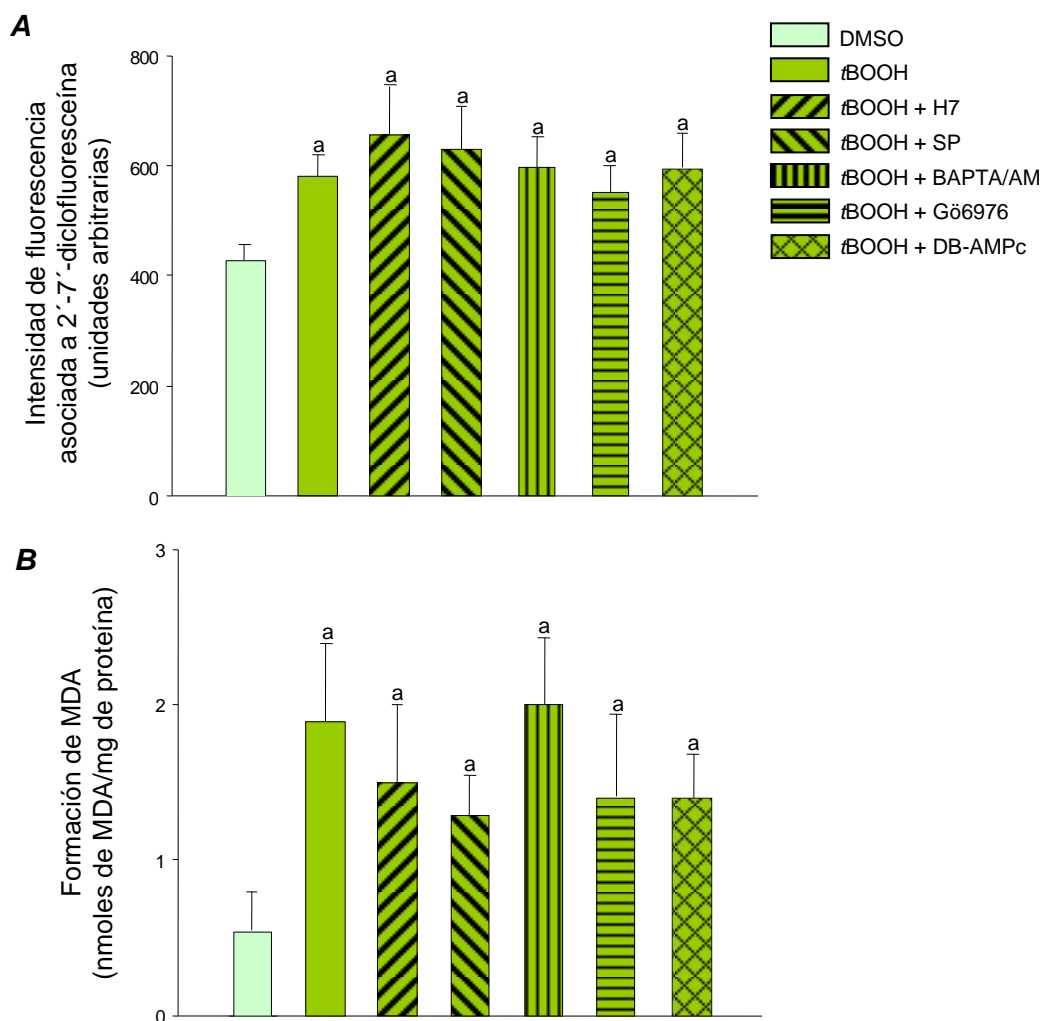
4.10. Efecto de los moduladores de señalización sobre la generación de estrés oxidativo y el aumento en los niveles de Ca^{2+} inducidos por tBOOH

Al menos conceptualmente, los fenómenos de prevención/reversión registrados luego de la inhibición de PKC o la activación de PKA pueden haberse producido como consecuencia de un efecto de los moduladores de señalización a nivel de la *producción* de radicales libres originados por el metabolismo de tBOOH, en lugar de una modulación de los efectos de dichos

radicales libres cascada abajo de su generación. Para descartar este artefacto, evaluamos si los mismos afectaban a la producción intracelular de ROS inducida por tBOOH, así como sus dos más notables consecuencias, a saber: el incremento en la peroxidación lipídica y el aumento en los niveles citosólicos de Ca²⁺.

Como puede verse en la Fig. 24, la capacidad de tBOOH 100 μM para incrementar la formación de ROS (evaluada a través de la conversión dependiente de ROS del compuesto 2'-7'-diclorofluorescina diacetato en 2'-7'-diclorofluoresceína), la lipoperoxidación lipídica y los niveles de Ca²⁺ intracelulares no fue significativamente afectada por los inhibidores de PKC, o por el activador de PKA DB-AMPC. Tampoco se registraron cambios en la fluorescencia asociada a la 2'-7'-diclorofluoresceína en condiciones controles luego de la administración de los moduladores de señalización en forma individual; ésto nos permite descartar la existencia de cambios en la capacidad de captación de la sonda fluorescente por los hepatocitos, o en su conversión intracelular debida a algún efecto provocado por estos moduladores, hecho que podría introducir un artefacto en los resultados.

Similarmente, y a pesar de que el pre-tratamiento con BAPTA/AM anuló el incremento de Ca²⁺ citosólico inducido por los ROS, ni la formación de especies reactivas ni la lipoperoxidación inducida por tBOOH se vieron atenuadas por el agente quelante de Ca²⁺ (Fig. 24).



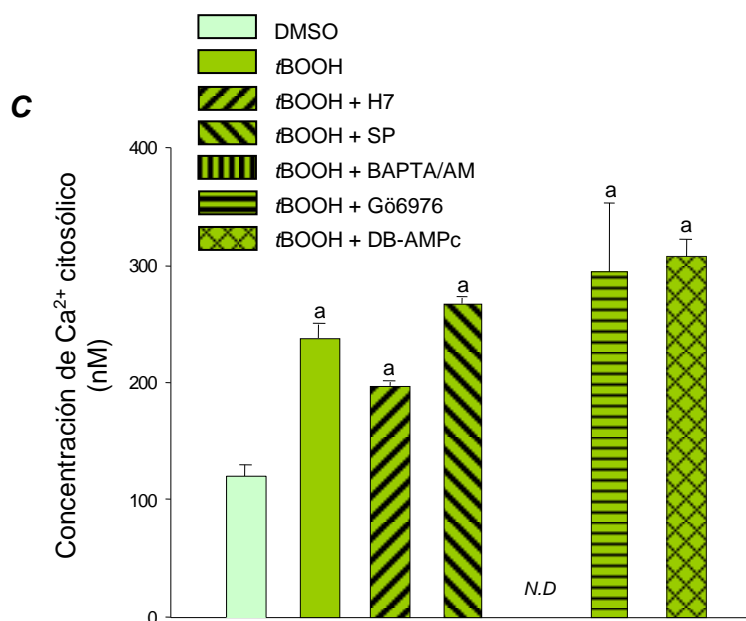


Figura 24. Efecto de la inhibición panespecífica de PKC con H7 (100 μ M) o SP (10 μ M), la inhibición de las isoformas de PKC dependientes de Ca²⁺ con Gö6976 (2 μ M), el secuestro de Ca²⁺ citosólico con BAPTA/AM (20 μ M) o la activación de PKA con DB-AMPc (500 μ M) en **(A)** la formación de ROS, **(B)** la peroxidación lipídica y **(C)** las elevaciones de Ca²⁺ intracelular inducidas por tBOOH (100 μ M). La formación de ROS se determinó fluorométricamente a través de la conversión dependiente de ROS de la sonda fluorescente 2'-7'-diclorofluoresceína a partir de su compuesto parental no fluorescente 2'-7'-diclorofluorescina diacetato. La peroxidación lipídica se evaluó a través de la formación de MDA dependiente de ROS. Los niveles de Ca²⁺ intracelular se determinaron fluorométricamente utilizando Fura-2/AM como sonda fluorescente. Los valores informados representan las medias aritméticas \pm EE. ^a, significativamente diferente del grupo control (DMSO) ($p < 0,05$). N.D., no detectado.

4.11. Efecto de los moduladores de señalización sobre el componente de estrés oxidativo de origen mitocondrial inducido por tBOOH

El tBOOH induce estrés oxidativo no solamente por la generación de radicales libres producto de su metabolismo sino, además, generando la formación de *poros de transición de permeabilidad mitocondrial* (PTPM), con la subsiguiente liberación de electrones de la cadena respiratoria al citosol (Nieminen *et al*, 1995). La formación de PTPM inicia un círculo vicioso que contribuye a la perpetuación del daño oxidativo, ya que exagera la producción de ROS de origen mitocondrial (Lemasters *et al*, 1999). Como consecuencia, este fenómeno conduce a la muerte celular por necrosis o apoptosis, dependiendo del número de mitocondrias afectadas (Lemasters *et al*, 1999). Las elevaciones de Ca²⁺ secundarias al estrés oxidativo debidas a la lipoperoxidación y posterior inhibición de la bomba de Ca²⁺ en microsomas, mitocondrias y membrana plasmática (Pascoe y Reed, 1989) producen sobrecarga de Ca²⁺ mitocondrial, el cual cumple un papel facilitador de la formación de PTPM inducida por los ROS en hepatocitos (Byrne *et al*, 1999). Los mecanismos moleculares involucrados en este fenómeno continúan aún siendo especulativos. Por este motivo, resultó de interés investigar si, en nuestro modelo de estudio, tBOOH es capaz de generar la apertura de PTPM, y si este efecto es facilitado por

el Ca^{2+} . De esta manera, se pretende avanzar en el entendimiento de las vías de señalización involucradas cascada abajo de este ión.

4.11.1. Dosis-dependencia de la generación de PTPM inducida por tBOOH y su efecto sobre los niveles de lipoperoxidación

La generación de estrés oxidativo secundaria a la formación de PTPM inducida por tBOOH requiere de la acción facilitadora de la elevación de Ca^{2+} mitocondrial (Nieminen *et al*, 1995). Este efecto no se puso de manifiesto a bajas dosis de tBOOH (100 μM), ya que el quelante de Ca^{2+} intracelular BAPTA/AM no modificó la capacidad de tBOOH para inducir la elevación de MDA (ver ítem 4.9). Dado que, al menos conceptualmente, la generación de PTPM es dependiente de la dosis de tBOOH, dicho fenómeno puede no ser significativo a bajas dosis, explicando la falta de efecto de los moduladores de Ca^{2+} sobre el estrés oxidativo inducido por tBOOH a dosis bajas (100 μM ; Fig. 24 C). Existe, por lo tanto, la posibilidad de que dicho efecto regulatorio pueda ponerse de manifiesto a dosis mayores, capaces de inducir en mayor extensión la formación de PTPM. Para ello, se corroboró primero la dependencia con la dosis de tBOOH de la generación de PTPM y su asociación con las elevaciones de los niveles de lipoperoxidación utilizando CsA (5-20 μM) como inhibidor específico de PTPM; toda atenuación de los cambios en el $\Delta\psi_m$ y la lipoperoxidación inducida por CsA puede atribuirse a la participación de PTPM en dichos fenómenos. Como puede observarse en la Fig. 25, CsA efectivamente previno, aunque parcialmente, la despolarización mitocondrial y la lipoperoxidación inducida por tBOOH 500 μM . Estos datos claramente indican que parte del estrés oxidativo inducido por tBOOH a altas dosis es secundario a la formación de PTPM. Debido a que 5 μM de CsA fue la mínima concentración con la que se obtuvo el máximo efecto, se continuaron los estudios a esta dosis.

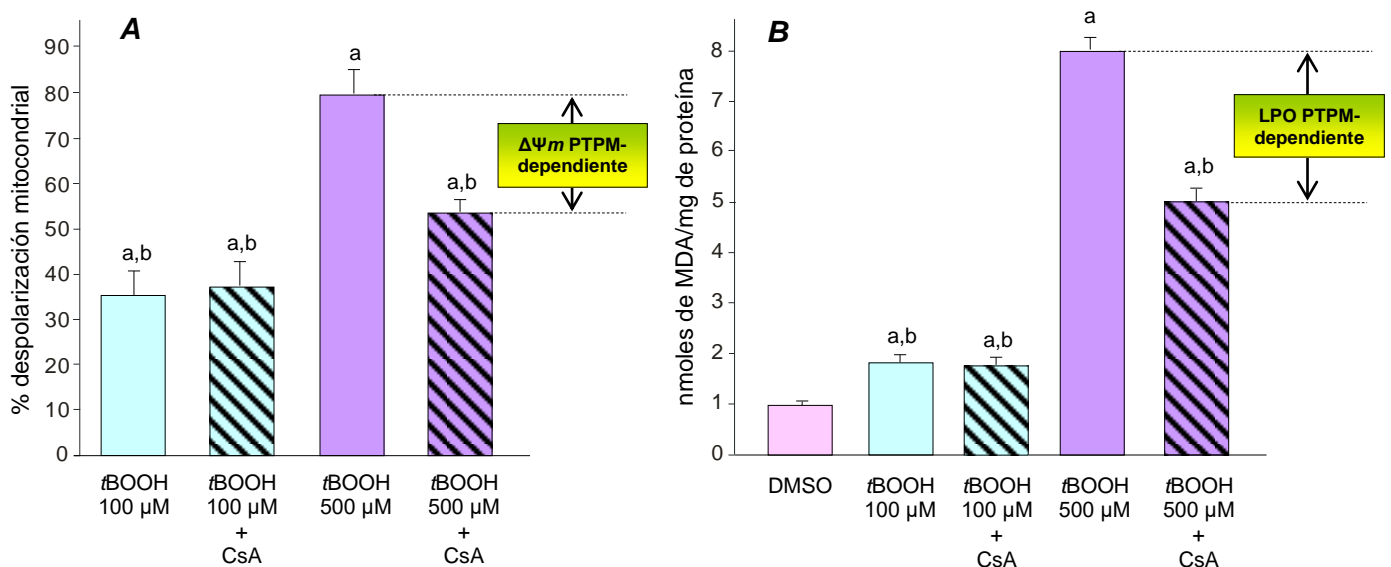


Figura 25. Efecto de t BOOH a diferentes dosis sobre: **(A)** la formación de PTPM (evaluada a través del cambio en el porcentaje de despolarización mitocondrial, $\Delta\Psi m$) y **(B)** la subsecuente lipoperoxidación (LPO, evaluada a través de la formación dependiente de ROS de MDA), en presencia o en ausencia del inhibidor de PTPM, CsA (5 μ M). Las células se pre-trataron durante 15 min con CsA (5 μ M), o con su vehículo (DMSO) en los controles. Luego, las células fueron expuestas a t BOOH durante otro periodo de 15 min. Los valores reportados son las medias aritméticas \pm EE. ^a, significativamente diferente del grupo control (DMSO) ($p < 0,05$); ^b, significativamente diferente del grupo t BOOH 500 μ M ($p < 0,05$).

Nos propusimos, por lo tanto, estudiar en tales condiciones el efecto de BAPTA/AM sobre la generación de estrés oxidativo dependiente de PTPM.

4.11.2. Papel del Ca^{2+} en la generación de estrés oxidativo de origen mitocondrial inducido por t BOOH

Como se comentó anteriormente, las elevaciones de Ca^{2+} que ocurren bajo condiciones de estrés oxidativo producen sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial, el cual cumple un papel facilitador de la formación de PTPM inducida por ROS en hepatocitos (Byrne *et al*, 1999). Debido a que el tratamiento de hepatocitos aislados con t BOOH 500 μ M aumentó significativamente los niveles de Ca^{2+} citosólicos (ver Tabla 2), evaluamos si, en nuestro modelo experimental, se ponía de manifiesto el rol facilitador del mismo en la formación de PTPM y en la generación de estrés oxidativo. Puesto que la generación de PTPM resulta en la disipación del potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi m$), los cambios en el mismo son un parámetro subrogado de PTPM, posibilitando así su cuantificación. Como se observa en la Fig. 26, el pre-tratamiento de hepatocitos aislados de rata con BAPTA/AM (50 μ M) previno significativamente, y a niveles similares a los alcanzados con CsA (5 μ M), el cambio en el $\Delta\Psi m$ y en la lipoperoxidación, indicando que, efectivamente, la apertura de PTPM generada por t BOOH (500 μ M) es facilitada por las elevaciones de Ca^{2+} intracelular. La prevención parcial de este efecto es compatible con la existencia de dos fuentes de producción de radicales libres a partir de t BOOH: una debida a su propia metabolización hepatocelular (a radicales libres alcoxilo y peroxilo) y otra secundaria a la fuga de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial por la formación de PTPM inducida por el agente pro-oxidante. Solamente este segundo componente oxidativo, generado vía PTPM, es dependiente de Ca^{2+} y, por ende, prevenido por CsA (inhibidor de PTPM) y BAPTA (quelante de Ca^{2+}).

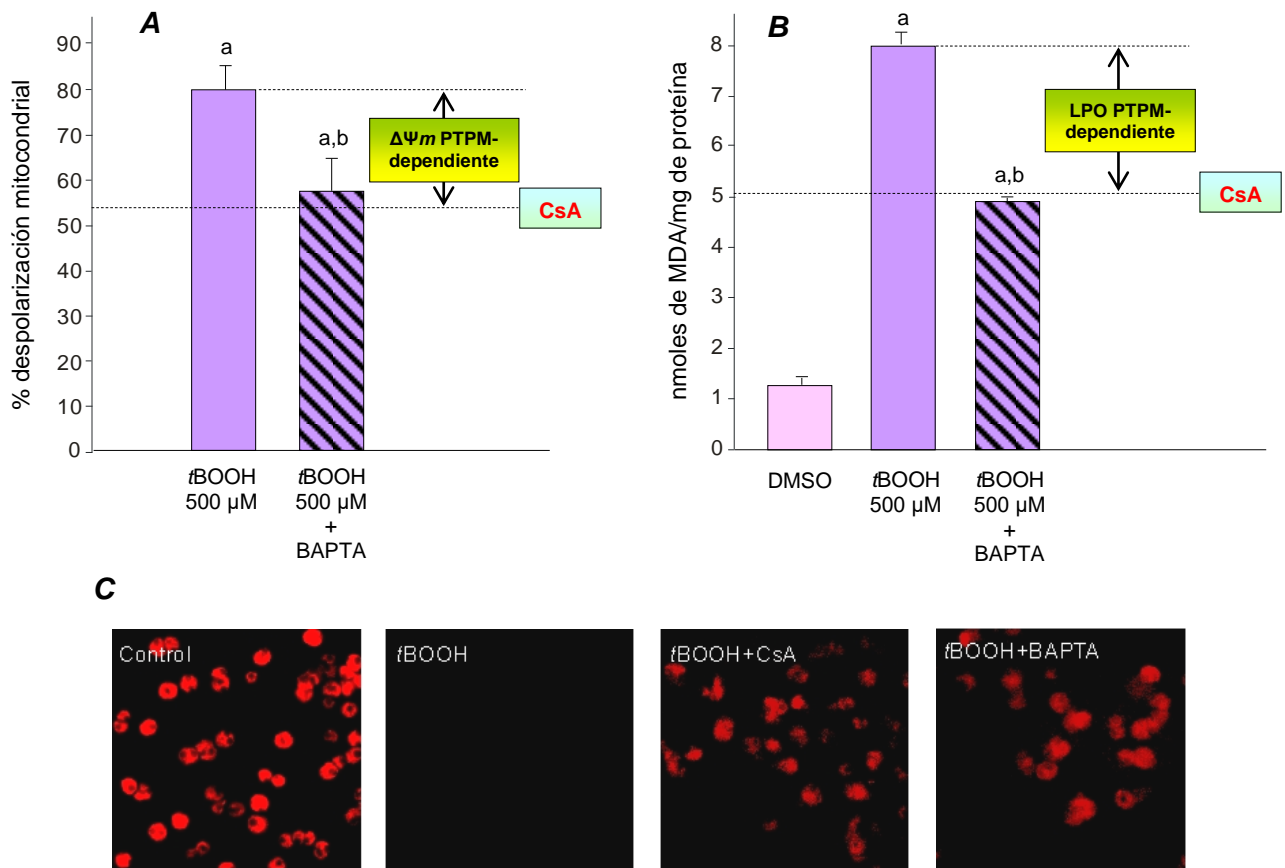


Figura 26. Efecto del pre-tratamiento de hepatocitos aislados con el quelante de Ca^{2+} intracelular BAPTA/AM (BAPTA; 50 μM) sobre: **(A)** la formación de PTPM inducida por tBOOH 500 μM (evaluada a través del cambio en el porcentaje de despolarización mitocondrial, $\Delta\Psi_m$, utilizando tetra-metil-rodamina metil éster como sonda fluorescente), y **(B)** la subsecuente lipoperoxidación (LPO, evaluada a través de la formación de MDA dependiente de ROS). Las células pre-cargadas con la sonda fluorescente se pre-trataron durante 15 min con BAPTA/AM (50 μM), o con su vehículo (DMSO) en los controles. Luego, las células fueron expuestas a tBOOH durante otro periodo de 15 min. La línea de puntos marca el valor de corte de la inhibición obtenida en ambos parámetros ante el pre-tratamiento con el inhibidor de PTPM CsA (5 M). Los valores reportados son las medias aritméticas \pm EE. ^a, significativamente diferente del grupo control (DMSO) ($p < 0,05$); ^b, significativamente diferente del grupo tBOOH 500 μM ($p < 0,05$). **(C)** Microfotografías de fluorescencia mostrando los cambios en el contenido celular de la sonda fluorescente sensible a modificaciones del potencial mitocondrial inducido por tBOOH. Nótese que la sonda fluorescente se encuentra retenida principalmente en la mitocondria en condiciones controles. tBOOH induce cambios en el $\Delta\Psi_m$, un parámetro subrogado de PTPM, lo cual genera la pérdida del fluoróforo retenido electroforéticamente en la mitocondria, causando finalmente el eflujo celular de la sonda. Tanto el pre-tratamiento de los hepatocitos con CsA como con BAPTA/AM previnieron de manera similar los cambios en el $\Delta\Psi_m$ inducidos por tBOOH.

4.12. Mediadores involucrados en el efecto facilitador del Ca^{2+} en la generación de estrés oxidativo de origen mitocondrial inducido por tBOOH

Con el objetivo de avanzar en el entendimiento de las vías de señalización cascada abajo del Ca^{2+} involucradas en la generación de estrés oxidativo dependiente de PTPM, evaluamos la participación de diferentes moduladores de señalización cuya activación se encuentra regulada

por Ca^{2+} . Entre los posibles mediadores intracelulares, investigamos la participación de isoformas clásicas de PKC dependientes Ca^{2+} , de calpaínas (cisteínas proteasas dependientes de Ca^{2+}) y del complejo Ca^{2+} -calmodulina (CaM).

4.12.1. Proteína quinasa C (PKC)

En el ítem 4.2., se demostró que el pre-tratamiento de hepatocitos con $t\text{BOOH}$ induce la activación de isoformas clásicas de PKC. Al estudiar su participación como mediadora en el estrés oxidativo de origen mitocondrial inducido por $t\text{BOOH}$, observamos que el pre-tratamiento de los hepatocitos con el inhibidor panespecífico de PKC estaurosporina (SP), o su activador forbol miristato acetato (PMA), no indujo cambios significativos en el porcentaje de despolarización mitocondrial ni en la lipoperoxidación asociada, permitiéndonos concluir que PKC no se encuentra involucrada en la regulación de estos efectos (Fig. 27).

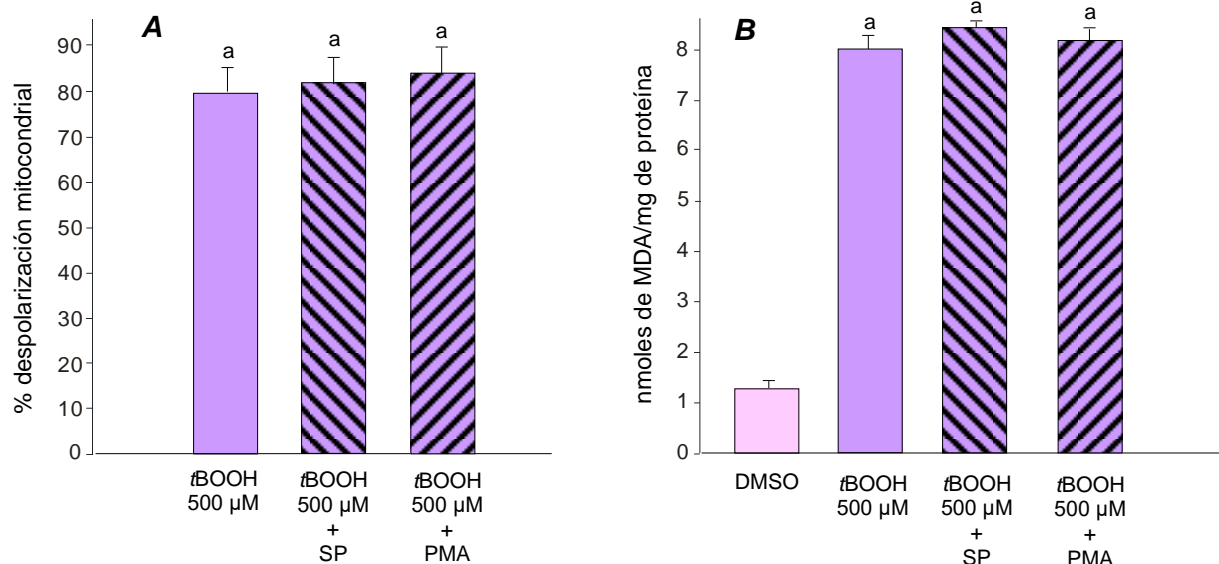


Figura 27. Efecto del pre-tratamiento de hepatocitos aislados con el inhibidor panespecífico de PKC SP (10 µM), o con su activador PMA (1 µM) sobre: **(A)** la formación de PTPM inducida por $t\text{BOOH}$ 500 µM (evaluada a través del cambio en el porcentaje de despolarización mitocondrial, $\Delta\Psi_m$, utilizando tetra-metil-rodamina metil éster como sonda fluorescente), y **(B)** la subsecuente lipoperoxidación (LPO, evaluada a través de la formación de MDA dependiente de ROS). Las células pre-cargadas con la sonda fluorescente se pre-trataron durante 15 min con los moduladores de señalización, o con sus vehículos en los controles. Luego, las células fueron expuestas a $t\text{BOOH}$ durante otro periodo de 15 min. Los valores reportados son las medias aritméticas \pm EE. ^a, significativamente diferente del grupo control (DMSO) ($p < 0,05$).

4.12.2. Calpaínas

Las calpaínas representan una familia de cisteína proteasas dependientes de Ca^{2+} que están asociadas con la muerte celular por apoptosis. Actúan a nivel de la proteína Bax, permitiendo que interaccione con componentes del PTPM para favorecer la liberación de citocromo c (ver Fig. 5) (Narita *et al*, 1998; Hajnóczky *et al*, 2000; Kroemer y Red, 2000). Al

estudiar la participación de calpaínas como mediadoras de la generación de estrés oxidativo de origen mitocondrial, observamos que el pre-tratamiento de hepatocitos con dos de sus inhibidores N-acetil-L-leucil-L-leucil-L-norleucina (ALLN) ó leupeptina (Leu) no mostró cambios significativos en el porcentaje de despolarización mitocondrial ni en la lipoperoxidación asociada producidas por tBOOH (500 μ M), permitiéndonos concluir que estas proteasas tampoco se encuentran involucradas en la regulación de estos fenómenos (Fig. 28).

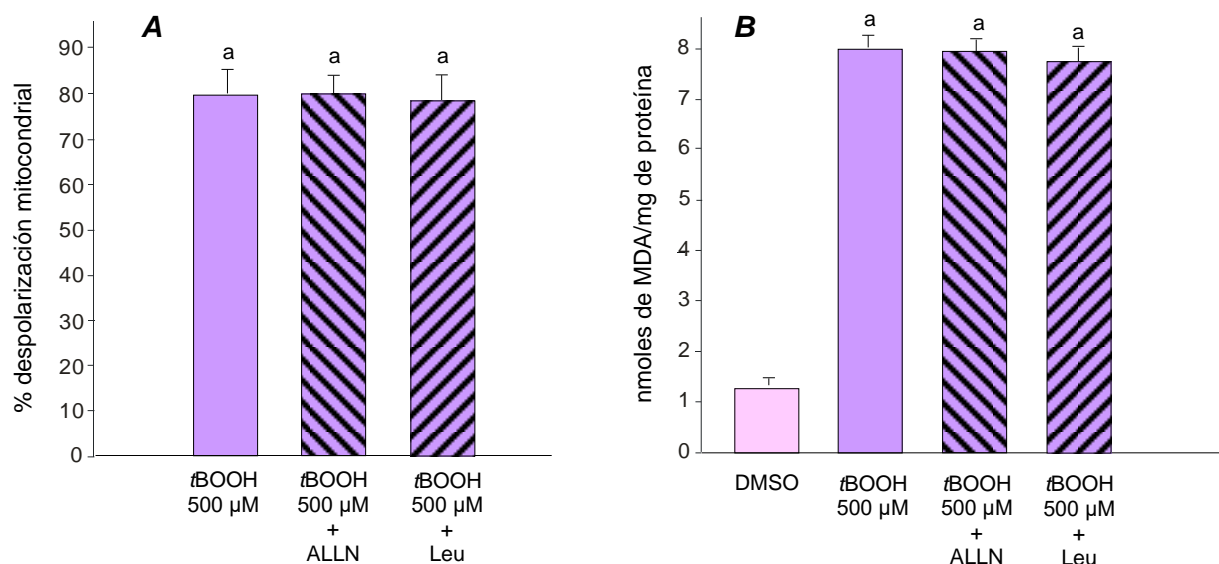


Figura 28. Efecto del pre-tratamiento de hepatocitos aislados con los inhibidores de calpaínas ALLN (50 μ M) o Leu (100 μ M) y la subsiguiente administración de tBOOH (500 μ M) sobre: **(A)** la formación de PTPM (evaluado a través del cambio en el porcentaje de despolarización mitocondrial, $\Delta\Psi_m$, utilizando tetra-metil-rodamina metil éster como sonda fluorescente), y **(B)** la subsecuente lipoperoxidación (LPO, evaluada a través de la formación de MDA dependiente de ROS). Las células pre-cargadas con la sonda fluorescente se pre-trataron durante 15 min con los moduladores de señalización, o con sus vehículos en los controles. Luego, las células fueron expuestas a tBOOH durante otro periodo de 15 min. Los valores reportados son las medias aritméticas \pm EE. ^a, significativamente diferente del grupo control (DMSO) ($p < 0,05$).

4.12.3. Calmodulina (CaM)

Otro posible modulador del daño mitocondrial dependiente de Ca^{2+} que ocurre bajo condiciones de estrés oxidativo es la CaM. Esta proteína une Ca^{2+} , formando un complejo que se encuentra involucrado en distintas funciones celulares a través de la activación de enzimas dependientes de CaM, tales como quinasa II dependiente de CaM (CaMKII), óxido nítrico sintasa y calcineurina (Colbran, 2004).

Como se observa en la Fig. 29, al inhibir la formación del complejo CaM mediante el pre-tratamiento de hepatocitos aislados con dos antagonistas de la formación del complejo Ca^{2+} -CaM, W7 o trifluoperazina (TFP), se previno la despolarización mitocondrial y la lipoperoxidación al mismo nivel que el obtenido pre-tratando separadamente los hepatocitos con el inhibidor de PTPM CsA (Fig. 29). La inhibición parcial de estos efectos deletéreos es

compatible con la existencia de dos fuentes de producción de radicales libres a partir de $t\text{BOOH}$: una debida a su propia metabolización hepatocelular (a radicales libres alcoxilo y peroxilo), y otra secundaria a la fuga de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial debida a la apertura de PTPM inducida por el agente pro-oxidante. Solamente este segundo componente es sujeto a regulación dependiente de Ca^{2+} , tal como lo demuestra el hecho que la formación de PTPM fue bloqueada por el antagonista de CaM W7 en la misma extensión que lo hizo el inhibidor de PTPM CsA, sugiriendo absoluta dependencia de este fenómeno con la formación del complejo CaM. La no existencia de efectos sumatorios en la prevención de estos procesos, como lo indica el pre-tratamiento conjunto de los hepatocitos con W7 y CsA, nos permitió confirmar esta presunción (Fig. 29).

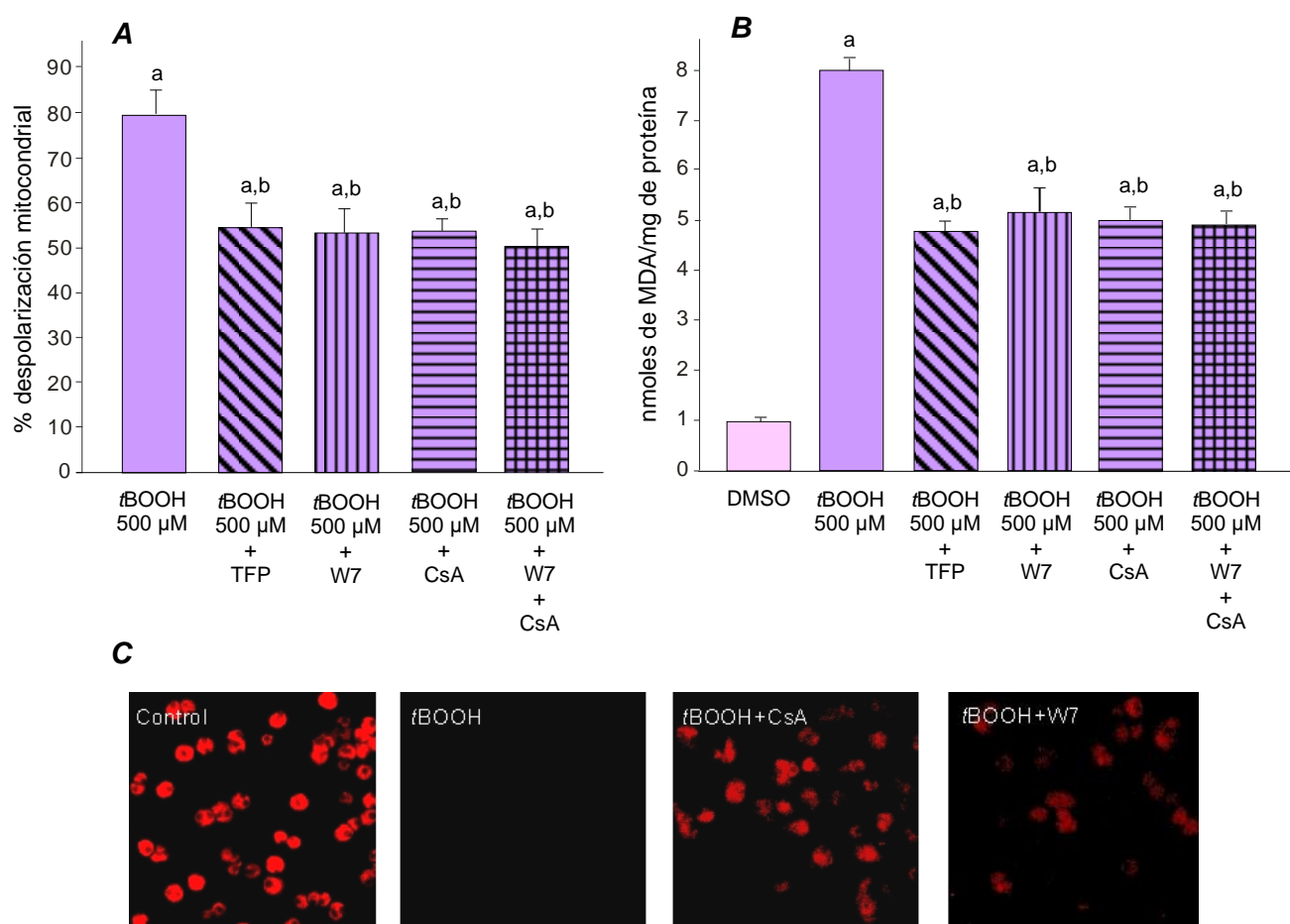


Figura 29. Efecto del pre-tratamiento de hepatocitos aislados con los inhibidores de CaM, W7 (100 μM) o TFP (10 μM), y con el inhibidor de PTPM CsA (5 μM) sobre: **(A)** la formación de PTPM inducida por $t\text{BOOH}$ 500 μM (evaluada a través del cambio en el porcentaje de despolarización mitocondrial, $\Delta\Psi_m$, utilizando tetra-metil-rodamina metil éster como sonda fluorescente), y **(B)** la subsecuente lipoperoxidación (LPO, evaluada a través de la formación de MDA dependiente de ROS). Las células pre-cargadas con la sonda fluorescente se pre-trataron durante 15 min con los moduladores de señalización, o con sus vehículos en los controles. Luego, las células fueron expuestas a $t\text{BOOH}$ durante otro periodo de 15 min. Los valores reportados son las medias aritméticas \pm EE. ^a, significativamente diferente del grupo control (DMSO) ($p < 0,05$); ^b, significativamente diferente del grupo $t\text{BOOH}$ 500 μM ($p < 0,05$). **(C)** Cambios en el contenido celular de la sonda fluorescente sensible a modificaciones del potencial mitocondrial, tetra-

metil-rodamina metil éster, inducidos por $t\text{BOOH}$. Nótese que la sonda fluorescente se encuentra retenida principalmente en la mitocondria en condiciones controles. $t\text{BOOH}$ induce cambios en el $\Delta\Psi_m$, un parámetro subrogado de PTPM, que genera la pérdida del fluoróforo contenido en la mitocondria, causando el eflujo celular de la sonda. Tanto el pre-tratamiento de los hepatocitos con CsA como con W7 previno de manera similar los cambios en el $\Delta\Psi_m$ inducidos por $t\text{BOOH}$.

4.13. Mediadores del efecto facilitador de CaM en la generación de estrés oxidativo de origen mitocondrial inducido por $t\text{BOOH}$

CaM es una proteína ubicua que se encuentra en hígado, principalmente, en el citoplasma, el núcleo y la membrana plasmática (Harper *et al*, 1980). A su vez, la mitocondria contiene CaM en la membrana interna y la matriz mitocondrial (Hatase *et al*, 1985), así como numerosas proteínas de unión a CaM (Itano *et al*, 1986), como la fosfatasa dependiente de Ca^{2+} /CaM calcineurina (Rusnak y Mertz, 2000). Por lo tanto, para avanzar en la caracterización de los moduladores de señalización involucrados cascada abajo de CaM, evaluamos la participación en la formación de PTPM y en la generación de ROS de origen mitocondrial de dos proteínas dependientes de CaM: calcineurina (de localización mitocondrial) y proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} -CaM (CaMKII, de localización citosólica).

4.13.1. Calcineurina

Esta serina/treonina fosfatasa dependiente CaM, desfosforila a la proteína Bad, facilitando su translocación a la mitocondria en donde ejerce efectos regulatorios sobre la muerte celular apoptótica vinculados con la formación de PTPM (ver Fig. 5) (Wang *et al*, 1999; Hajnóczky *et al*, 2000). Para estudiar su posible rol regulatorio en la generación de estrés oxidativo dependiente de PTPM, se evaluó, en hepatocitos aislados, el porcentaje de despolarización mitocondrial (como parámetro subrogado de PTPM) y la lipoperoxidación inducidos por $t\text{BOOH}$ en presencia del inhibidor específico de calcineurina tracolimus (FK506).

Como se puede observar en la Fig. 30, no se observaron cambios significativos en los parámetros evaluados ante la inhibición de calcineurina. Incidentalmente, esta ausencia de efecto de FK506 permite confirmar que la prevención en la formación de PTPM y en la peroxidación lipídica observada frente al pre-tratamiento de los hepatocitos con CsA no es debida a su conocido efecto inhibitorio sobre la actividad fosfatasa de la calcineurina (Hemenway y Heitman, 1999), sino a su capacidad para contrarrestar la formación de PTPM (Bernardi, 1996).

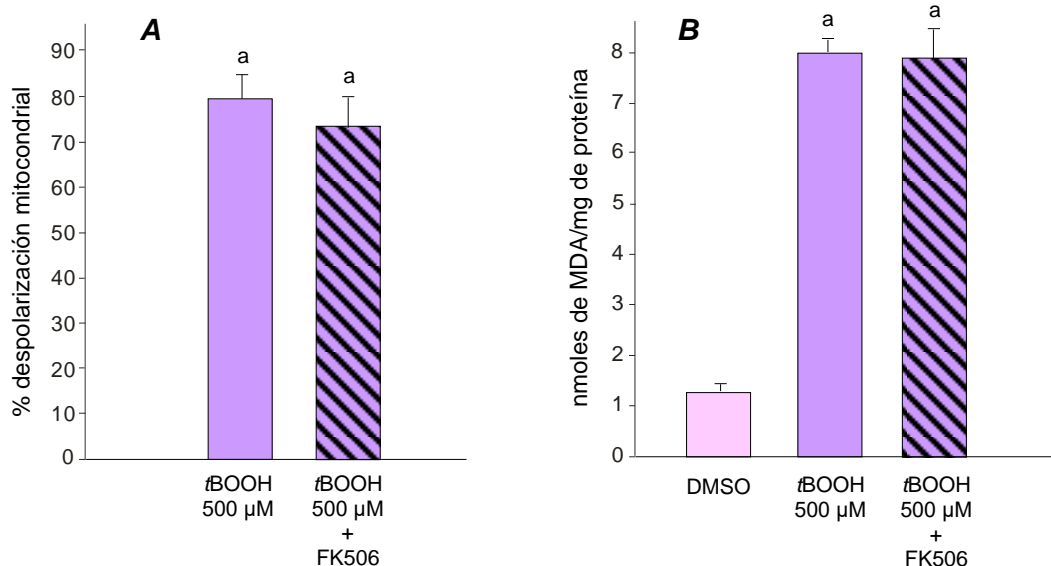
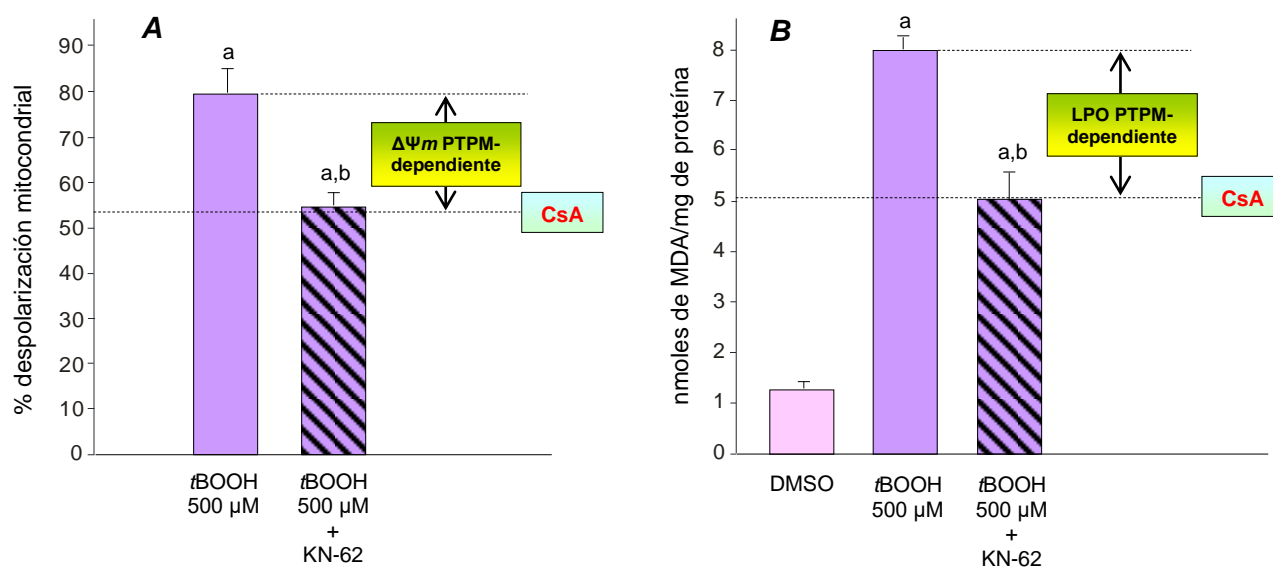


Figura 30. Efecto del pre-tratamiento de hepatocitos aislados con el inhibidor de calcineurina FK506 (1 μM) sobre, **(A)** la formación de PTPM inducida por tBOOH 500 μM (evaluada a través del cambio en el porcentaje de despoliarización mitocondrial, $\Delta\Psi_m$, utilizando tetra-metil-rodamina metil éster como sonda fluorescente), y **(B)** la subsecuente lipoperoxidación (LPO, evaluada a través de la formación de MDA dependiente de ROS). Las células pre-cargadas con la sonda fluorescente se pre-trataron durante 15 min con FK506, o con su vehículo (DMSO) en los controles. Luego, las células fueron expuestas a tBOOH durante otro periodo de 15 min. Los valores reportados son las medias aritméticas \pm EE. ^a, significativamente diferente del grupo control (DMSO) ($p < 0,05$).

4.13.2. Proteína quinasa II dependiente de CaM (CaMKII)

Al evaluar la participación en la formación de PTPM y en la generación de ROS de origen mitocondrial de la proteína CaMKII, observamos que, efectivamente, al inhibir esta quinasa con KN-62, prevenimos totalmente el daño mitocondrial, a niveles comparables a los obtenidos con el inhibidor de PTPM CsA (Fig. 31).



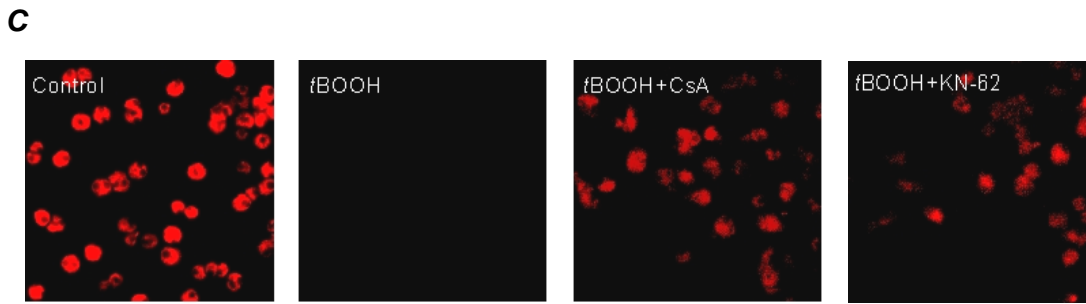


Figura 31. Efecto del pre-tratamiento de hepatocitos aislados con el inhibidor de CaMKII KN-62 (10 μ M) sobre: **(A)** la formación de PTPM inducida por tBOOH 500 μ M (evaluada a través del cambio en el porcentaje de despolarización mitocondrial, $\Delta\Psi_m$, utilizando tetra-metil-rodamina metil éster como sonda fluorescente), y **(B)** la subsecuente lipoperoxidación (LPO, evaluada a través de la formación de MDA dependiente de ROS). Las células pre-cargadas con la sonda fluorescente se pre-trataron durante 15 min con KN-62, o con su vehículo (DMSO) en los controles. Luego, las células fueron expuestas a tBOOH durante otro periodo de 15 min. Los valores reportados son las medias aritméticas \pm EE. ^a, significativamente diferente del grupo control (DMSO) ($p < 0,05$). ^b, significativamente diferente del grupo tBOOH 500 μ M ($p < 0,05$). **(C)** Cambios en el contenido celular de la sonda fluorescente sensible a modificaciones del potencial mitocondrial, tetra-metil-rodamina metil éster, inducidos por tBOOH. Nótese que la sonda fluorescente se encuentra retenida principalmente en la mitocondria en condiciones controles. tBOOH induce cambios en el $\Delta\Psi_m$, un parámetro subrogado de PTPM, que genera la pérdida del fluoróforo contenido en la mitocondria, causando finalmente el eflujo celular de la sonda. Tanto el pre-tratamiento de los hepatocitos con CsA como con KN-62 previnieron, de manera similar, los cambios en el $\Delta\Psi_m$ inducidos por tBOOH.

Estos resultados nos permiten concluir que el efecto facilitador del Ca^{2+} en la formación de PTPM y en la lipoperoxidación de origen mitocondrial inducida por tBOOH (500 μ M) dependen de la formación del complejo CaM, vía activación de CaMKII, regulando un proceso de exacerbación/preservación del daño oxidativo.

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

“Ciencia es todo aquello sobre lo cual cabe siempre discusión.”

*José Ortega y Gasset (1883-1955).
Literato y filósofo español.*

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo tesis, se caracterizaron alteraciones estructurales y funcionales inducidas por estrés oxidativo sobre el sistema secretor hepatobiliar y la integridad mitocondrial, determinándose la existencia de una regulación mediada por desbalances de señalización intracelular en el daño oxidativo hepático. Estos resultados aportan nuevas evidencias sobre cómo las especies reactivas del oxígeno son capaces de actuar como segundos mensajeros intracelulares, regulando procesos fisiológicos y fisiopatológicos (Kamata y Hirata, 1999). Este concepto permite imaginar un futuro terapéutico más amplio, potencialmente dirigido al re-establecimiento del balance entre los diferentes caminos de señalización celular alterados por el estrés oxidativo, complementario al dirigido a controlar la generación de los radicales libres.

5.1. Caracterización del estrés oxidativo inducido por tBOOH en células hepáticas

Existen diversos modelos experimentales que han sido desarrollados con el objetivo de profundizar la comprensión de los mecanismos de daño celular inducidos por estrés oxidativo. En particular, se destaca el empleo de compuestos químicos capaces de generar radicales libres del oxígeno una vez administrados y metabolizados. Entre ellos, se encuentran compuestos del tipo de los hidroperóxidos sintéticos, tales como el *tert*-butil hidroperóxido (tBOOH) utilizado en este estudio, cuyo metabolismo, mediado principalmente por CYP-450, conduce a la formación de radicales libres alcoxilo y peroxilo de alta reactividad hacia membranas y otros componentes celulares (Ahmed-Choudhury *et al*, 1998). Utilizando esta clase de compuestos pro-oxidantes, se ha demostrado que la inducción de estrés oxidativo produce alteraciones hepatocelulares variables, dependiendo de la duración e intensidad del mismo.

En este trabajo, se caracterizó, como primer paso, el daño oxidativo producido por tBOOH en hepatocitos, administrando el compuesto a dos concentraciones. A la dosis más baja (100 µM), se observó un incremento en la producción de ROS, lo cual fue demostrado utilizando dos metodologías diferentes: *i*) la generación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y *ii*) el ensayo fluorescente con 2'-7'-diclorofluorescina diacetato (ver Tabla 2). Si bien el daño oxidativo generado con esta dosis del agente pro-oxidante fue moderada, resultó suficiente para elevar significativamente los niveles de Ca²⁺ citosólico (ver Tabla 2) e inducir la translocación a la membrana celular de la isoforma de PKC dependiente de Ca²⁺, PKC α , un fenómeno asociado a su activación (Newton, 2001) (ver Fig. 12). Sin embargo, no se observaron cambios mensurables en la viabilidad celular (ensayo de azul tripán), en la liberación de la enzima citosólica LDH, en el contenido total de ATP, en los niveles intracelulares de GSht ni en la relación GSSG/GSht (ver Tabla 2), un patrón de cambios compatible con el establecimiento de condiciones pro-oxidantes leves. Estos dos últimos resultados pueden ser explicados por el hecho que, en estas condiciones, el GSSG formado puede ser reconvertido totalmente a GSH vía la enzima glutation reductasa, lo cual previene, a su vez, tanto la pérdida de GSht por exportación del GSSG celular formado

como las alteraciones en la relación GSSG/GSht (Dickinson y Forman, 2002). En cambio, frente a un estímulo oxidativo más energético, como el alcanzado con la dosis de tBOOH más alta (500 μ M), todos estos parámetros, con excepción de los niveles de ATP, se vieron fuertemente afectados (ver Tabla 2). Estos efectos se encuentran causalmente asociados a la disfunción mitocondrial que precede a la muerte celular, ocasionada por la generación de PTPM (ver Fig. 25), y son compatibles con estudios previos que demuestran que tBOOH es capaz de provocar muerte celular necro-apoptótica en hepatocitos, con liberación de citocromo c, pérdida de la polaridad de la membrana mitocondrial y establecimiento de PTPM (Haidara *et al*, 2002; Lemasters *et al*, 1999). Por otro lado, la notable conservación del contenido de ATP a tBOOH 500 μ M, a pesar de verse alterada la función mitocondrial, es congruente con lo reportado por Buc-Calderon y col. (1991), quienes observaron que los niveles de ATP no se modificaban durante la incubación de hepatocitos sometidos a un amplio rango de concentraciones de tBOOH, a pesar de registrarse un aumento de la liberación de LDH y una disminución progresiva del contenido de glucógeno. Este último resultado sustenta la posibilidad de que, en nuestra condición experimental más extrema (exposición de 15 min a tBOOH 500 μ M), los niveles de ATP puedan haber sido recuperados por glicólisis (Lemasters y Nieminen, 1997).

5.2. Alteraciones de la organización y la función secretora hepatocanalicular inducidas por tBOOH

Estudios previos utilizando una variedad de agentes pro-oxidantes han demostrado que el estrés oxidativo causa alteraciones en la organización y la función hepática, las cuales son responsables de producir fallas en los mecanismos de secreción biliar, así como la liberación paracelular de solutos secretados al espacio canalicular, que llevan a una caída del flujo biliar y a la disipación del gradiente osmótico involucrado en la formación de bilis (Crocenzi *et al*, 2004; Jaeschke *et al*, 2002). Entre estas alteraciones, el citoesqueleto de actina es uno de los blancos primarios de ataque, ya que el daño oxidativo induce el entrecruzamiento de los grupos tioles de la actina (Dalle-Donne *et al*, 2001). En concordancia con esto, estudios previos han demostrado que niveles leves de estrés oxidativo, tales como los inducidos por tBOOH o menadiona a bajas concentraciones, son capaces de inducir desorganización del citoesqueleto de actina en duplas aisladas de hepatocitos de rata (Ahmed-Choudhury *et al*, 1998; Stone *et al*, 1994). En este trabajo de tesis, corroboramos estas observaciones previas. En efecto, los niveles de estrés oxidativo generados por tBOOH 100 μ M, aunque moderados, fueron sin embargo capaces de provocar profundas alteraciones en la red de microfilamentos de F-actina, morfológicamente visibles por la formación de múltiples protrusiones (“blebs”) en la superficie de la membrana plasmática (ver Figs. 14 y 15). Además, tBOOH 100 μ M redujo la capacidad de duplas de hepatocitos para retener y acumular el análogo de sal biliar fluorescente CLF en su vacuola

canalicular (ver Figs. 20 y 22, respectivamente), hecho que concuerda con datos anteriores (Ahmed-Choudhury *et al*, 1998).

Elias y col. (1980) demostraron que las interrupciones al citoesqueleto de actina inducidas por faloidina alteran la permeabilidad de las uniones estrechas hepatocelulares. Por otro lado, se demostró que la colestasis extrahepática inducida por ligadura de conductos biliares, un modelo que cursa con estrés oxidativo como una característica preeminente (Baron y Muriel, 1999; Huang *et al*, 2003), provoca profundas alteraciones estructurales en la interacción entre F-actina y ZO-1 que conducen a la disfunción de las uniones estrechas (Song *et al*, 1996 a). Estos hallazgos podrían explicar las fallas funcionales en la retención de solutos excretados observadas en nuestro estudio (ensayo de RVC de CLF), ya que también pudimos notar una extensa redistribución de la proteína ZO-1 asociada con la desorganización del citoesqueleto de actina (ver Fig. 19).

Además de las alteraciones arriba descritas en la capacidad para retener a nivel canalicular las sales biliares excretadas en condiciones de estrés oxidativo, hemos verificado una disminución en la cantidad de sales biliares secretadas al canalículo biliar, como lo sugiere la disminución en el ensayo de acumulación de CLF en la vacuola canalicular (AVc) (ver Figs. 13 y 22). Si bien esta falla secretora había sido descrita en diferentes modelos experimentales de estrés oxidativo (Akerboom *et al*, 1984; Akerboom *et al*, 1988; Ballatori y Truong, 1989), la misma había sido atribuida a un incremento en los niveles de GSSG, el cual inhibe el transporte de sales biliares como lo revelan estudios en vesículas de membranas canaliculares (Griffiths *et al*, 1987). Sin embargo, este hecho no explica las alteraciones observadas en nuestro estudio ocasionadas por H_2O_2 100 μM , debido a que, a esta concentración del agente pro-oxidante, no se modificaron los niveles de GSht ni la relación GSSG/GSht (Tabla 2). En particular, en nuestras condiciones experimentales, parecen estar involucrados mecanismos subyacentes colestásicos de origen hepatocelular, ya que pudimos observar, mediante estudios de inmunolocalización, la internalización endocítica de la bomba exportadora de sales biliares (Bsep) desde la membrana canalicular (Fig. 21). La crucial importancia de este mecanismo de transporte en la generación del flujo biliar, dado que las sales biliares amidas transportadas por ella son el principal determinante osmótico del mismo, permiten inferir que la redistribución a sitios intracelulares desde donde no puede ejercer su función secretora normal debe repercutir críticamente en la formación de la bilis. Sustentando esta afirmación, se ha reportado la existencia de un fenómeno de internalización endocítica de Bsep similar al observado por nosotros en varias condiciones colestásicas, tales como aquellas inducidas por “shock” hiperosmótico (Schmitt *et al*, 2001), colestasis obstructiva o administración de los agentes colestásicos estradiol 17 β -D-glucuronido (Crocenzi *et al*, 2003 a), taurolitocolato (Crocenzi *et al*, 2003 b) y ciclosporina A (Román *et al*, 2003). En este último caso, además, la internalización de Bsep se mostró asociada con la desorganización del citoesqueleto de actina (Román *et al*, 2003). Esta íntima relación entre la

integridad del citoesqueleto y la actividad de proteínas transportadoras canaliculares había sido previamente descrita para Mrp2 por Rost y col. (1999), quienes demostraron que la desorganización del citoesqueleto de actina inducida por faloidina provoca su relocalización en vesiculares intracelulares; al igual que Bsep, este transportador sufre internalización endocítica en condiciones pro-oxidantes, como se describió recientemente en duplas aisladas de hepatocitos de rata expuestas a ácido etacrínico (Sekine *et al*, 2006). Por lo tanto, es concebible que, en nuestro modelo de estudio, la internalización de Bsep se encuentre íntimamente relacionada con la desorganización de F-actina inducida por estrés oxidativo. Si bien se conoce poco acerca de proteínas celulares capaces de mediar la interacción entre el citoesqueleto de actina y Bsep, evidencias recientes sugieren algunas nuevas posibilidades a explorar. Gallagher y col. (2000) demostraron, en células de riñón (COS-7), la existencia de una asociación entre HAX-1, un polipéptido que se asocia con Bsep, Mdr1 y Mdr2 en la membrana canalicular de hepatocitos de rata (Ortiz *et al*, 2004), y cortactina, una proteína de unión a F-actina (Wu y Parsons, 1993). A su vez, Ortiz y col. (2004) demostraron que HAX-1 y cortactina participan en la internalización endocítica mediada por clatrina de Bsep en células de riñón caninas MDCK, regulando así su abundancia apical. Por lo tanto, resulta factible especular una asociación indirecta entre Bsep y F-actina mediada por HAX-1 y cortactina.

5.3. Modulación por PKC de los daños a la organización y la función hepatocanalicular inducidos por tBOOH

De todas las cascadas de transducción hormonal que se encuentran activadas en condiciones de estrés oxidativo, aquella que parece contribuir crucialmente a explicar las alteraciones morfológicas y funcionales arriba descritas es la cascada dependiente de PKC. Esta enzima se activa en hígado cuando ocurre un cambio en el estado redox ocasionado por estrés oxidativo moderado, como el inducido por bajas concentraciones de CCl₄ (Pronzato *et al*, 1993), quinonas pro-oxidantes (por ej., menadiona o dimetil-naftoquinona) (Kass *et al*, 1989) o tBOOH (Kishimoto *et al*, 2000). Nuestros resultados demostrando la translocación a la membrana celular de la isoforma de PKC dependiente de Ca²⁺ PKC α inducida por tBOOH (ver Fig. 12) confirman y extienden estas observaciones preliminares.

Estudios previos realizados utilizando el modelo de duplas aisladas de hepatocitos de rata demostraron que la activación de PKC inducida por vasopresina o ésteres de forbol promueve cambios morfológicos y alteraciones al sistema hepatobiliar dependientes de Ca²⁺, similares a los obtenidos en modelos de estrés oxidativo. Éstos incluyeron desorganización del citoesqueleto de actina y alteraciones de secreción y retención canalicular de sales biliares (Roma *et al*, 1998, 1999). Estas observaciones sustentan la posibilidad que las alteraciones inducidas por estrés oxidativo estén mediadas, al menos en parte, por la activación de isoformas “clásicas”, dependientes de Ca²⁺, de PKC. Los resultados presentados en este trabajo de tesis mostrando

que un amplio rango de inhibidores de PKC (H7, SP, Gö6976) y un agente quelante de Ca^{2+} (BAPTA/AM) previnieron completamente las alteraciones inducidas por tBOOH arriba descritas (ver Figs. 16-23) confirman esta presunción.

Un mecanismo capaz de explicar la mediación de PKC en el daño oxidativo del citoesqueleto de actina es la fosforilación directa del mismo por isoformas clásicas de PKC dependientes de Ca^{2+} . En efecto, se ha demostrado que PKC fosforila y/o induce la desorganización de varios componentes del citoesqueleto de actina, incluyendo a la propia actina, proteínas asociadas a actina (por ej., α -actinina, vinculina y filamina) y proteínas de membrana de unión al citoesqueleto, principalmente, MARCKS (Keenan y Kelleher, 1998). La fosforilación mediada por PKC α de estas últimas proteínas ha sido involucrada en la regulación de la interacción membrana-actina en macrófagos (Allen y Aderem, 1995). Si bien, en el presente estado de avance, no podemos establecer específicamente cuál es el blanco de acción de PKC sobre el citoesqueleto, su inhibición fue completamente eficaz en prevenir la desorganización de la F-actina inducida por tBOOH 100 μM (ver Figs. 16 y 17).

Nuestros resultados también demostraron que, al igual que lo que ocurre con actina, la inhibición de PKC fue también eficaz en prevenir completamente la deslocalización de ZO-1 inducida por tBOOH (ver Fig. 19). Es altamente probable que estos dos fenómenos se encuentren causalmente asociados, ya que las alteraciones en los componentes del citoesqueleto de actina pueden inducir *per se* cambios en la organización de las uniones estrechas (Elias *et al*, 1980). Sin embargo, ambos mecanismos pueden ser independientes, ya que puede existir un fenómeno de fosforilación directa de los componentes de las uniones estrechas mediada por PKC. A favor de esta hipótesis, Kubitz y col. (2001) demostraron en células HepG2 que la activación de PKC inducida por ésteres de forbol provoca la desintegración del anillo pericanalicular de ocludina. Similarmente, Marano y col. (2001) demostraron, en células epiteliales gastrointestinales, que la activación de PKC, también con ésteres de forbol, induce un aumento de la fosforilación de ocludina, aunque sin afectar la localización ni la cantidad de ocludina o ZO-1. Anteriormente, se había descrito en células MDCK que la ocludina se encuentra anormalmente fosforilada después de la activación de PKC ocasionando una fragmentación irreversible de las uniones estrechas en pequeños agregados filamentosos de ocludina y ZO-1 (Farshori y Kachar, 1999). Finalmente, se ha observado en células endoteliales que la activación de isoformas “clásicas” de PKC provoca la fosforilación de ocludina (Harhaj *et al*, 2006) y la disociación de la unión ocludina-actina (Park *et al*, 1999), ocasionando un aumento de la permeabilidad de las uniones estrechas. Es interesante notar que existen numerosos trabajos demostrando que la fosforilación dependiente de PKC de ocludina y ZO-1 sería necesaria para la correcta biogénesis y ensamblaje de las uniones estrechas (Stuart y Nigam, 1995; Sakakibara *et al*, 1997; Nunbhakdi-Craig *et al*, 2002). Sin embargo, en este efecto estarían más bien involucradas isoformas “atípicas” de PKC.

Otro efecto deletéreo del estrés oxidativo dependiente de PKC que caracterizamos en este trabajo de tesis es la alteración en la capacidad del hepatocito para secretar sales biliares, un proceso críticamente dependiente del estado funcional y de la localización de su transportador canalicular Bsep, así como de la integridad del citoesqueleto de actina, dos factores posiblemente interrelacionados. En concordancia con nuestros resultados, se han reportado alteraciones funcionales de Bsep asociadas a su relocalización en compartimientos vesiculares intracelulares en condiciones de activación selectiva de PKC α (Kubitz *et al*, 2004). Además de producir alteraciones primarias a nivel del citoesqueleto de actina, las cuales pueden explicar por sí solas la internalización de Bsep (Rost *et al*, 1999), PKC podría fosforilar en forma directa a Bsep, o a otras proteínas asociadas, induciendo así alteraciones en su anclaje con la actina. Por ejemplo, se ha demostrado que el transportador canalicular dependiente de ATP Mdr1 (el transportador homólogo más cercano a Bsep) sufre fosforilación por PKC en su dominio de interacción con proteínas que lo asocian a actina, tales como HAX-1 (Chambers *et al*, 1993). Sin embargo, desconocemos hasta el momento si esta fosforilación también ocurre con Bsep, y si la misma conduce a una pérdida del anclaje en la membrana canalicular, explicando así los cambios en la localización del mismo. Cualquiera sea el mecanismo involucrado, éste no parece afectar exclusivamente a Bsep, ya que se reportaron cambios en la localización de Mrp2, y de su actividad de transporte, ocasionados por la activación de PKC por ésteres de forbol en células de hepatoblastoma HepG2 (Kubitz *et al*, 2001).

Si bien no es posible establecer con nuestros resultados cuál es el blanco de acción de PKC α sobre el sistema de secreción biliar, su inhibición fue completamente eficaz en prevenir la internalización de Bsep inducida por tBOOH 100 μ M (Figs. 21 y 22). De hecho, la falla en la secreción de sales biliares inducida por estrés oxidativo no es de naturaleza irreversible, ya que pudo revertirse rápidamente cuando se administraron inhibidores de PKC (Fig. 23). Esta reversión se vio acompañada de una extensa reducción en la formación de “blebs” de membrana (Fig. 18), relacionando nuevamente la falla secretora biliar con la integridad del citoesqueleto de actina. La característica reversible del fenómeno, así como la aceleración de tal reversión por inhibidores de PKC, renueva expectativas acerca de la posibilidad de restablecer el funcionalismo secretor biliar a través de un tratamiento selectivo que, actuando cascada abajo de la generación de radicales libres, permita contrarrestar el desbalance en la señalización inducido por el estrés oxidativo.

Nuestros resultados también demuestran que la activación de proteína quinasa A (PKA) con DB-AMPC fue tan eficaz como la inhibición de PKC en prevenir y revertir la formación de protrusiones de membrana, la disfunción secretora de sales biliares y la reorganización de la localización de las uniones estrechas, Bsep y F-actina (Figs. 16-23). El hecho que el inhibidor de PKA, KT5720, anulara la acción protectora de DB-AMPC sugiere que este efecto es efectivamente mediado por la activación de PKA y no por otros efectos inespecíficos de DB-

AMPc. En concordancia con esto, se ha demostrado que el DB-AMPc posee efectos preventivos contra la hepatotoxicidad inducida por D-galactosamina y lipopolisacárido (Kasai *et al*, 1996), dos hepatopatías que involucran daño oxidativo (Ben Sauhl *et al*, 1999). En hepatocitos, el AMPc previene la apoptosis inducida por sales biliares (Webster y Anwer, 1998), un evento que involucra tanto la formación de ROS (Patel y Gores, 1997) como la activación de PKC (Jones *et al*, 1997). Recientemente, Reinehr y Haussinger demostraron que la activación de PKA mediada por AMPc protege a los hepatocitos de la apoptosis inducida por taurolitocolato-3-sulfato y glicoquenodesoxicolato, fenómeno asociado, a su vez, a la inducción de estrés oxidativo (Reinehr y Haussinger, 2004).

No es posible establecer con nuestros resultados el mecanismo preciso por el cual DB-AMPc posee efecto protector sobre las alteraciones al flujo biliar y al citoesqueleto de actina inducidas por estrés oxidativo. Sin embargo, la literatura permite vislumbrar algunas alternativas. En primer lugar, existe un considerable grado de entrecruzamiento entre las vías de señalización mediadas por PKC y PKA, a menudo contrabalanceándose entre sí para regular respuestas celulares (Yoshimasa *et al*, 1987). Por ejemplo, varias proteínas involucradas en la acción agonista sobre la activación de PKC son inhibidas por PKA (Wen *et al*, 1992). En segundo lugar, pueden existir efectos inhibitorios inducidos por PKA sobre los caminos de señalización cascada abajo de PKC (Liebmann, 2001). Finalmente, pueden existir efectos benéficos directos del AMPc que no se encuentren mediados por modificaciones transduccionales sobre los caminos de señalización dependientes de PKC. Por ejemplo, se ha demostrado que el AMPc estimula la reorganización del citoesqueleto de F-actina y la recuperación de la función secretora de sales biliares en duplas aisladas de hepatocitos de rata luego de la pérdida de su polaridad debido al proceso de aislamiento (Roma *et al*, 2000). Aparentemente, el AMPc estimula la inserción exocítica de Bsep en su dominio de membrana apical (Crocenzi *et al*, 2003 a; Crocenzi *et al*, 2003 b). Por lo tanto, también es factible que el efecto protector del AMPc contra el daño inducido por el estrés oxidativo sobre el sistema hepatobiliar (ver Figs. 16-23) se deba a una acción conjunta sobre la re-organización de la actina y la re-inserción endocítica de Bsep.

Es importante notar que no encontramos evidencias que PKC actúe sobre los sistemas enzimáticos de metabolización de *t*BOOH exacerbando la generación de ROS, ya que la formación de especies reactivas y la peroxidación lipídica inducida por el pro-oxidante no se vieron significativamente afectadas por los antagonistas y/o agonistas utilizados en este estudio (ver Fig. 24 A y B). Por otro lado, la inhibición de PKC no sólo fue eficiente en la prevención de los daños oxidativos sino que, además, fue capaz de *revertir* las alteraciones funcionales y morfológicas inducidas por *t*BOOH *una vez que los niveles de radicales libres aumentaron* (ver Fig. 18). Esto permite confirmar que PKC es un mediador de señalización que actúa cascada

abajo de la formación de ROS siendo, una vez activado por los mismos, el responsable de los efectos deletéreos ocasionados por niveles moderados de estrés oxidativo.

En conclusión, estos resultados indican que niveles bajos de estrés oxidativo inducen alteraciones al citoesqueleto de actina, perturban morfológica y funcionalmente a las uniones estrechas y afectan la función secretora de sales biliares internalizando Bsep a través de un mecanismo dependiente de Ca^{2+} , mediado por PKC α . Es interesante notar que estos hallazgos se contrastan con la concepción general que supone a los radicales libres del oxígeno como responsables directos de la disfunción hepatobiliar, principalmente actuando a través de la oxidación de estructuras relevantes para el proceso de formación de bilis. En este caso, un estrés oxidativo moderado fue capaz de inducir daño hepatocanalicular activando cascadas de transducción de señales.

5.4. Regulación del estrés oxidativo de origen mitocondrial por señalización intracelular

Los resultados informados hasta aquí describen alteraciones hepatocelulares que ocurren a bajos niveles de estrés oxidativo, los cuales no se encuentran asociados con eventos de muerte celular. Sin embargo, esta situación puede cambiar en condiciones más severas de estrés oxidativo. Dosis más altas de tBOOH, capaces de comprometer la viabilidad celular, pueden inducir estrés oxidativo no solamente por la generación de radicales libres producto de su metabolismo sino que, además, promoviendo la formación de *poros de transición de permeabilidad mitocondrial* (PTPM), efecto que estimula la producción de especies reactivas de origen mitocondrial, estableciendo un círculo vicioso letal (Nieminen *et al*, 1995, 1997). En efecto, este fenómeno es uno de los eventos primarios que contribuye a la muerte celular en condiciones de estrés oxidativo en hepatocitos, ya que se asocia causalmente a la muerte celular por necrosis o apoptosis (Feldmann *et al*, 2000; Kin *et al*, 2003; Lemasters *et al*, 1999; Nieminen *et al*, 1997; 1995). El incremento en los niveles de Ca^{2+} inducido por el daño oxidativo genera la apertura de estos complejos proteicos ubicados en la membrana mitocondrial, provocando un aumento de la permeabilidad de la misma (Byrne *et al*, 1999; Invertí *et al*, 1993; Kowaltowski *et al*, 2001; Vercesi *et al*, 2006). Esto provoca la disipación del potencial transmembrana ($\Delta\psi_m$), aumento del tamaño de la organela (“*swelling*”) y liberación de citocromo *c* y otros componentes de la maquinaria apoptótica. La formación del poro provoca el bloqueo de la cadena de electrones mitocondrial, hecho que promueve el escape de los mismos al citosol con generación de radicales libres (Crompton, 1999; 2002; Kroemer y Reed, 2000; Kowaltowski *et al*, 2001; Zorov *et al*, 2006).

Si bien este efecto no se puso de manifiesto a tBOOH 100 μM , pudimos verificar que la generación de PTPM es dependiente de la dosis de tBOOH, siendo no significativo a bajas concentraciones (100 μM), pero manifiesto a dosis mayores (500 μM), como lo confirman nuestros resultados analizando el porcentaje de despolarización mitocondrial dependiente de PTPM y los niveles de lipoperoxidación, como parámetro subrogado de estrés oxidativo (ver Fig. 25). Estos

hallazgos son compatibles con los datos informados en la Tabla 2, donde se observó que sólo a la dosis mayor de tBOOH (500 μ M) se afectan parámetros asociados con la viabilidad celular (ensayo de azul tripán y liberación de LDH).

A pesar de la creciente información sobre la importancia del PTPM en condiciones de estrés oxidativo y su asociación con los procesos de muerte celular, los eventos de señalización que gobiernan este fenómeno en células hepáticas, particularmente aquellos asociados al Ca^{2+} intracelular, no han sido aún caracterizados. En este sentido, nuestros datos sustentan fuertemente la participación de este ión en la generación de PTPM inducida por tBOOH, ya que el secuestro de Ca^{2+} con BAPTA/AM previno la lipoperoxidación y la despolarización mitocondrial en una magnitud similar a CsA, un inhibidor clásico de PTPM (Bernardi, 1996) (ver Fig. 26). Estos resultados están en concordancia con trabajos previos que demostraron que las elevaciones de Ca^{2+} celular potencian la capacidad de los ROS para promover PTPM (Byrne *et al*, 1999; Kowaltowski *et al*, 2001; Vercesi *et al*, 2006). Solo se cuentan con hipótesis que explican, de modo tentativo, la reciprocidad existente entre el Ca^{2+} y los ROS para exacerbarse mutuamente en su capacidad de generar PTPM, aunque ninguna de ellas ha sido probada de modo conclusivo (Vercesi *et al*, 2006). Los ROS causan liberación de Ca^{2+} de la matriz mitocondrial, el cual puede ser recaptado por la mitocondria (reciclado de Ca^{2+}); se ha propuesto que este excesivo reciclado sería responsable de la formación de PTPM (Takeyama *et al*, 1993). Además, las elevaciones de Ca^{2+} libre en la matriz mitocondrial incrementan la respiración mitocondrial, la cual es controlada por deshidrogenasas mitocondriales reguladas por Ca^{2+} ; esto sobre-estimularía la producción mitocondrial de ROS, un factor exacerbado por la unión de Ca^{2+} a la cara interna de la membrana interna mitocondrial, la cual conduce a la formación de agregados de cardiolipina que incrementan la liberación de electrones de la cadena respiratoria (Grijalva *et al*, 1999); el estrés oxidativo mitocondrial así generado induciría la formación de PTPM por oxidación de grupos sulfidrilos libres en ANT, ya que esto incrementa la afinidad de esta proteína por ciclofilina D (Kanno *et al*, 2004). Lo opuesto también ocurre, esto es, los ROS magnifican sustancialmente la sensibilidad del PTPM al Ca^{2+} . Esto ocurriría tanto incrementando la afinidad de ciclofilina D por ANT, como reduciendo la afinidad del sitio de unión intramitocondrial de nucleótidos de adenina en la molécula de ANT; esta interacción inhibe competitivamente la formación de PTPM dependiente de Ca^{2+} (Halestrap *et al*, 2000). Por lo tanto, la sobrecarga de Ca^{2+} celular que ocurre en condiciones de estrés oxidativo representa un círculo vicioso por medio del cual el Ca^{2+} y los ROS se potencian mutuamente para exacerbar la formación de ROS de origen mitocondrial, lo cual induce, a su vez, mayores incrementos de Ca^{2+} .

Un posible candidato capaz de modular la apertura de PTPM de manera dependiente de Ca^{2+} en hepatocitos es la cisteína proteasa *calpaína* (Aguilar *et al*, 1996; Gores *et al*, 1998). Esta proteasa se encuentra asociada con la muerte celular por apoptosis, ya que favorece la

liberación de citocromo *c* (ver Fig. 5) (Narita *et al*, 1998; Hajnóczky *et al*, 2000; Kroemer y Red, 2000). Se ha demostrado que calpaína fragmenta a la proteína pro-apoptótica Bax, siendo el producto de esta ruptura, Bax/p18, un potente inductor de PTPM (Gao y Dou, 2000; Wood y Newcomb, 2000; Toyota *et al*, 2003). Miyoshi y col. (1996) demostraron que el tratamiento de hepatocitos aislados con *t*BOOH activa calpaína. Sin embargo, en nuestros estudios, no observamos cambios en los niveles de lipoperoxidación ni modificaciones en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi m$), inducidos por *t*BOOH al pre-tratar los hepatocitos con N-acetil-L-leucil-L-leucil-L-norleucina (ALLN) o leupetina (Leu), dos inhibidores de calpaína (ver Fig. 28). Concluimos, por lo tanto, que los efectos de calpaína sobre la formación de PTPM, de existir en nuestras condiciones experimentales, no son determinantes para explicar los mecanismos por los cuales el Ca^{2+} exacerba la generación estrés oxidativo de origen mitocondrial.

En cambio, hemos encontrado evidencias a favor de la participación de CaM en este proceso, ya que el bloqueo de la formación del complejo Ca^{2+}/CaM con W7 o TFP previno la lipoperoxidación y la despolarización mitocondrial ($\Delta\psi m$) en la misma extensión que el inhibidor de PTPM CsA (Fig. 29). A su vez, la ausencia de efectos aditivos en estos cambios al inhibir conjuntamente el PTPM y CaM con CsA y W7, respectivamente (ver Fig. 29), confirma la existencia de un mecanismo de acción común, esto es la inducción de PTPM.

Un posible candidato a mediar los efectos de CaM sobre la formación de PTPM es la *calcineurina*. Esta enzima es una serina/treonina fosfatasa dependiente de Ca^{2+}/CaM que induce apoptosis en diferentes tipos celulares promoviendo la desfosforilación de Bad, facilitando así su translocación a la mitocondria, en donde ejerce efectos regulatorios sobre la muerte celular apoptótica vinculados con la formación de PTPM (ver Fig. 5) (Hajnóczky *et al*, 2000; Sasaki *et al*, 2002; Wang *et al*, 1999). No obstante, no se observaron cambios en los niveles de lipoperoxidación ni modificaciones en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi m$) inducidos por *t*BOOH (500 μM) al pre-tratar los hepatocitos con tracrolimus (FK506), un inhibidor específico de calcineurina (Fig. 30). Es interesante notar que la ausencia de efecto con FK506 confirma que la protección obtenida con CsA aquí informada no se debe a su reconocido efecto adicional inhibitorio de la actividad fosfatasa de calcineurina (Hemenway y Heitman, 1999), sino específicamente a su capacidad para bloquear el establecimiento de PTPM (Bernardi, 1996).

Por el contrario, nuestros resultados han puesto en evidencia la participación de la vía de señalización citosólica Ca^{2+} -CaM-CaMKII en este fenómeno, al demostrar que la inhibición de CaMKII con KN-62 previno la lipoperoxidación y la despolarización mitocondrial inducidas por *t*BOOH de manera similar al inhibidor de PTPM CsA (Fig. 31). Estos resultados confirman que CaMKII es el principal, si no el único, mediador de la formación de PTPM inducida por *t*BOOH en condiciones conservadas de integridad celular. Se han reportado efectos directos del *t*BOOH sobre mitocondrias aisladas conducentes a la formación de PTPM (Inberti *et al*, 1993; Kakkar *et al*,

1996; Adonis *et al*, 2003), a pesar que, en tal sistema, la vía citosólica Ca^{2+} -CaM-CaMKII no está presente. Sin embargo, nuestros resultados indican que este fenómeno no sería el predominante en condiciones de contexto celular preservado, al menos a la dosis máxima de *t*BOOH analizada en este estudio. Esto puede deberse a que *t*BOOH, una vez captado del medio extracelular, es metabolizado primordialmente por el CYP-450 del retículo endoplasmático (ver ítem 1.6.2), produciéndose así la liberación de ROS al citosol, con subsiguiente aumento de Ca^{2+} citosólico; esto conduciría a una activación preferencial, si no exclusiva, de la vía citosólica Ca^{2+} -CaM-CaMKII para generar PTPM. Esta situación es diametralmente opuesta a la ocurrida cuando *t*BOOH es metabolizado exclusivamente a nivel mitocondrial, como ocurre cuando es expuesto a mitocondrias aisladas. En este caso, los ROS son generados directamente en la matriz mitocondrial, pudiendo producir efectos pro-oxidantes locales que gatillan la formación de PTPM (ver arriba).

Si bien existen numerosas publicaciones que relacionan el estrés oxidativo y la activación de CaM y de quinasas dependientes de CaM con la inducción de eventos de muerte celular en diferentes sistemas y modelos experimentales (Hajimohammadreza *et al*, 1995; Kuroda *et al*, 1997; Sato *et al*, 1999; Takano *et al*, 2003), sólo recientemente estos fenómenos han sido vinculados con la inducción de PTPM (Lee *et al*, 2005). Específicamente en células hepáticas, existen evidencias acordes con nuestros hallazgos. Por ejemplo, la inhibición farmacológica de CaM induce una disminución de la lipoperoxidación inducida por acetaminofeno (Dimova *et al*, 1995), una prevención parcial de la necrosis inducida por CCl_4 (Villarruel *et al*, 1990) y una atenuación de la apoptosis inducida por D-galactosamina (Ray *et al*, 2001; Tsutsui *et al*, 2003). Nuestros resultados también están en concordancia con el rol apoptótico de CaMKII informado en distintas situaciones, tanto en hepatocitos (Fladmark *et al*, 2002; Mellgren *et al*, 1997) como en otros sistemas celulares (Lee *et al*, 2005; Wright *et al*, 1997), principalmente aquella vinculada con la apoptosis inducida por microcistina en células hepáticas, evento que involucra, entre otros efectos, estrés oxidativo, elevaciones de Ca^{2+} citosólico y formación de PTPM (Ding y Nam, 2003; Krakstad *et al*, 2006). Por lo tanto, nuestra demostración de que CaM modula el estrés oxidativo generado por *t*BOOH en hepatocitos, impidiendo la función mitocondrial a través de la formación de PTPM, fenómeno que involucra CaMKII como molécula efectora, aporta una evidencia mecanística a estos hallazgos previos. Es interesante notar que, en este trabajo de tesis, hemos demostrado la existencia de este mecanismo utilizando, a diferencia de estudios anteriores, un modelo “puro” de estrés oxidativo (administración de *t*BOOH). Esto contribuye significativamente a generalizar el concepto que CaMKII es el principal mediador citosólico a través del cuál las elevaciones de Ca^{2+} intracelular inducidas por estrés oxidativo se encuentran ligadas a la disfunción mitocondrial en hepatocitos.

CaMKII es una serina/treonina quinasa (Hudmon y Schulman, 2002), de modo que es posible que modifique el estado de fosforilación de proteínas mitocondriales pertenecientes o reguladoras

del PTPM que posean residuos serina o treonina. Por ejemplo, se ha observado en cerebro de rata que los cambios en el estado de fosforilación de varias proteínas mitocondriales de bajo peso molecular se encuentran asociados con la apertura de PTPM (Azarashvili *et al*, 2003). Este fenómeno estaría mediado por el receptor de benzodiazepinas que se encuentra asociado con el canal aniónico dependiente de voltaje, VDAC, uno de los constituyentes principales del poro (Azarashvili *et al*, 2005). Notablemente, este efecto es dependiente de Ca^{2+} y prevenido por CMZ, un antagonista de CaM (Azarashvili *et al*, 2003). De los componentes específicos del PTPM que pueden ser blancos potenciales de regulación por fosforilación vía CaMKII, sólo se incluiría a VDAC, el cual es regulado por diferentes serina/treonina quinasas, tales como PKA (Bera y Ghosh, 2001) y PKC ϵ (Baines *et al*, 2003). Sin embargo, estas fosforilaciones parecen inhibir más que favorecer la apertura de PTPM.

Otra posibilidad es que CaMKII sea capaz de fosforilar proteínas extra-mitocondriales con capacidad de controlar el PTPM, tales como los reguladores apoptóticos de la familia Bcl-2, que modulan la liberación de citocromo *c* a través de este mecanismo (Kroemer y Reed, 2000). Sin embargo, entre ellos, sólo las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bad, y la proteína anti-apoptótica, Bcl-2, sufren modificaciones por fosforilación, aunque no en favor de estimular la liberación de este citocromo (Burlacu, 2003; Gardai *et al*, 2004). En efecto, tanto Bax (Gardai *et al*, 2004) como Bad (Burlacu, 2003) no son funcionales luego de la fosforilación, mientras que Bcl-2 es estabilizada luego de esta, haciéndose resistente a la degradación por ubiquitinación y previniendo de esta manera la apoptosis (Burlacu, 2003). Por otro lado, se ha observado que PKC δ , una isoforma de la familia “novel” de PKCs, viaja a la mitocondria en condiciones de estrés oxidativo donde estimula la liberación de citocromo *c* y, consecuentemente, la inducción de apoptosis (Horbinski y Chu, 2005; Majumder *et al*, 2001). Sin embargo, esta quinasa no es dependiente de Ca^{2+} , por lo tanto, parece improbable que se encuentre involucrada en los efectos inducidos por $t\text{BOOH}$, ya que estos fueron completamente prevenidos por el secuestro de Ca^{2+} con BAPTA/AM (Fig. 26). Además, en nuestro modelo experimental, no obtuvimos evidencias de la existencia de una regulación mediada por isoformas de PKC, ya que ni PMA o SP, quienes activan e inhiben, respectivamente, tanto isoformas “clásicas” como “nóveles” de PKC (Gschwendt *et al*, 1996), modificaron la capacidad de $t\text{BOOH}$ para inducir PTPM y generación de ROS (Fig. 27). La posibilidad inversa, esto es que CaMKII active por fosforilación una fosfatasa capaz de activar, por desfosforilación, los componentes generadores de PTPM arriba descritos, también es factible. Sin embargo, no se conoce hasta el momento la existencia de alguna clase de actividad fosfatasa promovida por CaMKII que sea capaz de modular la inducción de PTPM.

Existen ciertas consideraciones que deben tenerse en cuenta al momento de interpretar nuestros resultados, ya que se sustentan, principalmente, en el uso de inhibidores farmacológicos, cuyas acciones pueden no ser específicas, o estar sólo indirectamente relacionadas con el mecanismo de acción propuesto. Por ejemplo, además de inhibir CaM, TFP

(Kobayashi *et al*, 2003) y W7 (Olivero y Ganey, 2001) afectan la actividad de la fosfolipasa A₂, enzima capaz de liberar ácido araquidónico en la mitocondria, un potente inductor de PTPM (Penzo *et al*, 2004; Scorrano *et al*, 2001). Sin embargo, esta enzima mitocondrial no es dependiente de CaM en hepatocitos (De Winter *et al*, 1984). Otra posible complicación del uso de TFP, o de cualquier otro inhibidor de CaM catiónico, como el calmidazolium (CMZ), es su efecto inespecífico sobre la mitocondria. La carga positiva de estas moléculas las hace fácilmente acumulables en esta organela por partición electroforética, debido a la existencia de un $\Delta\psi_m$ negativo. El resultado de esta acumulación es una despolarización eléctrica que puede no sólo interferir con las sondas fluorescentes utilizadas para estimar el $\Delta\psi_m$ (Saris *et al*, 2004), sino impedir procesos dependientes del mismo como por ej., el almacenamiento de Ca²⁺ (Saris *et al*, 2004; Vale *et al*, 1983), o incluso estabilizar a la mitocondria, atenuando la apertura de PTPM y la generación de ROS mitocondrial inducida por estrés oxidativo (Aronis *et al*, 2002). Considerando el rol fundamental que posee el $\Delta\psi_m$ (Aronis *et al*, 2002) y el Ca²⁺ mitocondrial en el establecimiento de PTPM inducido por tBOOH (Byrne *et al*, 1999; Inverti *et al*, 1993; Kowaltowski *et al*, 2001; Vercesi *et al*, 2006), no podemos dejar de considerar la posibilidad de que exista alguna contribución de estos efectos en las propiedades preventivas de los compuestos utilizados. Sin embargo, obtuvimos resultados similares al utilizar, alternativamente, inhibidores no cargados como W7 (para CaM) o KN-62 (para CaMKII), por lo cual, este mecanismo preventivo, de existir, no contribuiría significativamente a explicar nuestros resultados. Finalmente, KN-62 no sólo inhibe CaMKII sino que, además, inhibe CaMKIV (Enslin *et al*, 1994; Tokumitsu *et al*, 1994) y CaMKV (Mochizuki *et al*, 1993) con la misma afinidad; por lo tanto, estas quinasas también podrían estar involucradas en los fenómenos observados. Sin embargo, la expresión en tejido hepático de CaMKIV es indetectable (Krebs, 1998), y la de CaMKV, muy baja (Ito *et al*, 1994).

En conclusión, nuestros resultados demuestran que las elevaciones de Ca²⁺ provocadas por estrés oxidativo, vía la formación del complejo CaM y la activación de CaMKII, intervienen en la regulación de la apertura de PTPM y la subsiguiente exacerbación/preservación del daño lipoperoxidativo. Estos hallazgos sugieren a CaM y CaMKII como blancos de acción promisorios para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas a atenuar el daño oxidativo en hepatocitos.

Finalmente, este trabajo de tesis establece la importancia de los desequilibrios en la señalización intracelular como herramientas para estimular la búsqueda de estrategias terapéuticas complementarias y/o alternativas, diseñadas específicamente, para proteger a los hepatocitos contra el daño oxidativo.

BIBLIOGRAFÍA

*“Si uno no puede comunicar
lo que ha estado haciendo,
su trabajo carecerá de valor”*

*Erwin Schrödinger (1887-1961).
Físico austriaco.*

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar HI, Botla R, Arora AS, Bronk S, Gores GJ. (1996). Induction of the mitochondrial permeability transition by protease activity in rats: a mechanism of hepatocyte necrosis. *Gastroenterology* 110: 558-56.
- Ahmed-Choudhury J, Orsler DJ, Coleman R. (1998). Hepatobiliary effects of tertiary-butyl hydroperoxide (tBOOH) in isolated rat hepatocyte couplets. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 152: 270-278.
- Akerboom TP, Bilzer M, Sies H. (1984). Relation between glutathione redox changes and biliary excretion of taurocholate in perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* 259: 5838-5843.
- Akerboom T, Bultmann T, Sies H. (1988). Inhibition of biliary taurocholate excretion during menadione metabolism in perfused rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 263: 10-18.
- Albano E. (2006). Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proc. Nutr. Soc.* 65: 278-290.
- Allen L-A H, Aderem A. (1995). A role for MARCKS, the α isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages. *J. Exp. Med.* 182: 829-840
- Anderson JM. (1993). Hepatocyte tight junctions in health and disease. *Prog. Liver Dis.* 11: 45-68.
- Anderson JM. (2001). Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol. Sci.* 15: 126-130.
- Andreyev A, Fiskum G. (1999). Calcium induced release of mitochondrial cytochrome Cc by different mechanisms selective for brain versus liver. *Cell Death Differ.* 6: 825-832.
- Angulo P. (2002). Nonalcoholic fatty liver disease. *N. Engl. J. Med.* 346: 1221-1231.
- Aronis A, Komarnitsky R, Shilo S, Tirosh O. (2002). Membrane depolarization of isolated rat liver mitochondria attenuates permeability transition pore opening and oxidant production. *Antioxid. Redox Signal.* 4: 647-54.
- Azarashvili T, Krestinina O, Odinkova I, Evtodienko Y, Reiser G. (2003). Physiological Ca^{2+} level and Ca^{2+} -induced Permeability Transition Pore control protein phosphorylation in rat brain mitochondria. *Cell Calcium* 34: 253-259.
- Azarashvili T, Krestinina O, Yurkov I, Evtodienko Y, Reiser G. (2005). High-affinity peripheral benzodiazepine receptor ligand, PK11195, regulates protein phosphorylation in rat brain mitochondria under control of $Ca(2+)$. *J. Neurochem.* 94 (4): 1054-1062.

- Baines CP, Song CX, Zheng YT, Wang GW, Zhang J, Wang OL, Guo Y, Bolli R, Cardwell EM, Ping P. (2003). Protein kinase Cepsilon interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria. *Circ. Res.* 92: 873-880.
- Balda MS, Garrett MD, Matter K. (2003). The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J. Cell Biol.* 160: 423-432.
- Ballatori N, Truong AT. (1989). Altered hepatic junctional permeability, bile acid excretion and glutathione efflux during oxidant challenge. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 251: 1069-1075.
- Bandyopadhyay U, Das D, Banerjee RK. (1999). Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Curr. Sci.* 77: 658-666.
- Baron V, Muriel P (1999). Role of glutathione, lipid peroxidation and antioxidants on acute bile-duct obstruction in the rat. *Biochim. Biophys. Acta* 1472: 173-180.
- Baur H, Kasperek S, Pfaff E. (1975). Criteria of viability of isolated liver cells. *Hoppe-Seyler's Z Physiol. Chem.* 356: 827-838.
- Bellomo G, Orrenius S. (1985). Altered thiol and calcium homeostasis in oxidative hepatocellular injury. *Hepatology* 5: 876-882.
- Bellomo G, Jewell SA, Thor H, Orrenius S. (1982). Regulation of intracellular calcium compartmentation studies with isolated hepatocytes and *tert*-butylhydroperoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (22): 6842-6846.
- Belzacq AS, Vieira LA, Verrier F, Vandecasteele G, Cohen I, Brenner C, Kroemer G. (2003). Bcl-2 and Bax modulate adenine nucleotide translocase activity. *Cancer Research* 63: 541-546.
- Ben Sauhl V, Sofer Y, Bergman M, Zurovsky Y, Grossman S. (1999). Lipopolysaccharide-induced oxidative stress in the liver: comparison between rat and rabbit. *Shock* 12: 288-293.
- Bera AK, Ghosh S. (2001). Dual mode of gating of voltage-dependent anion channel as revealed by phosphorylation. *J. Struct. Biol.* 135: 67-72.
- Berlett BS, Stadtman ER. (1997). Protein oxidation in ageing, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272: 20313-20316.
- Bernardi P, Broekemeier KM, Pfeiffer DR. (1994). Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J. Bioenerg. Biomemb.* 26: 509-517.
- Bernardi P. (1992). Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient: Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. *J. Biol. Chem.* 267: 8834-8839.

- Bernardi P. (1996). The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. *Biochim. Biophys. Acta* 1275: 5-9.
- Bernardi P, Vassanelli S, Veronese P, Colonna R, Szabo I, Zoratti M. (1992). Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *J. Biol. Chem.* 267: 2934-2939.
- Berry MN, Friend DS. (1969). High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: A biochemical and fine structural study. *J. Cell Biol.* 43: 506-520.
- Bodo A, Bakos E, Szeri F, Varadi A, Sarkadi B. (2003). The role of multidrug transporters in drug availability, metabolism and toxicity. *Toxicol. Lett.* 140/141: 133-143.
- Borgognone M, Pérez LM, Basiglio CL, Ochoa JE, Roma MG. (2005). Signaling modulation of bile salt-induced necrosis in isolated rat hepatocytes. *Toxicol. Sci.* 83: 114-125.
- Boveris A. (1977). Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv. Exp. Med. Biol.* 78: 67-82.
- Boyer JL. (1983). Tight junctions in normal and cholestatic liver: does the paracellular pathway have functional significance?. *Hepatology* 3: 614-617.
- Brockemeier KM, Schmid PC, Schmid HHO, Pfeiffer DR. (1985). Effects of phospholipase A₂ inhibitors on ruthenium red-induced Ca²⁺ release from mitochondria. *J. Biol. Chem.* 260: 105-113.
- Buc-Calderon P, Latour I, Roberfroid M. (1991). Biochemical changes in isolated hepatocytes exposed to *tert*-butyl hydroperoxide. Implications for its cytotoxicity. *Cell Biol. Toxicol.* 7 (2): 129-43.
- Buege JA, Aust SD. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods. Enzymol.* 52: 302-310.
- Burlacu A. (2003). Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J. Cell Mol. Med.* 7: 249-257.
- Byrne AM, Lemasters JJ, Nieminen AL. (1999). Contribution of increased mitochondrial free Ca²⁺ to the mitochondrial permeability transition induced by *tert*-butylhydroperoxide in rat hepatocytes. *Hepatology* 29 (5):1523-1531.
- Cafilisch C, Zimmerli B, Reichen J, Meier PJ. (1990). Cholate uptake in basolateral rat liver plasma membrane vesicles and in liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1021: 70-76.
- Carreras FI, Gradilone SA, Mazzone A, Garcia F, Huang BQ, Ochoa JE, Tietz PS, LaRusso NF, Calamita G, Marinelli RA. (2003). Rat hepatocyte aquaporin-8 water channels are down-regulated in extrahepatic colestasis. *Hepatology* 37: 1026-1033.

- Casellas P, Galiegue S, Basile AS. (2002). Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondria function. *Neurochem. Int.* 40: 475-486.
- Castedo M, Perfettini JL, Kroemer G. (2002). Mitochondrial apoptosis and the peripheral benzodiazepine receptor. A novel target for viral and pharmacological manipulation. *J. Exp. Med.* 196: 1121-1126.
- Cesaratto L, Vascotto C, Calligaris S, Tell G (2004). The importance of redox state in liver damage. *Ann. Hepatol.* 3: 86-92.
- Chai YC, Hendrich S, Thomas JA. (1994). Protein S-thiolation in hepatocytes stimulated by *t*-butylhydroperoxide, menadione and neutrophils. *Arch. Biochem. Biophys.* 310: 264-272.
- Chambers TC, Pohl J, Raynor RL, Kuo JF. (1993). Identification of specific sites in human P-glycoprotein phosphorylated by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 268: 4592-4595.
- Chandra D, Liu JW, Tang DG. (2002). Early mitochondrial activation and cytochrome c upregulation during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277: 50842-50854.
- Chen SU, Liu XF. (1992). Suggested mechanism for the modulation of the activity of NAD(P)H-quinone acceptor oxidoreductase (DT-diaphorase) by menadione: Interpretation of the effect of menadione on 5'-[P-(fluorosulfonyl) benzoyl] adenosine labeling of rat liver NAD(P)H-quinone acceptor oxidoreductase. *Mol. Pharmacol.* 42 (3): 545-548.
- Chernyak BV, Bernardi P. (1996). The mitochondrial permeability transition pore is modulated by oxidative agents through both pyridine nucleotides and glutathione at two separate sites. *Eur. J. Biochem* 238: 623-630.
- Chitturi S, George J. (2003). Interaction of iron, insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterol. Rep.* 5: 18-25.
- Colbran, R.J. (2004). Targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem. J.* 378:1-16.
- Comporti M. (1985). Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab. Invest.* 53: 599-623.
- Crocenzi FA, Mottino AD, Cao J, Veggi LM, Pozzi EJ, Vore M, Coleman R, Roma MG. (2003 a). Estradiol-17beta-D-glucuronide induces endocytic internalization of Bsep in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285 (2): G449-G459.
- Crocenzi FA, Mottino AD, Sanchez Pozzi EJ, Pellegrino JM, Rodriguez Garay EA, Milkiewicz P, Vore M, Coleman R, Roma MG. (2003 b). Impaired localisation and transport function of canalicular Bsep in taurolithocholate induced cholestasis in the rat. *Gut* 52 (8):1170-1177.

- Crocenzi FA, Mottino AD, Roma MG. (2004). Regulation of synthesis and trafficking of canalicular transporters and its alteration in acquired hepatocellular cholestasis: Experimental therapeutic strategies for its prevention. *Curr. Med. Chem.* 11: 501-524.
- Crompton M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* 341: 233-249.
- Crompton M, Barksby E, Johnson N, Capano M. (2002). Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death. *Biochimie* 84: 143-152.
- Crompton M, Virji S, Ward JM. (1998). Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur. J. Biochem.* 258: 729-735.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Milzani A, Di Simplicio P, Colombo R. (2001). The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. *Free Rad. Biol. Med.* 31 (12): 1624-1632.
- Dalton T, Shertzer HG, Puga A. (1999). Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 67-101.
- Davies MJ. (1989). Detection of peroxy and alkoxy radicals produced by reaction of hydroperoxides with rat liver Microsomal fractions. *Biochem. J.* 257: 603-606.
- Deroubaix X, Coche T, Depiereux E, Feytmans E. (1989). Compartmental modeling of the hepatic transport of taurocholate in the rat in vivo. *Am. J. Physiol.* 257 (2 Pt 1): G210-G220.
- De Winter JM, Korpancova J, van den Bosch H. (1984). Regulatory aspects of rat liver mitochondrial phospholipase A2: effects of calcium ions and calmodulin. *Arch. Biochem. Biophys.* 234: 243-252.
- Dickinson DA, Forman HJ. (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 64: 1019-1026.
- Dimova S, Koleva M, Rangelova D, Stoythchev T. (1995). Effect of nifedipine, verapamil, diltiazem and trifluoperazine on acetaminophen toxicity in mice. *Arch. Toxicol.* 70: 112-118.
- Ding WX, Nam OC. (2003). Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 220: 1-7.
- Ehrenberg B, Montana V, Wei M-D, Wuskell JP. (1988) Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes. *Biophys. J.* 53: 785-794.
- Elias E, Hruban Z, Wade JB, Boyer JL (1980). Phalloidin-induced cholestasis: a microfilament-mediated change in junctional complex permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2229-2233.

- Enslin H, Sun P, Brickey D, Soderling SH, Klamo E, Soderling TR. (1994). Characterization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV. Role in transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 269 (22): 15520-15527.
- Epanand RF, Martinou JC, Montessuit S, Epanand RM. (2003). Transbilayer lipid diffusion promoted by Bax: implications for apoptosis. *Biochemistry* 42: 14576-82.
- Eskes R, Antonsson B, Osen-Sand A, Montessuit S, Richter C, Sadoul R, Mazzei G, Nichols A, Martinou J. (1998). Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions. *J. Cell. Biol.* 143: 217-224.
- Fanning AS, Mitic LL, Anderson JM. (1999). Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 1337-1345.
- Farshori P, Kachar B. (1999). Redistribution and phosphorylation of occluding during opening and resealing of tight junctions in cultured epithelial cells. *J. Membr. Biol.* 170: 147-156.
- Feldmann G, Haouzi D, Moreau A, Durand-Schneider AM, Bringuier A, Berson A, Mansouri A, Fau D, Pessayre D. (2000). Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes matrix expansion and outer membrane rupture in Fas-mediated hepatic apoptosis in mice. *Hepatology* 31(3): 674-683.
- Finkel T, Holbrook NJ. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-247.
- Finkel T. (1998). Oxygen radicals and signaling. *Current Opinion in Cell Biology* 10: 248-253.
- Fladmark KE, Brustugun OT, Mellgren G, Krakstad C, Boe R, Vintermyr OK, Schulman H, Doskeland SO. (2002). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is required for microcystin-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277: 2804-2811.
- Frei B, Winterhalter KH, Richter C. (1986). Menadione- (2-methyl-1,4-naphthoquinone-) dependent enzymatic redox cycling and calcium release by mitochondria. *Biochemistry* 25: 4438-4443.
- Friguet B. (2006). Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress. *FEBS Lett.* 580: 2910-2916.
- Gamaley IA, Kluybin IV. (1999). Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. *Int. Review Cytology.* 188: 203-255.
- Gao G, Dou QP. (2000). N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death. *J. Cell Biochem.* 80: 53-72.

- Garcia-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Fernandez-Checa JC. (1997). Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J. Biol. Chem.* 272 (17): 11369-77.
- Garcia-Ruiz C, Colell A, Paris R, Fernandez-Checa JC. (2000). Direct interaction of GD3 ganglioside with mitochondria generates reactive oxygen species followed by mitochondrial permeability transition, cytochrome c release, and caspase activation. *FASEB J.* 14: 847-858.
- Gardai SJ, Hildeman DA, Frankel SK, Whitlock BB, Frasch SC, Borregaard N, Murrack P, Bratton DL, Henson PM. (2004). Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. *J. Biol. Chem.* 279: 21085-21095.
- Gallagher AR, Cedzich A, Gretz N, Somlo S, Witzgall R. (2000). The polycystic kidney disease protein PKD2 interacts with Hax-1, a protein associated with the actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (8): 4017-4022.
- Grijalba MT, Vercesi AE, Schreier S. (1999). Ca²⁺-induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca²⁺-stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain. *Biochemistry* 38: 13279-13287.
- González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. (2003). Tight junction proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 81: 1-44.
- Gores GJ, Herman B, Lemasters JJ. (1990). Plasma membrane bleb formation and rupture: a common feature of hepatocellular injury. *Hepatology* 11: 690-698.
- Gores GJ, Miyoshi H, Botla R, Aguilar HI, Bronk SF. (1998). Induction of the mitochondrial permeability transition as a mechanism of liver injury during cholestasis: a potential role for mitochondrial proteases. *Biochim. Biophys. Acta* 1366: 167-175.
- Green DR, Evan GI. (2002). A matter of life and death. *Cancer Cell* 1: 19-30.
- Griffith OW. (1980). Determination of Glutathione and Glutathione disulfide using glutathione reductase and 2 vinylpyridine. *Analytical Biochemistry* 106: 207-212.
- Griffiths JC, Sies H, Meier PJ, Akerboom TPM. (1987). Inhibition of taurocholate efflux from rat hepatic canalicular membrane vesicles by glutathione disulfide. *FEBS Lett.* 213: 34-38.
- Grisham MB, Gaginella TS, Von Ritter C, Tamai H, Be RM, Granger DN. (1990). Effects of neutrophil-derived oxidants on intestinal permeability, electrolyte transport and epithelial cell viability. *Inflammation* 14 (5): 531-542.

- Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RI. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440-3450.
- Gschwendt M, Dieterich S, Rennecke J, Kittstein W, Mueller HJ, Johannes FJ. (1996). Inhibition of protein kinase C mu by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes. *FEBS Lett.* 392: 77-80.
- Gunter TE, Pfeiffer DR. (1990). Mechanism by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol.* 258: C755-C786.
- Gutteridge J, Halliwell B. (1999). Antioxidant protection and oxygen radical signaling. En: Reactive oxygen species in biological systems: an interdisciplinary approach. D.L. Gilbert and C.A. Colton (eds.) Kluwer Academic Press. Plenum Publishers, New York. pp: 189-218.
- Hagenbuch B, Jacquemin E, Meier PJ. (1994). Na⁺-dependent and Na⁺-independent bile acid uptake system in the liver. *Cell. Physiol. Biochem.* 4: 198-205.
- Haidara K, Morel I, Abaléa V, Barré MG, Denizeau F. (2002). Mechanism of *tert*-butylhydroperoxide induced apoptosis in rat hepatocytes: involvement of mitochondria and endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* 1542: 173-185.
- Hajimohammadreza I, Probert AW, Coughenour LL, Borosky SA, Marcoux FW, Boxer PA, Wang KK. (1995). A specific inhibitor of calcium/calmodulin-dependent protein kinase-II provides neuroprotection against NMDA- and hypoxia/hypoglycemia-induced cell death. *J. Neurosci.* 15: 4093-4101.
- Hajnóczky G, Csordás G, Madesh M, Pacher P. (2000). Control of apoptosis by IP₃ and ryanodine receptor driven calcium signals. *Cell calcium* 28: 349-363.
- Halestrap AP, Davidson AM. (1990). Inhibition of Ca²⁺-induced large amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with adenine nucleotide translocase. *Biochem. J.* 268: 153-60.
- Halestrap AP, Doran E, Gillespie JP, O'Toole A. (2000). Mitochondria and cell death. *Biochem. Soc. Trans.* 28:170-177.
- Halliwell B, Gutteridge J. (1998). Free radicals in biology and medicine. 3rd Ed. Oxford Science Publications. Oxford. pp: 936.
- Halliwell B, Chirico S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am.J. Clin. Nutr.* 57(Suppl.): 715s-725s.

- Halliwell B, Clement MV, Long LH. (2000). Hydrogen peroxide in human body. *FEBS Lett.* 486: 10-13.
- Hannan AW, Maxwell MJ. (1995). An evaluation of the role of calcium in cell injury. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35: 129-144.
- Harhaj NS, Felinski EA, Wolpert EB, Sundstrom JM, Gardner TW, Antonetti DA. (2006). VEGF activation of protein kinase C stimulates occludin phosphorylation and contributes to endothelial permeability. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47 (11): 5106-5115.
- Harper JF, Cheung WY, Wallace RW, Huang HL, Levine SN, Steiner AL. (1980). Localization of calmodulin in rat tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 366-370.
- Hatase O, Doi A, Itano T, Matsui H, Ohmura Y. (1985). A direct evidence of the localization of mitochondrial calmodulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 132: 63-66.
- Hemenway CS, Heitman J. (1999). Calcineurin. Structure, function, and inhibition. *Cell Biochem. Biophys.* 30: 115-151.
- Horbinski C, Chu CT. (2005). Kinase signaling cascades in the mitochondrion: a matter of life or death. *Free Radic. Biol. Med.* 38: 2-11.
- Houslay MD. (1991). `Crosstalk': a pivotal role for protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways. *Eur. J. Biochem.* 195: 9-27.
- Huang YT, Hsu YC, Chen CJ, Liu CT, Wei YH (2003). Oxidative-stress-related changes in the livers of bile-duct-ligated rats. *J. Biomed. Sci.* 10: 170-178.
- Hudmon A, Schulman H. (2002). Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem. J.* 364: 593-611.
- Hunter DR, Haworth JH, Southard JH. (1976). Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J. Biol. Chem.* 251: 5069-5077.
- Huot J, Houle F, Spitz D, Landry J. (1996). HSP27 Phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res.* 56: 273-279.
- Imberti R, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ. (1993). Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butylhydroperoxide: protection by fructose, cyclosporin A and trifluoperazine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265: 392-400.
- Itano T, Matsui H, Doi A, Ohmura Y, Hatase O. (1986). Identification of calmodulin-binding proteins in pure mitochondria by photoaffinity labeling. *Biochem. Int.* 13: 787-792.

- Ito T, Mochizuki H, Kato M, Nimura Y, Hanai T, Usuda N, Hidaka H. (1994). Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase V: tissue distribution and immunohistochemical localization in rat brain. *Arch. Biochem. Biophys.* 312 (1): 278-284.
- Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. (2002). Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* 65 (2): 166-176.
- Jaeschke H. (2005). Role of inflammation in the mechanism of acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Expert. Opin. Drug. Metab. Toxicol.* 1 (3):389-397.
- James OFW, Day CP. (1998). Non-alcoholic steatohepatitis (NASH): a disease of emerging identity and importance. *J. Hepatol.* 29: 495-501.
- Jewell SA, Bellomo G, Thor H, Orrenius S, Smith MT. (1982). Bleb formation in hepatocytes during drug metabolism is caused by disturbance in thiol and calcium ion homeostasis. *Science* 217: 1257-1259.
- Jewell SA, Di Monte D, Richelmi P, Bellomo G, Orrenius S. (1986). *tert*-Butylhydroperoxide-induced toxicity in isolated hepatocytes: contribution of thiol oxidation and lipid peroxidation. *J. Biochem. Toxicol.* 1: 13–22.
- Jones BA, Rao YP, Stravitz RT, Gores GJ. (1997). Bile salt-induced apoptosis of hepatocytes involves activation of protein kinase C. *Am. J. Physiol.* 272: G1109-G1115.
- Kakkar P, Mehrotra S, Viswanathan PN. (1996). tBHP induced *in vitro* swelling of rat liver mitochondria. *Mol. Cell. Biochem.* 154: 39-45.
- Kamata H, Hirata H. (1999). Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* 11: 1-14.
- Kan KS, Coleman R. (1990). Menadione increases hepatic tight-junctional permeability: its effect can be decreased by butylated hydroxytoluene and verapamil. *Biochem. J.* 270: 241-243.
- Kanno T, Sato EE, Muranaka S, Fujita H, Fujiwara T, Utsumi T, Inoue M, Utsumi K. (2004). Oxidative stress underlies the mechanism for Ca^{2+} -induced permeability transition of mitochondria. *Free Radic. Res.* 38: 27-35.
- Kasai S, Kakisaka A, Kudo K, Mito M. (1996). Protective effects of dibutyryl cyclic AMP on acute hepatic failure in rats. *J. Surg. Res.* 66: 75-80.
- Kass GE, Duddy SK, Orrenius S. (1989). Activation of hepatocyte protein kinase C by redox-cycling quinones. *Biochem. J.* 260: 499-507.
- Kawahara H, Marceau N, French SW. (1989). Effect of agents which rearrange the cytoskeleton *in vitro* on the structure and function of hepatocytic canaliculi. *Lab. Invest.* 60: 692-704.
- Keenan C, Kelleher D. (1998). Protein kinase C and the cytoskeleton. *Cell Signal.* 10: 225-232.

- Kehrer JP. (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit. Rev. Toxicol.* 23: 21-48.
- Kennedy CH, Church DF, Winston GW, Pryor WA. (1992). tert-Butyl hydroperoxide-induced radical production in rat liver mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 12: 381-387.
- Kim JS, He L, Lemasters JJ. (2003). Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 304: 463-70.
- Kipp H, Pichetshote N, Arias IM. (2001). Transporters on demand: intrahepatic pools of canalicular ATP binding cassette transporters in rat liver. *J. Biol. Chem.* 276: 7218-7224.
- Kishimoto S, Sakon M, Umeshita K, Miyoshi H, Taniguchi K, Meng W, Nagano H, Dono K, Ariyosi H, Nakamori S, *et al.* (2000). The inhibitory effect of prostaglandin E1 on oxidative-stress induced hepatocyte injury evaluated by calpain-mu activation. *Transplantation* 69: 2314-2319.
- Knutton SK, Baldwin T, Williams PH, McNeish SA. (1989). Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: Basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 57: 1290-1298.
- Kobayashi T, Kuroda S, Tada M, Houkin K, Iwasaki Y, Abe H. (2003). Calcium-induced mitochondrial swelling and cytochrome c release in the brain: its biochemical characteristics and implication in ischemic neuronal injury. *Brain Res.* 960: 62-70.
- Kon K, Kim JS, Jaeschke H, Lemasters JJ. (2004). Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes. *Hepatology* 40 (5):1170-1179.
- Konig J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D. (1999). Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta* 1461: 377-394.
- Kouzuki H, Suzuki H, Ito K, Ohashi R, Sugiyama Y. (1998). Contribution of sodium taurocholate co-transporting polypeptide to the uptake of its possible substrates into rat hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286: 1043-1050.
- Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. (2001). Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett.* 495: 12-15.
- Krakstad C, Herfindal L, Gjertsen BT, Boe R, Vintermyr OK, Fladmark KE, Doskeland SO. (2006). CaM-kinase II-dependent commitment to microcystin-induced apoptosis is coupled to cell budding, but not to shrinkage or chromatin hypercondensation. *Cell Death Differ.* 13 (7): 1191-1202.

- Krebs J. (1998). Calmodulin-dependent protein kinase IV: regulation of function and expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1448 (2): 183-189.
- Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60: 619-642.
- Kroemer G, Reed JC. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nature Medicine* 6(5): 513-519.
- Kruman I, Guo Q, Mattson MP. (1998). Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* 51: 293-308.
- Kubitz R, Huth C, Schmitt M, Horbach A, Kullak-Ublick G, Haussinger D. (2001). Protein kinase C-dependent distribution of the multidrug resistance protein 2 from the canalicular to the basolateral membrane in human HepG2 cells. *Hepatology* 34: 340-350.
- Kubitz R, Saha N, Kuhlkamp T, Dutta S, Vom DS, Wettstein M, Haussinger D. (2004). Ca²⁺-dependent protein kinase C-isoforms induce cholestasis in rat liver. *J. Biol. Chem.* 279: 10323-10330.
- Kullak-Ublick GA, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ. (2000). Hepatic transport of bile salts. *Semin. Liver Dis.* 20 (3): 273-292.
- Kuroda S, Nakai A, Kristian T, Siesjo BK. (1997). The calmodulin antagonist trifluoperazine in transient focal brain ischemia in rats. Anti-ischemic effect and therapeutic window. *Stroke* 28: 2539-2544.
- Kurose I, Higuchi H, Miura S, Saito H, Watanabe N, Hokari R, Hirokawa M, Takaishi M, Zeki S, Nakamura T, Ebinuma H, Kato S, Ishii H. (1997). Oxidative stress-mediated apoptosis of hepatocytes exposed to acute ethanol intoxication. *Hepatology* 25: 368-378.
- Latour I, Demoulin JB, Buc-Calderon P. (1995). Oxidative DNA damage by *t*-butylhydroperoxide causes DNA single strand break which is not linked to cell lysis. A mechanistic study in freshly isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 373: 299-302.
- Leclercq IA. (2004). Antioxidant defense mechanisms: new players in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis?. *Clin. Sci. (Lond.)* 106: 235-237.
- Lee CS, Park SY, Ko HH, Song JH, Shin YK, Han ES. (2005). Inhibition of MPP⁺-induced mitochondrial damage and cell death by trifluoperazine and W-7 in PC12 cells. *Neurochem. Int.* 46: 169-178.

- Lemasters JJ, Nieminen A-L. (1997). Mitochondrial oxygen radical formation during reductive and oxidative stress to intact hepatocytes. *Bioscience Reports* 17 (3): 281-291.
- Lemasters JJ, Qian T, Bradham CA, Brenner DA, Cascio WE, Trost LC, Nishimura Y, Nieminen AL, Herman B. (1999). Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *J. Bioenerg. Biomembr.* 31 (4): 305-319.
- Lenaz G. (1998). Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochimica et Biophysica Acta* 1366: 53-67.
- Lengyel JFG, Blázovics A. (1998). Oxidative stress in the liver and biliary tract diseases. *Scand J. Gastroenterol.* 33 (Suppl. 228): 38-46.
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. (1994). Carbonyl assays for the determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 233: 346-357.
- Liebmann C. (2001). Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signaling pathway: Paradigms of multiplicity. *Cell Signal.* 13: 777-785.
- Lin DT, Lechleiter JD. (2002). Mitochondrial targeted cyclophilin D protects cells from cell death by peptidyl prolyl isomerization. *J. Biol. Chem.* 277: 31134-31141.
- Long LH, Halliwell B. (2000). Coffee drinking increases levels of urinary hydrogen peroxide detected in healthy human volunteers. *Free Radic. Res.* 32 (5): 463-7.
- Lotscher HR, Winterhalter KH, Carafoli E, Richter D. (1979). Hydroperoxides can modulate the redox state of pyridine nucleotides and the calcium balance in rat liver mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4340-4344.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lutter M, Fang M, Luo X, Nishijima M, Luo X, Nishijima M, Xie XS, Wang X. (2000). Cardiolipin provides specificity for targeting tBid to mitochondria. *Nat. Cell Biol.* 2: 754-756.
- Lyman GE, DeVincenzo JP. (1967). Determination of picogram amounts of ATP using the luciferin-luciferase enzyme system. *Anal. Biochem.* 21: 435-443.
- Lyn Patrick, ND. (2002). Nonalcoholic fatty liver disease: relationship to insulin sensitivity and oxidative stress. Treatment approaches using vitamin E, magnesium, and betaine. *Alternative Medicine Review* 7(4): 276-291.
- Madesh M, Hajnóczky G. (2001). VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release. *J. Cell Biol.* 155 (6): 1003-1015.

- Majumder PK, Mishra NC, Sun X, Bharti A, Kharbanda S, Saxena S, Kufe D. (2001). Targeting of protein kinase C delta to mitochondria in the oxidative stress response. *Cell Growth Differ.* 12: 465-470.
- Marano CW, Garulacan LA, Ginanni N, Mullin JM. (2001). Phorbol ester treatment increases paracellular permeability across IEC-18 gastrointestinal epithelium in vitro. *Dig. Dis. Sci.* 46 (7): 1490-1499.
- Matouschek A, Rospert S, Schmid K, Glick BS, Schatz G. (1995). Cyclophilin catalyses protein folding in yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6319-6323.
- Meier PJ, Eckhardt U, Schroeder A, Hagenbuch B, Stieger B. (1997). Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver. *Hepatology* 26: 1667-1677.
- Mellgren G, Bruland T, Doskeland AP, Flatmark T, Vintermyr OK, Doskeland SO. (1997). Synergistic antiproliferative actions of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, interleukin-1beta, and activators of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in primary hepatocytes. *Endocrinology* 138 (10): 4373-4383.
- Milkiewicz P, Mills CO, Roma MG, Ahmed-Chaudhury J, Elias E, Coleman R. (1999). Tauroursodeoxycholate and S-adenosyl-L-methionine exert an additive ameliorating effect on tauroolithocholate-induced cholestasis: a study in isolated rat hepatocyte couplets. *Hepatology* 29 (2): 471-476.
- Mills CO, Milkiewicz P, Saraswat V, Elias E. (1997). Cholyllysyl fluorescein and related lysyl fluorescein conjugated bile acid analogues. *Yale J. Biol. Med.* 70: 447-457.
- Mills CO, Milkiewicz P, Muller M, Roma MG, Havinga R, Coleman R, Kuipers F, Jansen PL, Elias E. (1999). Different pathways of canalicular secretion of sulfated and non-sulfated fluorescent bile acids: a study in isolated hepatocyte couplets and TR- rats. *J. Hepatol.* 31: 678-684.
- Miyoshi H, Umeshita K, Sakon M, Imajoh-Ohmi S, Fujitani K, Gotoh M, Oiki E, Kambayashi J-I, Monden M. (1996). Calpain activation in plasma membrane bleb formation during *tert*-butyl hydroperoxide-induced rat hepatocyte injury. *Gastroenterology* 110: 1987-1904.
- Mochizuki H, Ito T, Hidaka H. (1993). Purification and characterization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase V from rat cerebrum. *J. Biol. Chem.* 268 (12): 9143-9147.
- Moncada S, Erusalimsky JD. (2002). Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis?. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 214-220.

- Morrissey PA, O'Brien NM. (1998). Dietary antioxidants in health and disease. *Int. Dairy. J.* 8: 463-472.
- Müller M, Jansen PL. (1997). Molecular aspects of hepatobiliary transport. *Am. J. Physiol.* 272: G1285-G1303.
- Müller M, Jansen PL. (1998). The secretory function of the liver: new aspects of hepatobiliary transport. *J. Hepatol.* 28: 344-354.
- Murphy RC, Schneider E, Kinnally KW. (2001). Overexpression of Bcl-2 suppresses the calcium activation of a mitochondrial megachannel. *FEBS Lett.* 497: 73-76.
- Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H, Tsujimoto Y. (1998). Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome C release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14681-14686.
- Nathanson MH, Gautam A, Ng OC, Bruck R, Boyer JL. (1992). Hormonal regulation of paracellular permeability in isolated rat hepatocyte couplets. *Am. J. Physiol.* 262: G1079-G1086.
- Newton AC. (2001). Protein kinase C: structural and spatial regulation by, phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem. Rev.* 101: 2353-2364.
- Nicotera P, Bellomo G, Orrenius S. (1992). Calcium-mediated mechanism in chemically induced cell death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 449-470.
- Nicotera P, Hartzell P, Davis G, Orrenius S. (1986). The formation of plasma membrane blebs in hepatocytes exposed to agents that increase cytosolic Ca^{2+} is mediated by the activation of a nonlysosomal proteolytic system. *FEBS Lett.* 209: 139-144.
- Nieminen AL, Byrne AM, Herman B, Lemasters JJ. (1997). Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH: NAD(P)H and reactive oxygen species. *Am. J. Physiol.* 272: C1286-C1294.
- Nieminen A-L, Saylor AK, Tesfai SA, Herman B, Lemasters JJ. (1995). Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide. *Biochem. J.* 307: 99-106.
- Nishizuka Y. (1986). Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233: 305-312.
- Nunbhakdi-Craig V, Machleidt T, Ogris E, Bellotto D, White CL 3rd, Sontag E. (2002). Protein phosphatase 2A associates with and regulates atypical PKC and the epithelial tight junction complex. *J. Cell Biol.* 158 (5):967-978.

- O'Donnell V, Burkitt MJ. (1994). Mitochondrial metabolism of a hydroperoxide to free radicals in human endothelial cells: an electron spin resonance spin-trapping investigation. *Biochem. J.* 304: 707-713.
- Olivero J, Ganey PE. (2001). Participation of Ca²⁺/calmodulin during activation of rat neutrophils by polychlorinated biphenyls. *Biochem. Pharmacol.* 62: 1125-1132.
- Orrenius S, McCabe MJ, Nicotera P. (1992). Ca²⁺-dependent mechanism of cytotoxicity and programmed cell death. *Toxicol. Lett.* 64-65: 357-364.
- Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G, Nicotera P. (1989). Role of Ca²⁺ in toxic cell killing. *Trends Pharmacol. Sci.* 10: 281-285.
- Ortiz DF, Moseley J, Calderon G, Swift AL, Li S, Arias IM. (2004). Identification of HAX-1 as a protein that binds bile salt export protein and regulates its abundance in the apical-membrane of Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 279: 32761-32770.
- Park JH, Okayama N, Gute D, Krsmanovic A, Battarbee H, Alexander JS. (1999). Hypoxia/aglycemia increases endothelial permeability: role of second messengers and cytoskeleton. *Am. J. Physiol.* 277 (Cell Physiol. 46): C1066–C1074.
- Pascoe GA, Reed DJ. (1989). Cell calcium, vitamin E, and the thiol redox system in cytotoxicity. *Free Radic. Biol. Med.* 6 (2): 209-224.
- Patel T, Gores GJ. (1997). Inhibition of bile-salt-induced hepatocytes apoptosis by the antioxidant lazaroid U83836E. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142: 116-122.
- Penzo D, Petronilli V, Angelin A, Cusan C, Colonna R, Scorrano L, Pagano F, Prato M, Di Lisa F, Bernardi P. (2004). Arachidonic acid released by phospholipase A(2) activation triggers Ca(2+)-dependent apoptosis through the mitochondrial pathway. *J. Biol. Chem.* 279 (24): 25219-25225.
- Petit PX, Goubern M, Diolez P, Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. (1998). Disruption of the outer mitochondrial membrane as a result of large amplitude swelling: the impact of irreversible permeability transition. *FEBS Lett.* 426: 111-116.
- Petrosillo G, Ruggiero FM, Paradies G. (2003). Role of oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria. *FASEB J.* 17: 2202-2208.
- Phillips MJ, Oshio C, Miyairi M, Watanabe S, Smith CR. (1983). What is actin doing in the liver cell?. *Hepatology* 3: 433-436.
- Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarotto E. (2004). Oxidative stress and cell signalling. *Curr. Med. Chem.* 11: 1163-1182.

- Poli G. (1993). Liver damage due to free radicals. *Brit. Med. Bull.* 49: 604-620.
- Powell DW. (1981). Barrier function of epithelia. *Am. J. Physiol.* 241: G275-G288.
- Pronzato MA, Domenicotti C, Rosso E, Bellocchio A, Patrone M, Marinari UM, Melloni E, Poli G. (1993). Modulation of rat liver protein kinase C during "in vivo" CCl₄-induced oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194: 635-641.
- Rao RK, Baker RD, Baker SS, Gupta A, Holycross M. (1997). Oxidant-induced disruption of intestinal epithelial barrier function: role of protein tyrosine phosphorylation. *Am. J. Physiol.* 273: G812-G823.
- Ray SD, Balasubramanian G, Bagchi D, Reddy CS. (2001). Ca²⁺-calmodulin antagonist chlorpromazine and poly(ADP-ribose) polymerase modulators 4-aminobenzamide and nicotinamide influence hepatic expression of bcl-XL and p53 and protect against acetaminophen-induced programmed and unprogrammed cell death in mice. *Free Radic. Biol. Med.* 31 (3): 277-291
- Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. (1997). Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm. Metabol. Res.* 29 (8): 363-72.
- Reinehr R, Haussinger D. (2004). Inhibition of bile salt-induced apoptosis by cyclic AMP involves serine/threonine phosphorylation of CD95. *Gastroenterology* 126 (1): 249-262.
- Ricchelli F, Gobbo S, Moreno G, Salet C. (1999). Changes of the fluidity of mitochondrial membranes induced by the permeability transition. *Biochemistry* 38: 9295-9300.
- Richter C, Schweizer M, Cossarizza A, Franceschi C. (1996). Control of apoptosis by the cellular level. *FEBS Lett.* 378: 107-110.
- Rippo MR, Malisan F, Ravagnan L, Tomassini B, Condo I, Constantini P, Susin SA, Testi R. (2000). GD3 ganglioside directly targets mitochondria in a bcl-2-controlled fashion. *FASEB J.* 14: 2047-2054.
- Roma MG, Ahmed-Choudhury J, Coleman R. (1999). The protein kinase inhibitor 1-(5-isoquinolinylsulfonyl)-2-methyl-piperazine (H-7) prevents and reverses Ca²⁺-mediated injury in isolated rat hepatocyte couplets. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 161: 192-201.
- Roma MG, Milkiewicz P, Elias E, Coleman R. (2000). Control by signaling modulators of the sorting of canalicular transporters in rat hepatocytes couplets: role of the cytoskeleton. *Hepatology* 32: 1342-1356.

- Roma MG, Orsler D, Coleman R. (1997). Canalicular retention as a marker of tight junctional permeability in isolated hepatocyte couplets: Effects of protein kinase modulation and cholestatic agents. *Fund. Appl. Toxicol.* 37 (1): 71-81.
- Roma MG, Stone V, Shaw R, Coleman R. (1998). Vasopressin-induced disruption of actin cytoskeleton organization and canalicular function in isolated rat hepatocyte couplets: Possible involvement of protein kinase C. *Hepatology* 28:1031-1041.
- Roman ID, Fernandez-Moreno MD, Fueyo JA, Roma MG, Coleman R. (2003). Cyclosporin A induced internalization of the bile salt export pump in isolated rat hepatocyte couplets. *Toxicol. Sci.* 71 (2): 276-281.
- Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, Jareño EJ, Romero B, Marin N, Roma J. (1998). Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ. Hlth. Perspect.* 106 (5): 1229-1234.
- Rost D, Kartenbeck J, Keppler D. (1999). Changes in the localization of the rat canalicular conjugate export pump Mrp2 in phalloidin-induced cholestasis. *Hepatology* 29: 814-821.
- Rusnak F, Mertz P. (2000). Calcineurin: form and function. *Physiol Rev.* 80: 1483-1521.
- Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Tsukita S. (1997). Possible involvement of phosphorylation of occluding in tight junction formation. *J. Cell Biol.* 137 (6): 1393-1401.
- Sanyal AJ. (2005). Mechanisms of disease: pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 2: 46-53.
- Saris NE, Teplova VV, Odinkova IV, Azarashvily TS. (2004). Interference of calmidazolium with measurement of mitochondrial membrane potential using the tetraphenylphosphonium electrode or the fluorescent probe rhodamine 123. *Anal. Biochem.* 328: 109-112.
- Sasaki M, Miyazaki K, Koga Y, Kimura G, Nomoto K, Yoshida H. (2002). Calcineurin-dependent mitochondrial disturbances in calcium-induced apoptosis of human immunodeficiency virus gp160-expressing CD4+ cells. *J. Virol.* 76: 416-420.
- Sato T, Morishima Y, Sugimura M, Uchida T, Shirasaki Y. (1999). DY-9760e, a novel calmodulin antagonist, reduces brain damage induced by transient focal cerebral ischemia. *Eur. J. Pharmacol.* 370: 117-123.
- Saunders MJ, Soll H. (1989). Cell preparation by elutriation: major and minor cell types from complex tissues. *Methods Enzymol.* 171: 482-497.
- Scaduto RC, Jr., Grotyohann LW. (1999). Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys. J.* 76:469-477.

- Schmitt M, Kubitz R, Lizun S, Wettstein M, Haussinger D. (2001). Regulation of the dynamic localization of the rat Bsep gene-encoded bile salt export pump by anisoosmolarity. *Hepatology* 33: 509-518.
- Schmitt M, Kubitz R, Wettstein M, von Dahl S, Haussinger D. (2000). Retrieval of mrp2 gene encoded conjugate export pump from the canalicular membrane contributes to cholestasis induced by tert-butyl hydroperoxide and chloro-dinitrobenzene. *Biol. Chem.* 381: 487-495.
- Scorrano L, Penzo D, Petronilli V, Pagano F, Bernardi P. (2001). Arachidonic acid causes cell death through the mitochondrial permeability transition. Implications for tumor necrosis factor- α apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.* 276: 12035-12040.
- Scorrano L, Petronilli V, Di Lisa F, Bernardi P. (1999). Commitment to apoptosis by GD3 ganglioside depends on opening of the mitochondrial permeability transition pore. *J. Biol. Chem.* 274: 22581-22585.
- Sekine S, Ito K, Horie T. (2006). Oxidative stress and Mrp2 internalization. *Free Radic. Biol. Med.* 40 (12): 2166-2174.
- Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399: 483-487.
- Small JV, Rother K, Kaverina I. (1999). Functional design in the cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11: 54-60.
- Sokol RJ, Devereaux M, Khandwala R, O'Brien K. (1993). Evidence for involvement of oxygen free radicals in bile acid toxicity to isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 17: 869-881.
- Song JY, Van Marle J, Van Noorden CJ, Frederiks WM. (1996 a). Disturbed structural interactions between microfilaments and tight junctions in rat hepatocytes during extrahepatic cholestasis induced by common bile duct ligation. *Histochem. Cell. Biol.* 106: 573-578.
- Song JY, Van Marle J, Van Noorden CJ, Frederiks WM. (1996 b). Redistribution of Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity in relation to alterations of the cytoskeleton and tight junctions in hepatocytes of cholestatic rat liver. *Eur. J. Cell Biol.* 71: 277-285, 1996
- Spector A. (1991). The lens and oxidative stress. En: Oxidative stress: oxidants and antioxidants. H. Sies (ed.). Academic Press Limited. pp: 529-557.
- Sperber I. (1959). Secretion of organic anions in the formation of urine and bile. *Pharmacol. Rev.* 11: 109-134.
- Stadtman ER, Berlett BS. (1991). Fenton Chemistry. Amino acid oxidation. *J. Biol. Chem.* 266 (26): 17201-17211.

- Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo BJ, Browne SE, Patel MS, Beal MF. (2004). Mitochondrial alphaketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J. Neurosci.* 24: 7779-7788.
- Stocker R, Frei B. (1991). Endogenous antioxidant defenses in human blood plasma. En: Oxidative stress: oxidants and antioxidants. H. Sies (ed.). Academic Press Limited. pp: 213-243.
- Stone V, Coleman R, Chipman JK. (1996). Comparison of effects of redox cycling and arylating quinones on hepatobiliary function and glutathione homeostasis in rat hepatocyte couplets. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 138: 195-200.
- Stone V, Johnson GD, Wilton JC, Coleman R, Chipman JK. (1994). Effect of oxidative stress and disruption of Ca²⁺ homeostasis on hepatocytes canalicular function in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 47: 625-632.
- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* 277: 44784-44790.
- Stuart RO, Nigam SK. (1995). Regulated assembly of tight junctions by protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6072-6076.
- Swann JD, Smith MW, Phelps PC, Maki A, Berezsky IK, Trump BF. (1991). Oxidative injury induces influx-dependent changes in intracellular calcium homeostasis. *Toxicol. Pathol.* 19: 128-137.
- Szalai G, Krischnamurthy R, Hajnoczky G. (1999). Apoptosis driven by IP-3-linked mitochondrial calcium signals. *EMBO J.* 18: 6349-6361.
- Takano H, Fukushi H, Morishima Y, Shirasaki Y. (2003). Calmodulin and calmodulin-dependent kinase II mediate neuronal cell death induced by depolarization. *Brain Res.* 962: 41-47.
- Takeyama N, Matsuo N, Tanaka T. (1993). Oxidative damage to mitochondria is mediated by the Ca²⁺-dependent inner-membrane permeability transition. *Biochem. J.* 294: 719-725.
- Taylor CG, Nagy LE, Bray TM. (1996). Nutritional and hormonal regulation of glutathione homeostasis. *Current Topics in Cellular Regulation.* 34: 189-208.
- Teebor GW, Boorstein RJ, Cadet J. (1988). The reparability of oxidative free radical mediated damage to DNA: a review. *Int. J. Radiat. Biol.* 54(2): 131-150.
- Thannickal V, Fanburg B. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 279: L1005-L1028.

- Thibault N, Claude JR, Ballet F. (1992). Actin filament alteration as a potential marker for cholestasis: a study in isolated rat hepatocyte couplets. *Toxicology* 73: 269-279.
- Thor H, Smith MT, Hartzell P, Bellomo G, Jewell SA, Orrenius S. (1982). The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphtoquinone) by isolated hepatocytes. A study of the implication of oxidative stress in intact cell. *J Biol. Chem.* 257: 12419-12425.
- Tietze F. (1969). Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry* 27: 502-522.
- Tokumitsu H, Brickey DA, Glod J, Hidaka H, Sikela J, Soderling TR. (1994). Activation mechanisms for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV. Identification of a brain CaM-kinase IV kinase. *J. Biol. Chem.* 269 (46): 28640-28647.
- .Toyota H, Yanase N, Yoshimoto T, Moriyama M, Sudo T, Mizuguchi J. (2003). Calpain-induced Bax-cleavage product is a more potent inducer of apoptotic cell death than wild-type Bax. *Cancer Lett.* 189 (2): 221-230.
- Trauner M, Boyer JL. (2003). Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol. Rev.* 83: 633-671.
- Tsutsui S, Itagaki S, Kawamura S, Harada K, Karaki H, Doi K, Yoshikawa Y. (2003). D-galactosamine induced hepatocyte apoptosis is inhibited in vivo and in cell culture by a calcium calmodulin antagonist, chlorpromazine, and a calcium channel blocker, verapamil. *Exp. Anim.* 52 (1): 43-52.
- Turrens JF. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552: 335-344.
- Vale MG, Moreno AJ, Carvalho AP. (1983). Effects of calmodulin antagonists on the active Ca²⁺ uptake by rat liver mitochondria. *Biochem. J.* 214: 929-935.
- Vercesi AE, Kowaltowski AJ, Oliveira HC, Castilho RF. (2006). Mitochondrial Ca²⁺ transport, permeability transition and oxidative stress in cell death: implications in cardiotoxicity, neurodegeneration and dyslipidemias. *Front Biosci.* 11: 2554-2564.
- Villarruel MC, Fernandez G, de Ferreyra EC, de Fenos OM Castro JA. (1990). Modulation of the course of CCl₄-induced liver injury by the anti-calmodulin drug thioridazine. *Toxicol. Lett.* 51: 13-21.
- von Ruecker AA, Han-Jeon BG, Wild M, Bidlingmaier. (1989). Protein kinase C involvement in lipid peroxidation and cell membrane damage induced by oxygen-based radicals in hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163: 836-842.

- Wang HG, Pathan N, Ethel IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF, Reed JC. (1999). Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of Bad. *Science* 284: 339-343.
- Watanabe S, Smith CR, Phillips MJ. (1985). Coordination of the contractile activity of bile canaliculi. Evidence from calcium microinjection of triplet hepatocytes. *Lab. Invest.* 53: 275-279.
- Webster CR, Anwer MS. (1998). Cyclic adenosine monophosphate-mediated protection against bile acid-induced apoptosis in culture rat hepatocytes. *Hepatology* 27: 1324-1331.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten V, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thomson CB, Korsmeyer SJ. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292: 727-730.
- Weltman MD, Farrel GC, Hall P, Ingelman-Sundberg M, Liddle C. (1998). Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 27: 128 -133.
- Wen Y, Anwer K, Singh SP, Sanborn BM. (1992). Protein kinase-A inhibits phospholipase-C activity and alters protein phosphorylation in rat myometrial plasma membranes. *Endocrinology* 131: 1377-1382.
- Wilton JC, Coleman R, Lankester DJ, Chipman JK. (1993). Stability and optimization of canalicular function in hepatocyte couplets. *Cell Biochem. Funct.* 11:179-185.
- Wilton JC, Matthews GN, Burgoyne RD, Mills CO, Chipman JK, Coleman R. (1994). Fluorescent choleric and cholestatic bile salts take different paths across the hepatocyte: transcytosis of glycolithocholate leads to an extensive redistribution of annexin II. *J. Cell Biol.* 127: 401-410.
- Wilton JC, Williams DE, Strain AJ, Parslow RA, Chipman JK, Coleman R. (1991). Purification of hepatocyte couplets by centrifugal elutriation. *Hepatology* 14: 180-183.
- Wood DE, Newcomb EW. (2000). Cleavage of Bax enhances its cell death function. *Exp. Cell Res.* 256 (2): 375-382.
- Wright SC, Schellenberger U, Ji L, Wang H, Larrick JW. (1997). Calmodulin-dependent protein kinase II mediates signal transduction in apoptosis. *FASEB J.* 11: 843-849.
- Wu H, Parsons JT. (1993). Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60src substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex. *J. Cell Biol.* 120: 1417-1426.
- Yoshimasa T, Sibley DR, Bouvier M, Lefkowitz RJ, Caron MG. (1987). Cross-talk between cellular signaling pathways suggested by phorbol-ester-induced adenylate cyclase phosphorylation. *Nature* 327: 67-70.

Yu BP. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74:139-162.

Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. (2006). Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (5-6): 509-517.