

Tesis Doctoral

Neurotoxicidad inducida por manganeso. Vías de muerte apoptóticas y rol de la dinámica mitocondrial

Alaimo, Agustina

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Alaimo, Agustina. (2012). Neurotoxicidad inducida por manganeso. Vías de muerte apoptóticas y rol de la dinámica mitocondrial. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Alaimo, Agustina. "Neurotoxicidad inducida por manganeso. Vías de muerte apoptóticas y rol de la dinámica mitocondrial". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**Neurotoxicidad inducida por manganeso.
Vías de muerte apoptóticas
y rol de la dinámica mitocondrial.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica.

Lic. Agustina Alaimo

Director de Tesis: Dra. Mónica Lidia Kotler

Consejero de Estudios: Dra. Elba Susana Vazquez

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Apoptosis en el Sistema Nervioso y
Nano-Oncología

Departamento de Química Biológica

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, 2012

Resumen

Neurotoxicidad inducida por manganeso. Vías de muerte apoptóticas y rol de la dinámica mitocondrial.

El Manganismo es un desorden neurológico originado por exposición crónica al manganeso (Mn) que presenta características clínicas y vías de señales similares a las de la enfermedad de Parkinson Idiopático (EPI). El Mn se acumula preferentemente en los ganglios basales y en particular, en las mitocondrias de los astrocitos. Estas organelas son dinámicas y de morfología variable como resultado del balance entre eventos de fusión y fisión mitocondrial, el cual está alterado en varias enfermedades neurodegenerativas.

En el presente trabajo, se estudiaron las cascadas de señalización molecular implicadas en la muerte celular inducida por Mn, con particular énfasis en el rol de la dinámica mitocondrial.

Los estudios *in vitro* realizados en la línea C6 de astrocitoma de rata indicaron que el Mn indujo muerte celular apoptótica dependiente de caspasas con participación de las Vías Extrínseca e Intrínseca, la cual estuvo mediada por la generación de especies reactivas de oxígeno. Aún más, el Mn promovió la fragmentación exacerbada de las redes mitocondriales y disturbios en los niveles de expresión de las proteínas de fusión y fisión Opa-1 y Drp-1, generando un desequilibrio hacia éste último evento, lo cual contribuyó a la muerte celular.

Por otra parte, estudios *in vivo* realizados en ratas expuestas a Mn indicaron la presencia de lesiones en el tejido estriatal y de alteraciones en los niveles de expresión de las proteínas reguladoras de la dinámica mitocondrial.

En conjunto, nuestros resultados contribuyen al esclarecimiento de los mecanismos moleculares participantes en la apoptosis inducida por Mn y demuestran por primera vez que las proteínas Opa-1 y Drp-1 juegan roles protagónicos en la ejecución de la vía apoptótica mitocondrial.

Palabras claves: Apoptosis, Dinámica Mitocondrial, Astrocitos, Manganeso, Parkinsonismo.

Abstract

Manganese-induced neurotoxicity. Apoptotic death pathways and mitochondrial dynamics role.

Manganism is a neurological disorder caused by chronic exposure to Mn, closely resembling Idiopathic Parkinson's Disease (IPD) at both clinical characteristics and molecular signaling pathways. Mn accumulates predominantly in the basal ganglia, particularly in the mitochondria of astrocytes. These are dynamic organelles which morphology is variable as a result of a delicate equilibrium between mitochondrial fission and fusion events. This balance is known to be altered in neurodegenerative diseases. In this research, we studied the molecular signaling pathways involved in Mn-induced cell death, with special focus on the role of mitochondrial fusion and fission proteins.

In vitro studies conducted in rat astrocytoma C6 cells demonstrated that Mn induced cell death by caspase-dependent apoptosis mediated by ROS. A detailed analysis of signaling pathways showed the involvement of the Extrinsic and Intrinsic pathways. Moreover, Mn induced exacerbated mitochondrial network fragmentation and disturbances in the expression levels of fusion and fission proteins, Opa-1 and Drp-1, shifting the balance towards to the fragmentation event and contributing to cell death.

Furthermore, *in vivo* studies conducted in rats exposed to Mn showed that Mn produce lesions in the striatal tissue and alterations in mitochondrial dynamics regulatory proteins. Taking together, these findings contribute to a deeper elucidation of the molecular signaling mechanisms underlying Mn-induced apoptosis and demonstrate for the first time that Opa-1 and Drp-1 are central protagonists in the execution of mitochondrial apoptotic pathway.

Key words: Apoptosis, Mitochondrial Dynamics, Astrocytes, Manganese, Parkinsonism.

Agradecimientos

En la realización de la presente tesis, he recibido apoyo por parte de dos organismos estatales a los cuales debo mi agradecimiento: al CONICET, por otorgarme el soporte financiero necesario durante los cinco años del doctorado y la FCEN/UBA, por brindarme una educación de excelencia y gratuita.

En lo que respecta a las personas, en primer lugar quiero agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Mónica Kotler, por el apoyo, la confianza y el estímulo que me ha brindado desde el primer momento para la realización de esta tesis doctoral. Además, quiero destacar que la dedicación que ha tenido conmigo ha ido mucho más allá de la labor propia de un director de tesis debido a los grandes consejos y abrazos que me ha dado en buenos y malos momentos por los que he pasado durante todos estos años. Gracias Moni, te quiero mucho.

En segundo lugar, quiero dedicar los siguientes párrafos a la Lic. Roxana Gorojod, que me ha acompañado durante todos estos años en el laboratorio, me divertí muchísimo con su compañía, me ha brindado ayuda incondicional, apoyo moral, ha soportado todos mis estados de humor y mis elucubraciones científicas y por sobre todo, gracias por ser mi amiga personal. Te adoro Roxy.

Agradezco la amplia colaboración y apoyo tanto científico como moral al resto de las personas que son y fueron parte del laboratorio: Lic. Delfina Romero, Lic. Natalia Garabano, Lic. Carla Sapienza, Lic. Laura Gonzalez, Paula Couto y Esteban Miglietta. Aprovecho para incorporar en este grupo a Leonardo Barilari ya que de alguna manera es parte del laboratorio y me ha ayudado con el diseño de posters y esquemas de la tesis. A todos ellos: muchas gracias!

Un apartado especial merece el Dr. Dante Paz, quien me ha enseñado, guiado y aconsejado en cada oportunidad que lo consulté, desde que yo era una estudiante de la licenciatura. Dante: quiero decirte que sos un guía importantísimo en mi vida académica y sobre todo un ejemplo de bondad.

Quiero mencionar a la Dra. Elba Vazquez, al Dr. Juan Carlos Calvo y al Dr. Eduardo Cánepa, quienes merecen mi agradecimiento, por su humildad y la amplia colaboración que han brindado, ya sea en materia de investigación pero también, por justas palabras en momentos de necesidad.

A la Dra. Flavia Saravia y al Dr. Juan Beauquis quiero agradecerles muy afectuosamente por la gran ayuda y conocimientos que me han brindado con los experimentos *in vivo*. Lo mejor de todo es que conocí a dos personas excelentes más allá de la parte laboral. Gracias a ambos!

A las Dras. Adali Pecci y Sandra Ruzal por su trabajo a diario en el Departamento de Química Biológica, para que cada día estemos todos los integrantes estemos más cómodos y con mayores posibilidades en nuestro trabajo.

Además, quiero agradecerles el otorgamiento de becas de viáticos para solventar gastos de congresos nacionales.

Quiero agradecer al grupo de la Dra. Elizabeth Jares, entre los que se incluyen al Dr. Federico Coloccio Lescow, el Dr. Federico Fuertes, la Lic. Jimena Martinez y a Francisco Guaimas ya que me han ayudado ampliamente en lo referente a microcopia de fluorescencia, es un grupo humano excelente, siempre han tenido muy buena predisposición conmigo.

Gracias a todos los becarios e investigadores del Departamento de Química Biológica que en muchos momentos han estado dispuestos a responderme a cualquier pregunta y a aconsejarme, además de las charlas de pasillo que han generado un ambiente cálido y familiar.

Quiero dar las gracias a la Dra. Mónica Costas por haberme brindado el anticuerpo anti-Bid en dos oportunidades. Además, le agradezco los comentarios realizados en las sesiones de posters de las SAIC ya que me han sido muy útiles para abordar mis experimentos.

Quiero agradecer a los siguientes investigadores por haberme cedido reactivos que me han sido muy útiles en mi tesis: Dr. Norberto Zwirner, Dr. Pablo Mele, Dra. Maria del Carmen Ríos, Dr. Martín Monte, Dr. Diego Laderach, Dr. Daniel Compagno y Dr. Alvaro Estevez.

Agradezco a la Dra. Nora Ceballos por permitirme la permanencia de varias horas en su laboratorio sacando fotos en su microscopio óptico y por hacerme sentir cómoda en cada oportunidad.

Quiero mencionar muy especialmente a mis amigos y compañeros de la facultad y de la vida, con los que he compartido muchos momentos personales a lo largo de muchos años: Eleonora Regueira, Stella Garcia, Carolina Tropea, Verónica Barbieri, Julián Corbelli, Facundo Labarque, Luis Ignacio Pérez, Matías Goldin, entre otros.

A lo largo de todos estos años y durante toda la vida, mi familia fue un pilar fundamental para mí. Me siento muy contenida y acompañada por ellos. Quiero agradecer a mis hermanos, Emiliano y Federico por demostrarme siempre que mi felicidad es la felicidad de ellos también, por bancarme y escucharme.

Quiero agradecer a mi mamá. Gracias por hacerme saber que siempre estás dispuesta a sostenerme, a contenerme, a escucharme, a acompañarme y a educarme.

Trabajos Publicados

Los contenidos de este trabajo de Tesis Doctoral forman parte de las siguientes publicaciones y han sido presentados en congresos nacionales e internacionales:

Publicación científica.

- **Alaimo A.**, Gorojod R.M, Kotler M.L. (2011). **The Extrinsic and Intrinsic Apoptotic Pathways are Involved in Manganese Toxicity in Rat Astrocytoma C6 cells.** *Neurochemistry International*. 59: 297- 308.

Publicación científica en preparación.

- **Alaimo A.**; Gorojod R. M.; Beauquis J.; Saravia F.; Morelli M.; Kotler M.L. (2011). **Impaired Mitochondrial Dynamics in a Manganism's Disease Model.**

Participación en congresos nacionales e internacionales.

- X Taller Argentino de Neurociencias. 11, 12 y 13 de Abril del 2008; Huerta Grande, Provincia de Córdoba, Argentina. **Implicancia de la vía extrínseca en la apoptosis inducida por manganeso en células C6 de glioma.** Póster.
Alaimo A.; Sapienza C.; Kotler M.
- *II Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC) (VI Reunión SETAC en Argentina): Avances en Toxicología y Química Ambiental.* 26 al 28 de Noviembre de 2008, Mar del Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina. **Marcadores de Neurotoxicidad. Activación de la vía extrínseca en la apoptosis inducida por manganeso en células C6 de glioma.** Póster.
Alaimo A.; Sapienza C.; Gorojod, R.; LLauger, G.; Kotler M.
- *I Reunión conjunta Taller Argentino de Neurociencias-Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias.* 2 al 6 de Septiembre de 2009. Huerta Grande, Provincia de Córdoba, Argentina. **Relevance of OPA-1 in the manganese induced mitochondrial apoptotic pathway.** Póster.
Alaimo A.; Gorojod R.M.; Sapienza C.E.; Kotler M.L.
- *LVI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica y la LVII Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Inmunología.* 18 al 21 de Noviembre de 2009, Mar del Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina. **Mecanismos moleculares implicados en la vía de transducción de señales inducida por manganeso en células gliales.** Póster
Publicación en *Revista Medicina (Buenos Aires)*, 2009. Vol.69. SUPL. I. pág. 242. ISSN 0025-7680.
Alaimo A.; Gorojod R.; Sapienza C.; Kotler M.

- *Society for Risk Analysis 2009 Annual Meeting*. 6 al 9 de Diciembre de 2009; Baltimore, Maryland, Estados Unidos. **Glial cells as makers of manganese-induced neurotoxicity**. Póster.
Alaimo A.; Gorojod R.; Sapienza C.; Kotler M.

- *II Reunión conjunta Taller Argentino de Neurociencias-Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias*. 8 al 10 de Octubre de 2010; Huerta Grande, Provincia de Córdoba, Argentina. **OPA1 cleavage mediates impaired mitochondrial dynamics in an experimental model of Parkinsonism**. Póster.
Alaimo A.; Gorojod R.; Sapienza C.; Kotler M.

- *40th Annual Meeting- Society for Neuroscience*. 13 al 17 de Noviembre de 2010; San Diego, Estados Unidos. **Involvement of mitochondrial fission events in an experimental model of Manganism's disease**. Póster.
Alaimo A.; Gorojod R.; Kotler M.

- *LV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología y XLII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental*. 17 al 20 de Noviembre de 2010, Mar del Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina. **Alteración de la dinámica mitocondrial en un modelo de Parkinsonismo inducido por manganeso**. Oral.
Publicación en Revista Medicina (Buenos Aires), 2009. Vol.70. SUPL.II pág. 163. ISSN 0025-7628.
Alaimo A.; Gorojod R.; Sapienz C.; Kotler M.

- *8th IBRO World Congress of Neuroscience*. 14 al 18 de Julio de 2011. Florencia, Italia. **OPA1 cleavage mediates impaired mitochondrial dynamics in an experimental model of Parkinsonism**. Póster.
Alaimo A.; Gorojod R.; Sapienza C.; Kotler M.

- *XXVI Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias*. 20 al 22 de Octubre de 2011; Huerta Grande, Provincia de Córdoba, Argentina. **Impaired mitochondrial dynamics and cell death in manganese-induced Parkinsonism**. Póster.
Alaimo A., Gorojod R.M, Simola N., Beauquis J., Saravia F., Morelli M., Kotler M.

- *8th FENS Forum of Neuroscience*. 14 al 18 de Julio de 2012; Barcelona, España. **Impaired mitochondrial dynamics and cell death in manganese-induced Parkinsonism**. Póster.
Alaimo A., Gorojod R.M, Simola N., Beauquis J., Saravia F., Morelli M., Kotler M.L.

Índice

ABREVIATURAS	17
INTRODUCCIÓN	22
1. Muerte Celular	23
1.1. Apoptosis	24
1.1.1. Origen del término y características generales	24
1.1.2. Caspasas: clasificación y funciones	26
1.1.3. Proteínas de la familia Bcl-2: clasificación y funciones	30
1.1.4. Vías de señales	34
2. Dinámica Mitocondrial	42
2.1. Mitocondrias: aspectos generales	42
2.2. Fisión y fisión mitocondrial	44
2.3. Dinámica mitocondrial y Apoptosis	53
2.4. Dinámica mitocondrial y Neurodegeneración	56
3. Neurotoxicidad	59
3.1. Generalidades del sistema nervioso	59
3.2. Manganeseo	62
3.3. Manganismo	65
4. Glía	69
4.1. Características generales y clasificación	70
4.2. Astrocitos y metales	75
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	77
1. Hipótesis de estudio	78
2. Objetivos	79
2.1. Objetivo general	79
2.2. Objetivos específicos	79
MATERIALES Y MÉTODOS	81
1. Materiales	82
1.1. Reactivos generales	82
1.2. Reactivos para cultivos celulares eucariotas	82
1.3. Anticuerpos	83
1.4. Línea celular eucariota	84
1.5. Plásmidos	84
2. Métodos	85
2.1. Estudios <i>in vitro</i>	85
2.1.1. Cultivo de células eucariotas	85
2.1.2. Preservación criogénica	85
2.2. Medición de la viabilidad celular	85
2.2.1. Actividad mitocondrial como indicador de viabilidad celular	86
2.2.2. Integridad lisosomal como indicador de viabilidad celular	86
2.3. Análisis de la morfología celular por microscopía de contraste de fase	86
2.4. Determinación de especies reactivas de oxígeno	87
2.5. Ensayo de actividad de caspasas 3/7	87
2.6. Análisis de la morfología nuclear	88
2.7. Análisis del potencial de membrana y morfología mitocondrial	89
2.8. Inmunocitoquímica	90
2.9. Fraccionamiento subcelular	90
2.10. Determinación de la concentración de proteínas	92
2.11. Western blot	93
2.11.1. Extracción de proteínas	93
2.11.2. Preparación de muestras para electroforesis	94
2.11.3. Transferencia	95
2.11.4. Inmunodetección	95
2.11.5. Stripping de la membrana	96
2.12. Preparación y transfección de vectores de expresión	96
2.12.1. Preparación de bacterias competentes	96

2.12.2. Transformación de bacterias competentes	97
2.12.3. Extracción de ADN plasmídico: método de lisis alcalina	97
2.12.4. Determinación de la concentración de ADN plasmídico purificado	98
2.12.5. Determinación de la integridad y pureza del ADN plasmídico aislado por separación en gel de agarosa	99
2.12.6. Transfecciones de células mamíferas: método fosfato de calcio	99
2.13. Estudios <i>in vivo</i>	100
2.13.1. Animales	100
2.13.2. Cirugía estereotáxica intra-estriado	101
2.13.3. Perfusión de animales	102
2.13.4. Corte y preservación de cortes cerebrales	102
2.13.5. Tinción de Nissl	103
2.13.6. Tinción con Hoechst 33258	103
2.13.7. Inmunohistoquímica	104
2.14. Análisis estadístico	105
RESULTADOS	106
Estudios <i>in vitro</i>	107
1. Efecto citotóxico del Mn en células C6 de astrocitoma de rata	108
1.1. Ensayos de viabilidad celular	108
1.2. Análisis de la morfología celular	108
2. Generación de especies reactivas de oxígeno	110
3. El Mn induce muerte celular apoptótica	114
3.1. Análisis de la morfología nuclear	114
3.2. El Mn induce apoptosis dependiente de caspasas	116
4. Vías de Señalización implicadas en la apoptosis inducida por Mn	118
4.1. Vía Extrínseca o de Receptores de Muerte	118
4.1.1. Fas y Fas-L	118
4.1.2. La vía Fas/Fas-L es indispensable para la apoptosis inducida por Mn	119
4.1.3. Activación de la caspasa 8	121
4.2. Vía Intrínseca o Mitocondrial	123
4.2.1. Clivaje de Bid	123
4.2.2. El Mn induce la activación de la caspasa 8 en la mitocondria	124
4.2.3. Activación de la caspasa 9	126
4.2.4. Rol del mPTP	127
4.2.5. Liberación del citocromo c	129
4.2.6. Rol de los miembros de la familia Bcl-2	131
4.2.7. Participación de p53	132
5. Citotoxicidad del Mn y dinámica mitocondrial	135
5.1. El Mn induce disipación del potencial de membrana y fragmentación de las redes mitocondriales	136
5.2. Proteínas reguladoras de la fusión y fisión mitocondrial	140
5.2.1. Opa-1	141
5.2.1.1. El Mn induce clivaje y liberación al citoplasma de Opa-1	141
5.2.1.2. Rol del mPTP y de las ROS en el procesamiento de Opa-1	143
5.2.1.3. La activación de la caspasa 8 interviene en el clivaje de Opa-1	145
5.2.1.4. Rol de Opa-1 en la apoptosis inducida por Mn.	146
5.2.3. Drp-1	151
5.2.3.1. El Mn induce un aumento en la expresión de Drp-1 y su translocación a la mitocondria	151
5.2.3.2. Rol de Drp-1 en la apoptosis inducida por Mn	155
5.2.3.3. CsA previene la translocación de Drp-1 inducida por Mn	159
Estudios <i>in vivo</i>	161
6. Estudios <i>in vivo</i>	162
6.1. El Mn induce daño en el estriado	162
6.2. El Mn induce alteración de los niveles de expresión de Opa-1 y Drp-1	163

DISCUSIÓN	167
1. El Mn induce muerte celular activando las vías apoptóticas extrínseca e intrínseca	168
2. Efectos del Mn sobre la dinámica mitocondrial	178
3. Estudios <i>in vivo</i>	190
CONCLUSIONES	192
BIBLIOGRAFÍA	197

Abreviaturas

$\Delta\phi_m$	Potencial de membrana mitocondrial.
Ac-DEVD-pNA	N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp paranitroanilida
Ac-DEVD-CMK	acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-CMK
Z-IETD-FMK	Z-Ile-Glu(OMe)-Thr-Asp(OMe)-FMK
Ac-LEHD-CMK	Ac-Leu-Glu-His- Asp-CMK
ADN	Ácido desoxi-ribonucleico
AIF	Apoptosis-inducing factor (Factor inductor de apoptosis)
ANT	Adenine nucleotide translocator (Traslador de nucleótidos de adenina)
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1 (Factor apoptótico-1 activador de proteasa)
APC	<i>Adenomatous polyposis coli protein</i>
ARC	Activity-regulated cytoskeleton-associated protein
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASA	Ácido acetil salicílico
ATP	Adenosina trifosfato
Bcl	B-cell lymphoma (Linfoma de células B)
BH	Bcl-2 homology domain (Dominio de homología Bcl-2)
BNIP3	Bcl-2/adenovirus E1B-interacting protein (Proteína de interacción Bcl-2/adenovirus E1B)
CAD	Caspase-activated DNase (ADNasa activada por caspasa)
Caf4	CCR4-associated factor 4 (Factor 4 asociado a CCR4)
CaMKI	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (calmodulina kinasa dependiente de calcio)
CARD	Caspase-recruitment domain (dominio de reclutamiento de caspasas)
CsA	Ciclosporina A
DD	Death domain (Dominio de muerte)
DED	Death effector domain (Dominio efector de muerte)
DISC	Death-inducing signaling complex (Complejo de señalización inductor de muerte)
DMT-1	Divalent metal transporter-1 (transportador de metales divalentes -1)
Drp-1	Dynamitin related protein-1 (Proteína relacionada a

	dinaminas-1)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis (2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetracético
EIM	Espacio intermembrana mitocondrial
ELA	Esclerosis Lateral Amiotrófica
EO	Estrés oxidativo
EP	Enfermedad de Parkinson
EPI	Enfermedad de Parkinson Idiopática
FADD	Fas-associated protein with death domain (Proteína asociada a Fas con dominio de muerte)
Fis-1	Fission related protein -1 (Proteína relacionada a fisión -1)
FLIP	FLICE-inhibitory protein (Proteína inhibidora de FLICE)
GDAP1	Ganglioside-induced differentiation activated protein 1 (Proteína 1 activada en la diferenciación por gangliósidos).
GFAP	Glial fibrillary acidic protein (Proteína glial fibrilar acídica)
GSH	Glutathione (Glutation)
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etansulfónico
HRP	Horseradish peroxidase (Peroxidasa de rábano)
IAPs	Inhibitor of apoptosis proteins (Proteínas inhibidoras de apoptosis)
LETM1	Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1
Mdivi-1	Mitochondrial division inhibitor-1 (Inhibidor de la división mitocondrial-1)
Mff	Mitochondrial fission factor (Factor de fisión mitocondrial)
Mfn1/2	Mitofusina 1/2
MiB	Mitofusin-binding protein (Proteína de unión a mitofusinas)
Mito-PLD	Mitochondrial-associated phospholipase D (Fosfolipasa D asociada a mitocondria).
MM	Matriz mitocondrial
MME	Membrana mitocondrial externa
Mn	Manganeso
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization (Permeabilización de la membrana externa mitocondrial).

mPTP	Mitochondrial permeability transition pore (Poro de permeabilidad transitoria mitocondrial)
MTP18	Mitochondrial protein 18 kDa (Proteína mitocondrial 18kDa)
Omi/HtrA2	High temperature requirement protein A2 (proteína A2 requeridora de alta temperatura).
ON	Over night (Durante la noche)
Opa-1	Optic atrophy protein-1 (Proteína de atrofia óptica-1)
PARL	Presenilins-associated rhomboid-like protein (Proteína tipo romboide asociada a presinilinas)
PARP	Poli (ADP-ribose) polymerase (Polimerasa de poli ADP-ribose)
PBS	Phosphate buffer saline (Buffer fosfato salino)
PKA	Protein kinase A (Proteína kinasa A)
PLD	Phospholipase D (Fosfolipasa D)
PLP	Proteolipid protein 1 (Proteína proteolipídica 1)
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo)
PUMA	p53-upregulated modulator of apoptosis (Modulador de apoptosis con regulación transcripcional positiva para p53)
ROS	Reactive oxygen species (Especies reactivas de oxígeno)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Dodecil sulfato de sódio)
Smac/DIABLO	Second mitochondrial activator of caspases/Direct IAP-binding protein with low pl (Segundo activador mitocondrial de caspasas/proteína de unión directa a IAP con bajo pl)
SNC	Sistema nervioso central
TA	Temperatura ambiente
TBS	Tris buffer saline (Buffer Tris salino)
TBST	Tris buffer saline Tween-20 (Buffer Tris salino Tween-20)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyl-ethane-1,2-diamine (N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina)
TfR	Transferrin receptor (Receptor de transferrina)
TNF	Tumor necrosis factor (Factor de necrosis tumoral)
TNFR	TNF receptor (Receptor de TNF)
TRADD	TNF receptor-associated death domain protein (Proteína con dominio de muerte asociada al receptor de TNF)

TRAIL	TNF- α -related apoptosis-inducing ligand (Ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF- α)
TWEAK	TNF-like weak inducer of apoptosis (Inductor débil de apoptosis tipo-TNF)
VDAC	Voltage-dependent anion channel (canal aniónico dependiente de voltaje).

Introducción

1. Muerte Celular

Las primeras descripciones de muerte celular programada datan de la década de 1960 (Klion y Schaffner, 1966) y desde entonces se han realizado importantes contribuciones tendientes a definir las diferentes categorías encontradas. Los primeros estudios en el área se enfocaron exclusivamente en aspectos morfológicos debido a la inexistencia hasta ese momento, de pruebas bioquímicas adecuadas. No obstante, las clasificaciones morfológicas han dominado este campo de investigación aún luego de la incorporación de ensayos bioquímicos en la rutina del laboratorio. En este contexto, es relevante considerar que morfotipos de muerte celular aparentemente similares exhiben una gran heterogeneidad en los eventos bioquímicos. Hoy en día, se ha profundizado el estudio de las vías moleculares que ejecutan y regulan la muerte celular, sin embargo, la comunidad científica no ha adoptado una clasificación sistemática acerca de las diferentes modalidades existentes. Por esta razón, se ha constituido el “Comité de Nomenclatura de Muerte Celular” que tiene como misión “proveer un foro en el cual los distintos nombres que describen a las diferentes modalidades de muerte celular sean críticamente evaluados y se formulen recomendaciones acerca de su definición y uso para facilitar la comunicación entre científicos y acelerar el ritmo de los descubrimientos” (Galluzzi et al., 2011). En línea con esta misión, el comité destaca la necesidad de obtener una clasificación de muerte celular basada en eventos bioquímicos cuantificables y definen y describen las distintas formas de muerte celular reguladas reconocidas actualmente: *apoptosis intrínseca (dependiente o independiente de caspasas)*, *apoptosis extrínseca*, *anoikis*, *muerte celular autofágica*, *catástrofe mitótica*, *cornificación*, *entosis*, *necroptosis*, *netosis*, *partanatos* y *piroptosis*.

1.1. Apoptosis

1.1.1. Origen del término y características generales

El término “*apoptosis*” derivado del griego *apo*: separación y *ptosis*: caída, era empleado en la antigua Grecia para describir la caída de las hojas de los árboles. Esta terminología fue introducida por primera vez por Kerr et al. (1972) en referencia a un tipo de muerte celular controlada. Estos investigadores habían observado mediante microscopía electrónica que las células morían de una manera morfológicamente distinta a la muerte por necrosis. En dichas células se producían una serie de cambios secuenciales que no tenían como resultado la pérdida de la integridad de la membrana celular y que además, no desencadenaban una respuesta inflamatoria, como ocurría en la necrosis.

El papel que desempeña la apoptosis en los organismos pluricelulares no se limita a su acción durante el desarrollo, en particular en la morfogénesis, diferenciación sexual y formación y maduración del sistema nervioso y sistema inmune, sino que también es crucial para el mantenimiento de la homeostasis tisular en el adulto, eliminando células dañadas o anómalas e interviniendo en la defensa contra infecciones y en la regulación del proceso fisiológico de envejecimiento. Este tipo de muerte celular está genéticamente programada y ocurre de forma permanente y dinámica en todos los organismos (Danial y Korsmeyer, 2004).

El mecanismo por el cual las células mueren por apoptosis es activo, complejo y sofisticado. Así, múltiples moléculas promueven la muerte celular implicando efectos en cascada de modo de asegurar que una vez iniciado el proceso, éste sea rápido e irreversible. Como mecanismo de prevención, la célula produce moléculas reguladoras cuya función es evitar que pequeñas alteraciones resulten en una muerte innecesaria. Por lo tanto, la desregulación de la maquinaria apoptótica da lugar al desarrollo de patologías humanas. La apoptosis se encuentra

inhibida en el cáncer, las enfermedades autoinmunes (lupus, diabetes tipo I, artritis reumatoide) y las infecciones virales (herpes- virus, adeno-virus). Por otra parte, ejemplos de patologías asociadas a un aumento de la apoptosis son el SIDA, la isquemia y las enfermedades neurodegenerativas (Mattson, 2000; Reed, 2001).

Durante el proceso apoptótico tiene lugar la pérdida de contacto entre células vecinas (debido a la carencia de elementos de superficie como las microvellosidades y a la pérdida de uniones célula-célula), el burbujeo (“blebbing”) de la membrana, la disminución del volumen celular y la condensación de la cromatina. Estas alteraciones morfológicas están acompañadas por diferentes eventos bioquímicos tales como la translocación de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática (señal de reconocimiento de la célula apoptótica para su degradación por parte de los macrófagos), la activación de una familia de cisteína-proteasas (caspasas) que degradan numerosos sustratos celulares y de endonucleasas que clivan al ADN. Una de ellas, denominada DNAasa activada por caspasas (CAD), cliva al ADN a nivel de los nucleosomas originando fragmentos de entre 180-200pb y múltiplos de ellos. De este modo, cuando el ADN proveniente de células apoptóticas se analiza mediante electroforesis en geles de agarosa, se observa un característico patrón en escalera (“ladder”), frecuentemente utilizado como marcador bioquímico de este tipo de muerte. Este patrón no es visible en todos los tipos celulares ya que depende del grado de fragmentación y de que la ruptura se produzca en las dos cadenas (Danial y Korsmeyer, 2004; Edinger y Thompson, 2004).

Durante la apoptosis la integridad de las organelas y de la membrana plasmática se mantiene. Las células apoptóticas terminan fragmentándose en vesículas recubiertas de membrana llamadas cuerpos apoptóticos que finalmente son reconocidos y fagocitados por macrófagos. De esta manera, se previene la

liberación del contenido citoplasmático al medio extracelular y con ello la iniciación de una respuesta inflamatoria. En cambio, cuando las células están en cultivo y por lo tanto no hay macrófagos presentes, se hinchan y destruyen en un proceso conocido como apoptosis secundaria o falsa necrosis (Danial y Korsmeyer, 2004; Edinger y Thompson, 2004).

1.1.2. Caspasas: clasificación y funciones

Las “caspasas” pertenecen a una familia evolutivamente conservada de cisteína proteasas que median cambios morfológicos durante la apoptosis. Las primeras 13 caspasas descritas se pueden clasificar en tres grupos en base a su función y posición en la cascada apoptótica *iniciadoras de la apoptosis* (2, 8, 9, 10 y 12), *efectoras o ejecutoras de la apoptosis* (3, 6 y 7) e *inflamatorias* (1, 4, 5, 11 y 13) (**Tabla 1**) (Lavrik et al., 2005). La excepción la constituye la caspasa 14 que interviene en procesos de cornificación. Por otra parte, recientemente se ha identificado a las caspasas 15-18 en diferentes linajes de metazoos, aunque con excepción de la 16, las otras han desaparecido en humanos y ratón (Crawford y Wells, 2011).

Grupo I		Grupo II		Grupo III	
Iniciadoras de apoptosis		Efectoras de apoptosis		Inflamatorias	
Caspasa	Dominio/s	Caspasa	Dominio/s	Caspasa	Dominio/s
2	CARD	3	–	1	CARD
8	DED DED	6	–	4	CARD
9	CARD	7	–	5	CARD
10	DED DED			11	CARD
12	CARD			13	CARD

Tabla 1. Clasificación de Caspasas

Las caspasas se clasifican en tres grupo: iniciadoras de la apoptosis, efectoras o ejecutoras de la apoptosis e inflamatorias. CARD (dominio de reclutamiento de caspasas); DED (dominio efector de muerte) (Adaptado de Crawford y Wells, 2011).

La estructura tridimensional de las caspasas determina su función y los mecanismos de activación. Estas constan de tres dominios: un pro-dominio N-terminal, una subunidad larga p20 y una subunidad corta p10 hacia el extremo C-terminal. Las subunidades p20 y p10 se encuentran unidas por un pequeño fragmento peptídico (Pop y Salvesen, 2009). Las caspasas se sintetizan como pro-caspasas ó zimógenos y necesitan de un procesamiento proteolítico para activarse. Generalmente, dicha activación supone el clivaje entre los dominios mencionados anteriormente y la posterior asociación entre las subunidades p20 y p10. De este modo, la enzima activa es un homodímero, donde cada monómero está constituido por una subunidad larga y una corta (Thornberry y Lazebnik, 1998) (**Figura 1**).

En las caspasas efectoras, el pro-dominio es inexistente o corto (menor a 30 aminoácidos), mientras que en las caspasas iniciadoras comprende un mayor número de aminoácidos y es fundamental para su activación (Thornberry y Lazebnik, 1998). Así, los pro-dominios de las pro-caspasas iniciadoras incluyen al dominio efector de muerte (DED) en las pro-caspasas 8 y 10 y al dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) en las pro-caspasas 2, 9 y 12. El DED interactúa con un dominio homólogo presente en la molécula adaptadora FADD (molécula adaptadora con dominio de muerte asociado al receptor Fas) la cual es reclutada a los receptores de muerte de membrana a través de sus dominios de muerte (DD). Por otra parte, los dominios CARD de la pro-caspasa 9 se unen a dominios homólogos presentes en el factor apoptótico activador de proteasa-1 (Apaf-1), siendo este proceso clave para el inicio de la vía apoptótica mitocondrial (Utz y Anderson, 2000).

Ante la presencia de una señal apoptótica, se activan diferentes caspasas integrando una cascada de activación secuencial, lo cual permite la amplificación de dicha señal y la regulación a varios niveles (Lavrik et al., 2005). Las caspasas

pueden activarse mediante dos mecanismos diferentes: la homoactivación en el caso de las caspasas iniciadoras y la heteroactivación o transactivación para las caspasas efectoras (Utz y Anderson, 2000).

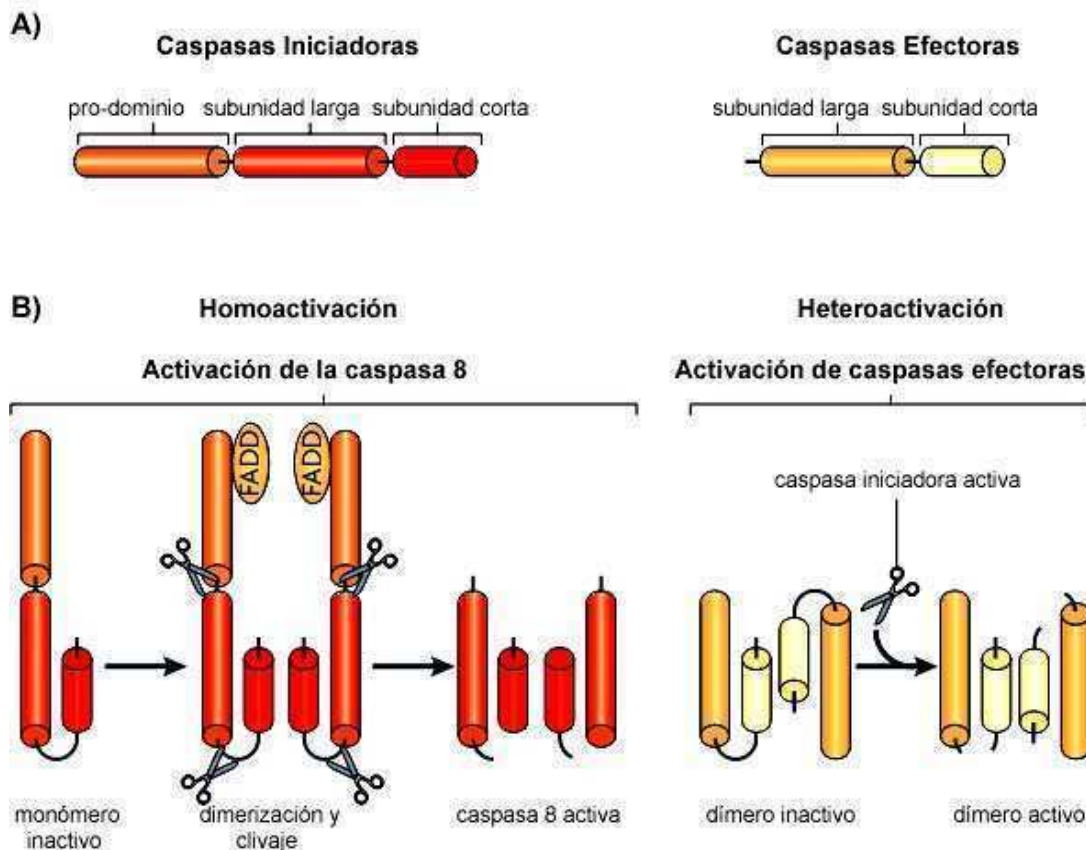


Figura 1. Estructura y activación de las caspasas

A) Las caspasas poseen un pro-dominio, una subunidad larga y una corta. Las iniciadoras se caracterizan por la presencia de un pro-dominio largo, el cual es corto o inexistente en las efectoras. **B)** Durante la activación de la caspasa 8, los monómeros inactivos de la pro-caspasa 8 son reclutados mediante sus pro-dominios a las moléculas adaptadoras FADD presentes en el receptor de muerte. La dimerización seguida de clivaje proteolítico entre las subunidades son pasos necesarios en la activación y estabilización de la enzima activa. En cambio, las caspasas efectoras están presentes en la célula como dímeros inactivos, los cuales al ser procesados por las caspasas iniciadoras activas, sufren un re-ordenamiento intra-molecular que conduce a la formación de un dímero enzimáticamente activo (Adaptado de Tait and Green, 2010).

En la homoactivación, varias moléculas de pro-caspasa 8 (o 10) son reclutadas al receptor de muerte donde se activan por autoclivaje. Lo mismo ocurre en el caso de la pro-caspasa 9 cuando es reclutada al complejo apoptosoma, encargado de iniciar la vía apoptótica mitocondrial. Por otra parte, en la

heteroactivación, las caspasas iniciadoras 8, 9 y 10 procesan y activan a las caspasas efectoras 3, 6 y 7 (**Figura 1**). Estas últimas amplifican la señal y ejecutan la muerte celular clivando proteínas reguladoras y estructurales y conduciendo finalmente al desmantelamiento de la célula (Utz y Anderson, 2000). Sin embargo, también está descrito que la caspasa 3 puede activar a la pro-caspasa 9, lo cual produce un bucle de amplificación de la señal de muerte (Fujita et al., 2001).

Entre las principales acciones de las caspasas se destacan el clivaje de componentes del citoesqueleto (laminina, actina, gelsolina, vimentina, tubulina, etc), de proteínas relacionadas al ADN (PARP, ICAD), de proteínas de adhesión (β - y γ -cateninas, tensina, cadherinas) y la proteólisis de miembros de la familia Bcl-2 (Bid, Bcl-2) (Taylor et al., 2008).

En las células existen inhibidores naturales de las caspasas encargados de prevenir su acción cuando la apoptosis no es necesaria. Entre ellas, las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) se caracterizan por la presencia de uno o más dominios BIR, los cuales median las interacciones proteína-proteína y son esenciales para su actividad anti-apoptótica. Las proteínas IAPs de mamíferos (cIAP1, cIAP2 y XIAP) llevan 3 dominios BIR y promueven la degradación de las caspasas activas o las secuestran evitando la acción de éstas sobre sus sustratos. En el caso de la apoptosis inducida por la vía de receptores de muerte, las IAPs no se unen a la caspasa iniciadora 8 pero sí a la caspasa 3. En cambio, en la vía apoptótica mitocondrial, las IAPs ejercen su efecto inhibitorio a través de los siguientes mecanismos: uniéndose en forma competitiva a la pro-caspasa 9 e impidiendo la formación del apoptosoma y uniéndose directamente a la caspasa 9 y/o a la caspasa 3. Por otra parte, en la apoptosis que involucra al retículo endoplasmático, las IAPs inhiben el efecto de las caspasas 2 y 9 (Wei et al., 2008).

Otras proteínas inhibidoras de caspasas son FLIP (proteína inhibidora de FLICE/caspasa 8) y ARC (represor de la apoptosis con dominio CARD). FLIP contiene dos dominios DED y antagoniza la apoptosis mediada por receptores de muerte compitiendo con las caspasas 8 y 10 por su unión a FADD (Kataoka et al., 1998). Por su parte, ARC actúa tanto a nivel de la vía de receptores de muerte como de la vía mitocondrial (Koseki et al., 1998).

Además de su rol en la regulación de la apoptosis, las caspasas participan en otros eventos fisiológicos como: neurogénesis, plasticidad sináptica y procesos de aprendizaje y memoria (caspasa 3) (D'Amelio et al., 2010), regulación del ciclo celular a nivel del pasaje M/G1 (caspasas 3 y 7) (Hashimoto et al., 2011) y diferenciación celular (caspasas 3, 6, 7, 8, 9, 10) (Crawford y Wells, 2011).

1.1.3. Proteínas de la familia Bcl-2: clasificación y funciones

Las proteínas que integran la “*familia Bcl-2*” están involucradas en numerosos procesos relacionados con la entrada de las células en apoptosis ya que integran diversas señales de supervivencia y de muerte que se generan extra e intracelularmente (Chipuk et al., 2010).

El nombre de la familia proviene de la proteína fundadora, el oncogen Bcl-2, identificada inicialmente en el linfoma folicular de células B que presentaban una translocación recíproca entre los cromosomas 14 y 18. Los primeros estudios de la expresión de Bcl-2 demostraron su capacidad de bloquear la muerte celular inducida por distintos estímulos fisiológicos y patológicos. En particular, la proteína Bcl-2 localizada en la mitocondria era capaz de inhibir distintos eventos apoptóticos tales como la contracción citoplasmática, la condensación nuclear, el blebbing de la membrana plasmática y el clivaje del ADN (Danial y Korsmeyer, 2004 y referencias allí citadas).

Las proteínas de la familia Bcl-2 residen principalmente en el citoplasma y en la membrana mitocondrial externa (MME). Sin embargo, algunos miembros pueden localizarse en la membrana nuclear y del retículo endoplasmático (Shinzel, 2004).

Los integrantes de esta familia poseen en su estructura dominios de homología a Bcl-2 (BH) que corresponden a segmentos de α -hélices. En base a la presencia de estos dominios se los clasifica en dos subfamilias (Cory y Adams, 2002):

1) *Subfamilia anti-apoptótica*: sus integrantes contienen cuatro dominios BH (BH1-4) e incluyen a Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1, NR-13, Boo/Diva/Bcl-2-L-10 y Bcl-B.

2) *Subfamilia pro-apoptótica*: integrada por dos subclases de proteínas:
Efectoras: poseen tres dominios BH (BH1-3): Bax, Bak, Bok/Mtd y Bcl-x_s.
BH3-only: presentan un único dominio BH (BH3): Bad, Bid, Bim, BNIP3, EGL-1, Bik/Nbk, Blk, Hrk/DP5, Noxa, PUMA/Bbc3 y Bmf (**Figura 2A**).

Las proteínas pro- y anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 interactúan entre sí regulando el proceso apoptótico (Chipuk et al., 2010). Los miembros anti-apoptóticos necesitan de los cuatro dominios BH para llevar a cabo su actividad promotora de supervivencia. Si bien estos dominios carecen de actividad enzimática, son los encargados de mediar las interacciones de los factores anti-apoptóticos con otras proteínas de la familia. Tanto los miembros anti-apoptóticos como los pro-apoptóticos efectores contienen un dominio transmembrana en el extremo C-terminal y sus dominios BH1-3 constituyen un bolsillo hidrofóbico al cual se unen los miembros BH3-only (Borner, 2003).

Algunos de los miembros pro-apoptóticos de la subfamilia BH1-3 son proteínas residentes en la mitocondria (Bak), mientras que otros se encuentran en el citoplasma y frente a un estímulo apoptótico translocan a la MME (Bax). Siguiendo

al estímulo apoptótico, Bax y Bak sufren cambios conformacionales que conducen a la formación de homo-oligómeros en la MME los cuales constituyen poros que contribuyen a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP).

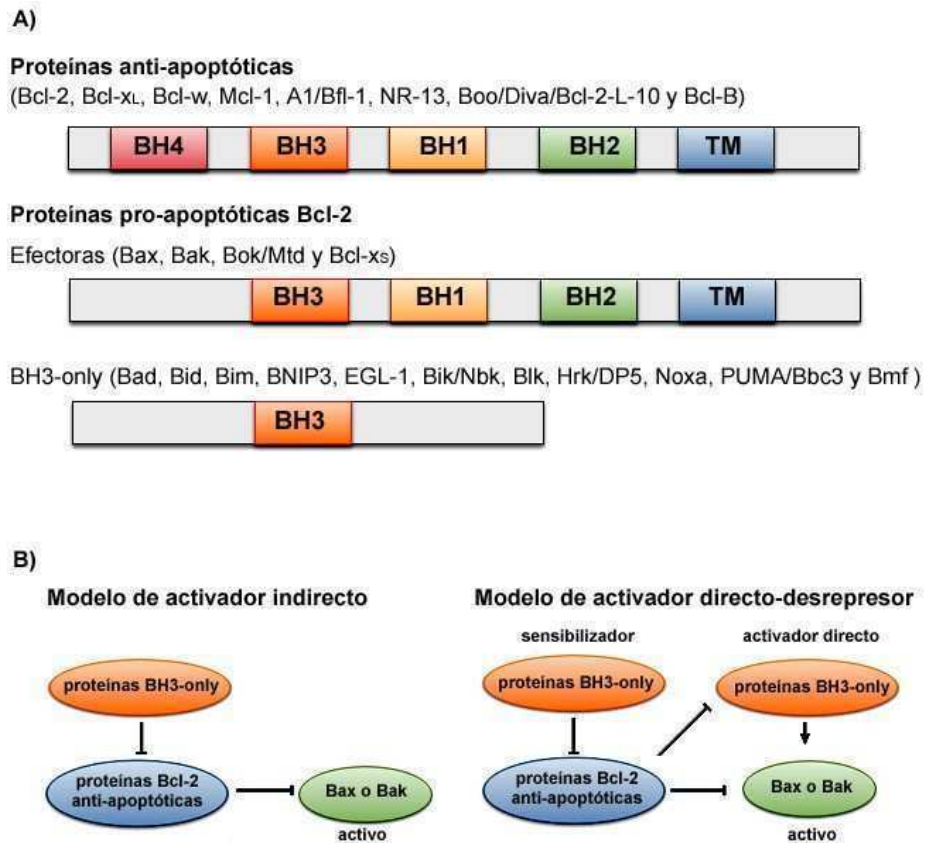


Figura 2. Proteínas de la familia Bcl-2

A) Las proteínas de la familia Bcl-2 se dividen en dos subfamilias en función de su estructura y función: Subfamilia anti-apoptótica y Subfamilia pro-apoptótica (efectores y BH3-only). El dominio transmembrana (TM) interviene en el anclaje a membranas y no está presente en todos los integrantes de la familia. **B)** Esquema de los dos modelos propuestos para la activación de Bax y Bak por proteínas BH3-only (Modificado de Tait y Green, 2010).

La MOMP permite que algunas proteínas residentes en el espacio intermembrana mitocondrial (EIM) se liberen al citosol y activen a las pro-caspasas propagando así la señal apoptótica. Sin embargo, la naturaleza y estructura exacta de estos poros así como también la forma en que operan estas proteínas es aún materia de debate. Una posibilidad es que Bax y Bak interactúen con lípidos de la MME dando origen a poros lipídicos transientes. También, podrían interactuar con

proteínas propias de la mitocondria, orquestando la formación de un poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (mPTP), el cual compromete a la MME y a la membrana mitocondrial interna (MMI). Si bien aún no se ha esclarecido totalmente, lo más aceptado es que el mPTP estaría compuesto por el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) y la ciclofilina D (Tait y Green, 2010).

Los miembros de la familia Bcl-2 tienen la capacidad de formar homo y heterodímeros. En este sentido, los miembros pro-apoptóticos como Bax pueden heterodimerizar con los anti-apoptóticos como Bcl-2 ó Bcl-x_L y de esta forma bloquear su acción. Contrariamente, las proteínas anti-apoptóticas pueden secuestrar e inhibir a los pro-apoptóticos (Borner, 2003). La clásica “*Teoría del Reóstato*” de Korsmeyer (1992) propone que es la relación entre los niveles de expresión de proteínas pro- y anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 lo que determinaría la susceptibilidad de una célula a la muerte por apoptosis. De este modo, cuando la proteína Bcl-2 está en exceso, las células estarían protegidas de la muerte celular, mientras que si lo está Bax, la célula estaría destinada a entrar en apoptosis. Si bien esta teoría es aceptada desde su formulación, actualmente debe ser considerada con ciertos ajustes para explicar hallazgos posteriores referentes al modo de activación de Bax y Bak y es aquí donde entran en escena las proteínas pro-apoptóticas BH3-only. Los miembros de ésta subfamilia son considerados los principales centinelas del estrés celular y factores promotores de apoptosis que actúan uniéndose a integrantes de las otras dos subfamilias (Chipuk et al., 2010). Hoy en día, existen dos modelos que intentan explicar el modo en que las proteínas BH3-only pueden promover la activación de Bax y Bak: *el modelo del activador indirecto* (o neutralizador) y *el modelo del activador directo-desrepressor* (Tait y Green, 2010).

El modelo activador indirecto tiene como base la Teoría del Reóstato y propone que Bax y Bak en un estado constitutivamente activo se encuentran unidos a proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 y que las interacciones competitivas entre éstas últimas y las proteínas BH3-only, serían suficiente para liberar Bax y Bak activados. En cuanto al modelo del activador directo-desrepresor, se postula que Bax y Bak son activados luego de la interacción con un conjunto de proteínas BH3-only conocidas como activadores directos y que las anti-apoptóticas previenen la MOMP ya sea secuestrando a los BH3-only o inhibiendo a las proteínas Bax y Bak activas. Además, en este modelo tendrían participación un segundo conjunto de proteínas BH3-only llamadas sensibilizadores, que si bien no serían capaces de activar directamente a Bax y Bak, podrían neutralizar a los miembros anti-apoptóticos (**Figura 2B**) (Tait y Green, 2010).

1.1.4. Vías de señales

Las rutas de muerte celular apoptótica más extensivamente descritas son la Vías Extrínseca o de Receptores de Muerte y la vía Intrínseca o Mitocondrial (**Figura 3**). Sin embargo, otras organelas como los lisosomas, el retículo endoplasmático y el núcleo son también capaces de actuar como sensores e integradores de señales apoptóticas. Estas organelas poseen detectores de alteraciones específicas que activan localmente vías de transducciones de señales y emiten otras que aseguran la conexión inter-organelas. Los antecedentes indican que hasta el momento existen cinco vías implicadas en la muerte celular apoptótica dependiente de caspasas: la Vía Extrínseca o de Receptores de Muerte, la Vía Intrínseca o Mitocondrial, la Vía Lisosomal, la Vía del Retículo Endoplasmático y la Vía Nuclear (Ferri y Kroemer, 2001).

Vía Extrínseca o de Receptores de Muerte

El término “*apoptosis extrínseca*” ha sido introducido para describir instancias de muerte celular apoptótica inducidas por señales de estrés extracelular que son sensadas y propagadas por receptores específicos transmembrana (**Figura 3**) (Galluzzi et al., 2011). Estos receptores se denominan “*Receptores de Muerte*” y se agrupan dentro de la *Superfamilia del receptor del Factor de Necrosis Tumoral* (TNF). Sus miembros comparten la presencia de dominios extracelulares ricos en residuos cisteína y de secuencias citoplasmáticas homólogas de 80 aminoácidos correspondientes a los DD, los cuales permiten a los receptores reclutar la maquinaria apoptótica celular. Sin embargo, en ciertas instancias, algunos receptores pueden promover la supervivencia aumentando la expresión de proteínas anti-apoptóticas a través de la vía de señales de NF- κ B (Ashkenazi y Dixit, 1998). Los receptores de muerte incluyen a Fas/CD95, TNFR1, DR3/ Apo3, TRAIL-R1/DR4 y TRAIL-R2/DR5. Por su parte, los ligandos que activan a estos receptores están estructuralmente relacionados y son Fas-L (CD95L), TNF α , la linfotoxina α (también conocida como TNF β), TWEAK (o Apo3L) y TRAIL (o Apo2L) respectivamente (Ashkenazi y Dixit, 1998).

Uno de los receptores de muerte más estudiado es Fas/CD95, el cual se ha asociado clásicamente a tres tipos de apoptosis fisiológica: i) eliminación de linfocitos T maduros y activados al final de una respuesta inmune, ii) eliminación de células tumorales ó infectadas por virus por parte de linfocitos T citotóxicos y natural killers y (iii) muerte de células inflamatorias en sitios de inmuno-privilegio (Ashkenazi y Dixit, 1998). Por otra parte, se ha identificado la participación del sistema Fas/FasL en enfermedades neurodegenerativas como la EP, Alzheimer y Huntington (Ferrer et al., 2000, 2001).

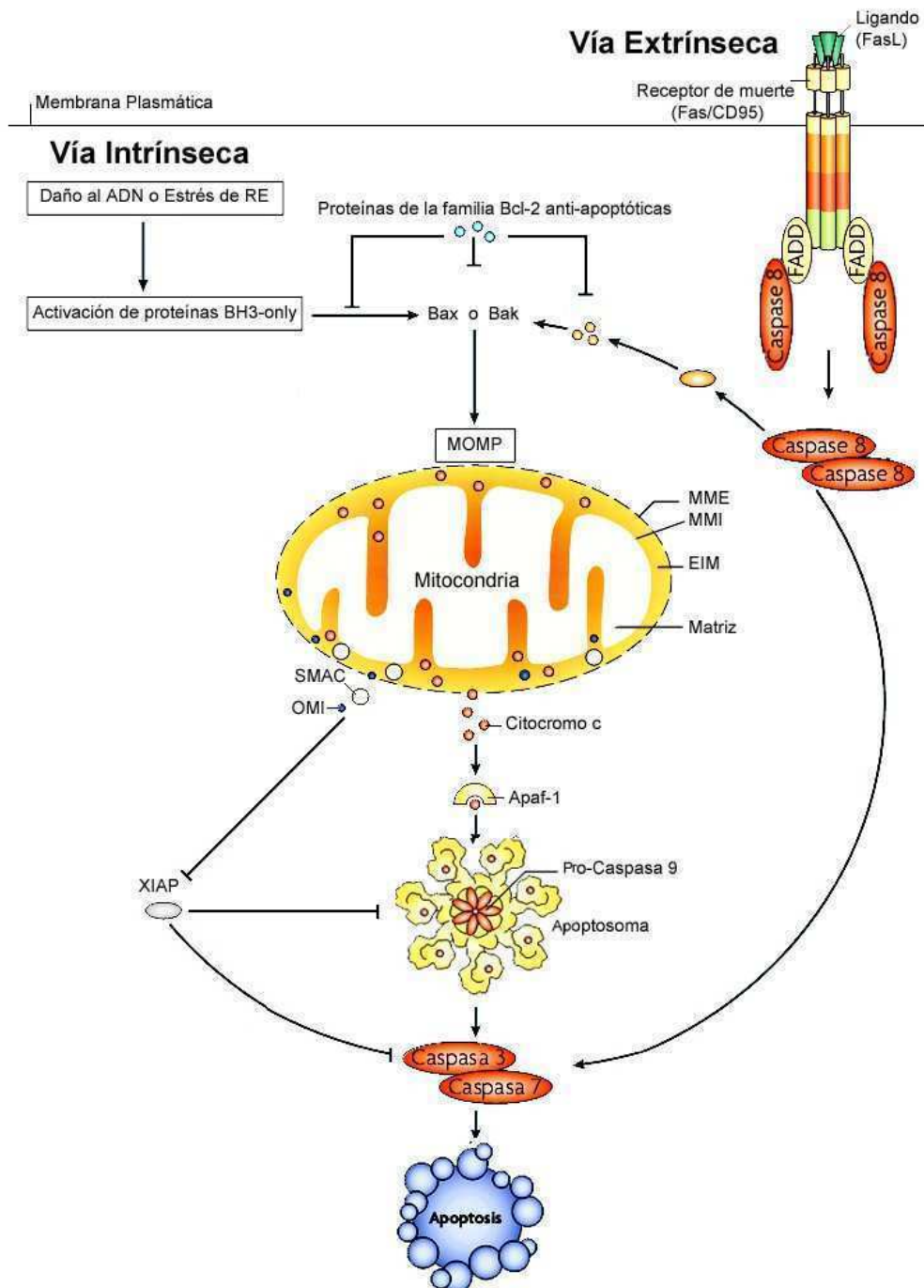


Figura 3. Principales vías de muerte celular apoptótica

La Vía Extrínseca se inicia por la unión de ligandos de muerte a sus respectivos receptores, conduciendo a la formación del complejo DISC donde la pro-caspasa 8 es reclutada y activada por autoclivaje. La caspasa 8 cliva y activa a las pro-caspasas 3/7 y a Bid. Bid truncado establece un nexo con la Vía Intrínseca a modo de amplificación de la señal. Por otra parte, estímulos intrínsecos son capaces de iniciar la vía mitocondrial induciendo la liberación del citocromo c al citoplasma, el cual junto con Apaf-1 y la pro-caspasa 9 forman el apoptosoma. En éste, tiene lugar la activación de la pro-caspasa 9, encargada de clivar y activar a las pro-caspasas 3/7. RE: retículo endoplasmático; MME: membrana mitocondrial externa; MMI: membrana mitocondrial interna; EIM: espacio inter-membrana mitocondrial. Adaptado de Tait y Green, 2010.

El ligando Fas-L es una molécula homotrimétrica que se une a tres moléculas del receptor Fas e induce la trimerización del mismo y de sus DD. Este proceso es necesario para la transducción de la señal apoptótica y reclutamiento de FADD, la cual a su vez recluta a la pro-caspasa 8 y de este modo se forma el complejo de señalización inductor de muerte (DISC). El reclutamiento y oligomerización de la pro-caspasa 8 en dicho complejo conduce entonces a su activación por autoclivaje (Ashkenazi y Dixit, 1998) (**Figura 3**).

Vía Intrínseca o Mitocondrial

La Vía Intrínseca puede ser ejecutada a modo de amplificación de la señal de muerte iniciada por la Vía Extrínseca. Sin embargo, también puede ser activada por una plétora de condiciones de estrés intracelular, entre los que se incluye, el daño al ADN, estrés oxidativo, incremento en los niveles de Ca^{2+} citosólico, excitotoxicidad relacionada con la sobre-estimulación del receptor de glutamato en el sistema nervioso central (SNC), acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplasmático y muchas otras más. Entonces, a pesar de que las cascadas de señalización que activan la apoptosis intrínseca pueden ser muy heterogéneas en cuanto a estímulos iniciadores se refiere, todas ellas están conectadas a un ejecutor central que es la mitocondria (Galluzzi et al., 2011).

Usualmente, junto con la propagación de la cascada de señales pro-apoptóticas, se desencadenan también mecanismos anti-apoptóticos en un intento de permitir que las células puedan afrontar el estrés al que se ven sometidas. En este escenario, tanto las señales pro- como anti-apoptóticas convergen a nivel de la MME, la cual será permeabilizada en caso de que las primeras prevalezcan sobre las segundas (Kroemer et al., 2008).

La MOMP es un evento que normalmente es considerado como un “punto de no retorno” en la cascada de señalización apoptótica (Kroemer et al., 2008). Si bien es un concepto que actualmente sigue vigente, se han descrito ejemplos en los cuales tiene lugar la supervivencia celular pese a la ocurrencia de la MOMP (Tait y Green, 2010). Como ya se mencionó anteriormente, las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak, al igual que el mPTP, contribuyen a la MOMP. De todos modos, independientemente de cuál sea el mecanismo responsable de este fenómeno, si resulta ser irreversible, tendrá como consecuencia la disipación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), la inhibición de la cadena respiratoria, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la liberación de proteínas desde el EIM al citosol, entre ellas, el citocromo c (**Figura 4**) (Kroemer et al., 2008).

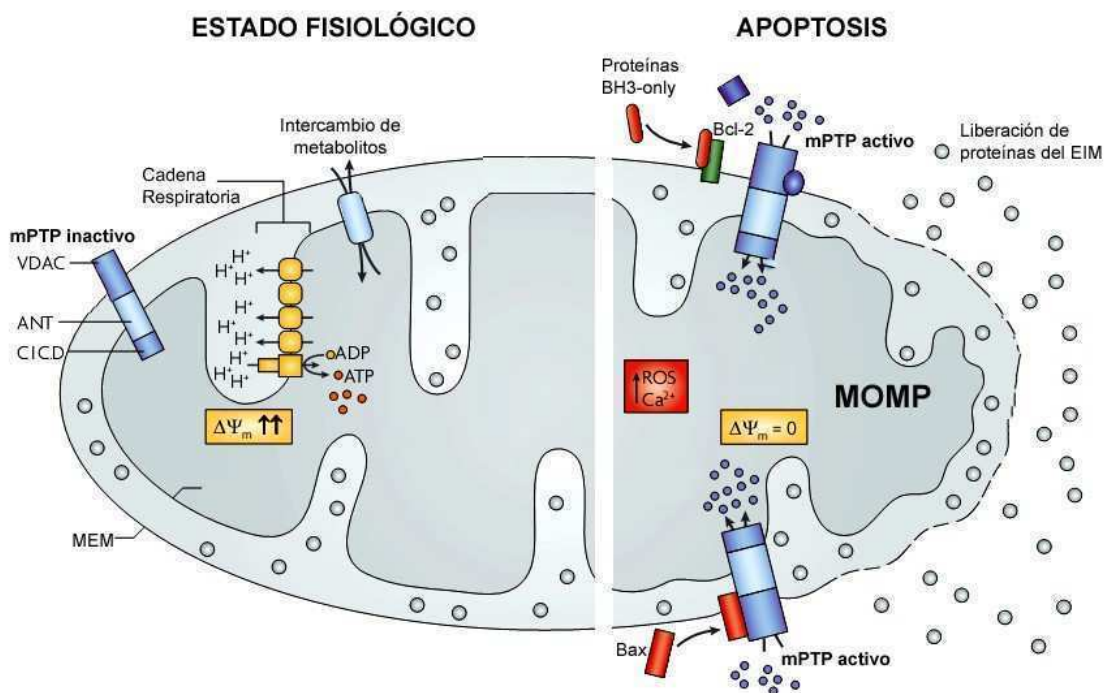


Figura 4. Permeabilización mitocondrial

Uno de los eventos característicos de la apoptosis es la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) que implica la formación de diferentes tipos de poros resultando en la liberación de proteínas pro-apoptóticas. VDAC: canal aniónico dependiente de voltaje. ANT: translocador de nucleótidos de adenina. CICD: ciclofilina D. $\Delta\psi_m$: potencial de membrana mitocondrial. ROS: especies reactivas de oxígeno. mPTP: poro de permeabilidad transitoria mitocondrial. Adaptado de Fulda et al. (2010).

La apoptosis intrínseca resulta en una catástrofe metabólica y bioenergética acoplada a múltiples mecanismos ejecutores de muerte celular. En uno de ellos, el citocromo c liberado al citosol se une a la proteína Apaf-1. Como resultado de esta interacción, Apaf-1 sufre un cambio conformacional y en presencia de deoxiadenosina trifosfato (dATP) se oligomeriza y forma el apoptosoma, un complejo heptamérico de alto peso molecular que se asemeja a una rueda de siete rayos. Este complejo es el encargado de reclutar a siete moléculas de pro-caspasa 9 que luego se activarán por autoclivaje. Finalmente, la caspasa 9 procesa y activa a las pro-caspasas 3/7, las cuales, a su vez, clivan sustratos intracelulares dando lugar a los cambios morfológicos y bioquímicos de la apoptosis (**Figura 3**) (Kroemer et al., 2008). Otras proteínas liberadas desde el EIM también contribuyen al proceso apoptótico. Una de ellas es el factor inductor de apoptosis (AIF), una flavoproteína semejante a la óxido reductasa bacteriana que al ser liberada transloca al núcleo y causa la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN. Otra proteína liberada al citoplasma es la denominada segundo activador mitocondrial de caspasas/proteína de unión directa a IAP con bajo pI (Smac/DIABLO) y su función consiste en activar la apoptosis por unión a las proteínas IAPs. Contiene en su extremo N-terminal una secuencia de direccionamiento a la mitocondria de 55 aminoácidos. Esta secuencia es removida en la mitocondria y se genera un nuevo extremo N-terminal en la Smac/DIABLO madura, donde los primeros cuatro aminoácidos (ala, val, pro, ile) constituyen el dominio IBM de unión a dominios BIR presentes en las proteínas IAPs. La proteína A2 que requiere de alta temperatura (Omi/HtrA2), es otra proteína proveniente del EIM. Consiste en una serina proteasa que al ser liberada al citoplasma en respuesta a un estímulo apoptótico, interactúa, al igual que Smac/DIABLO, con las proteínas IAPs promoviendo su inactivación. Finalmente, la endonucleasa G (ENDO-G) que es una nucleasa de 30kDa residente

en la mitocondria, una vez liberada al citoplasma se dirige hacia el núcleo, donde induce la fragmentación internucleosomal del ADN. Esta acción es también llevada a cabo por la enzima CAD que, en condiciones normales, se encuentra unida a su correspondiente inhibidor (ICAD); sin embargo, ante una señal apoptótica, dicho inhibidor es clivado por la caspasa 3 activa, dejando a CAD libre para ejercer su acción (Wang, 2001).

Se han descrito dos tipos celulares caracterizados por la generación de altos (tipo I) o bajos (tipo II) niveles de DISC y activación de la caspasa 8 (Scaffidi et al., 1998). Se considera que las células son tipo I cuando los niveles de DISC formados son elevados y la concentración de caspasa 8 activa es lo suficientemente alta para procesar de manera directa a las caspasas ejecutoras (3, 6 y 7). Contrariamente, las células tipo II poseen bajos niveles de DISC y consecuentemente se genera una baja concentración de caspasa 8 activa. En este último caso, se necesita de mecanismos adicionales de amplificación de la señal apoptótica y lo instrumenta la caspasa 8 clivando y activando a Bid, un miembro pro-apoptótico BH3-only de la familia Bcl-2. El fragmento generado se denomina Bid truncado (tBid) y transloca a la mitocondria donde promueve eventos relacionados al desencadenamiento de la Vía Intrínseca (Scaffidi et al., 1998).

En el año 2008, Gonzalez et al., describieron un rol inesperado de la mitocondria en la activación de la caspasa 8, en las células tipo II. En el mecanismo propuesto, la cardiolipina desempeña un rol relevante. Si bien este lípido se localiza en la MMI, se lo ha detectado también en los sitios de contacto entre esta membrana y la MME. Los autores encontraron que la pro-caspasa 8 puede translocar a la mitocondria anclándose en la membrana a través de la cardiolipina. Una vez allí, tendría lugar su activación por proximidad, dando origen a los fragmentos proteolíticamente activos (p43 y p10), que luego serían insertados en la

MME donde formarían oligómeros estables. Esta asociación con la mitocondria depende enteramente de la presencia de la cardiolipina, lo cual ha sido probado en membranas naturales y artificiales. Estos eventos tendrían entonces como resultado final, la activación de Bid sobre la superficie mitocondrial y no únicamente en el citoplasma como clásicamente se pensaba.

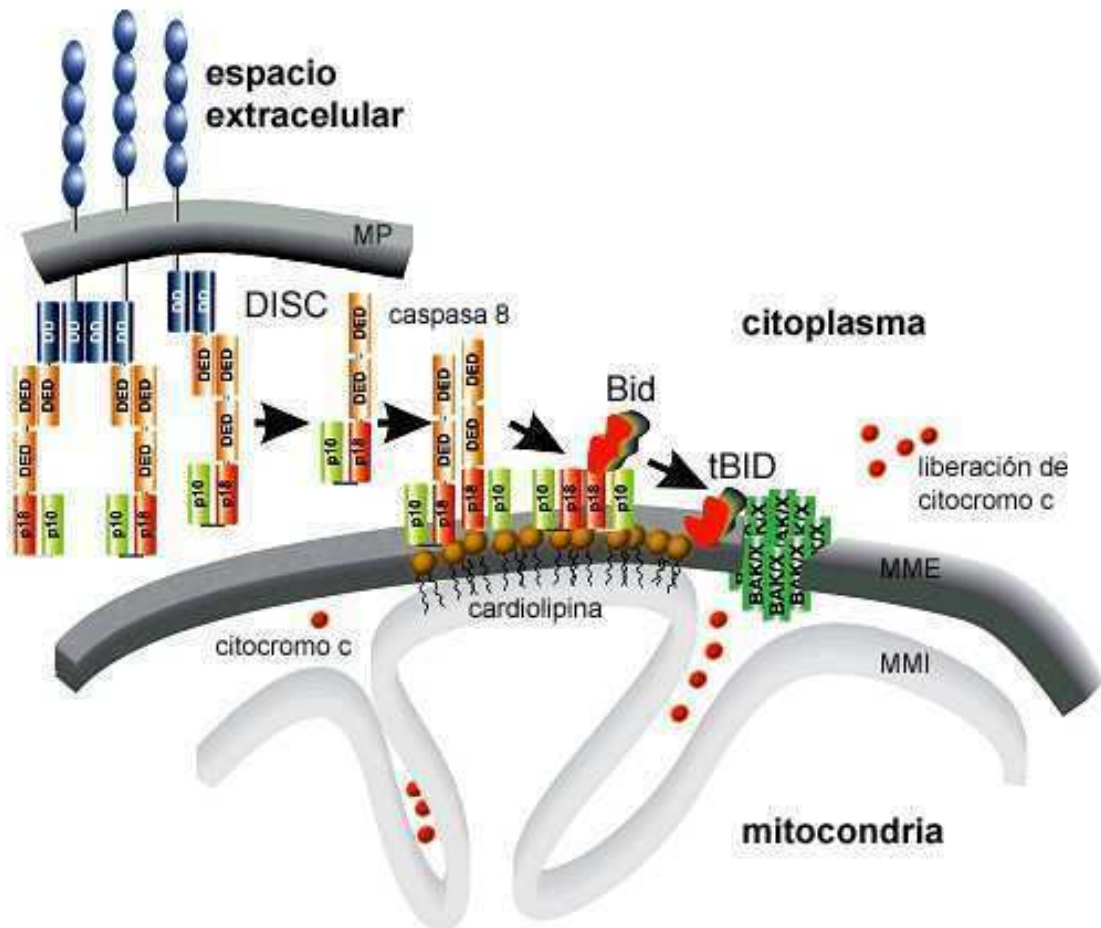


Figura 5. Modelo de activación de caspasa 8 y producción de Bid activo

Secuencia de eventos que ocurrirían en las células tipo II de acuerdo a los hallazgos de Gonzalez et al. (2008). DD: dominios de muerte; DED: dominios efectores de muerte; p18 y p10: dominios largo y corto de caspasa 8. MP: membrana plasmática. MME: membrana mitocondrial externa. MMI: membrana mitocondrial interna. Adaptado de Scorrano (2008).

Finalmente, los autores postularon como hipótesis que las consecuencias funcionales de la producción de tBid precisamente sobre esta organela durante la apoptosis, podría estar relacionada a su inserción en la MMI y posterior inducción del remodelamiento de las crestas mitocondriales. Esto, sumado a la

permeabilización de la MME (ej. poros formados por Bax/Bak), culmina con la liberación de citocromo c al citoplasma (**Figura 5**). Este descubrimiento fue revolucionario y modernizó la teoría descrita previamente por Scaffidi et al. (1998).

2. Dinámica Mitocondrial

2.1. Mitocondrias: aspectos generales

La “*Teoría Endosimbiótica*” indica que las mitocondrias derivan de α -proteobacterias aeróbicas que han sido endocitadas por células pre-eucarióticas hace más de 1.5 millones de años. A partir de entonces, han evolucionado hasta llegar a ser organelas citoplasmáticas especializadas, que participan en numerosas funciones celulares, siendo la principal, la producción de energía bajo la forma de ATP requerida para la vida de la célula. A su vez, son también reservorios de calcio, son esenciales en rutas de biosíntesis, en la diferenciación y crecimiento celular, muerte programada y control del ciclo celular. Por lo tanto, dada la multitud de funciones en las que participan, no resulta sorprendente que la disfunción mitocondrial tenga graves consecuencias celulares y esté asociada a diversos desórdenes, entre ellos, trastornos neurodegenerativos y envejecimiento en humanos (Tatsuta y Langer, 2008).

La estructura de las mitocondrias consiste en una doble bicapa lipídica (MME y MMI), un estrecho EIM y una gran matriz interna. La MME contiene canales que normalmente son permeables a ciertos iones, metabolitos y polipéptidos. Por su parte, la MMI forma invaginaciones o pliegues llamadas crestas mitocondriales que aumentan la superficie de anclaje de enzimas y es donde se encuentra la cadena transportadora de electrones y ocurre la fosforilación oxidativa. Así mismo, existen puntos de contacto entre la MME y la MMI donde se ubican proteínas tales como

VDAC y ANT, que son propuestos como sitios de fisión y/o fusión mitocondrial (Hom y Sheu, 2009).

El número de mitocondrias en cada célula es variable en función del requerimiento energético de cada tejido, por lo que algunas células carecen de mitocondrias (por ejemplo, los eritrocitos) o poseen unas pocas, mientras que otras pueden contener varios miles (por ejemplos, las células hepáticas, cerebrales y musculares) (Kuznetsov et al., 2009). En cuanto a sus dimensiones, el diámetro es de $\sim 0,5\mu\text{m}$ aunque su longitud puede variar entre $0,5\text{-}10\mu\text{m}$ (Detmer y Chan, 2007).

Las imágenes convencionales de las mitocondrias las muestran como aparentemente estáticas; sin embargo, se movilizan a través del citoesqueleto y se fusionan y dividen, lo cual indica que son organelas dinámicas y de aspecto variable. El espectro de las morfologías mitocondriales comprende formas esféricas, largas hebras individuales e incluso ramificaciones filamentosas que pueden formar una gran red mitocondrial interconectada dentro de cada célula. Estas diferentes morfologías son el resultado del balance entre dos procesos antagónicos denominados *fusión* y *fisión*, necesarios para el correcto funcionamiento de esta organela y de la célula. En este marco teórico, el concepto "*Dinámica Mitocondrial*", se refiere al movimiento de las mitocondrias a lo largo del citoesqueleto y a la regulación de su morfología (Liesa et al., 2009).

La realización de una breve reseña histórica es suficiente para poner en evidencia que la variación en la morfología mitocondrial no es un concepto novedoso. Precisamente, fue Carl Benda en el año 1898, el que bautizó a estas organelas con el nombre mitocondria (del griego *mitos*: hilo, y *chondros*: gránulo) en referencia a la heterogeneidad de sus formas. Sin embargo, durante gran parte del SXX, el estudio de la morfología de las mitocondrias fue abandonado, puesto que los investigadores estaban abocados al estudio de los eventos bioquímicos

implicados en el Ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa. Entonces, fue recién a fines de la década de 1990, con el advenimiento de tecnologías más avanzadas, que el interés se enfocó nuevamente en la morfología mitocondrial. A partir de ese momento se iniciaron estudios genéticos y moleculares centrados en la identificación de grupos de genes encargados del control y ejecución de los procesos de fusión y fisión (Liesa et al., 2009).

2.2. Fusión y fisión mitocondrial

Las células han desarrollado complejos sistemas para hacer frente a diversos desafíos impuestos sobre la integridad mitocondrial. La primera línea de defensa está integrada por un sistema proteolítico conservado que lleva a cabo el control de calidad de las proteínas. En dicho sistema, participan chaperonas y proteasas que monitorean el correcto plegamiento de las proteínas mitocondriales y remueven de manera selectiva a aquellas que resultan defectuosas. La segunda línea de defensa reside en la naturaleza dinámica de las mitocondrias a través de los eventos de fusión y fisión, los cuales a su vez participan en varias funciones biológicas (Tatsuta y Langer, 2008).

La “*fusión*” es un proceso que involucra la unión de dos o más mitocondrias y su función primaria es la de permitir la mezcla de contenidos entre las mismas. Así, la existencia de redes fusionadas correspondientes a mitocondrias conectadas permite la complementación del ADN a través del intercambio de genomas entre las mitocondrias que se están fusionando, facilita la transmisión de energía acoplada al $\Delta\psi_m$ a lo largo de la célula, además de restituir mitocondrias dañadas cuando estas se fusionan con mitocondrias intactas (**Figura 6**) (Detmer y Chan, 2007; Westermann, 2010).

La “*fisión*” da lugar a mitocondrias fragmentadas, las cuales son fácilmente transportables de modo de permitir un rápido tráfico de estas organelas a través del citoesqueleto hacia sitios de requerimiento energético dentro de las células. Dado que las mitocondrias proliferan a partir del crecimiento y división de otras pre-existentes, la fisión es un evento importante para el mantenimiento del número, pero también durante la mitosis, permitiendo a la célula madre el traspaso de sus mitocondrias a las células hijas. Así mismo, la fisión facilita la mitofagia (degradación de mitocondrias dañadas por autofagia) e interviene en la muerte celular apoptótica, contribuyendo a la liberación del citocromo c al citoplasma (Figura 6) (Detmer y Chan, 2007; Westermann, 2010).

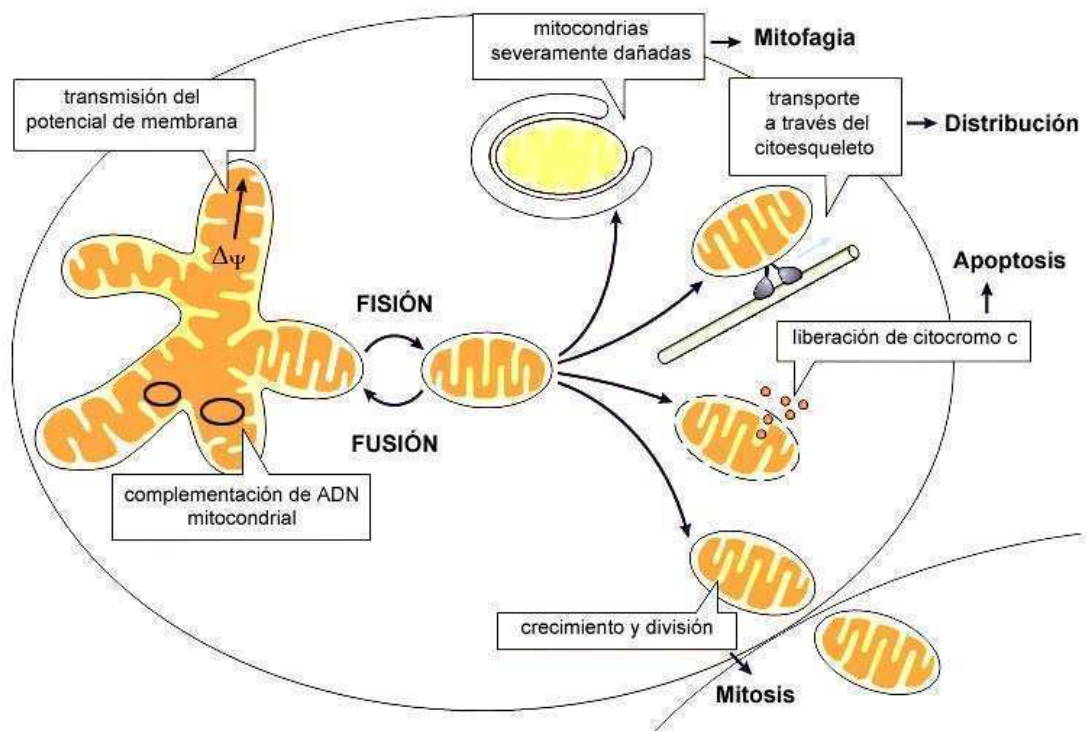


Figura 6. Funciones Biológicas de la Dinámica Mitocondrial
Adaptado de Westermann (2010).

Las mitocondrias atraviesan un ciclo de vida que comprende un balance entre eventos de fusión y de fisión, los cuales tienen funciones en diversos procesos celulares (Westermann, 2010).

La fusión mitocondrial es un proceso en dos pasos, donde las membranas externas e internas se fusionan en eventos separados. Esto tiene correlato con la ubicación diferencial de las principales proteínas de fusión, donde Mfn-1/2 se encuentran en MME y EIM y Opa-1 en la MMI y EIM (**Tabla 2**). De todos modos, pese a las investigaciones existentes, aún resta determinar con exactitud el mecanismo que interviene en la fusión coordinada de ambas membranas y elucidar cuál es la región particular de las membranas donde se inicia la unión y la fusión, seguida de la mezcla de los contenidos mitocondriales.

Proceso	Proteína	Localización
Fusión	Opa-1	MMI y EIM
	Mfn-1	MME y EIM
	Mfn-2	MME, EIM y Retículo Endoplasmático
	MiB	MME
	Mito-PLD	MME
	LETM1	MMI
	Prohibitinas	MMI
	Fisión	Drp-1
Fis-1		MME y Peroxisomas
Mff		MME
GDAP1		MME
MTP18		MME

Tabla 2. Proteínas reguladoras de la fisión y fusión mitocondrial

Localización de las principales proteínas responsables de los eventos de fisión y fusión en mamíferos (Opa-1, Mfn 1/2, Fis-1 y Drp-1) y de otras cuyo rol en dichos procesos aún es objeto de estudio (MiB: proteína de unión a Mitofusinas, Mito-PLD: fosfolipasa D asociada a mitocondria, LETM1: leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1; Mff: factor de fisión mitocondrial, GDAP1: Proteína 1 activada en la diferenciación inducida por gangliósidos, MTP18: proteína mitocondrial 18kDa. Campello y Scorrano (2010).

Las proteínas Mfn-1/2 son GTPasas de ~85kDa que comparten alto grado de homología entre sí y por consiguiente, poseen estructura similar. Estas proteínas contienen 741 y 757 aminoácidos respectivamente y están compuestas por un gran dominio GTPasa hacia el extremo N-terminal, dos dominios coiled-coil (repeticiones heptad) y dos dominios transmembrana que se ubican en la MME, conectados por una región corta en el EIM. La región más importante de la proteína mira hacia el citosol (**Figura 7**) (Liesa et al., 2009). La principal diferencia entre ambas proteínas radica en su afinidad por GTP; la Mfn-1 tiene mayor actividad GTPasa y menor afinidad por GTP que la Mfn-2. Así mismo, poseen diferentes funciones en la fisiología celular, siendo Mfn-2 la de mayor versatilidad, con participación en el metabolismo oxidativo, ciclo celular, transporte axonal de mitocondrias y control de la unión del retículo endoplasmático a las mitocondrias. Aún más, mutaciones en el gen de Mfn-2 están asociadas al desarrollo de una neuropatía periférica denominada Charcot Marie Tooth tipo 2A (Liesa et al., 2009).

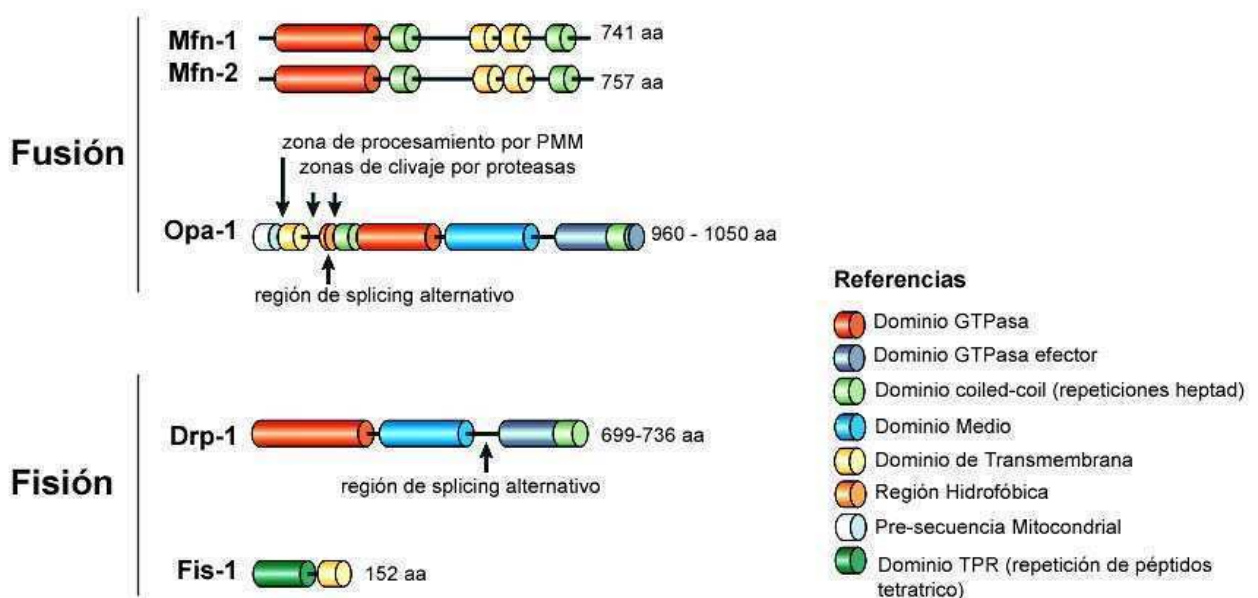


Figura 7. Proteínas reguladoras de la fusión y la fisión mitocondrial
Esquema de los componentes estructurales. Adaptado de Westermann (2010).

La proteína Opa-1 recibe su nombre de una mutación causante de una neuropatía denominada Atrofia Óptica Autosómica Dominante (ADOA) que resulta en la pérdida de fibras del nervio óptico. Aunque su expresión es ubicua, está presente en altos niveles en cerebro, retina, hígado, corazón, páncreas, músculo esquelético y testículos (Liesa et al., 2009). Además de su rol en el control de la fusión mitocondrial, Opa-1 interviene en el mantenimiento de la arquitectura de las crestas mitocondriales y en la liberación de citocromo c.

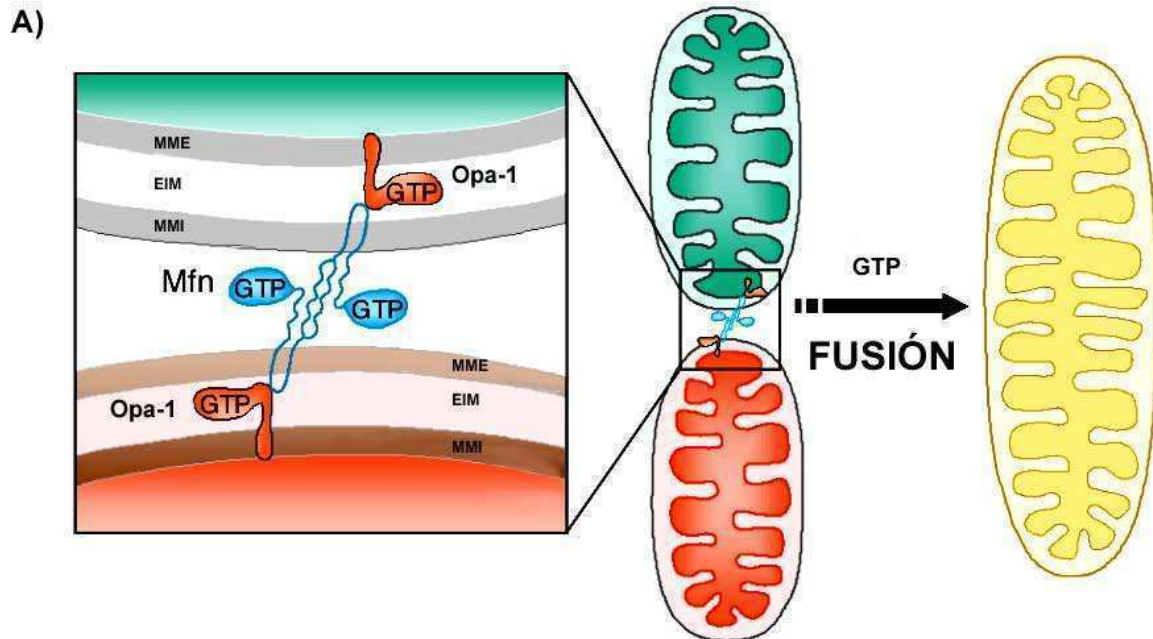
La estructura de Opa-1 contiene hacia el extremo N-terminal una secuencia de importe a la mitocondria (SIM). Esta región en particular contiene tres presuntos sitios de clivaje para la peptidasa de procesamiento mitocondrial (PPM), la cual remueve a la secuencia SIM luego de la importación. Opa-1 contiene además un dominio transmembrana (que sirve de anclaje a la MMI), una región de splicing alternativo (exones 4, 4b y 5b en humanos; exones 4b y 5b en ratón), un dominio GTPasa (crucial para la actividad de Opa-1), un dominio medio (postulado como sitio de oligomerización) y un dominio GTPasa efector. Además, Opa-1 contiene dos dominios coiled-coil, los cuales contribuyen a la formación de complejos entre moléculas de Opa-1 (**Figura 7**) (Liesa et al., 2009).

En células humanas existen ocho variantes de splicing de Opa-1 (1-8) que dan lugar hasta cinco bandas proteicas cuyo PM se encuentra en un rango de 80-100kDa. En cambio, en ratón se han descrito cuatro variantes de splicing correspondientes a las formas 1, 5, 7 y 8 que dan origen a seis bandas proteicas como máximo. El procesamiento del dominio SIM da lugar a las isoformas largas, en tanto que el clivaje a nivel de los sitios S1 y S2 vecinos a los sitios de splicing, da origen a las isoformas cortas (Song et al., 2007). Las formas largas se localizan en la MMI y las cortas (solubles) en el EIM. Ambas se complementan entre sí para ejercer su función (Palmer et al., 2011).

Hoy en día todavía existen controversias en cuanto al procesamiento de Opa-1. Según Wasileski y Scorrano (2009), el consenso más aceptado indica que las proteasas *m*-AAA paraplegina o *i*-AAA Yme1L o AFG3L2 producirían las formas de bajo peso molecular, sobre las cuales la proteasa PARL (proteína de tipo romboide asociada a presenilinas) actúa generando una forma soluble de Opa-1 que reside en el EIM.

Los primeros pasos en el proceso de fusión involucran la formación de homo- y hetero-oligómeros entre las mitofusinas ubicadas en mitocondrias adyacentes (Wasilewski y Scorrano, 2009). Además, está ampliamente aceptado que Opa-1 coopera con las mitofusinas para promover la fusión mitocondrial. Pese a que las maquinarias de fusión correspondientes a cada membrana mitocondrial pueden funcionar de manera independiente, se ha determinado al menos en fibroblastos, que Mfn-1 es requerida para el desencadenamiento de la fusión mediada por Opa-1, lo cual genera un escenario complejo. La forma en la que las Mfn se comunicarían con moléculas de Opa-1 es probablemente a través de sus regiones situadas en el EIM (**Figura 8A**). De este modo, mutaciones en dichas regiones podrían comprometer la función pro-fusión (Cipolat et al., 2004; Wasilewski y Scorrano, 2009).

La fisión mitocondrial depende principalmente de Drp-1, una GTPasa que posee similitudes en su estructura con las dinaminas (proteínas involucradas principalmente en la escisión de las vesículas recién formadas de la membrana plasmática) (Wasilewski y Scorrano, 2009).



Fusión de mitocondrias a través de la unión entre las membranas externas (MME) e internas (MMI).

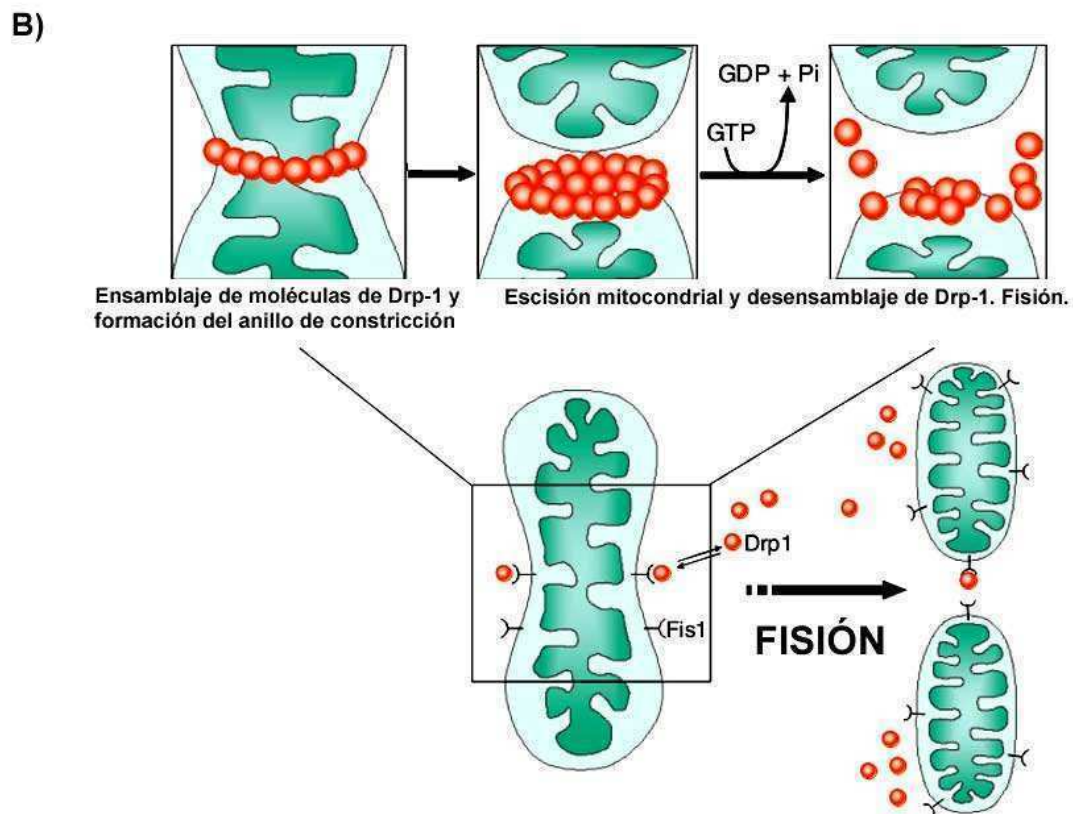


Figura 8. Fusión y Fisión Mitocondrial

Esquema de los eventos de fusión (A) y fisión (B) mitocondrial. Adaptado de Nissoli y Carruba (2006).

Drp-1 también conocida como DLP1 (proteína tipo dinamina-1) (Cereghetti y Scorrano, 2006) es una proteína soluble que contiene en su estructura un dominio GTPasa N-terminal, un dominio medio (homólogo a las dinaminas y postulado como sitio de inicio de oligomerización), un dominio C-terminal GTPasa efector (involucrado en el auto-ensamblaje de la proteína) y una región de splicing alternativo (**Figura 7**) (Westermann, 2010).

Esta proteína se encuentra altamente expresada en diferentes tejidos. Sin embargo, la isoforma específica de cerebro se genera por splicing alternativo y está ausente o no es detectable en otros tejidos (Liesa et al., 2009).

La proteína Drp-1 es fundamental para el desarrollo ya que ratones “knock out” (KO) en este gen (+/- ó -/-) presentan anomalías que resultan ser letales en los embriones. En humanos, se ha descrito tan solo un caso de mutación “missense” heterocigota (A395D) en una niña que nació con microcefalia, desarrollo anormal del cerebro, atrofia e hipoplasia óptica y alteraciones metabólicas determinadas por una acidemia láctica persistente y una concentración elevada de ácidos grasos en plasma. Este desorden resultó ser letal y la paciente murió a los 37 días post-nacimiento (Liesa et al., 2009).

La localización intracelular de Drp-1 es mayormente citoplasmática pero una parte considerable de esta proteína es detectada en puntos concretos (“foci”) de la mitocondria donde se producirá la escisión mitocondrial.

Dado que Drp-1 cambia continuamente de compartimento celular, muchas de las investigaciones actuales ponen especial atención al estudio de su reclutamiento y de las modificaciones post-traduccionales que ocurren en esta proteína. Hasta el momento se conoce que Drp-1 participa en la apoptosis, la función neuronal, la diferenciación cardíaca y muscular y el ciclo celular (Liesa et al., 2009).

La fosforilación/defosforilación de Drp-1 regula su localización subcelular dependiendo del tipo de señal. Durante la mitosis, Drp-1 es fosforilada (isoforma de cerebro: Ser-616 en humanos, Ser-585 en ratas) por Cdk1/Ciclina B lo cual estimula la migración y la consecuente fragmentación y distribución de las mitocondrias a las células hijas nacientes. La proteína encargada de la defosforilación de la serina en cuestión aún no ha sido identificada (Liesa et al., 2009).

Por otra parte, frente a un estímulo de muerte celular que implique un aumento de calcio en el citoplasma, se activa la calcineurina. Esta fosfatasa es la encargada de defosforilar a la Ser-637 de la isoforma de cerebro humano induciendo su translocación a la mitocondria. Actualmente, sigue siendo tema de debate cuál es la enzima encargada de fosforilar a dicha serina aunque la candidata más aceptada es la proteína kinasa A (PKA) (Wasilewski y Scorrano, 2009). Así mismo, como consecuencia de la elevación del calcio intracelular, se ha descrito la activación de otra enzima, la CaMKI (calmodulina kinasa dependiente de calcio) encargada de fosforilar la Ser-600 de la isoforma 3 de Drp-1 (Liesa et al., 2009).

Otra de las modificaciones post-traduccionales de Drp-1 es la SUMOilación, la cual le permite su estabilización en la superficie de la mitocondria, impidiendo su degradación por el sistema ubiquitina-proteasoma (Wasilewski y Scorrano, 2009). En este sentido, se postula que la ubiquitinación contribuye a la disminución de la tasa de fisión, mientras que la s-nitrosilación potenciaría la fisión mitocondrial (Santos et al., 2010).

Otra de las proteínas involucradas en la fisión es Fis-1. Tiene un peso molecular de 17 kDa, consiste en 152 aminoácidos y se encuentra anclada en la MME actuando de "receptor transiente" para la proteína Drp-1 a través de sus dominios de repetición de péptidos tetrátrico (TPR) (**Figura 7**). Sin embargo, las evidencias acerca de su requerimiento absoluto aún son controversiales. En el caso

de las levaduras están descritas otras dos moléculas, Mdv1 y Caf4, que actúan como mediadoras en la unión de los homólogos de Drp-1 y Fis-1. Sin embargo, no está esclarecido si en mamíferos existen moléculas similares a éstas dos o si la interacción es directa (Campello y Scorrano, 2010). Otera y Mihara (2011) señalan al factor de fisión mitocondrial (Mff) como una proteína fundamental en el reclutamiento de Drp-1 a la mitocondria junto con Fis-1. Al igual que ésta última, Mff se encuentra en la MME y se considera que su interacción con Drp-1 es transiente.

Ante una señal de fisión, Drp-1 transloca a la mitocondria y se oligomeriza formando un anillo de constricción alrededor de la organela, lo que culmina en la escisión mediada por hidrólisis de GTP (Campello y Scorrano, 2010) (**Figura 8B**).

2.3. Dinámica Mitocondrial y Apoptosis

La alteración de la morfología mitocondrial durante la apoptosis ha sido establecida de manera previa a la identificación de los genes involucrados en la Dinámica Mitocondrial (Liesa et al., 2009). Sin embargo, aún está en debate si dichos cambios morfológicos representan un epifenómeno de la cascada de muerte celular o poseen un rol clave en la amplificación de este proceso (Campello y Scorrano, 2010). Lo que sí está claramente definido es que la fisión mitocondrial *per se* no resulta en la muerte celular, aunque ésta última no ocurre sin que tenga lugar la fragmentación mitocondrial, al menos en los paradigmas reportados hasta la fecha (Bossy-Wetzel et al., 2003). Además, existe acuerdo en que la fisión mitocondrial es un evento general en la apoptosis en la mayoría de los tipos celulares y en respuesta a casi todos los estímulos apoptóticos (Arnoult, 2007; Autret y Martin, 2009). Las isoformas de Opa-1 que contienen al exón 4 evolutivamente conservado modulan la actividad de fusión y mantienen el $\Delta\psi_m$. Sin embargo, lo que resulta destacable en la relación de la dinámica mitocondrial con la

apoptosis es que las isoformas de Opa-1 que poseen los exones específicos de vertebrados, 4b y 5b, serían las encargadas de evitar la liberación de citocromo c contenido en las crestas mitocondriales (Liesa et al., 2009). Esto se debe a que las formas largas y las cortas de Opa-1 forman complejos que regulan el diámetro de las uniones entre las crestas manteniendo su correcta arquitectura (Wasilewski y Scorrano, 2009).

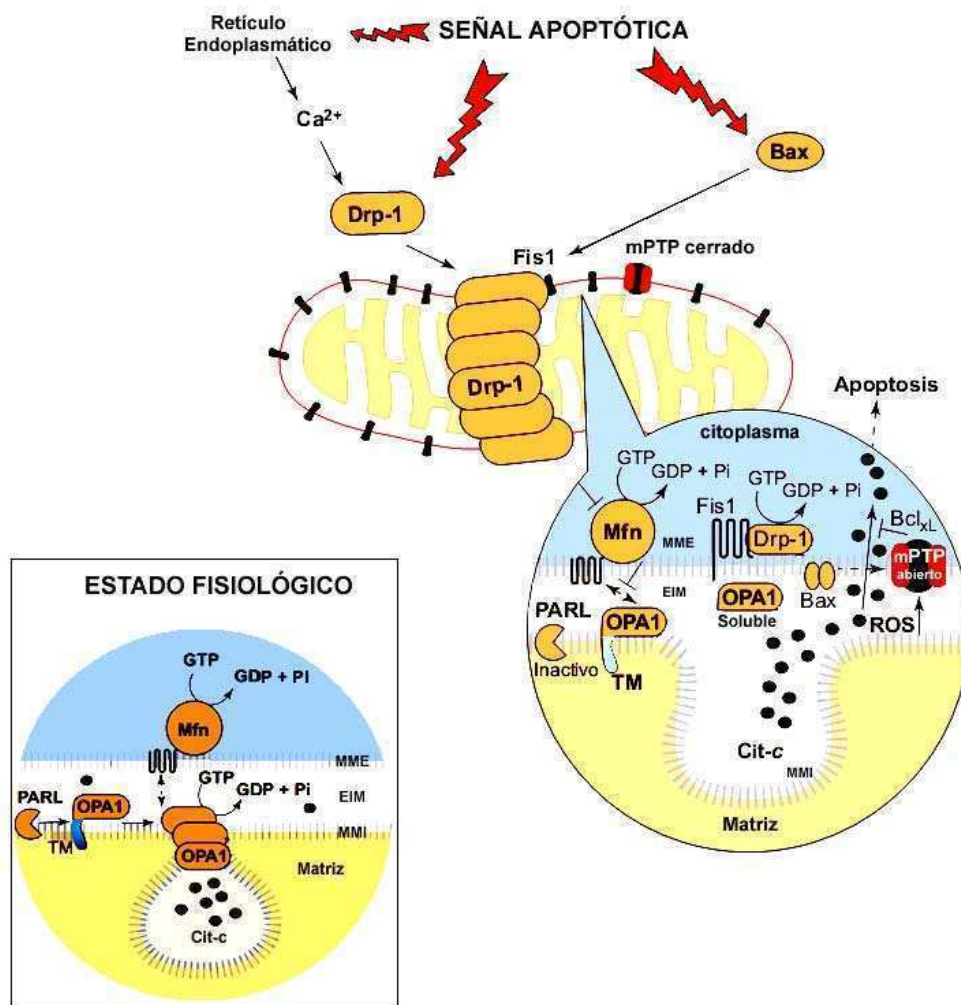


Figura 9. Modelo esquemático de la fisión mitocondrial durante la apoptosis
 Algunas señales apoptóticas inducen la translocación de Drp-1 y Bax a la MME facilitando la permeabilización de esta organela (MOMP). Por su parte, los complejos de Opa-1 se desensamblan contribuyendo a la remodelación de las crestas y por consiguiente a la liberación de citocromo c desde la MMI al EIM y finalmente al citoplasma a través de distintos poros (Bax/Bak; PTP) ubicados en la MME. (Adaptado de Bossy-Wetzel, 2003).

Durante la apoptosis, se produce un desbalance en el equilibrio fusión/fisión hacia una fisión exacerbada, dando lugar a la fragmentación de las redes filamentosas que conforman las mitocondrias a lo largo de la célula. Además, se induce el desensamblaje de los complejos que forma Opa-1, cuya consecuencia es el remodelamiento de las crestas mitocondriales (que incluye apertura de las estrechas uniones crestales). Esto lleva a la redistribución del citocromo c que en condiciones normales se encuentra allí contenido (85% del total), culminando con su liberación al EIM y finalmente al citoplasma debido a la MOMP (**Figura 9**) (Scorrano, 2009).

Por lo tanto, durante la apoptosis, tienen lugar la fragmentación, la MOMP y el remodelamiento de las crestas, como consecuencia de cambios estructurales y bioquímicos en la mitocondria. Sin embargo, no están completamente dilucidados la secuencia temporal ni los nexos existentes entre estos eventos.

Los miembros de la familia Bcl-2 están implicados en la regulación de la fisión y fusión mitocondrial durante la apoptosis. En un estudio pionero, Karbowski et al. (2002), demostraron que Bax co-localiza en la MME con componentes de la maquinaria de fusión y fisión (Mfn-2 y Drp-1 respectivamente) durante la apoptosis inducida por estrés. Adicionalmente, Brooks et al. (2007) encontraron que Bak interactúa con Mfn-1 y Mfn-2 y que ante un estímulo apoptótico Bak se disocia de Mfn-2 y se asocia con Mfn-1. Sus resultados muestran una correlación entre la actividad de pro-fisión de Bak y su disociación de la Mfn-2 y sugieren que dicha disociación podría disminuir la actividad de fusión de la Mfn-2 induciendo así la fragmentación mitocondrial. Una función similar se ha reportado para Bax quien también es capaz de inhibir la actividad de fusión de Mfn-2 durante la apoptosis (Liesa et al., 2009). Existen varios reportes que indican que Bcl-x_L induce la fusión

mitocondrial protegiendo contra la apoptosis. Por otra parte, se ha detectado que tBid promueve la proteólisis de los complejos de Opa-1 (Frezza et al., 2006).

Así, la fragmentación mitocondrial estaría regulada por moduladores apoptóticos a través de la inhibición de la fusión o activación de la fisión mitocondrial, procesos que participan en la progresión de la apoptosis.

Si bien aún no se ha alcanzado un consenso en relación a esta temática, colectivamente las evidencias indican que perturbaciones en el balance de las interacciones entre miembros de la familia Bcl-2, aún cuando no conduzcan a la apoptosis, producen un impacto en la conectividad de la red mitocondrial. Esto indica que las proteínas Bcl-2 pueden actuar como reguladores de la morfogénesis mitocondrial independientemente de su rol en la apoptosis.

2.4. Dinámica Mitocondrial y Neurodegeneración

La desregulación del equilibrio entre los eventos de fusión y fisión mitocondrial tienen impacto en una amplia variedad de patologías humanas. Entre ellas, ya hemos mencionado previamente a la ADOA y a CMT 2A; sin embargo existen otras enfermedades neurodegenerativas que afectan a diferentes regiones tanto del sistema nervioso cerebral como periférico (Chen y Chan, 2009).

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra. Si bien la mayoría de los casos son idiopáticos, aproximadamente un ~10% es hereditario. En ésta última forma de la enfermedad, se han identificado dos genes pink1 y parkina que resultan ser importantes en el mantenimiento de la integridad mitocondrial. Pink1 es una serina treonina quinasa localizada tanto en el citosol como en la MME y Parkina es una ubiquitina E3 ligasa.

Reportes previos indican que en diversos modelos de Parkinson, la disminución de la expresión de Pink1 origina anomalías en la morfología mitocondrial aunque estos efectos varían según el tipo celular estudiado. En el caso de fibroblastos de pacientes con EP, se ha reportado la presencia de mitocondrias fragmentadas, al igual que en cultivos de células HeLa o de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) KO para el gen pink1. Contrariamente, se ha observado un incremento en la longitud de las redes mitocondriales en células Cos7 KO para el gen pink1 donde el efecto era suprimido por sobre-expresión de Fis-1 o Drp-1. Ratones KO para los genes pink1 o parkina resultaron tener fenotipos sutiles; en cambio, los correspondientes mutantes en *Drosophila melanogaster* exhibieron severas disfunciones mitocondriales en múltiples tejidos. Ambas mutaciones dieron origen a degeneraciones en los músculos del vuelo, acompañados de mitocondrias hinchadas con crestas afectadas. En base a estos ensayos, se ha sugerido que Pink1 y Parkina promueven la fisión mitocondrial o inhiben la fusión, ya que la sobre-expresión de Drp-1 o la “down-regulation” de Opa-1 o Mfn-2 revertía los efectos descritos previamente en las moscas mutantes en pink1 o parkina. Las observaciones en conjunto indicaron la existencia de una relación de Pink1 y Parkina con los procesos de fusión y fisión mitocondrial (Chen y Chan, 2009).

La enfermedad de Alzheimer es otra de las neurodegenerativas en las cuales se han focalizado varios grupos de investigación para estudiar la posible implicancia de alteraciones en la dinámica mitocondrial. Esta enfermedad se caracteriza por la disfunción cognitiva y falta de memoria causada por la muerte neuronal en el cortex cerebral, además de la acumulación de placas β -amiloides ($A\beta$). Se han determinado anomalías en la estructura mitocondrial en cerebros de pacientes con Alzheimer. La exposición de células neuronales a medios condicionados derivados de otras que expresaban de manera estable una mutante de la proteína

precursora de A β exhibieron un incremento de la fisión mitocondrial, incremento de los niveles de Drp-1 y muerte celular. De manera contraria, otro estudio en fibroblastos de pacientes con Alzheimer esporádico expresaban bajos niveles de Drp-1 y presentaban mitocondrias elongadas. Sin embargo, el mismo grupo de investigación halló que la sobre-expresión de la proteína precursora de A β en células M17 de neuroblastoma resultó en una fragmentación exacerbada, disminución de los niveles de Opa-1 y translocación de Drp-1 a las mitocondrias (Chen y Chan, 2009; Wang et al., 2009).

La enfermedad de Huntington es una enfermedad autosómica dominante caracterizada por la pérdida de neuronas corticales y estriatales. La proteína afectada por mutación en su gen es la Huntingtina que está relacionada con la dinámica mitocondrial. Así, en ensayos empleando neuronas corticales de rata o células HeLa sobre-expresando la proteína mutada, se observó la presencia de mitocondrias fragmentadas, reducción de los niveles de ATP y muerte celular incrementada (Chen y Chan, 2009).

Colectivamente, los antecedentes descritos muestran que la fisión mitocondrial puede constituir un mecanismo subyacente en diversos desórdenes neurodegenerativos. De todos modos, el área de investigación que implica a la morfología mitocondrial es relativamente joven y es probable que en los próximos años se identifiquen nuevas proteínas sean identificadas, las cuales seguramente ayudarán a un mejor entendimiento de estos complejos mecanismos. Por dicha razón, las contribuciones a este conocimiento prometen detectar blancos para potenciales terapias contra éste tipo de patologías.

3. Neurotoxicidad

3.1. Generalidades del sistema nervioso

El SNC está formado por el encéfalo y la médula espinal. El encéfalo se divide en seis partes: el cerebro, el diencefalo, el mesencefalo, el cerebelo, la protuberancia y el bulbo raquídeo (Guyton, 1995).

El cerebro (o telencefalo) está compuesto por dos grandes masas bilaterales que constituyen los hemisferios cerebrales, conectados entre sí por medio de varios haces de fibras nerviosas, entre los cuales, los más importantes son el cuerpo calloso y la comisura anterior. De hecho, cuando estos dos se encuentran dañados, cada hemisferio funciona como un encéfalo separado, incluso con pensamientos y reacciones independientes en ambos lados del cuerpo (Guyton, 1995).

En cuanto a la estructura interna del cerebro, se distinguen dos zonas denominadas sustancia gris y sustancia blanca. La primera está formada por un gran número de cuerpos celulares neuronales, que en su conjunto presentan un tono grisáceo. Por su parte, la sustancia blanca está compuesta por grandes fibras nerviosas que se dirigen a las neuronas de la sustancia gris o provienen de ellas y su aspecto blanco es conferido por las vainas de mielina que recubren las fibras. Una delgada capa de sustancia gris cubre toda la superficie del cerebro incluidas las fisuras y surcos y se trata de la corteza cerebral (Guyton, 1995).

Existen áreas de la sustancia gris denominadas “*núcleos*” que corresponden a conjuntos de cuerpos de células nerviosas. Dos de éstos son el *tálamo* (el cual está compuesto por múltiples núcleos pequeños y forma parte del diencefalo) y los *ganglios basales*, que forman parte del cerebro (Guyton, 1995).

Los ganglios basales consisten en varios núcleos subcorticales interconectados con proyecciones hacia la corteza, tálamo y tallo cerebral (**Figura 10A**). Tradicionalmente se los asociaba con el movimiento voluntario. Sin embargo,

hoy en día está ampliamente aceptado que a través de su interacción con la corteza, contribuyen a una variedad de comportamientos que incluyen esquelomotor, óculo-motor, cognitivo y funciones emocionales. Son varias las razones que apuntan a su diversidad de funciones. En primer lugar, ciertas lesiones en los ganglios basales, ya sea experimentales o relacionadas a enfermedades, producen efectos emocionales, comportamentales y cognitivos, reconocidos inicialmente en pacientes con EP y Huntington. En segundo lugar, los ganglios basales tienen conexiones altamente organizadas con la mayor parte de la corteza, así como con el hipocampo y la amígdala. Por último, una amplia gama de comportamientos motores y no motores han sido correlacionados con la actividad individual de neuronas de los ganglios basales en estudios experimentales con animales y de imagen en humanos (Kandel et al., 2000).

Los cuatro ganglios basales principales son: el estriado, el globo pálido, el núcleo subtalámico y la sustancia negra (**Figura 11B**).

El *estriado* consiste en tres subdivisiones importantes del mismo origen embriológico: el núcleo caudado, el putamen y el estriado ventral (que incluye al núcleo accumbens). Es el principal ganglio basal que recibe “inputs” provenientes de la corteza, del tálamo y del tallo cerebral y sus neuronas proyectan al globo pálido y a la sustancia negra. Aunque contiene diversos tipos celulares, entre el 90 y 95% corresponde a neuronas GABAérgicas, las cuales suelen ser quiescentes excepto durante el movimiento corporal o en respuesta a un estímulo periférico.

El *globo pálido* se encuentra medial al putamen, lateral a la cápsula interna, se divide en segmentos externo e interno y es rico en neuronas GABAérgicas.

La *sustancia negra* está compuesta por la pars reticulata (relacionada funcionalmente con el segmento interno del globo pálido) y la pars compacta. Esta

última zona se halla dorsal a la reticular, sus neuronas son dopaminérgicas y contienen neuromelanina, un pigmento oscuro derivado de la dopamina oxidada.

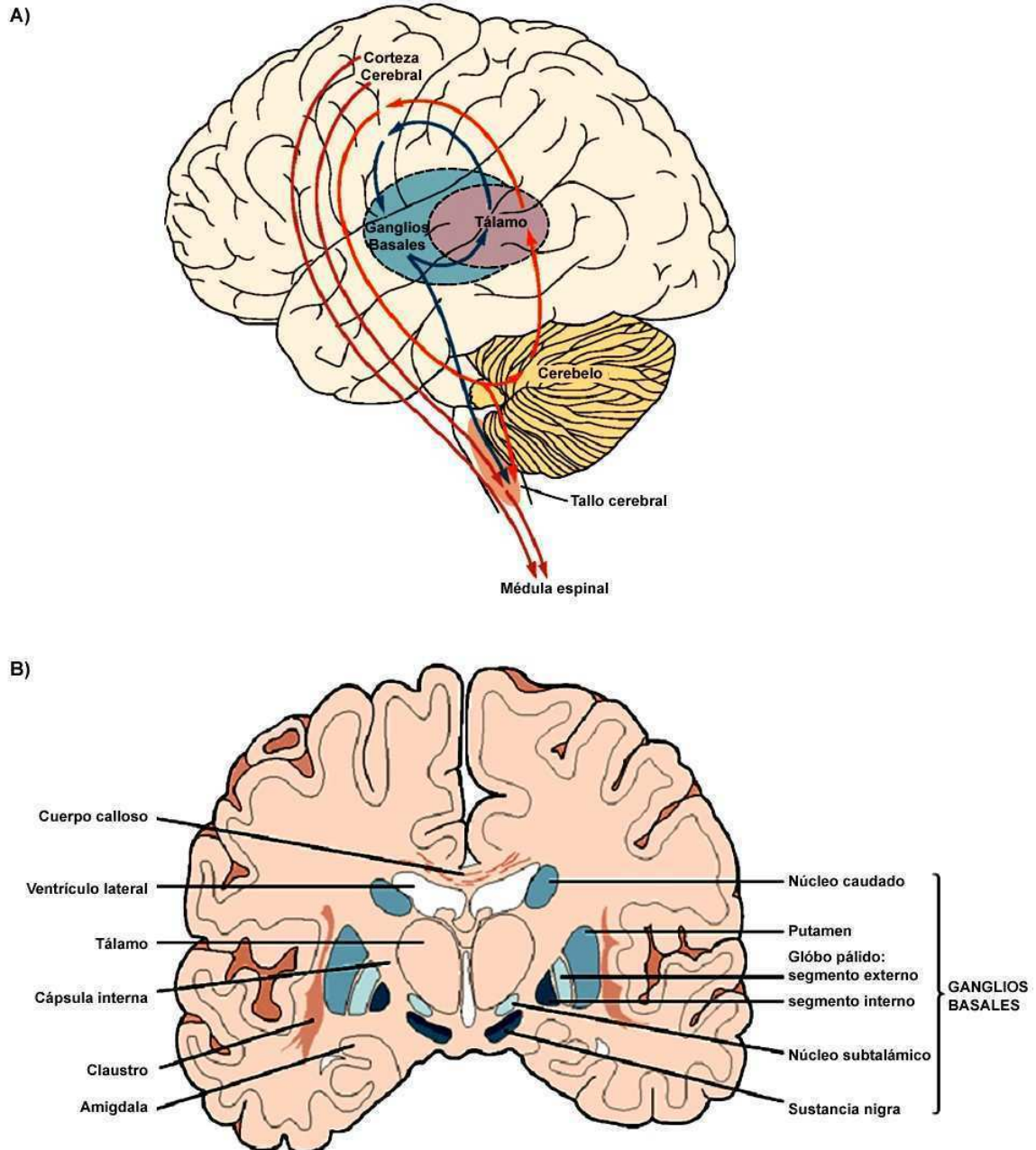


Figura 10. Ganglios Basales

A) Relación entre los ganglios basales y los principales componentes del sistema motor. Las flechas de colores indican que los ganglios basales y el cerebelo reciben “inputs” de la corteza cerebral. A su vez, éstos devuelven información a la corteza. La integración y elaboración de dicha información proveniente de los ganglios basales es la base de la correcta ejecución del movimiento. **B)** Corte coronal del cerebro donde se observan los ganglios basales y su relación con las estructuras circundantes. Adaptado de Kandel et al. (2000).

El *núcleo subtalámico* está relacionado anatómicamente con ambos segmentos del globo pálido, se encuentra justo debajo del tálamo y por encima de la porción anterior de la sustancia negra. Las células glutaminérgicas de este núcleo son las únicas que envían proyecciones excitatorias desde los ganglios basales (Kandel et al., 2000).

3.2. Manganeseo

El manganeseo (Mn) es un elemento abundante en la corteza terrestre que se encuentra frecuentemente bajo la forma de óxidos, carbonatos y silicatos. Es considerado uno de los siete metales esenciales en la fisiología animal, requerido para el correcto metabolismo de aminoácidos, lípidos y carbohidratos. Algunas enzimas dependientes de manganeseo son la arginasa, glutamina sintetasa, fosfoenolpiruvato decarboxilasa y la enzima antioxidante Mn-superóxido dismutasa (MnSOD) (Benedetto et al., 2009). Este metal es necesario para el correcto funcionamiento del sistema inmune, la regulación de los niveles de azúcar en sangre, la reproducción, digestión, crecimiento de huesos y defensa contra los radicales libres (Aschner y Aschner, 2005).

La Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos (National Academy of Sciences, 2001) ha establecido los parámetros adecuados de ingesta de Mn en humanos, siendo en hombres y mujeres adultos de 2,3 y 1,8 mg/día, respectivamente. Mientras tanto, durante el período de desarrollo corporal, el consumo varía desde 3 µg/día para recién nacidos y 600 µg/día para el período de 7-12 meses hasta 1,2-1,5 mg/día para niños entre 1 a 8 años de edad. En adultos, se calcula que entre el 1-5% del Mn ingerido es normalmente absorbido por el sistema gastrointestinal. La principal vía de excreción es la biliar, la cual suele ser pobre o nula en algunos mamíferos neonatos. Por su parte, las vías de excreción

pancreática y urinaria contribuyen tan solo con una pequeña fracción del Mn absorbido (Aschner y Achner, 2005).

El rango normal de concentración de Mn en tejidos de mamíferos varía entre 0,3-2,9 µg/gr de tejido húmedo. Se han cuantificado altas concentraciones de Mn en tejidos con gran demanda energética (ejemplo, el cerebro) y alto contenido de pigmentos (ejemplos, la retina, la piel morena y el pelo oscuro) como también el hueso, el hígado, el páncreas y los riñones (Aschner y Aschner, 2005).

En el plasma, el Mn^{2+} circula unido a proteínas tales como la γ -globulina y la albúmina y sólo una pequeña fracción del mismo, en estado trivalente, se une a la proteína transferrina transportadora de hierro. De este modo, el estado de oxidación del Mn determina a qué enzima se va a unir (Aschner y Aschner, 2005).

Los mecanismos de transporte de Mn al interior de la célula son similares a los que utiliza el hierro. Estos pueden ser tanto dependientes como independientes de transferrina. En el primer caso, el Mn^{3+} unido a transferrina se une al receptor de esta proteína (TfR) en la membrana celular y posteriormente el complejo es internalizado. La acidificación de las vesículas endosomales promueve la liberación de Mn^{3+} , el cual debe sufrir una reducción a Mn^{2+} para poder atravesar la membrana del endosoma a través del transportador de metales divalentes-1 (DMT-1). También existe la posibilidad de que el Mn^{2+} sea captado por la célula desde el medio extracelular por mecanismos independientes de transferrina en los cuales está también involucrado el transportador DMT-1, además de canales de calcio voltaje dependientes, canales de calcio sensibles a glutamato y el miembro 8 (ZIP8), de la familia transportadora de metales denominada Carrier de Solutos-39 (SC-39) (**Figura 11**) (Aschner, 2006; Au et al., 2008).

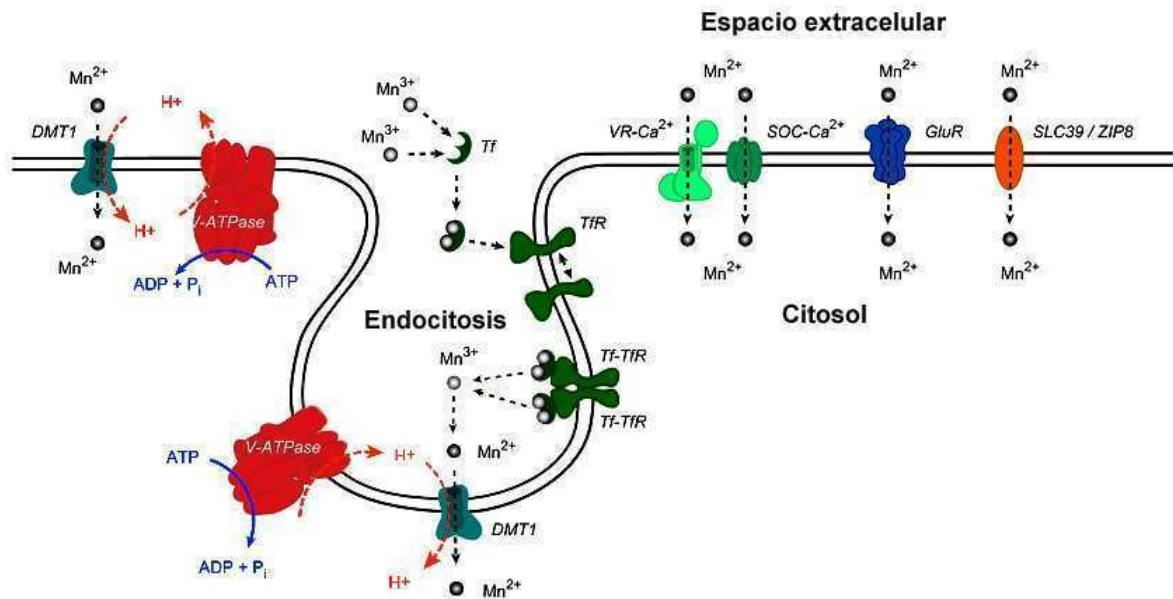


Figura 11. Mecanismos de transporte intracelular del Mn

El Mn ingresa a las células por vías que requieren del transportador DMT-1 y que pueden ser dependientes o independientes de transferrina (Tf) y su receptor (TfR). Alternativamente, la entrada de Mn puede llevarse a cabo a través de canales de calcio voltaje-dependientes ($VR-Ca^{2+}$), operados por depósito ($SOC-Ca^{2+}$) y del receptor de glutamato (GluR). Adaptado de Au et al. (2008).

El Mn puede acceder al cerebro atravesando la barrera hematoencefálica, ya que las células endoteliales expresan TfR y DMT-1 (Aschner, 2006). A su vez, tiene una vía de entrada a este órgano sin involucrar a la sangre, a través del transporte axonal desde las neuronas sensoriales ubicadas en el epitalio nasal y que proyectan hacia el bulbo olfatorio, accediendo directamente al SNC (Tjalve y Henriksson, 1999).

Una baja incorporación de Mn en la dieta contribuye a alteraciones en el crecimiento corporal, escasa formación de huesos y defectos en el esqueleto, fertilidad reducida, anormal tolerancia a la glucosa y alteración en el metabolismo de lípidos y carbohidratos. De todos modos, si bien los estados de deficiencia de Mn no han sido completamente descritos en humanos, se conoce más acerca de aquellos generados por exposición a niveles elevados de este metal, causantes de la neurotoxicidad denominada *Manganismo* (Aschner y Aschner, 2005).

3.3. Manganismo

En 1817, el británico James Parkinson publicó en su monografía titulada “*An Essay on the Shaking Palsy*”, descripciones acerca de un desorden neurológico conocido hasta hoy en día como *Enfermedad de Parkinson*, donde detalló cinco casos con parálisis agitante, un término poco utilizado por los médicos de aquel entonces (Parkinson, 1817). Luego de la enfermedad de Alzheimer, la EP es la neurodegenerativa con mayor incidencia principalmente en la población de la tercera edad. El 90% de los casos de EP se denominan idiopáticos o esporádicos y corresponden a aquellos sin un claro componente familiar hereditario detectable, mientras que el 10% es genético (de Lau y Breteler, 2006). La EP se caracteriza por alteraciones motoras severas debido principalmente al deterioro de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra. La dopamina es un neurotransmisor de la familia de las catecolaminas que contribuye a la precisión de los movimientos y la coordinación de los cambios de postura en los mamíferos por su acción en los circuitos de los ganglios basales (de Lau y Breteler, 2006).

En 1837, John Couper describió por primera vez los síntomas de la toxicidad debida a Mn en individuos que trabajaban en la fábrica química “Charles Tennant and Co” en Escocia. Couper en su trabajo denominado “*On the effects of black oxide of manganese when inhaled in the lungs*”, comentó: “un considerable número de empleados que se encargaban de la molienda de óxido de manganeso para la fabricación de polvo de blanqueo tenían la superficie corporal completamente cubierta de Mn. El aire que estas personas inhalaban estaba cargado de Mn bajo la forma de finas partículas de polvo y además, debido a la falta de limpieza del ambiente, éstas eran ingeridas junto con la comida”. Así mismo, en su reseña especificó que los individuos manifestaban debilidad muscular, paraplegia, temblor

en las extremidades, una tendencia a inclinarse hacia adelante mientras caminaban y salivación (Couper, 1837).

En 1955, Rodier publicó un estudio que ha sido ampliamente citado en trabajos referentes a deterioros en el SNC por exposición crónica al Mn. En él, comentó que durante el período transcurrido entre las descripciones de Couper hasta entonces, el Mn ha sido reconocido como “veneno que afecta al sistema nervioso aunque menos conocido respecto a otros venenos metálicos”. La publicación de este autor se basó en estudios realizados en 3849 trabajadores de tres minas en Marruecos y en base a su seguimiento a lo largo de los años, pudo establecer que la evolución de la toxicidad por Mn suele ser lenta y puede ser dividida en tres estadios.

Si bien no han sido muchos los reportes epidemiológicos llevados a cabo en el mundo, Roth (2009) ha revisado la información que describe la sintomatología que manifiestan los individuos intoxicados con Mn. Así, la primera etapa del Manganismo está marcada por disturbios emocionales y cognitivos caracterizados por excitación, cambios de humor, irritabilidad, comportamiento compulsivo, déficit intelectual y en algunos casos, cambios en la capacidad de escribir. Una exposición continua da lugar a una segunda etapa caracterizada por una mayor injuria neurológica, anorexia, debilidad, comportamiento psicótico más severo, dificultad en el habla, reducción de la expresión facial y torpeza general. En el período final, la enfermedad se caracteriza por deterioros neurológicos más agudos respecto a los de la etapa anterior que generan incapacidades motoras. Entre estos se incluye, la rigidez de miembros, temblor leve, distonía de mayor frecuencia a la observada en la EP, trastornos en la marcha con una característica distintiva que se ha denominado "marcha de gallo" ya que los individuos caminan flexionando los codos y con la espalda erguida (Roth, 2009).

Los principales grupos de riesgo corresponden a individuos que están expuestos a Mn en su lugar de trabajo. Se han registrado casos de Manganismo en trabajadores de fábricas de baterías, de reparación de automóviles y en minas. Por otra parte, el Mn también puede combinarse con carbono para producir compuestos orgánicos entre los que se incluyen pesticidas, tales como el maneb o mancozeb y el metilciclopentadienil manganeso tricarbonil (MMT), un aditivo que mejora el rendimiento de las gasolinas (Benedetto et al., 2009; Checkoway, 2010).

Existen otros grupos de individuos que manifiestan neurotoxicidad por Mn no relacionada a exposición ocupacional, como las personas que ingieren agua corriente con altas concentraciones de metales entre los cuales se encuentra el Mn (Hafeman et al., 2007). Además, se han reportado casos en adictos a una droga psico-estimulante llamada efedrona o cocktail ruso. Esta droga consiste en una mezcla química casera no purificada basada en la efedrina. Los adictos incorporan desde miligramos a gramos de Mn en las sucesivas inyecciones, alcanzando en pocas semanas, concentraciones en sangre de este metal de $\sim 2.000-3.000\mu\text{g/L}$, siendo los valores de referencia $\leq 10-12\mu\text{g/L}$. Así mismo, existe documentación de pacientes con enfermedades hepáticas (ejemplo, cirrosis) que manifiestan parkinsonismo inducido por Mn debido a las fallas en la excreción de este metal y por ende, su acumulación en el cerebro (Guilarte, 2010).

El Manganismo se caracteriza por la acumulación de niveles elevados de Mn en los ganglios basales. A diferencia de la EP, donde la degeneración de neuronas dopaminérgicas ocurre en la sustancia negra, el Mn produce inicialmente daño en el globo pálido, dando lugar a una disminución de la inervación de neuronas GABAérgicas al núcleo subtalámico y consecuentemente, a una desregulación de liberación de glutamato (Olanow, 2004). Las neuronas del globo pálido constituyen un blanco selectivo del Mn por recibir “inputs” glutaminérgicos del núcleo

subtalámico. Dado que tanto el glutamato como el Mn son capaces de producir citotoxicidad, la combinación de ambos en el globo pálido podría aumentar el daño neuronal (Roth, 2009).

Por lo tanto, si bien la etiología subyacente del Manganismo y de la EP es diferente, ambas están asociadas con disfunciones neurológicas relacionadas a los ganglios basales. Puesto que esta área del SNC es compleja y dependiente del balance de muchos neurotransmisores, no resulta sorprendente que los síntomas de ambas patologías se superpongan, sobre todo considerando aquellos del período más avanzado del Manganismo, donde el daño se propaga a las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (Roth, 2009). Este hecho sumado al escaso conocimiento y divulgación que se tiene sobre el Manganismo hace que muchas veces los diagnósticos se confundan.

Desde una perspectiva clínica, muchos de los individuos ocupacionalmente expuestos a Mn, adictos a la efedrona y pacientes con enfermedades hepáticas suelen presentar una respuesta baja o nula al fármaco L-DOPA (precursor inmediato de la dopamina capaz de atravesar la barrera hematoencefálica) al igual que ocurre en aquellos que padecen EP (Guilarte, 2010).

En cuanto al mecanismo de citotoxicidad del Mn se ha demostrado la ocurrencia de muerte apoptótica en numerosas líneas celulares: células B humanas, HeLa, feocromocitoma de rata (PC12), neuroblastoma humano (SH-SY5Y), células madre neuronales, fibroblastos de ratón (NIH3T3) y astrocitos corticales de rata (Alaimo et al., 2011 y referencias allí citadas). Sin embargo, el mecanismo molecular subyacente por el cual produce apoptosis no ha sido completamente elucidado.

El Estrés Oxidativo (EO) y sus efectos en el metabolismo energético mitocondrial han sido descritos en muchos procesos patológicos y especialmente en condiciones neurodegenerativas como la EP y Alzheimer. Así mismo, ha sido

implicado como un mecanismo contribuidor por el cual el Mn media sus efectos citotóxicos (Dobson et al., 2004). A nivel subcelular, el Mn es mayormente (60-70%) secuestrado por las mitocondrias a través de uniporters de calcio. Dentro de la organela, este metal tiene la capacidad de inhibir la fosforilación oxidativa y la actividad de los complejos de la cadena respiratoria, generando exceso de ROS y disminución de ATP (Roth, 2009). A su vez, se ha reportado que el Mn promueve la generación de 6-hidroxidopamina *in vitro* y otras catecolaminas tóxicas y disminuye el contenido de peroxidasa y catalasa en la sustancia negra (Takeda, 2003; Benedetto et al., 2009). Estos resultados avalan la participación del estrés oxidativo en la citotoxicidad inducida por Mn.

4. Glía

Durante mucho tiempo, los estudios acerca del sistema nervioso se encararon desde un punto de vista “neuro-céntrico” en concordancia con el nombre de la disciplina científica “Neurociencias”. Esto significa que los investigadores se focalizaban mayormente en el estudio de las neuronas postergando aquellos que implicaban a la glia.

Afortunadamente, en las dos últimas décadas se ha avanzado en el reconocimiento de la importancia de otros tipos celulares del sistema nervioso y su relación simbiótica con las células neuronales. Así, desde hace dos décadas, se ha ido incrementando el conocimiento sobre la morfología, las propiedades fisiológicas y las funciones de las células gliales, demostrando que estas contribuyen de manera crucial con la formación, función y adaptación del circuito neuronal. De este modo, a partir del cambio en las doctrinas de estudio y en las percepciones acerca de las patologías cerebrales, muchos neurocientíficos se han centrado en el estudio de células gliales, ya que fallas en su funcionamiento condicionarían la

supervivencia neuronal y por ende, influenciarían el grado de déficit neurológico (Giaume et al., 2007; Allen y Barres, 2009).

4.1. Características generales y clasificación

Las células gliales están conservadas evolutivamente ya que están presentes en todas las especies analizadas, desde el más simple invertebrado hasta humanos. La proporción de la glía con respecto al total de células del cerebro, depende de la especie animal y representa el 25% en *Drosophila*, 65% en ratones, 90% en humanos y en elefantes alcanza el 95%, mientras que los nematodos presentan tan sólo unas pocas. A medida que los animales han ido evolucionando, las células gliales se han diversificado, especializado y han adquirido una esencialidad tal que sin ellas, las neuronas son deficientes funcionalmente (Allen y Barres, 2009). De este modo, los avances filogenéticos en cuanto a la complejidad y a las capacidades del cerebro coinciden con un incremento en el número de células gliales (Giaume et al., 2007).

Durante mucho tiempo, la visión tradicional del rol de la glía en el sistema nervioso era meramente la protección y el mantenimiento de la correcta funcionalidad de las neuronas, lo cual las etiquetaba como células pasivas. Sin embargo, este concepto de pasividad fue desechado al incrementarse el conocimiento sobre el aspecto, propiedades fisiológicas y funciones de la glía, lo que contribuyó con el aprendizaje de que éstas células son tan diversas como las neuronas (Giaume et al., 2007).

Las células gliales se clasifican en macro y microglia (**Figura 12**).

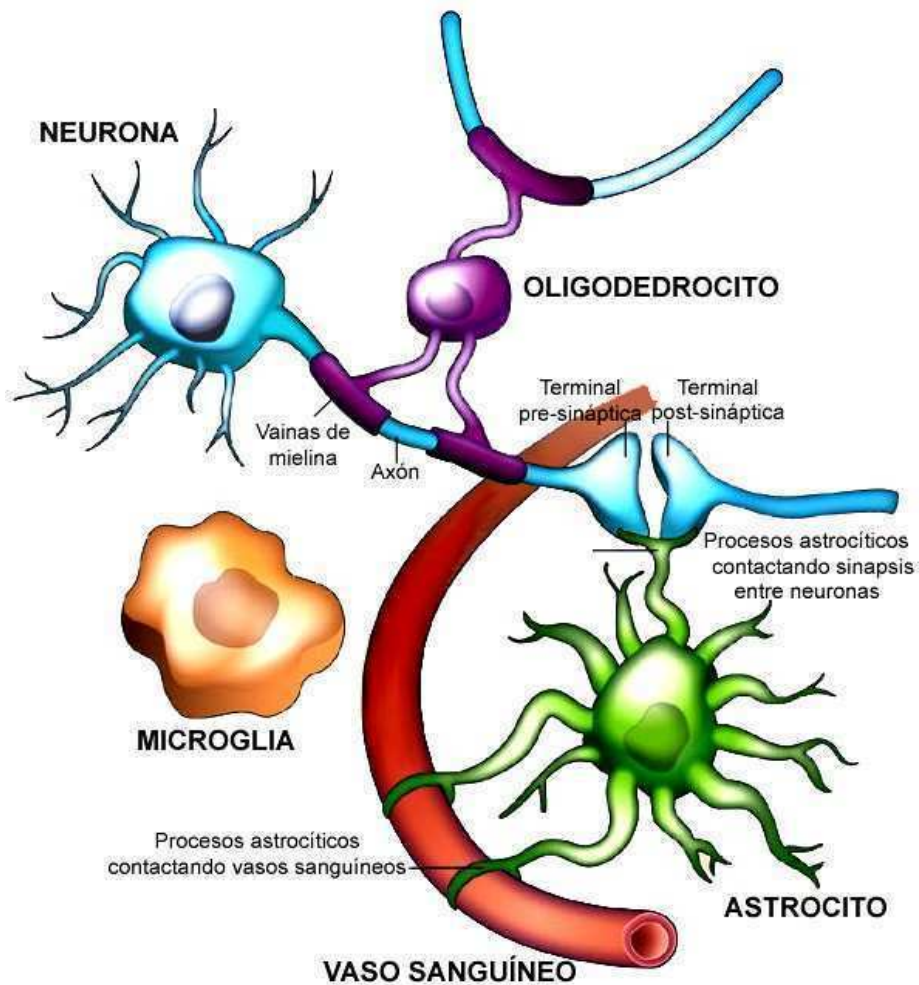


Figura 12. Células Gliales

Diferentes tipos de células gliales interactúan con neuronas y vasos sanguíneos circundantes. Los oligodendrocitos forman la vaina de mielina que envuelve los axones de las neuronas, lo cual contribuye a acelerar la transmisión neuronal. Los astrocitos extienden sus procesos y contactan vasos sanguíneos y sinapsis neuronales. La microglía mantiene al cerebro bajo vigilancia contra daños o infecciones. Adaptado de Allen y Barres (2009).

La *microglía* es de origen mesodérmico, más específicamente hematopoyético. Estas células son parte del sistema inmune y penetran en el cerebro desde la circulación sanguínea muy tempranamente en el desarrollo del organismo (Rowitch y Kriegstein, 2010). Su función es el reconocimiento de daños e infecciones cerebrales fagocitando células muertas y debris, pero también están implicadas en la remodelación sináptica durante el desarrollo del sistema nervioso,

ya que remueven conexiones inapropiadas a través del proceso de fagocitosis (Allen y Barres, 2009).

Los principales componentes de la *macroglia* son los oligodendrocitos y los astrocitos y se encuentran en todo el SNC. Junto con las neuronas, estas células comparten precursores que derivan del neuroectodermo (Rowitch y Kriegstein, 2010).

Los *oligodendrocitos* maduros expresan dos proteínas que los identifican: proteína proteolípida 1 (PLP1) y la proteína *adenomatous polyposis coli* (APC). Son células más pequeñas que los astrocitos, con pocas prolongaciones y su función es la de formar una vaina lipídica llamada mielina que envuelve a los axones de las neuronas y agiliza la conducción de los impulsos nerviosos (Allen y Barres, 2009; Rowitch y Kriegstein, 2010).

Los *astrocitos* maduros pueden dividirse en dos tipos: fibrosos y protoplasmáticos. Los primeros se hallan en la sustancia blanca del cerebro y se caracterizan por un aspecto estelar, por poseer gran cantidad de material fibroso y asociarse a los axones neuronales. Por su parte, los protoplasmáticos que están estrechamente asociados a los somas neuronales y sinapsis, residen en la sustancia gris, poseen poco material fibroso y procesos con apariencia irregular y breñosa. Ambos tipos se caracterizan por expresar a la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP), la cual es considerada como la proteína marcadora de astrocitos (Allen y Barres, 2009; Rowitch y Kriegstein, 2010).

Las células astrocíticas contribuyen a la homeostasis cerebral ya que proporcionan energía y sustratos a las neuronas para la neurotransmisión. Actúan como barreras entre las conexiones sinápticas de neuronas vecinas y remueven el exceso de moléculas neurotransmisoras del espacio extracelular, permitiendo de esta manera codificaciones precisas de las señales sinápticas. Así mismo, se ha

identificado que están involucradas en la formación de sinapsis y en la modulación de éstas a través de la comunicación bidireccional con las neuronas. Por otra parte, los astrocitos tienen la capacidad de comunicarse entre ellos y lo hacen a través de ondas de iones de calcio, lo que permite la propagación de la información a lo largo de grandes distancias. Así mismo, existe una comunicación bidireccional entre neuronas y astrocitos, ya que éstos últimos son capaces de contactar sinapsis neuronales. Por lo tanto, las sinapsis no consisten solamente en una neurona pre- y una post- sináptica, sino que además se incluye a las proyecciones astrocíticas que “envuelven” a la sinapsis. Esta estrecha relación espacial ha dado origen al término *sinápsis tripartita*, cuya localización de los astrocitos contribuye a que estos monitoreen y respondan a la actividad sináptica. Aún más, los astrocitos poseen varios de los mismos receptores de neurotransmisores presentes en las células neuronales. Dichos neurotransmisores liberados por las neuronas activan cascadas de señales de calcio en los astrocitos y promueven la liberación de sustancias que pueden actuar como estimulantes o inhibidoras de la actividad neuronal (**Figura 13**) (Allen y Barren, 2009; Smith, 2010).

Otra de las funciones de los astrocitos es el control del flujo de sangre a través de sus procesos, los cuales forman asociaciones con los vasos sanguíneos y las neuronas. En respuesta a una actividad neuronal incrementada, los astrocitos regulan el flujo sanguíneo promoviendo la distribución de oxígeno y glucosa hacia la zona activa del cerebro (Giaume et al., 2007; Allen y Barren, 2009).

Durante la actividad neuronal, los iones de K^+ son transferidos desde el citoplasma al espacio extracelular. Los astrocitos tienen la capacidad de remover el exceso de K^+ del espacio extracelular de modo que controlan la excitabilidad neuronal (Walz, 2000).

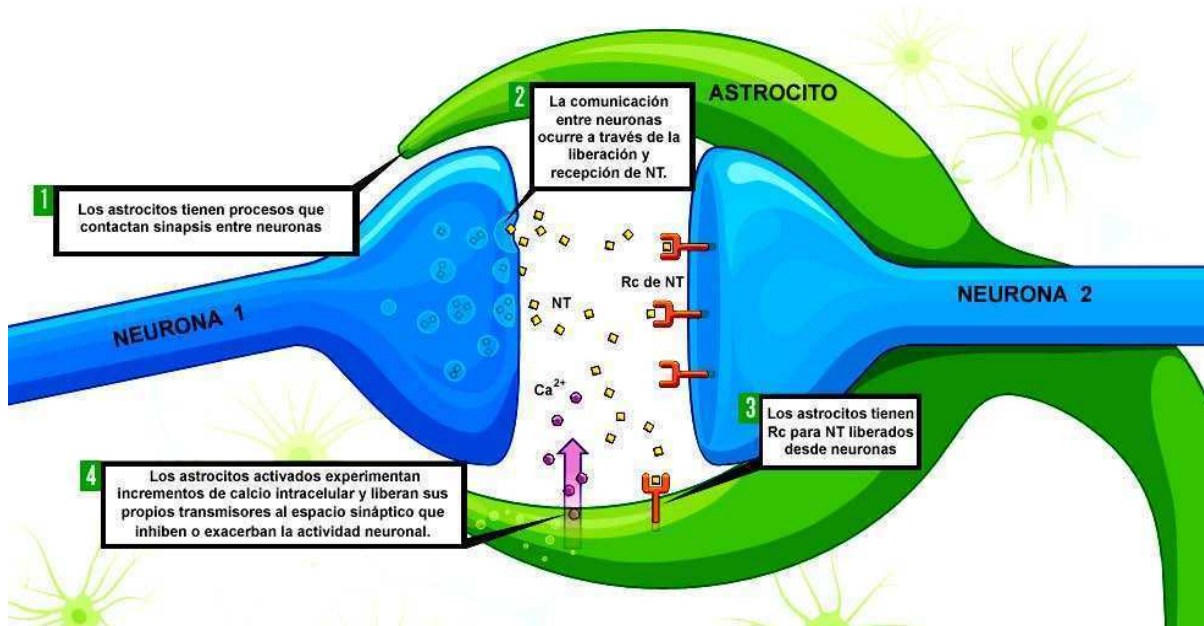


Figura 13. Sinapsis tripartita

Los astrocitos expresan varios de los mismos receptores que las neuronas. Cuando los neurotransmisores (NT) se liberan a la terminal pre-sináptica de una neurona, contactan a sus respectivos receptores en el post-sináptico (Rc). Además, los NT activan a los receptores de los astrocitos dando origen al incremento de los niveles intracelulares de calcio en estas células, con posterior liberación de sustancias activas que incrementan o inhiben la actividad neuronal. Adaptado de Allen y Barres (2009) y Smith (2010).

Por otro lado, los astrocitos responden típicamente a injurias en el sistema nervioso con un aumento de volumen, hipertrofia-hiperplasia (proceso conocido como astrogliosis) y proliferación (astrocitosis) (Montgomery, 1994). Este tipo celular conforma la principal defensa cerebral contra la excitotoxicidad mediada por glutamato debido a la presencia de numerosos transportadores en sus membranas. Este tipo celular posee alto contenido de antioxidantes como el glutatión y el ascorbato, de modo que protegen al cerebro contra la generación de ROS (Giaume et al., 2007).

A pesar de las funciones beneficiosas mencionadas anteriormente, los astrocitos poseen un “lado oscuro” frente una injuria cerebral. Es decir, si bien son capaces de secuestrar el exceso de glutamato, pueden convertirse en una fuente del mismo. La despolarización de la membrana del astrocito y el incremento del Na⁺

extracelular pueden revertir el transporte del glutamato, promoviendo su salida desde el interior de la célula. Por lo tanto, la contribución de los astrocitos en patologías cerebrales puede adoptar dos caras opuestas, es decir, protectora o deletérea (Giaume et al., 2007).

4.2. Astrocitos y metales

El cerebro es un órgano que concentra metales y estos suelen compartimentalizarse en la astroglia. Este tipo celular es reconocido como el principal sitio de acumulación de Pb, Mn, Hg y Cu (Wedler y Denman, 1984; Tiffany-Castiglioni y Qian, 2001).

Los astrocitos poseen varias características que le confieren la capacidad de servir de depósitos metálicos en el cerebro, como ser:

-una citoarquitectura que las posiciona como las primeras células en el parénquima cerebral en encontrar metales que atraviesan la barrera hematoencefálica.

-la presencia de altos niveles citoplasmáticos de metaloproteínas I y II que son ricas en cisteína y tienen alta afinidad por metales iónicos divalentes. De este modo, las metaloproteínas permiten que los astrocitos puedan quelar metales libres en el cerebro cumpliéndose así una acción neuroprotectora. A diferencia de los astrocitos, las neuronas poseen bajos niveles de metaloproteínas.

-la existencia de altos niveles de glutatión, un potente desintoxicante de metales pesados, que confiere mayor poder reductor al citoplasma.

-la localización de enzimas dependientes de metales: Cu-Zn-SOD, Mn-SOD y glutamina sintetasa.

-la presencia de transportadores de metales y/o proteínas transportadoras: ceruloplasmina y ATP7A.

Con respecto a la relación particular entre la astrogliya y el manganeso, el 80% de este metal se une a la enzima glutamina sintetasa presente en dicho tipo celular. Reportes previos indican que cultivos de astrocitos de pollo acumulan una concentración 200 veces mayor (niveles de al menos 50-75 μ M) que la extracelular (Tholey et al., 1988). Por su parte, Aschner et al. (1992) demostró que cultivos de primarios de astrocitos de ratas neonatales poseen un sistema de alta capacidad de transporte de Mn²⁺. Una vez que ingresa a los astrocitos, el Mn se acumula en las mitocondrias por transporte activo, donde se une a otras moléculas, tal como la MnSOD (Wedler et al., 1989).

De este modo, dada su capacidad de acumular Mn, los astrocitos son considerados un blanco en neuropatología asociado a la toxicidad por dicho metal (Tiffany-Castiglioni y Qian, 2001).

Hipótesis y Objetivos

1. Hipótesis de estudio

Los astrocitos son las células gliales más abundantes del cerebro. Si bien hasta hace poco tiempo se consideraba que actuaban como mero soporte de las neuronas, en los últimos años, se ha vuelto evidente que los astrocitos son responsables de una amplia variedad de funciones complejas y esenciales en el sistema nervioso, incluyendo roles primarios en la transmisión sináptica y procesamiento de la información mediante circuitos neurales. La abundancia de funciones descritas para estas células ha conducido a la noción emergente de que los astrocitos pueden constituir un blanco primario en la neurotoxicidad de varios compuestos y su disfunción puede causar muerte neuronal. Esta disfunción astrocítica está implicada en varias enfermedades neurodegenerativas tales como la EP, Alzheimer, Huntington e incluso Manganismo.

Estudios previos indican que, en algunos modelos experimentales, el Mn es pro-oxidante y genera muerte celular apoptótica comprometiendo la función mitocondrial. Sin embargo, las vías de señalización que operan en la muerte de astrocitos inducida por Mn no han sido completamente elucidadas y nada se ha investigado aún acerca del rol de la dinámica mitocondrial en modelos de Manganismo *in vivo* e *in vitro*.

En base a estos antecedentes, la hipótesis planteada en esta tesis propone que el Mn incorporado a los astrocitos induce la generación de especies reactivas de oxígeno las cuales desencadenan una respuesta de muerte celular. Dicha muerte procede, al menos en parte, por un mecanismo apoptótico comprometiendo las dos vías más importantes, la Extrínseca y la Intrínseca. Además de las moléculas clásicamente involucradas en la vía intrínseca, nosotros proponemos que las proteínas encargadas de regular la dinámica mitocondrial se encuentran desreguladas de manera que el Mn induce la fragmentación de estas organelas y

que este evento contribuye a la apoptosis. Así, aportamos una visión diferente en cuanto a las posibles moléculas blanco que pueden ser estudiadas con el fin de establecer nuevas estrategias terapéuticas. Evidentemente, el conocimiento de los mecanismos moleculares que operan en la muerte celular de los astrocitos nos permitirán plantear estrategias basadas en proteger a estas células y consecuentemente a las neuronas, del daño citotóxico inducido por Mn.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Estudiar las cascadas de señalización molecular implicadas en la muerte celular apoptótica inducida por Mn en astrocitos, con particular énfasis en el papel desempeñado por las proteínas de fusión y fisión mitocondrial.

2.2. Objetivos específicos

Estudios *in vitro*

Empleando la línea celular C6 de astrocitoma de rata y $MnCl_2$ (Mn) como agente citotóxico:

- Evaluar la citotoxicidad del Mn y la posible contribución de las ROS a la muerte celular.
- Determinar la eventual participación de eventos apoptóticos en las células expuestas a Mn.
- Describir en detalle las vías apoptóticas intervinientes (Extrínseca e Intrínseca) y establecer el posible nexo entre ambas.
- Estudiar la participación de los miembros de la familia Bcl-2 en el proceso de muerte celular apoptótica.

- Analizar el efecto del Mn sobre la integridad de las redes mitocondriales.
- Investigar el efecto del Mn sobre la dinámica mitocondrial mediante el estudio de la expresión y localización subcelular de las proteínas que regulan los procesos de fusión y fisión mitocondrial.
- Estudiar el rol de las proteínas que regulan los procesos de fusión/fisión mitocondrial en la muerte celular inducida por Mn.

Estudios *in vivo*

Empleando ratas de la cepa Sprague-Dawley inyectadas con una dosis aguda de Mn en el estriado:

- Determinar la posible ocurrencia de muerte celular en el tejido estriatal.
- Estudiar la presencia de células con características apoptóticas.
- Analizar el efecto del Mn sobre la expresión de las proteínas que regulan los procesos de fusión y fisión mitocondrial.

Materiales y Métodos

1. Materiales

1.1. Reactivos generales

Se utilizaron los reactivos cuya procedencia se describe a continuación: Kit de ácido bicinconínico, CHAPS (3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamonio]-propano sulfonato, H₂DCF-DA (2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato), ácido cumárico, luminol, GSH (glutati3n reducido), Hoechst 33258, MnCl₂•4H₂O, MTT (4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolium), NAC (N-acetil-cisteína), Neutral Red, Sustrato de caspasas 3/7 (Ac-DEVD-pNA), DAB (3,3'-diaminobencidina) y citocromo c (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*). Ácido acetil salicílico (*Bayer, Buenos Aires, Argentina*). Ciclosporina A (*Sandimmun Novartis Farmacéutica S.A., Argentina*). Inhibidor de caspasa 3 (Ac-DEVD-CMK), inhibidor de caspasa 9 (Ac-LEHD-CMK) e inhibidor de caspasa 8 (Z-IETD-FMK) (*BD Pharmingen, San Diego, CA, USA*). Mdivi-1 (3-(2,4-dicloro-5-metoxifenil)-2-sulfanil-4(3H)-quinazolinona (*Santa Cruz Biotechnology, CA, USA*). MitoTracker Red CMXRos (*Molecular Probes, Eugene, OR, USA*). Kit Fas (human): Fc (human) (recombinant) + Enhancer for Receptors (*Enzo Life Sciences, NY, USA*) (Gentilmente provisto por el Dr. Álvaro Estevez. Laboratory of Motor Neuron Biology, Burke Medical Research Institute. Department of Neurology and Neurosciences, Weill Medical College of Cornell University, NY, USA). Kit ABC para inmunohistoquímica: complejo biotina estreptavidina-peroxidasa (*Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA*).

Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado biología molecular o grado analítico según el caso.

1.2. Reactivos para cultivo de células eucariotas

Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) y tripsina (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*). Suero fetal bovino (SFB) (*BIO-NOS, Buenos*

Aires, Argentina). Antibióticos: penicilina, estreptomina y antimicótico: anfotericina B (*Richet S.A., Argentina*). Glutamina (*Parafarm, Argentina*).

1.3. Anticuerpos

-Anticuerpos primarios monoclonales: anti- Opa-1 (612607) (1:1000) y anti- Drp-1 (611113) (1:400) (*BD Pharmingen, San Diego, CA, USA*); anti- Complex III subunit core 1-OxPhos (459140) (*Molecular Probes, Eugene, OR, USA*).

-Anticuerpos primarios policlonales: anti- Opa-1 (C-15): sc-30573, anti-caspasa 8 (H-134): sc-7890 (1:500), anti- PARP-1 (H-250): sc-7150 (1:100), anti-Fas-L (C-178): sc-6237 (1:300), anti- Bax (N-20): sc-493 (1:500), anti- Bcl-2 (N-19): sc-492 (1:500), anti- p53(HR231): sc-65226 (1:500) y anti- β - Actina (C4): sc-47778 (1:10000) (*Santa Cruz Biotechnology, CA, USA*); anti-caspasa 9 (9506) (1:500) y anti- Bid (2003) (1:500) (*Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA*); anti-GFAP (G-9269) (1:400) (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*).

-Anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano: anti-IgG de conejo-HRP: sc-2030 (1:1000) y anti- IgG de ratón-HRP: sc-2031 (1:1000) (*Santa Cruz Biotechnology, CA, USA*); anti-IgG de cabra-biotinilado (B7014-5ML) (1:400) (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*); anti- IgG de ratón-biotinilado (1:400) (BA-2000) (*Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA*).

-Anticuerpos secundarios acoplado a fluoróforos: Alexa flúor 488 anti-mouse IgG (A-11001) (1:1000), Alexa flúor 488 anti-goat (A-11055) (1:1000), Alexa flúor 568 anti-rabbit (A-11036) (1:1000) (*Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA*).

1.4. Línea celular eucariota

La línea celular **C6 de astrocitoma de rata** fue obtenida a partir de la inducción de un tumor glial por N-nitrosometilurea en el cerebro de ratas de la especie *Rattus norvegicus* (ATCC® CCL-107™). La misma fue gentilmente provista por el Dr. Zvi Vogel, Weizmann Institute, Israel. El origen glial de las C6 fue confirmado por la producción de la proteína S-100, hallada en tejido cerebral de los vertebrados y que ha sido encontrada en numerosos tumores cerebrales animales y en particular en humanos (ATCC; Benda, 1968).

Estudios toxicológicos previos indican que esta línea celular responde de manera similar a la astroglia frente al tratamiento con diferentes metales pesados (Tiffany Castiglioni et al., 1998). En este sentido, en nuestro laboratorio hemos encontrado que los astrocitos en cultivo primario se comportan de manera análoga a las células C6 en cuanto a las vías de señales de muerte desencadenadas por exposición a Mn (González et al., 2008; Alaimo et al., 2011).

1.5. Plásmidos

Los plásmidos pcDNA3 y pcDNA3-GFP fueron gentilmente cedidos por la Dra. Elba Vazquez (Dpto. de Química Biológica, FCEN-UBA). El plásmido conteniendo el cDNA de la variante 1 de la proteína humana Opa-1 *wild type* (pcDNA3 WT Opa-1) y su mutante activa Q297V (pcDNA3 Q297V Opa-1) fueron amablemente cedidos por el Dr. Donald D. Newmeyer (La Jolla Institute for Allergy and Immunology, CA, USA).

2. Métodos

2.1. Estudios *in vitro*

2.1.1. Cultivo de células eucariotas

La línea celular C6 de astrocitoma de rata se mantuvo en medio DMEM suplementado con 10% de SFB, 2mM de glutamina, 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomina y 2,5µg/ml de anfotericina B. Las células se cultivaron en cajas de Petri de 100mm de diámetro, en presencia de una atmósfera húmeda de 5% CO₂ a 37°C renovando el medio de cultivo tres veces por semana. Una vez que las células formaron una monocapa, el medio fue aspirado y descartado, las células se lavaron con Earle (NaCl 116mM; KCl 5,4mM; NaH₂PO₄.H₂O 1mM; glucosa 0,6mM; pH 7,4) para remover los inhibidores de tripsina presentes en el suero y luego se agregó a cada placa de petri 1ml de solución de tripsina 0,25% [disuelta en una mezcla 1:1 de Earle: Versene 0,02% (EDTA 0,537mM; NaCl 130mM; KH₂PO₄ 1,76mM; KCl 2,68mM; Na₂HPO₄ 6,46mM; pH 7,4)]. Se incubaron a 37°C durante 3 min y se observó mediante microscopía óptica que las células se hayan despegado. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en medio fresco, contadas con cámara de Neubauer y plaqueadas en placas de Petri o multi-pocillos dependiendo del experimento a realizar.

2.1.2. Preservación criogénica.

Cuando los cultivos celulares alcanzaron el 85% de confluencia, las células fueron tripsinizadas, centrifugadas durante 5min a 1.000rpm y resuspendidas en 1,5ml de medio de cultivo suplementado con 50% de SFB. Se agregaron 75µl de DMSO e inmediatamente se almacenaron a -80°C. Luego de 24 hs, las células fueron transferidas a nitrógeno líquido.

2.2. Medición de la viabilidad celular

2.2.1. Actividad mitocondrial como indicador de la viabilidad celular

El ensayo de MTT es un método colorimétrico y cuantitativo empleado para la determinación de la supervivencia celular, basado en la capacidad que poseen las células vivas de reducir la sal MTT a formazán. Dicha reacción es catalizada por deshidrogenasas mitocondriales y depende del grado de actividad de las mismas (Mosmann, 1983).

Para llevar a cabo este ensayo se sembraron 2×10^4 células por pocillo, en placas de 96 pocillos. La exposición a Mn se realizó una vez que los cultivos alcanzaron un 60-70% de confluencia (aproximadamente luego de 24hs de plaqueadas). Luego de 24hs de tratamiento, las células se lavaron con PBS (NaCl 137mM; KCl 2,68mM; Na_2HPO_4 10mM; KH_2PO_4 1,76mM; pH 7,4) y a cada pocillo se le agregó MTT a una concentración final de 0,5mg/ml. El MTT se preparó por dilución de una solución stock (5mg/ml disuelto en PBS) en medio de cultivo sin suero. Luego de 1:30hs de incubación a 37°C la solución se retiró y el formazán se solubilizó en 200µl de DMSO. La densidad óptica del producto formado se midió a 570nm y se restó un “background” no específico a 655nm acorde a lo especificado en el protocolo de *Sigma Aldrich*. Las mediciones de absorbancia se realizaron en un lector de microplacas (*Bio-Rad, Hercules, CA, USA*).

2.2.2. Integridad lisosomal como indicador de la viabilidad celular

El ensayo de Neutral Red es un método colorimétrico y cuantitativo que evalúa la viabilidad celular en base a la integridad de los lisosomas, ya que solo es retenido en estas organelas cuando la membrana lisosomal está intacta (Borenfreund y Puerner, 1985).

Para este ensayo se sembraron 2×10^4 células por pocillo, en placas de 96 pocillos. La exposición a Mn se realizó una vez que los cultivos alcanzaron un 60-70% de confluencia. Luego de 24hs de tratamiento, se descartó el medio y las células se lavaron con PBS. La solución de Neutral Red (0,33% disuelto en H₂O bidestilada) se agregó a cada pocillo a la una concentración final de 5µg/ml, en medio de cultivo sin suero. Luego de 2hs de incubación a 37°C, la solución se descartó y las células fueron lavadas con una solución de formaldehído 40%: CaCl₂ 10%. Por último, el Neutral Red incorporado a las células se solubilizó en 200µl de un medio de elución (etanol 50%:ácido acético 1%). La absorbancia del colorante se midió a 570nm y se le restó la densidad óptica a 690nm. Las mediciones se realizaron en un lector de microplacas (*Bio-Rad, Hercules, CA, USA*).

2.3. Análisis de la morfología celular por microscopía de contraste de fase

Los cambios en la morfología celular inducidos por exposición a Mn, se evaluaron empleando un microscopio de contraste de fase Nikon Eclipse TS100 (*Nikon Instech Co., Ltd., Karagawa, Japón*).

2.4. Determinación de especies reactivas de oxígeno

Para evaluar la generación de ROS, se utilizó el reactivo 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA). Este compuesto es permeable a la membrana plasmática y dentro de la célula es deacetilado por esterasas a 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF). En presencia de ROS, este producto es oxidado al compuesto fluorescente diclorofluoresceína (DCF) (Page et al., 1993).

El reactivo H₂DCF-DA se disolvió en DMSO. Luego de los tratamientos correspondientes, las células fueron incubadas con H₂DCF-DA 25µM durante 30min a 37°C, manteniendo una concentración final de DMSO menor a 0,1%. Luego, se

realizaron dos lavados con PBS, las células se despegaron de la placa de cultivo mediante tripsinización y se diluyeron con PBS. A continuación, las células fueron sonicadas y centrifugadas a 12.000rpm durante 20min a 4°C. La intensidad de fluorescencia fue evaluada en los sobrenadantes mediante un espectrómetro de fluorescencia (*LS-50B, Perkin Elmer, Inc., Wellesley, MA, USA*) (λ_{ex} : 490nm; λ_{em} : 515nm). Se emplearon como controles negativos células sin incubar con H₂DCF-DA. Los valores se normalizaron a la cantidad total de proteínas determinadas empleando el método del ácido bicinconínico (Hill y Straka, 1988).

2.5. Ensayo de actividad de caspasas 3/7

Este ensayo se basa en la hidrólisis del sustrato Acetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilida (Ac-DEVD-pNA) por parte de las enzimas caspasas 3/7, resultando en la liberación de p-nitroanilida (pNA). La pNA libre puede ser cuantificada espectrofotométricamente a 405nm ($\epsilon_{mM}=10.5$), lo que permite estimar la concentración de sustrato clivado. La actividad específica de las caspasas 3/7 se determinó empleando el sistema de incubación puesto a punto en nuestro laboratorio (Juknat et al., 2005).

Luego de cada tratamiento, realizado por triplicado en placas de 12 pocillos, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con 50 μ l/pocillo de buffer de lisis (Tris-HCl 50mM pH 7,4; EDTA 1mM; EGTA 10mM; digitonina 0,01mM; inhibidores de proteasas: benzamidina 63,86 μ M; aprotinina 1,54 μ M; PMSF 0,5mM) durante 30min a 37°C. A continuación, los triplicados de las suspensiones celulares correspondientes al mismo tratamiento se juntaron y se centrifugaron a 14.000rpm durante 20min. Se tomaron 150 μ l de los sobrenadantes (80-100 μ g de proteína) y se incubaron con 146 μ l de buffer de incubación (HEPES 100mM pH 7,5; glicerol 10%; EDTA 1mM; DTT 10mM; inhibidores de proteasas: benzamidina 63,86 μ M; aprotinina

1,54 μ M; PMSF 0,5mM) y 4 μ l del sustrato Ac-DEVD-pNA 100 μ M en placas de 96 pocillos durante 2hs a 37°C. Se midió la absorbancia del producto formado a 405nm en un lector de placas (*Bio-Rad, Hercules, CA, USA*). Como blanco de proteínas se emplearon 150 μ l de buffer de lisis en reemplazo del sobrenadante. La actividad específica de las caspasas 3/7, se expresó como el cociente entre la absorbancia a 405nm (en unidades arbitrarias) y los mg de proteínas calculados mediante el método de Bradford (1976).

2.6. Análisis de la morfología nuclear

La detección de núcleos apoptóticos se realizó mediante microscopía de fluorescencia empleando el colorante fluorescente Hoechst 33258, el cual se intercala entre las bases del ADN.

Para realizar este ensayo se colocaron cubreobjetos en placas de 12 pocillos y se sembraron 6x10⁴ células en cada pocillo. Luego de realizado el tratamiento correspondiente, las células se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron con 200 μ l de PFA 8%: sacarosa 8% (1:1) en PBS durante 30min a temperatura ambiente (TA). Se retiró la solución, se dejó evaporar y se realizaron cinco lavados con PBS. Posteriormente se agregó el reactivo de Hoechst 33258 a una concentración final de 1,5 μ g/ml (Solución stock: 0,1mg/ml en PBS) y se mantuvo durante 10min en oscuridad. Los cubreobjetos se montaron sobre un portaobjetos empleando como líquido de montaje PBS: glicerol (1:1) y se observaron al microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E600 con filtro UV (filtro UV-2E/C DAPI: λ_{ex} : 330-380, λ_{em} : 435-485) (*Nikon Instech Co., Ltd., Karagawa, Japón*). Se tomaron fotografías representativas de cada tratamiento mediante el empleo de una cámara digital acoplada al microscopio Nikon COOLPIX 5000 (*Nikon Instech Co., Ltd., Karagawa, Japón*).

2.7. Análisis del potencial de membrana y de la morfología mitocondrial

El compuesto fluorescente MitoTracker Red CMXRos ingresa a las células y queda retenido en las mitocondrias activas que conservan el $\Delta\psi_m$. De esta manera, pueden distinguirse por microscopía de fluorescencia las células que no sufrieron una pérdida del $\Delta\psi_m$ de aquellas que sí lo hicieron. Además, el empleo de este compuesto permite visualizar la morfología mitocondrial.

Las células se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio esterilizados, contenidos en placas de 12 pocillos. Luego de los tratamientos correspondientes, las células se lavaron con PBS y se incubaron con MitoTracker Red CMXRos 75nM durante 30min a 37°C. Posteriormente, se fijaron con 200 μ l de PFA 8%: sacarosa 8% (1:1) en PBS durante 30min a TA. Luego, se realizaron dos lavados con PBS y se montaron las muestras sobre portaobjetos utilizando PBS: glicerol (1:1) como solución de montaje. La observación de los preparados se realizó en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E600 (*Nikon Instech Co., Ltd., Karagawa, Japón*) (λ_{ex} : 528-553nm; λ_{em} : 600-660nm) acoplado a una cámara digital Nikon CoolPix5000 (*Nikon Instech Co., Ltd., Karagawa, Japón*). En forma paralela se obtuvieron imágenes empleando el microscopio de fluorescencia Olympus IX71 (*Olympus Corporation, Tokio, Japón*) con un objetivo de 60X/1,43 Oil (λ_{ex} : 543/20nm; λ_{em} : 593/40nm) acoplado a una cámara Hamamatsu Photonics ORCA-ER (*Hamamatsu Photonics K.K., Systems Division, Hamamatsu, Japón*). A partir de las mismas, se realizaron reconstrucciones 3D empleando el software Huygens Deconvolution Software (*Scientific Volume Imaging B.V., Hilversum, Países Bajos*).

2.8. Inmunocitoquímica

Los ensayos de inmunocitoquímica se realizaron a partir de células sembradas sobre cubreobjetos de vidrio contenidos en placas de 24 pocillos. A las

24 hs de tratamiento, las células se marcaron con MitoTracker Red CMXRos 75nM (como se detalló en el apartado 2.7) y se fijaron con 200µl de PFA 8% y sacarosa 8% (1:1) en PBS durante 30min a TA. Posteriormente, se realizaron cinco lavados con PBS (5min), se permeabilizó con Tritón X-100 0,25% durante 10min y se lavó 3 veces con PBS (5min). Luego, se bloqueó con una solución de BSA 1% en PBST (NaCl 137mM; KCl 2,68mM; Na₂HPO₄ 10mM; KH₂PO₄ 1,76mM; Tween 20 0,05%; pH 7,4) durante 30min a TA y se incubó con el anticuerpo anti-Drp-1 durante toda la noche (ON) a 4°C. Al día siguiente, las muestras se lavaron tres veces con PBS (5 min), se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa Fluóor 488 anti-mouse durante 1h y se lavaron tres veces con PBS (5min). Para visualizar las preparaciones, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos utilizando PBS: glicerol (1:1). Las muestras fueron analizadas con un microscopio confocal digital Nikon Eclipse E800 C1 (Mitotracker Red: λ_{ex} : 544nm; λ_{em} : 570-LP nm / Alexa 488: λ_{ex} : 488nm; λ_{em} : 515-530nm) (*Nikon Instech Co., Ltd., Karagawa, Japón*) y las imágenes fueron capturadas con el objetivo Nikon Plan Apo 60X/1,40 Oil. Los parámetros de adquisición de las imágenes fueron optimizados a fin de que la ganancia de la señal no se encontrara saturada y la señal de fondo/ruido fuese casi nula.

El grado de co-localización fue determinado empleando diferentes parámetros provistos por el programa Image J (*NIH*) (Manual online: "Image J for Microscopy" http://www.uhnresearch.ca/facilities/wcif/imagej/colour_analysis.htm)

-Coeficiente de correlación de Pearson (Rr): describe la correlación en la distribución de intensidades de las señales. El rango de valores varía entre -1 y 1, donde 1 indica co-localización absoluta, -1 señala anti-colocalización y 0 representa una distribución aleatoria de los fluoróforos. El manual indica que aquellos valores

cercanos a cero y los negativos son difíciles de interpretar en tanto que los cercanos a 1 indican una co-localización confiable.

-Coeficiente de solapamiento de Manders (R): de acuerdo al manual de la NIH es un coeficiente más sencillo de interpretar que el de Pearson e indica la superposición de las señales de ambos canales. El rango de valores varía entre 0 y 1, donde 1 representa perfecta co-localización y 0 co-localización nula.

-Colour Scatter Plot: es un mapa de dispersión de intensidades rojas y verdes. Si bien no indica la frecuencia de los pixels, se lo puede relacionar fácilmente con la imagen original.

-Display Frequency Scatter Plot: los colores en este mapa representan la frecuencia con la que los pixels verdes y rojos se combinan entre sí en la imagen original (por convención, los colores más cálidos representan altos valores). Este tipo de mapa es el que brinda mayor información, aunque de acuerdo al manual de la NIH, es difícil de relacionar con la imagen original.

2.9. Fraccionamiento subcelular

El fraccionamiento subcelular se realizó acorde a los descrito por Galli y colaboradores (Galli et al., 2009) para la obtención de las fracciones citosólica y enriquecida en mitocondrias. Luego del tratamiento, las células fueron lavadas con PBS y tripsinizadas. Posteriormente, se centrifugaron a 1.000rpm durante 5min a TA y el pellet fue resuspendido en buffer MSHE (manitol 0,22M; sacarosa 0,07M; EGTA 0,5mM; HEPES-KOH 2mM; inhibidores de proteasas: benzamidina 63,86µM, aprotinina 1,54µM y PMSF 0,5mM; pH 7,4). Las muestras fueron sonicadas a 40% de amplitud durante 10seg en un equipo Fisher Sonic Dismembrator modelo 500 (Fisher Scientific, Loughborough, Reino Unido). A continuación, se centrifugó a 700g, durante 10min a 4°C para separar núcleos, los cuales permanecen en el

pellet 1. Luego, se centrifugó el sobrenadante 1 durante 20min a 4°C, obteniéndose en el pellet 2 la fracción mitocondrial y en el sobrenadante 2, la fracción citosólica. Para obtener una fracción mitocondrial con mayor pureza, depletada de ARNm citoplasmáticos, el pellet 2 fue lavado con 150mM KCl y se volvió a centrifugar a 10.000g, durante 10min a 4°C. Finalmente, se obtuvo el pellet 3 que constituye una fracción subcelular enriquecida en mitocondrias. Las mitocondrias aisladas según este procedimiento se encuentran enteras, funcionales y mayormente libres de componentes provenientes de otros compartimientos (Galli et al., 2009).

2.10. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford (1976) empleando seroalbúmina bovina (BSA) como proteína patrón. Se hicieron reaccionar 20µl de la muestra correspondiente con 1ml de reactivo de Bradford (Coomasie brillant blue G250 0,01%; etanol 4,75%; ácido fosfórico 8,5%) durante 15 min en oscuridad. Posteriormente, se determinó la densidad óptica a 595nm en un lector de microplacas (*BIO-RAD, Hercules, CA, USA.*) y la concentración de proteínas se determinó aplicando la Ley de Lambert y Beer: $A = c \cdot \epsilon \cdot l$, donde la absorbancia (A) de una sustancia es directamente proporcional a la concentración (C) de la sustancia absorbente, la longitud del paso de luz (l) y una constante denominada coeficiente de absorción (ϵ), que es característico para cada sustancia a una longitud de onda determinada.

2.11. Western Blot

2.11.1. Extracción de proteínas

Se sembraron $1,2 \times 10^5$ células en placas de 12 pocillos las cuales alcanzaron un 60-70% de confluencia luego de 24hs en cultivo. Posteriormente se

realizaron los tratamientos correspondientes empleando 3 pocillos para cada uno. Una vez finalizados los mismos, se retiró el medio de incubación, se lavó con PBS y se incubó con 25µl/pocillo de buffer de lisis (HEPES 50mM; Tritón X-100 0,1%; pH 7; inhibidores de proteasas: benzamidina 63,86µM; aprotinina 1,54µM; PMSF 0,5mM) durante 30min a 4°C. En el caso particular del análisis de los niveles de Bax, se empleó un buffer de lisis conteniendo CHAPS (Tris HCl 50 mM; CHAPS 0,1%; DTT 10mM; EDTA 1mM; EGTA 10mM e inhibidores de proteasas: benzamidina 63,86µM, aprotinina 1,54µM y PMSF 0,5mM, pH 7,4). Posteriormente, las células se despegaron con un “cell scraper” y los triplicados de las suspensiones celulares se reunieron, sonicaron y centrifugaron a 12.000rpm durante 20min a 4°C. El sobrenadante se recogió en tubos eppendorfs y se separaron alícuotas para cuantificar la concentración de proteínas y para realizar la electroforesis.

2.11.2. Preparación de muestras para electroforesis

A los sobrenadantes procedentes del paso anterior se les agregó buffer de cracking (Tris-HCl 62,5mM pH 6,8; SDS 2%; glicerol 30%; β-mercaptoetanol 15%; azul de bromofenol $5,75 \times 10^{-3}$ %; DTT 3mM) en la relación 2:1 (muestra:buffer de cracking) y luego se calentaron a 100°C durante 10min.

Las soluciones utilizadas para la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes fueron: Gel separador (Tris-HCl 350mM; SDS 0,09%; acrilamida/bisacrilamida 7,5-8,5-10-12-13,5-15% según la proteína a identificar, persulfato de amonio 0,1%; TEMED 0,2%, pH 8,8). Gel stacking (Tris-HCl 130mM, SDS 0,1%, acrilamida/bisacrilamida 3,8%, persulfato de amonio 0,1%, TEMED 0,2%, pH 6,8). Las muestras (60-80µg) se corrieron a un voltaje constante de 120V en presencia de buffer de electroforesis (Tris 25mM; glicina 192mM; SDS 0,1%)

durante 1,5 a 2hs según el porcentaje de gel utilizado, empleando el sistema Mini Protean III de Bio-Rad (*Bio-Rad, Hercules, CA, USA*). Finalizada la electroforesis, los geles se equilibraron en buffer de transferencia (Tris 25mM; glicina 192mM; metanol 20%) para su posterior transferencia.

2.11.3. Transferencia

Una vez finalizada la separación electroforética, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (*Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA*) a un amperaje constante de 250mA, durante 2 horas en frío. Luego se realizó una tinción con Rojo Ponceau (Rojo Ponceau S 0,2%:ácido acético 1%) para comprobar la eficiencia de la transferencia. Posteriormente, la membrana se lavó con TBS (Tris-HCl 50mM; NaCl 150mM; pH 8) para eliminar el colorante.

2.11.4. Inmunodetección

Luego de la transferencia, las membranas de nitrocelulosa se incubaron con la solución de bloqueo (SDS 0,1%; leche en polvo descremada 5% en TBS) durante 1,5hs a TA con agitación suave. A continuación, se incubó con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C con agitación suave. Posteriormente, se realizaron dos lavados con TBST (Tris-HCl 10mM; NaCl 150mM; Tween-20 0,05%; pH 8) de 10min cada uno y otros dos con TBS nuevamente de 10min cada uno, con agitación rápida. Se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1h con agitación suave y se realizaron tres lavados con TBST (10min) y otro con TBS (10min) con agitación rápida. Los anticuerpos fueron diluidos en TBS conteniendo SDS 0,1% y leche en polvo descremada 3%.

Finalmente, se llevó a cabo el revelado. Dado que los anticuerpos secundarios utilizados están acoplados a HRP (Horse Radish Peroxidase), la

detección se realizó empleando el reactivo quimioluminiscente ECL (Solución A: Luminol 2,5mM; ácido cumárico 0,396mM; Tris-HCl 0,1M pH 8,5. Solución B: H₂O₂ 0,0192%; Tris-HCl 0,1M pH 8,5). Las imágenes fueron adquiridas con un equipo Fujifilm Luminiscent Analyser mediante el software LAS-1000plus (*Fuji Film Co., Tokio, Japón*).

Para la estimación del peso molecular de las proteínas se empleó un marcador de peso molecular cuyo rango se encuentra entre 10 y 170kDa: Page Ruler Prestained Protein Ladder (*Fermentas Life Sciences, Glen Burnie, MA, USA*). La intensidad de las señales obtenidas se determinó por densitometría empleando el programa Image J (*NIH*).

2.11.5. Stripping de la membrana

Para la reutilización de la membrana, esta se lavó con TBST (2 lavados, 5min). Luego se incubó con buffer de stripping (H₂O₂ 30vol. 15% en TBS) durante 30min a TA y con agitación suave. A continuación se efectuaron otros dos lavados con TBST (5min). De esta manera, la membrana puede ser reprobada con otro anticuerpo primario.

2.12. Preparación y transfección de vectores de expresión

Se utilizó la cepa *E. Coli* DH5 α para la transformación y clonado de plásmidos. La misma fue cedida gentilmente por la Dra. Elba Vazquez (Departamento de Química Biológica, FCEN-UBA).

2.12.1. Preparación de bacterias competentes

Se prepararon bacterias competentes de la cepa DH5 α de *E.coli* partiendo de un cultivo de 10ml de medio completo Luria-Bertani (LB) (Peptona 1%; Extracto de

Levadura 0,5%; NaCl 1%; pH 7) sin ampicilina que se dejó crecer durante la noche a 37°C con agitación. A continuación, se sembraron 2ml de este cultivo bacteriano en 40ml de medio LB y se dejó agitando a 37°C hasta llegar a una DO de 0,4-0,6 a 600nm. Posteriormente, se centrifugó a 3.000rpm durante 5min a 4°C y el pellet resultante se resuspendió en 16ml de CaCl₂ 50mM estéril y se incubó durante 15min en hielo. Nuevamente, se realizó una centrifugación a 3.000rpm durante 2min a 4°C y finalizado este paso, se resuspendió el pellet en 2ml de CaCl₂ 50mM y glicerol 15%. Por último, se armaron stocks de bacterias competentes con alícuotas de 100µl y éstas fueron congeladas a -70°C.

2.12.2. Transformación de bacterias competentes

Las bacterias competentes (100µl) se transformaron con los plásmidos de interés (de resistencia a ampicilina) (1-2µg) incubando durante 30min en hielo y luego sometiéndolas a un shock térmico (42°C durante 1min y posterior pasaje a hielo durante 5min) con el objeto de permeabilizar la pared bacteriana. Se les agregó 1ml de LB sin antibiótico y se las incubó 1h con agitación a 37°C. Una alícuota del cultivo (100µl) se rastrilló en una placa con LB-ampicilina (50µg/ml) y se incubó ON a 37°C. Se picó una colonia y se la dejó crecer ON en 100ml de medio LB con ampicilina. Al día siguiente, se tomaron 400µl del cultivo y se preparó un stock agregando glicerol a una concentración final de 15% y se congeló a -80°C.

2.12.3. Extracción de ADN plasmídico: método lisis alcalina

El volumen restante de cultivo bacteriano crecido en LB-ampicilina se centrifugó a 6.000g 15min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 10ml de solución 1 (Tris-HCl 25mM; EDTA 10mM; Glucosa 50mM; RNAasa A 2mg/ml; pH 8) y se agitó en vortex. Luego se agregaron 10ml de solución

2 (NaOH 0,2N; SDS 1%) y se mezcló por inversión 4-6 veces. Por último, se agregaron 10ml de solución 3 (Acetato de potasio 5M; Acido acético glacial 3M; pH 5,5) y se mezcló por inversión para lograr la precipitación del ADN genómico. Se incubó en hielo durante 20min y se procedió a centrifugar a 20.000g durante 30min a 4°C. El sobrenadante se volvió a centrifugar durante 15min y luego se precipitó al ADN plasmídico con 0,7 volúmenes de isopropanol. Se centrifugó a 15.000g durante 30min a 4°C. El pellet se lavó con etanol frío 70% y se centrifugó nuevamente a 15.000g durante 10 min a 4°C. Se dejó secar y el pellet se resuspendió en buffer TE (Tris HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8). Este método explota las diferencias en las propiedades de desnaturalización y renaturalización entre el ADN plasmídico y el ADN cromosómico. La alcalinización con NaOH en presencia de un detergente fuertemente aniónico tal como el SDS, provoca la lisis celular, la desnaturalización del ADN y de las proteínas, y la liberación de los plásmidos. Los plásmidos se ven menos afectados por su pequeño tamaño y estructura superenrollada y se renaturalizan mediante el tratamiento con la solución 3. La neutralización del medio en presencia de una concentración alta de sal (acetato potásico), provoca la precipitación de las proteínas (por el tratamiento con el detergente y la insolubilidad de la sal potásica del dodecil sulfato) y la del ADN cromosómico (por reasociaciones aleatorias intracatenarias). Los agregados insolubles de proteínas y ADN cromosómico se separan por centrifugación del ADN plasmídico que queda en el sobrenadante y conserva mayoritariamente su estructura nativa.

2.12.4. Determinación de la concentración del ADN plasmídico purificado

Para determinar la concentración del ADN purificado, se midió la absorbancia de una dilución 1:140 a una longitud de onda de 260nm en una cubeta de cuarzo. La concentración se calculó a partir de la siguiente fórmula: $(A / \epsilon \times b) \times d = C$,

donde, A es la absorbancia obtenida a 260nm, ϵ es el coeficiente de extinción molar ($50^{-1} \text{ L} \times \text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), b es el camino óptico y d es la dilución. Por otra parte, para determinar la pureza del ADN, se cuantificaron las absorbancias a 280nm (absorbancia de proteínas) y 230nm (absorbancia de sales). Se consideró una extracción de ADN con óptima pureza cuando las relaciones A260/A280 y A260/230 resultaban ser $\geq 1,8$ y 2,3 respectivamente.

2.12.5. Determinación de la integridad y pureza del ADN plasmídico aislado por separación en gel de agarosa

Los plásmidos aislados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 0,8% (p/v) en TAE 1 X (Tris-acetato 40mM; EDTA 1mM; pH 8). En cada calle del gel se sembró una mezcla que contenía: 5 μ l del plásmido a verificar, 5 μ l buffer TE y 3,5 μ l de buffer de corrida (*Blue/Orange Loadind Dye, G188A, Promega, Madison, WI, USA*) y en paralelo se sembró un marcador de PM (*Lambda DNA/ EcoR I + Hind III Marker; Promega, Madison, WI, USA*). Luego, se procedió a realizar una electroforesis a 80V en buffer TAE 1X. Finalizada la corrida electroforética, sumergió el gel en una solución de Bromuro de Etidio (0,5 μ g/ml en H₂O_d) durante 30min. Las bandas correspondientes a los plásmidos fueron visualizadas por transiluminación con UV, verificando que el plásmido se encuentre en el PM correspondiente. Además, se constató la purificación del ADN plasmídico por la ausencia de marca inespecífica que podría deberse a ADN genómico.

2.12.6. Transfección de células de mamíferos: método de precipitación con fosfato de calcio

Las células C6 fueron sembradas en placas de 96 ó 12 pocillos según el ensayo a realizar y para ensayos de microscopía, se hicieron crecer sobre

cubreobjetos. Alcanzada una confluencia del 70%, se procedió a transfectarlas con el correspondiente plásmido. Se preparó una solución A (por cada pocillo de placas de 12: 215µl H₂O destilada estéril; 31,25 µl CaCl₂ 2M; 25 µg tRNA y 5 µg del plásmido y una solución B (por cada pocillo: 250 µl buffer HN (HEPES 50mM, NaCl 280mM, volumen final 1l con H₂O; pH 7,1) y 6,25 µl NaH₂PO₄ 70mM). Se incubó la mezcla durante 40min a TA y luego se agregó por goteo a las células. Se incubó durante 4 h a 37°C en atmósfera de CO₂ 5%. Transcurrido este período, la mezcla de transfección fue removida y se realizaron 4 lavados con medio de cultivo completo. Finalmente, se incubaron las células en estufa a 37°C y CO₂ 5% durante 24hs antes de ser expuestas al tratamiento con MnCl₂.

2.13. Estudios *in vivo*

2.13.1. Animales

Se utilizaron ratas *Sprague-Dawley* machos de 150-170g provistas por el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), Buenos Aires (certificado de seguridad de la NIH #A5072-01).

Los animales recibieron una dieta balanceada y agua *ad libitum* bajo condiciones controladas de temperatura (22°C) con ciclos de 12 horas de luz/ 12 horas de oscuridad (encendido de luces: 7:00 am), respetándose en todo momento las reglas de la “Guía para el cuidado y utilización de animales de laboratorio” del *Instituto Nacional de Salud* de los Estados Unidos (*NIH*) y bajo la supervisión del Comité de Ética del IBYME.

La metodología empleada en los experimentos contempló el minimizar el sufrimiento de los animales y reducir el número de ratas utilizadas.

2.13.2. Cirugía estereotáxica intra-estriado

Los animales se dividieron al azar en dos grupos independientes de igual tamaño: tratamiento de 24hs (n=4) y tratamiento de 7 días (n=4). El día de la cirugía, los animales fueron anestesiados con 1ml de una solución de xilacina (50mg/ml)/ketamina (20mg/ml) (1:4) disueltas en solución salina. Para realizar las inyecciones, los animales se colocaron en un marco estereotáxico (*David Kopf Stereotaxic Instruments, Tujunga, CA, USA*) con la barra de los incisivos situada a -3,3 mm respecto a la línea interauricular. Previo a la realización de la trepanación se rasuró la cabeza y se identificaron las coordenadas correspondientes a la zona del estriado: Anteroposterior: -0,2, Lateral: ± 3 , Ventral: -5 con respecto al bregma, en base a la Figura 17 del Atlas de Paxinos y Watson (1998). Se procedió a utilizar el protocolo descrito por Simola et al. (2008), según el cual un hemisferio recibe el tratamiento y el otro hemisferio es utilizado como control. Por lo tanto, en cada animal se realizaron dos trepanaciones, para luego inyectar 1 μ l de MnCl₂ (1 μ mol) en el hemisferio izquierdo y 1 μ l de solución salina (NaCl 0,9% en agua bidestilada) en el hemisferio derecho (**Figura 14**).

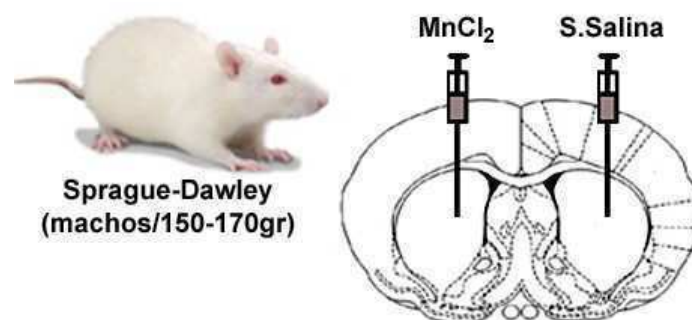


Figura 14. Protocolo de inyección intra-estriado

El esquema corresponde a un diagrama coronal de cerebro de rata (Figura 17 Atlas de Paxinos y Watson, 1998). Cada animal fue sometido a una doble inyección en el estriado: 1 μ l MnCl₂ (1 μ mol) en el hemisferio izquierdo y 1 μ l NaCl (0,9%) en el hemisferio derecho.

Las inyecciones fueron efectuadas con una jeringa Hamilton a una velocidad promedio de 1µl/40seg y manteniendo la aguja dos min más antes de retirarla para evitar el reflujo de la solución. Finalmente se cerró la piel con puntos sueltos y se colocó a los animales en una jaula hasta que despertaran de la anestesia y se observó su comportamiento. Transcurrido el período de cada tratamiento, las ratas fueron perfundidas y sacrificadas.

2.13.3. Perfusión de animales.

Las ratas fueron anestesiadas con 1ml de una solución de xilacina (50mg/ml)/ketamina (20mg/ml) (1:4) disueltas en solución salina. Se perfundió a cada rata con 20ml de solución fisiológica y luego con 40ml de PFA 4% (preparado en buffer fosfato 0,1M) intra-cardíaco. Luego de la perfusión, se extrajeron los cerebros, los cuales fueron guardados a 4°C en PFA 4% durante 24 hs. Transcurrido este tiempo, los cerebros fueron lavados dos veces con PBS y mantenidos en dicho buffer hasta el momento de ser cortados.

2.13.4. Corte y preservación de secciones cerebrales

Se realizaron cortes coronales de 50µm de espesor, correspondientes a las zonas del estriado (Figuras 15-23; Paxinos y Watson, 1998) empleando un vibrátomo Integraslice 7550PSDS (*Campden Instruments, Loughborough, Reino Unido*).

Las secciones obtenidas se colocaron en libre flotación en placas de 24 pocillos conteniendo una solución criopreservadora (glicerol: etilenglicol: buffer fosfato 0,2M; 3:3:4 v/v) y mantenidas a -20°C.

2.13.5. Tinción de Nissl

El análisis morfológico del tejido cerebral se llevó a cabo mediante la tinción de Nissl. El fundamento de la tinción es el uso de un colorante básico (violeta de cresilo) que, en un medio ácido (pH 3) reacciona con los grupos fosfato de los ácidos nucleicos. Como resultado, se tiñen los núcleos de todas las células (neuronas y células gliales) y los cuerpos de Nissl (ribosomas libres y asociados a retículo endoplasmático).

Se tomaron secciones cerebrales crioprotegidas, se lavaron 3 veces con PBS durante 15min, se colocaron en portaobjetos pre-tratados con gelatina y se las dejó secar ON. Al día siguiente, las secciones fueron lavadas con agua destilada y sumergidas en una solución de violeta de cresilo 0,5% durante 5min. Luego se procedió a deshidratar las muestras pasándolas por un gradiente creciente de etanol (96%: 2 veces, 1min y 100%: 2 veces, 2 min) y luego por xilol (2 veces, 3min). Finalmente, las muestras se cubrieron con cubreobjetos empleando el medio de montaje Permount. Las secciones coronales se analizaron utilizando un microscopio óptico Leica DM2000 (*Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania*) equipado con una cámara fotográfica Leica ICC50 (*Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania*).

2.13.6. Tinción con Hoechst 33258

Se tomaron 3-4 cortes de cada animal, se los colocó en pocillos correspondientes a placas de 24 pocillos y se los lavó 3 veces con PBS (10min). Luego, se tiñeron con una solución de Hoechst 33258 2,5µg/ml en PBS y se realizaron 3 lavados con PBS (10min). Finalizada la etapa de tinción nuclear, las secciones se montaron con PBS:glicerol (1:1) y se observaron al microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E600 con filtro UV (filtro UV-2E/C DAPI: λ_{ex} : 330-380,

λ_{em} : 435-485) (*Nikon Instech Co., Ltd., Karagawa, Japón*). Se tomaron fotografías representativas de cada tratamiento mediante el empleo de una cámara digital acoplada al microscopio Nikon COOLPIX 5000 (*Nikon Instech Co., Ltd., Karagawa, Japón*).

2.13.7. Inmunohistoquímica

Se tomaron 3-4 cortes de cada animal, se los colocó en pocillos correspondientes a placas de 24 pocillos y se los lavó 3 veces con PBS (10min). Se inhibió a la peroxidasa endógena con H_2O_2 :metanol (1:100) durante 10min a TA y luego se realizaron 3 lavados con PBS (5min). Las secciones se bloquearon con Tritón X-100 0,1% en PBS y suero de cabra o caballo 10% durante 30min a 37° C. Luego, se incubaron con el anticuerpo primario anti-Opa1 (1:50) ó anti-Drp-1 (1:50) (preparados en Tritón X-100 0,1% en PBS y suero de cabra o caballo 1%) durante 48hs a 4°C en una cámara húmeda, en libre flotación y agitación suave. Los controles negativos se realizaron incubando las muestras en iguales condiciones pero sin el anticuerpo primario.

Luego de 48hs, las muestras se lavaron 3 veces con PBS (5min) y luego se incubaron con el anticuerpo secundario anti-mouse o anti-goat biotinilado (preparados en Tritón X-100 0,1% en PBS y suero de cabra o caballo 1%) durante 1h a TA. Después de 3 lavados con PBS (5min), las secciones fueron incubadas con el complejo Avidina-Biotina- Peroxidasa (ABC) en PBS (1:100) durante 30min a TA y posteriormente fueron lavadas 2 veces con PBS (5min). El revelado se realizó con el cromógeno DAB durante 2-5min y luego se frenó la reacción con PBS. La reacción de la peroxidasa con el DAB forma un precipitado marrón en el sitio de unión del antígeno con el anticuerpo. Las muestras se montaron en portaobjetos y se los dejó secando ON. Al día siguiente, se procedió a deshidratar las muestras

pasándolas por un gradiente creciente de etanol (96%: 2 veces de 1min y 100%: 2 veces de 2 min) y luego por xilol (2 veces de 3min). Finalmente, las muestras fueron cubiertas con un cubreobjetos empleando el medio de montaje Permount. Las secciones coronales fueron observadas utilizando un microscopio óptico Leica DM2000 (*Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania*) equipado con una cámara fotográfica Leica ICC50 (*Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania*).

2.14. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron como la media de 2 ó 3 experimentos independientes con el correspondiente error estándar. Para la determinación de diferencias significativas ($p < 0,05$), se llevó a cabo el correspondiente análisis estadístico mediante el uso del programa Graph Pad Prism 4 (*Graph Pad Software, San Diego, CA, USA*).

En el caso de comparar sólo dos medias se aplicó la Prueba T-Student; por otra parte, para llevar a cabo la comparación de tres o más medias, se llevó a cabo el test ANOVA de un factor, seguido del test a posteriori Student-Newman-Keuls.

Resultados

Estudios *in vitro*



1. Efecto citotóxico del Mn en células C6 de astrocitoma de rata

1.1. Ensayos de viabilidad celular

En una primera etapa del trabajo, se analizó el efecto citotóxico de concentraciones variables de MnCl_2 (Mn) (200, 350, 500, 750 y $1000\mu\text{M}$) en cultivos de células C6 de astrocitoma de rata, durante 24hs de incubación. Se emplearon dos ensayos de viabilidad, MTT y Neutral Red, los cuales evalúan diferentes eventos celulares (detallado en *Materiales y Métodos*) (**Figura 15**).

Los resultados obtenidos para ambas metodologías indicaron que el Mn no ejerció efecto citotóxico en presencia de SFB 10%. Sin embargo, en condiciones de privación de suero, se observó una disminución dosis dependiente en la viabilidad celular que alcanzó un plateau a partir de $750\mu\text{M}$, para el cual los valores de viabilidad resultaron ser de $55 \pm 3\%$ ($p < 0,001$) (ensayo de MTT) y del $40 \pm 3\%$ ($p < 0,001$) (ensayo de Neutral Red). Estas diferencias en los porcentajes de viabilidad medidos con ambas técnicas se presentaron para todas las concentraciones de Mn ensayadas y en primera instancia podrían ser la consecuencia del empleo de dos metodologías diferentes. Sin embargo, no es posible descartar la posibilidad de que los lisosomas resulten más sensibles al daño inducido por Mn. En este sentido, se ha descrito en nuestro laboratorio la participación de una vía lisosomal de muerte en la apoptosis inducida por Mn en células C6 (Gorojod et al., 2009, 2010).

1.2. Análisis de la morfología celular.

En forma paralela al ensayo anterior se analizó el efecto citotóxico del Mn sobre la morfología celular mediante microscopía de contraste de fase. En la **Figura 16** se muestran solamente los resultados obtenidos para la concentración $750\mu\text{M}$ de Mn.

En ausencia de suero, el cultivo incubado con Mn 750 μ M mostró un menor número de células con pérdida de la morfología fibroblástica característica de la línea C6. Además, las células se redondearon, disminuyeron considerablemente su volumen y exhibieron burbujeo o “blebbing” de la membrana plasmática, todos ellos eventos característicos del proceso apoptótico. Contrariamente, la exposición a Mn en presencia de suero no ejerció efecto alguno.

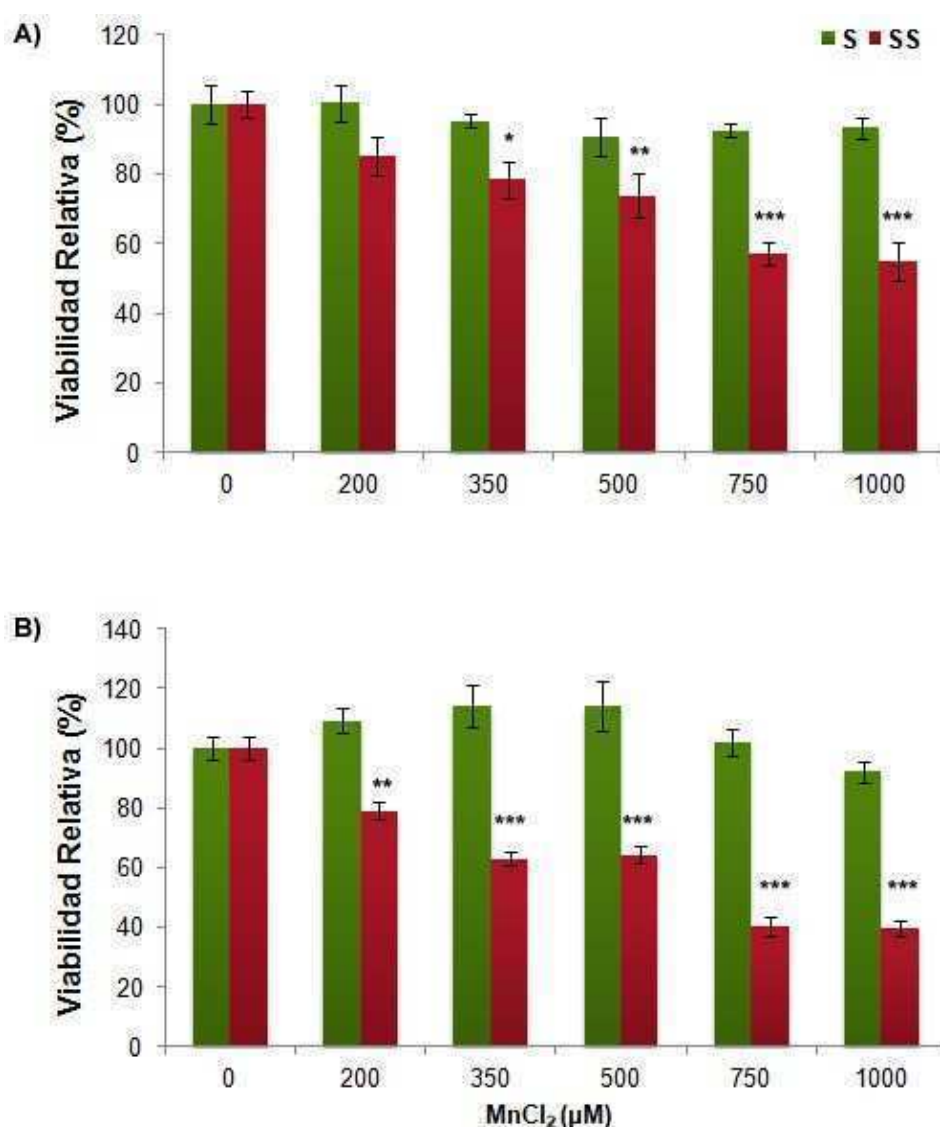


Figura 15. Viabilidad celular en función de la concentración de MnCl₂

Las células C6 se incubaron con diferentes concentraciones de Mn en presencia y ausencia de SFB 10% durante 24 hs. Se grafican los porcentajes de viabilidad relativos a los controles considerados como 100% (S: SFB 10%; SS: SFB 0%). **A)** Ensayo de MTT. **B)** Ensayo de Neutral Red. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs control SS.

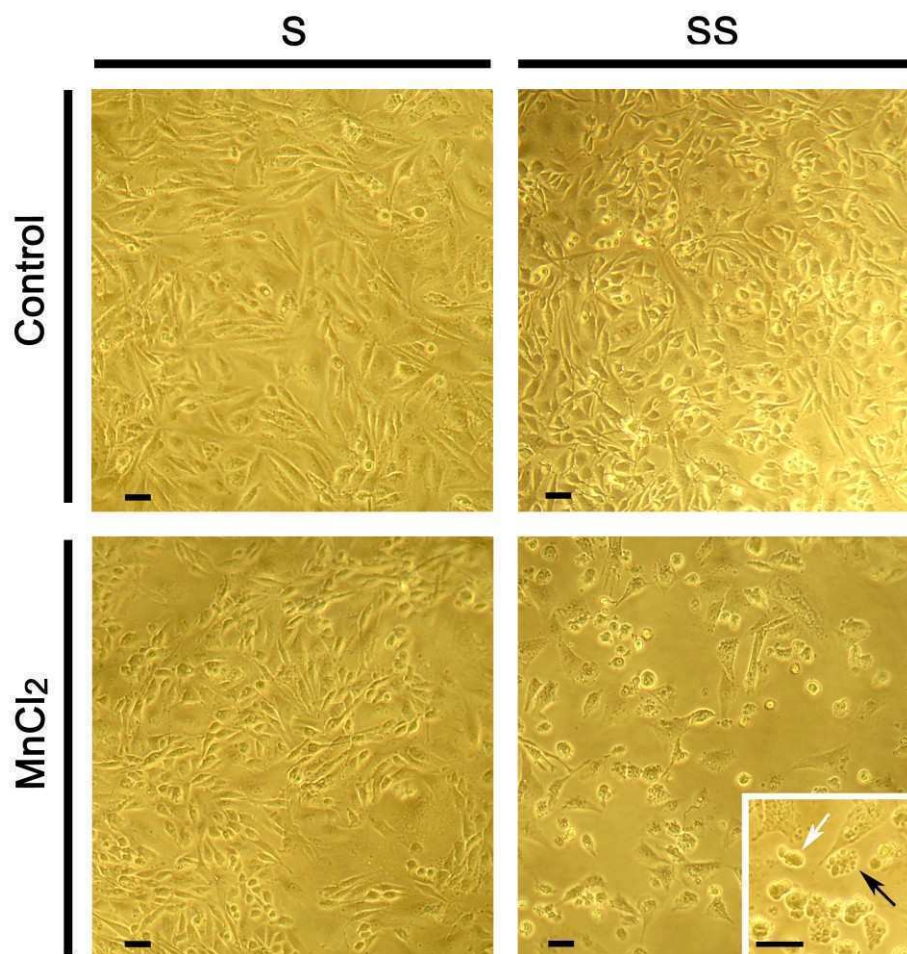


Figura 16. Análisis de la morfología celular

Microscopía de contraste de fase de células C6 se incubaron con Mn 750 μ M en presencia (S) y ausencia (SS) de suero. La barra equivale a 10 μ m (Aumento: 10X) (Inset, Barra: 50 μ m; Aumento: 20X). Flecha gris: célula con procesos retraídos y disminución de su volumen. Flecha negra: célula con burbujeo (o blebbing) de la membrana plasmática.

2. Generación especies reactivas de oxígeno

Uno de los mecanismos mediadores de la citotoxicidad inducida por Mn es la generación de especies reactivas (Reaney y Smith, 2005). Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que el Mn 1mM induce la producción de ROS en cultivos primarios de astrocitos corticales de rata (González et al., 2008). Aún más, la preincubación de estas células con el antioxidante melatonina (MLT) 0,1mM logró prevenir totalmente la muerte celular inducida por Mn 200 μ M (González, 2006).

Nos planteamos entonces estudiar si el Mn ejercía actividad pro-oxidante en el cultivo de células C6 para lo cual se evaluaron los cambios en el potencial redox intracelular mediante espectrofluorometría empleando el compuesto H₂DCF-DA.

La exposición de las células a Mn durante 24hs en ausencia de suero indujo un aumento en la producción de ROS de manera dosis dependiente, alcanzando un valor máximo de $77 \pm 4\%$ ($p < 0,001$) para la concentración de $750\mu\text{M}$ (**Figura 17A**). Por otra parte, la privación de suero por sí sola, no indujo un incremento significativo en los niveles de ROS, con respecto al control incubado en presencia de suero (S: 222 ± 2 / SS: 260 ± 3 UA/ μg proteína, $p > 0,05$).

Para elucidar si esta generación aumentada de ROS contribuía a la muerte celular se realizó un ensayo de viabilidad (MTT) en el cual se preincubaron las células con diferentes concentraciones de distintos compuestos antioxidantes: melatonina (MEL: 1, 100, $500\mu\text{M}$, 1 y 2 mM), N-acetil cisteína (NAC: 10 y 20mM), glutatión (GSH: 0,5 y 1mM) y ácido acetilsalicílico (ASA: 0,1, 1 y 10mM) y luego se las expuso a Mn $750\mu\text{M}$.

La MEL es una hormona sintetizada a partir de triptofano en la glándula pineal de mamíferos (Reiter, 1991) que actúa como un antioxidante directo secuestrando especies reactivas y tiene también tiene la capacidad de ingresar al núcleo (Menendez Peláez et al., 1993) y estimular la transcripción de genes involucrados en la respuesta al estrés oxidativo (Kotler et al., 1998). Por su parte, el tripéptido GSH es el antioxidante más abundante de la célula y el principal tiol encargado de mantener el óptimo balance redox. También desempeña acciones detoxificantes directas e indirectas, ya que puede actuar como secuestrante por sí mismo y como aceptor de electrones en la reacción catalizada por la enzima glutatión peroxidasa (Chance et al., 1979). Con respecto a NAC, además de ser un precursor de la síntesis de GSH, es capaz de actuar como depurador de especies reactivas a través

de su grupo tiol libre (Aruoma et al., 1989). Adicionalmente, se ha observado que en células PC12, los efectos promotores de la supervivencia ejercidos por NAC son bloqueados por actinomicina D lo que sugiere que este compuesto es capaz de actuar induciendo la expresión de determinados genes (Yan et al., 1995).

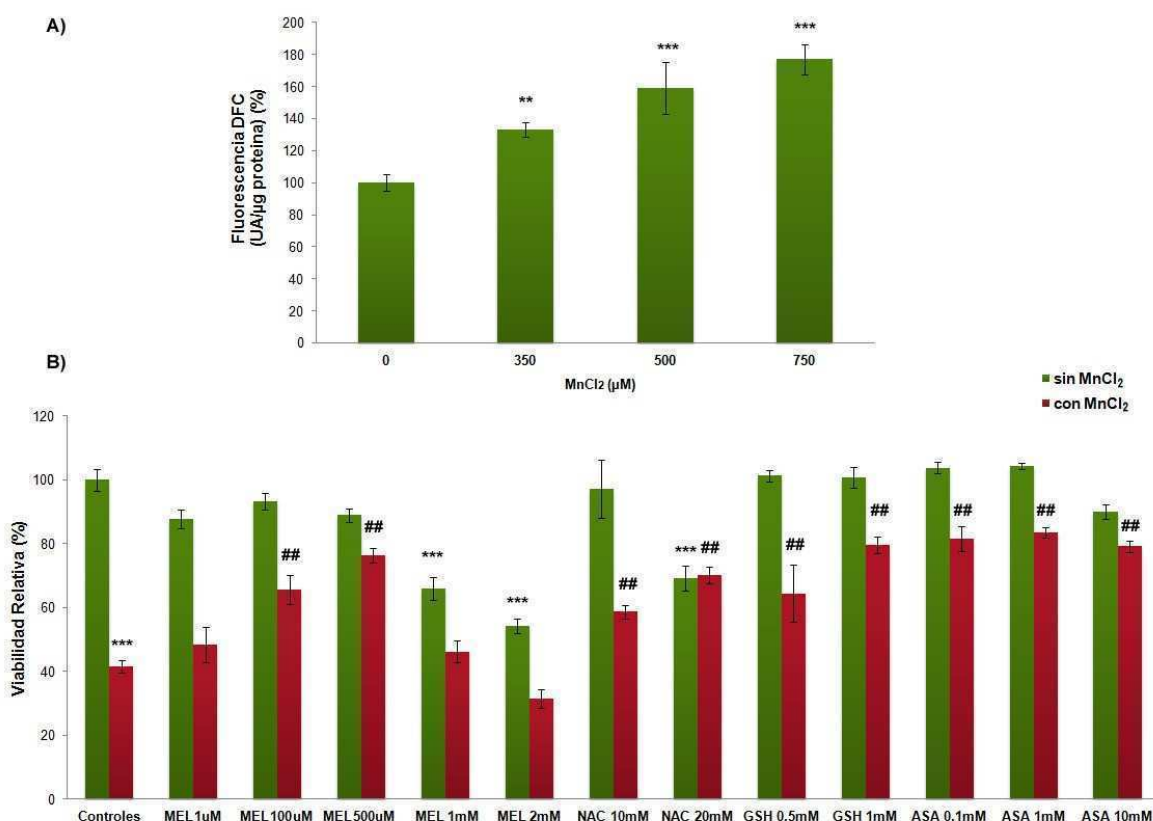


Figura 17. El MnCl₂ induce muerte celular mediada por la generación de ROS

A) Generación de ROS: Fluorescencia de la DCF en lisados de células C6 incubadas con diferentes concentraciones de Mn en ausencia de suero durante 24hs. Se cuantificó la conversión de H₂DCF-DA (25μM) en DCF como medida indirecta de la presencia de ROS intracelulares. **B)** Efecto de diferentes antioxidantes sobre la viabilidad celular: las células se preincubaron durante 1h con los siguientes antioxidantes: Melatonina (MEL: 1, 100, 500μM, 1 y 2mM), N-acetil-cisteína (NAC: 10 y 20mM), Glutation (GSH: 0,5 y 1mM) y Ácido Acetilsalícílico (ASA: 0,1, 1 y 10mM) y luego se las expuso a Mn 750μM durante 24hs. Se grafica el promedio de 8 réplicas ± SEM. **p<0,001 y ***p<0,001 vs. control; ##p<0,01; ###p<0,001 vs. Mn.

Todos los antioxidantes ensayados resultaron eficientes en proteger a las células de la citotoxicidad inducida por Mn. En particular, GSH 1mM y ASA 0,1-10mM estuvieron entre los más efectivos previniendo entre 38 y 42% (p<0,01) la

muerte celular mientras que el efecto de NAC 20mM fue de un 29% ($p < 0,01$). Por su parte, la MEL exhibió un comportamiento dual: a 100 y 500 μ M fue capaz de prevenir la muerte celular entre un 24 y 38% ($p < 0,01$) respectivamente, mientras que a 2mM aumentó la muerte inducida por Mn. Por otra parte, en ausencia de Mn, la MEL (1 y 2mM), por sí sola, disminuyó la viabilidad celular ($66 \pm 4\%$ y $54 \pm 2\%$; respectivamente, $p > 0,001$) (**Figura 17B**).

Los resultados obtenidos demuestran que las ROS desempeñan un rol crítico en la muerte celular inducida por Mn.

En base a las evidencias obtenidas hasta el momento se decidió continuar nuestras investigaciones exponiendo las células a Mn 750 μ M durante 24hs en ausencia de suero. Las razones de dicha elección se basan en diferentes hechos: En primer lugar, esta concentración de Mn genera niveles intracelulares del metal que se encuentran dentro del rango fisiológico reportado para astrocitos de corteza de embrión de pollo (50-75 μ M). Además, esto lo hemos establecido midiendo la acumulación de Mn mediante espectrometría de absorción atómica (González et al., 2008). Por otra parte, es bien conocido que el suero contiene factores citoprotectores, en particular frente al daño oxidativo, que podrían contribuir a la supervivencia celular (Roche et al., 2008). En efecto, el suero animal contiene hormonas, proteínas, factores estimulantes e inhibidores del crecimiento, los cuales pueden tener un efecto no deseado sobre las células en estudio. Además, el Mn es capaz de unirse a proteínas del plasma tales como albúmina, transferrina y α 2-macroglobulina disminuyendo la concentración efectiva de este metal (Rabin et al., 1993). En consecuencia, se necesitarían concentraciones de Mn superiores a las utilizadas en nuestros estudios (750 μ M) para lograr un efecto citotóxico significativo. Esto lleva a la situación desventajosa de alejarse de las concentraciones fisiológicas descritas para la intoxicación con Mn.

Además, es importante tener en cuenta que, a excepción de las células de la sangre y las endoteliales, el resto de los tipos celulares nunca están en contacto con el suero sino con el fluido linfático (Romijn, 1988) el cual difiere considerablemente en su composición química con el suero. En particular, las células del SNC debido a la protección ejercida por la barrera hemato-encefálica, se encuentran en un ambiente altamente específico no necesariamente semejante al SFB.

Por lo tanto, teniendo en cuenta estas desventajas del medio suplementado con suero se ha indicado que el uso de un medio de cultivo sin suero que cumpla con las necesidades particulares del tipo celular nervioso a ser cultivado, tendrá las siguientes ventajas: 1) las condiciones *in vitro* serán más cercanas a las condiciones originales *in vivo*, 2) mayor reproducibilidad en los estudios cuantitativos debido a la variabilidad que introduce el empleo de diferentes lotes de suero, 3) mejor detección y análisis de mensajeros químicos sintetizados por las células en cultivo y liberados al medio sin la interferencia de compuestos conocidos (Romijn, 1988).

3. El Mn induce muerte celular apoptótica

3.1. Análisis de la morfología nuclear

Con el objeto de determinar si la muerte desencadenada en las células C6 por efecto del Mn era de tipo apoptótica, se evaluó en primera instancia la morfología de los núcleos. Para ello, se empleó el reactivo fluorescente Hoechst 33258 (1ug/ml), un colorante con afinidad específica para los nucleótidos de adenina y timina. Esta técnica permite la detección de núcleos apoptóticos, en los cuales, la cromatina sufre una transición de un aspecto heterogéneo a una forma altamente condensada, que luego se volverá fragmentada y empaquetada en los llamados cuerpos apoptóticos (Oberhammer et al., 1993).

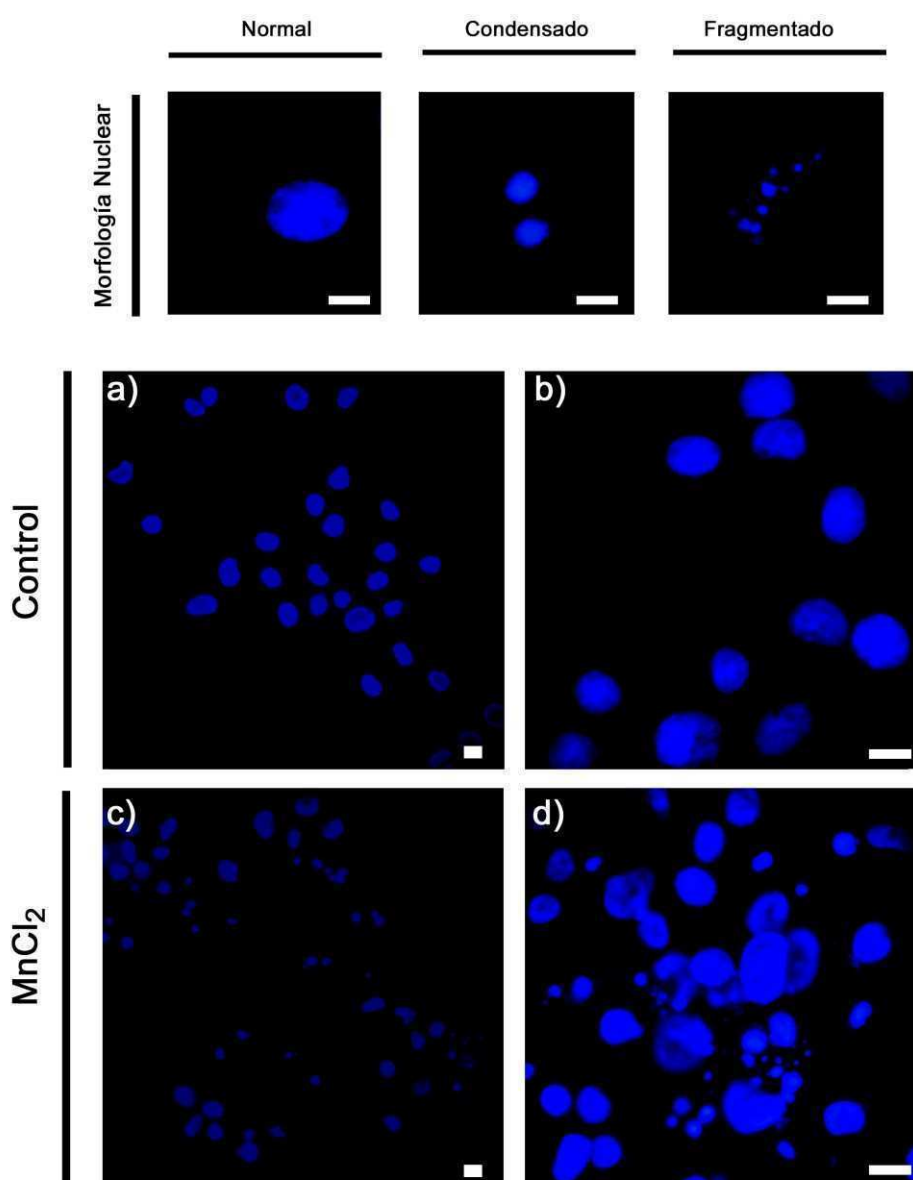


Figura 18. Análisis de la morfología nuclear

Las células C6 se incubaron en ausencia (Aumento: a, 40X; b, 100X) y en presencia de Mn 750 μ M (Aumento: c, 40X; d, 100X) durante 24 hs. Barra: 10 μ m. Se tiñeron con el reactivo Hoechst 33258 y los núcleos se observaron utilizando un microscopio de fluorescencia. Las fotografías son representativas de cada tratamiento.

Las células control presentaron núcleos con tinción homogénea de la cromatina, mientras que las incubadas con Mn 750 μ M exhibieron un $44 \pm 7\%$ ($p < 0,001$) de núcleos con alteraciones morfológicas consistentes con un proceso apoptótico, incluyendo disminución de tamaño y condensación y fragmentación de la cromatina (**Figuras 18**). Adicionalmente, se observó una disminución en la cantidad

total de núcleos. Estos resultados fueron consistentes con observaciones previas de nuestro laboratorio obtenidas en cultivos primarios de astrocitos de corteza cerebral de rata (González et al., 2008).

3.2. El Mn induce apoptosis dependiente de caspasas

Como ya se mencionó en el apartado 1.1.2, la cascada de activación de las caspasas constituye una vía ejecutora fundamental en la muerte celular apoptótica, siendo la caspasa 3 la efectora por excelencia junto con la caspasa 7. Por esta razón, un aumento en su actividad constituye un parámetro de muerte celular apoptótica ampliamente utilizado.

Se ha reportado la activación de la caspasa 3 inducida por Mn en diferentes líneas celulares (PC12: Desole et al., 1997; HeLa: Oubrahim et al., 2001; NIH3T3: Oubrahim et al., 2002; linfoma de células B: El Mchichi et al., 2007; glioblastoma T98G: Park y Park, 2010) y en cultivos primarios (hepatocitos: Susuki y Tsukamoto, 2005 y de astrocitos de rata: González et al., 2008).

En consecuencia, con el fin de confirmar mediante un parámetro adicional que el Mn induce apoptosis en las células C6, se midió la actividad de las caspasas 3/7 por espectrofotometría empleando el sustrato específico Ac-DEVD-pNA. El Mn indujo un aumento del $128 \pm 17\%$ ($p < 0,001$) en la actividad específica de dichas enzimas (**Figura 19A**). A su vez, para estudiar la contribución de la caspasa 3 a la muerte celular, se realizó un ensayo de viabilidad de MTT empleando el inhibidor específico de caspasa 3, Ac-DEVD-CMK ($10\mu\text{M}$). La pre-incubación con este inhibidor logró prevenir casi por completo la muerte celular inducida por Mn, obteniéndose un valor de viabilidad del $90 \pm 3\%$ ($p < 0,001$) (**Figura 19B**).

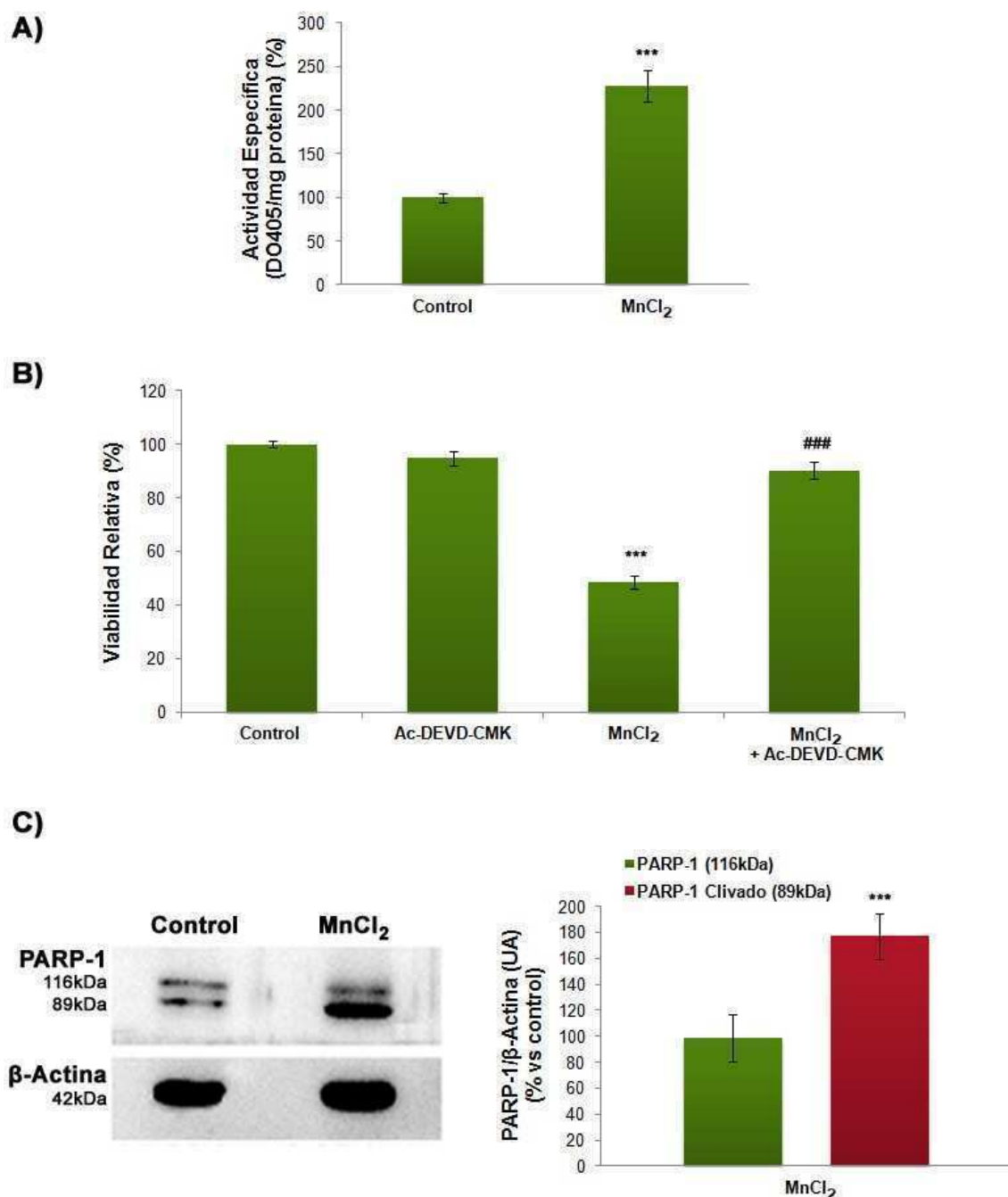


Figura 19. El MnCl₂ induce muerte celular apoptótica dependiente de caspasas
A) Medición de la actividad de las caspasas 3/7: se determinó empleando el sustrato Ac-DEVD-pNA (100μM) y se cuantificó el producto formado (pNA) mediante espectrofotometría (Abs: 405nm). Los resultados son promedio de dos experimentos independientes ± SEM. **B)** El inhibidor específico de caspasas 3/7 Ac-DEVD-CMK previno la muerte celular inducida por Mn²⁺, evaluada mediante ensayo de MTT. Los resultados son promedio de 8 réplicas ± SEM. **C)** Clivaje de PARP-1: se analizó mediante western blot. El resultado es promedio de cuatro experimentos independientes ± SEM (se consideraron los niveles de PARP-1 y PARP-1 clivado en el control como 100%). Las membranas se lavaron y reprobaron con anti-β-Actina como control de carga. ***p<0,001 vs.control; ###p<0,001 vs. Mn.

Un parámetro ampliamente utilizado para determinar la actividad de la caspasa 3 es la determinación de los niveles de expresión de uno de sus sustratos, la proteína Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa-1 (PARP-1) de 116kDa. Sin embargo, es importante señalar que existen otras enzimas capaces de clivar a PARP-1. Esta proteína cataliza la transferencia de unidades de ADP-ribosa a residuos carboxílicos de glutámico y aspártico de proteínas nucleares empleando como sustrato NAD^+ . PARP-1 está encargada del mantenimiento de la integridad del genoma, actuando como un sensor que se activa frente al daño al ADN. El clivaje de PARP-1 por parte de las caspasas 3/7 ha sido reportado en varios desórdenes neurodegenerativos tales como la isquemia cerebral, EP, Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), excitotoxicidad, y en tumores cerebrales, especialmente, en gliomas (Chaitanya et al., 2010). En nuestro modelo, se determinó mediante análisis western blot, que el Mn produjo un aumento de $77 \pm 17\%$ ($p < 0,001$) en el nivel de la proteína PARP-1 clivada de 89kDa (**Figura 19C**).

En conjunto, estos resultados demuestran que el Mn induce muerte celular apoptótica en células C6 y que las caspasas 3/7 participan en la cascada de señalización.

4. Vías de señalización implicadas en la apoptosis inducida por Mn

4.1. Vía Extrínseca o de Receptores de Muerte

4.1.1. Fas/Fas-L

Como ya se mencionó, la vía apoptótica extrínseca se inicia con la activación de receptores de membrana llamados Receptores de Muerte, siendo uno de los miembros más destacados el receptor Fas/CD95R.

Existen evidencias que demuestran que Fas/CD95R y su ligando, se expresan en cerebro humano y de rata, tanto en tejidos normales como tumorales. En

particular, las células C6 de astrocitoma de rata expresan altos niveles de Fas-L (Saas et al., 1997). Además, se ha descrito la señalización del sistema Fas/Fas-L en la EP, Alzheimer y Huntington (Ferrer et al., 2000, 2001; Pan et al., 2007). Por otra parte, si bien se conoce que la vía intrínseca participa en la apoptosis inducida por Mn (González et al., 2008; Yin et al., 2008), no existen reportes que demuestren la activación de la vía extrínseca en células expuestas a este metal. Estos antecedentes señalan la importancia de estudiar la posible participación de esta vía en nuestro modelo.

Mediante análisis western blot se determinó que las células control con y sin suero exhibieron niveles semejantes de Fas-L. Por su parte, la presencia de Mn indujo un incremento del $58 \pm 6 \%$ ($p < 0,01$) y $170 \pm 14\%$ ($p < 0,001$) en los niveles de Fas-L en presencia y ausencia de suero, respectivamente (**Figura 20A**).

Si bien el Mn en presencia de suero incrementa los niveles de Fas-L en más del 50%, no se observó muerte celular. Por lo tanto, esto permite especular que sería necesario alcanzar un umbral de niveles de Fas-L para desencadenar la vía extrínseca.

4.1.2. La vía de Fas/FasL es indispensable para la apoptosis inducida por Mn

Con el fin de estudiar la participación de Fas en la apoptosis inducida por Mn, evaluamos, mediante el ensayo de MTT, el efecto de un “señuelo molecular” consistente en una proteína quimera que contiene el dominio extracelular de Fas fusionado con el dominio Fc de una IgG (Fas-Fc) ($1 \mu\text{g/ml}$) y que secuestra a Fas-L, inhibiendo así la activación del receptor Fas endógeno. La eficacia de este inhibidor fue evaluada por Sahawneh et al. (2010) en un modelo genético de ELA empleando motoneuronas en cultivo primario derivadas de médula espinal de ratones G93A

embrionarios de 15 días. En este trabajo, Fas-Fc (1 μ g/ml) logró prevenir la muerte inducida por ausencia de factores tróficos en dichos cultivos.

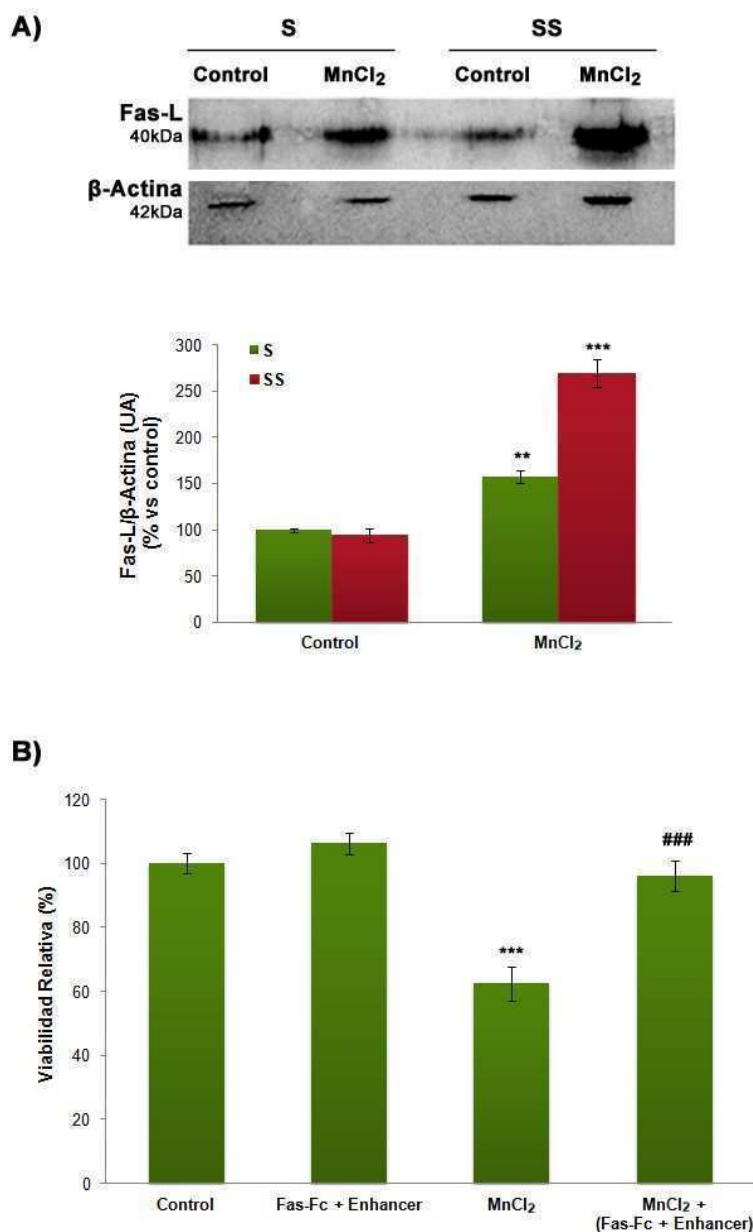


Figura 20. La apoptosis inducida por MnCl₂ es dependiente de la vía de Fas/Fas-L

A) Análisis western blot de los niveles de Fas-L: se procedió como se indica en Materiales y Métodos. Las membranas se lavaron y reprobaron con anti- β -Actina como control de carga. El resultado que se presenta es promedio de 3 ensayos independientes \pm SEM. ** p <0,001; *** p <0,001 vs. controles respectivos. **B)** Inhibición de la vía de Fas/FasL: las células fueron tratadas con Mn 750 μ M en presencia de 1 μ g/ml de Fas-Fc (inhibidor de la activación del receptor Fas) y 1 μ g/ml de enhancer en ausencia de suero. La viabilidad celular fue evaluada 24 hs después del tratamiento mediante ensayo de MTT. *** p <0,001 vs. control; ### p <0,001 vs. Mn.

En nuestro modelo, el señuelo Fas-Fc (1µg/ml) incubado junto con su potenciador (1µg/ml), el cual incrementa su actividad inhibitoria en un rango de ~20-50 veces, previno totalmente la muerte celular, obteniéndose una viabilidad del $96,3 \pm 4.6\%$ ($p < 0,001$) (**Figura 20B**).

Estos resultados confirman la participación del sistema Fas/Fas-L en la apoptosis inducida por Mn y además sugieren que la misma es apical en el desencadenamiento de la señal de muerte.

4.1.3. Activación de la caspasa 8

Como ya se mencionó, la pro-caspasa 8 reclutada al DISC del receptor Fas es capaz de activarse por autoclivaje mediando la señal de muerte río abajo de este receptor (Ashkenazi y Dixit, 1998). Hasta el momento, solo existe un reporte que demuestra que el Mn activa la caspasa 8 en células BL41 de linfoma humano (El Mchichi et al., 2007). Por lo tanto, con el fin de describir más detalladamente la vía de señalización que involucra al sistema Fas/FasL en nuestro modelo analizamos si el Mn inducía la activación de la caspasa 8.

Para ello, se realizó en primer lugar un análisis mediante western blot el cual mostró que el Mn disminuyó los niveles totales de expresión de las dos proformas inactivas de caspasa 8 (55 y 53kDa) en un 64 ± 6 y $62 \pm 8\%$ ($p < 0,001$) respectivamente, en tanto que los correspondientes a las isoformas clivadas (43 y 41kDa), aumentaron en un 135 ± 7 y $126 \pm 6 \%$ ($p < 0,001$) (**Figura 21A**).

Dado que el clivaje es un indicador de la activación, los resultados anteriores fueron confirmados empleando un inhibidor específico de la actividad de caspasa 8, z-IETD-FMK (10µM). El efecto del inhibidor fue sobre los siguientes parámetros: ensayo de viabilidad por MTT, conteo de núcleos apoptóticos y análisis western blot de los niveles de PARP-1.

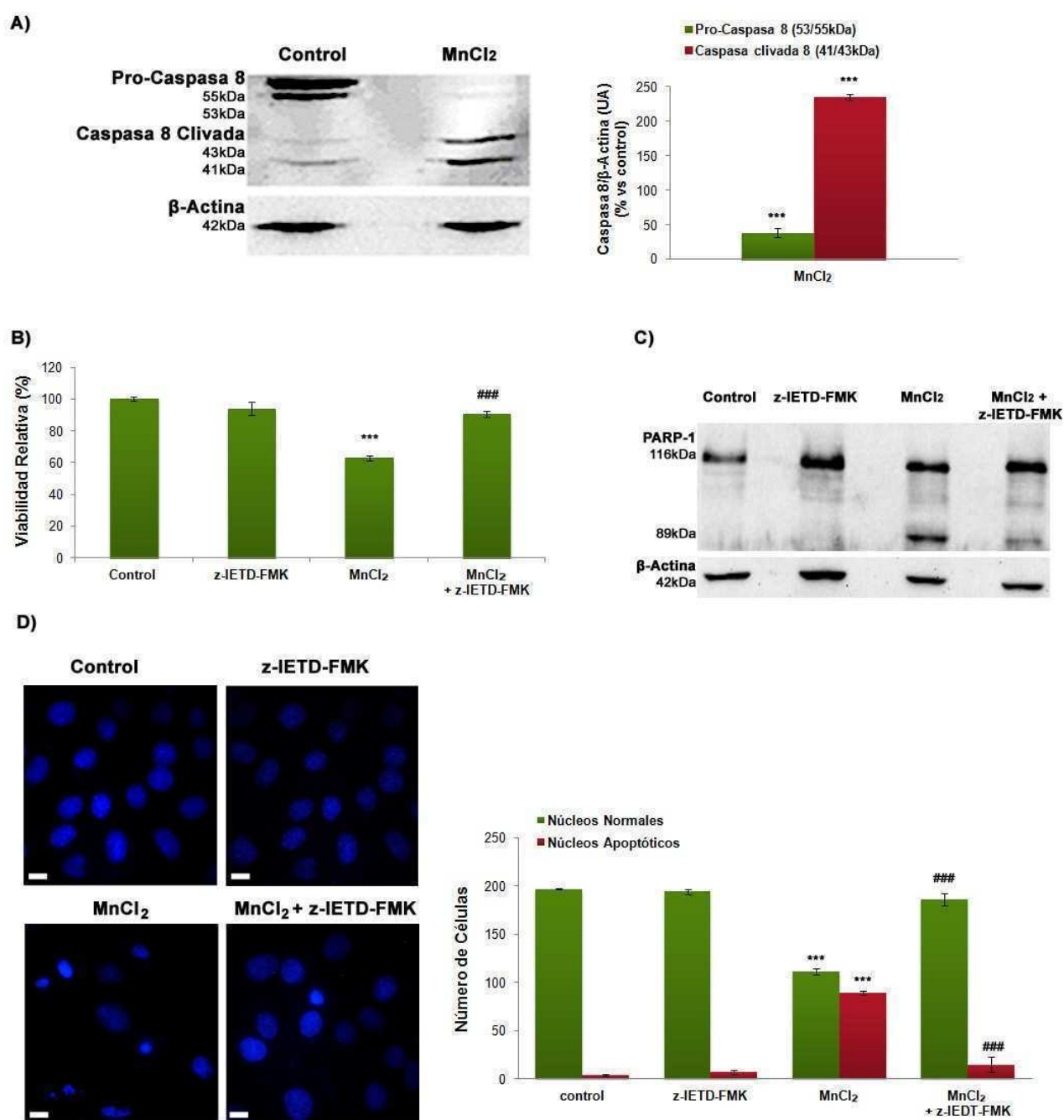


Figura 21. Rol de la caspasa 8 en la apoptosis inducida por $MnCl_2$

A) El Mn induce el clivaje de caspasa 8: análisis western blot de lisados celulares totales. Las membranas se lavaron y reprobaron con anti- β -Actina como control de carga. Los niveles de pro-caspasa 8 y caspasa 8 clivada correspondientes al control se consideraron como 100%. El resultado es promedio de cuatro experimentos independientes \pm SEM. **B-D)** Efecto del inhibidor de caspasa 8 (z-IETD-FMK) sobre la muerte celular inducida por Mn (ensayo de MTT) (**B**), el clivaje de PARP-1 (western blot) (**C**) y la aparición de núcleos apoptóticos (Hoechst 33258) (Barra: $10\mu m$; Aumento: 100X) (**D**). En la microscopía de fluorescencia se contabilizaron 200 células por tratamiento, clasificándose en núcleos normales o apoptóticos (condensados y fragmentados) y se seleccionaron imágenes representativas de cada tratamiento. *** $p < 0,001$ vs. control; ### $p < 0,001$ vs. Mn.

La pre-incubación con el inhibidor de caspasa 8 logró prevenir casi por completo la muerte celular inducida por el Mn, obteniéndose un valor de viabilidad del $90 \pm 2\%$ ($p < 0,001$) (**Figura 21B**). Por otra parte, el inhibidor de caspasa 8 previno el clivaje de PARP-1 (**Figura 21C**), además de la aparición de los núcleos apoptóticos en un $83 \pm 5\%$ ($p < 0,001$) (**Figura 21D**).

Este conjunto de resultados demuestran que la caspasa 8 juega un rol protagónico en la apoptosis inducida por Mn y avalan la hipótesis que sugiere que la activación de la vía del receptor Fas/FasL es un paso temprano en la cadena de eventos.

4.2. Vía Intrínseca o Mitocondrial

4.2.1. Clivaje de Bid

Una vez desencadenada la vía apoptótica extrínseca, la cascada de eventos posteriores puede proceder según dos caminos posibles dependiendo del tipo celular. En las células Tipo I, la caspasa 8 activada cliva y activa a la caspasa ejecutora 3. Sin embargo, en las células Tipo II la activación de la caspasa 8 en el DISC es limitada y la señal apoptótica depende de la amplificación ejecutada por la vía mitocondrial. Así, en las células Tipo II, tiene lugar un “cross talk” entre la vía apoptótica extrínseca y la intrínseca: la caspasa 8 cliva a Bid generando su forma activa truncada tBid y esta última contribuye a la inducción de la MOMP y la consecuente liberación de factores apoptogénicos al citosol (Chipuk et al., 2010).

Resultados de nuestro laboratorio han demostrado la participación de la vía mitocondrial y un aumento en los niveles de Fas-L en la apoptosis inducida por Mn en cultivos primarios de astrocitos lo cual sugiere que estas células podrían comportarse como Tipo II (González et al., 2008).

En base a estos antecedentes, se abordó el estudio acerca de la posible participación de Bid en la cascada de muerte, analizando los niveles de expresión de esta proteína mediante western blot.

Debido a las dificultades técnicas encontradas al tratar de detectar la banda correspondiente a tBid en los extractos totales (también mencionada por Gonzalez et al., 2008), se analizaron los cambios observados en la proforma de BID de 22 kDa. La exposición a Mn en ausencia de suero indujo un completo clivaje de la proforma de Bid como se deduce de la desaparición total de la señal. Contrariamente, el Mn no ejerció efecto en presencia de SFB10% (**Figura 22**).

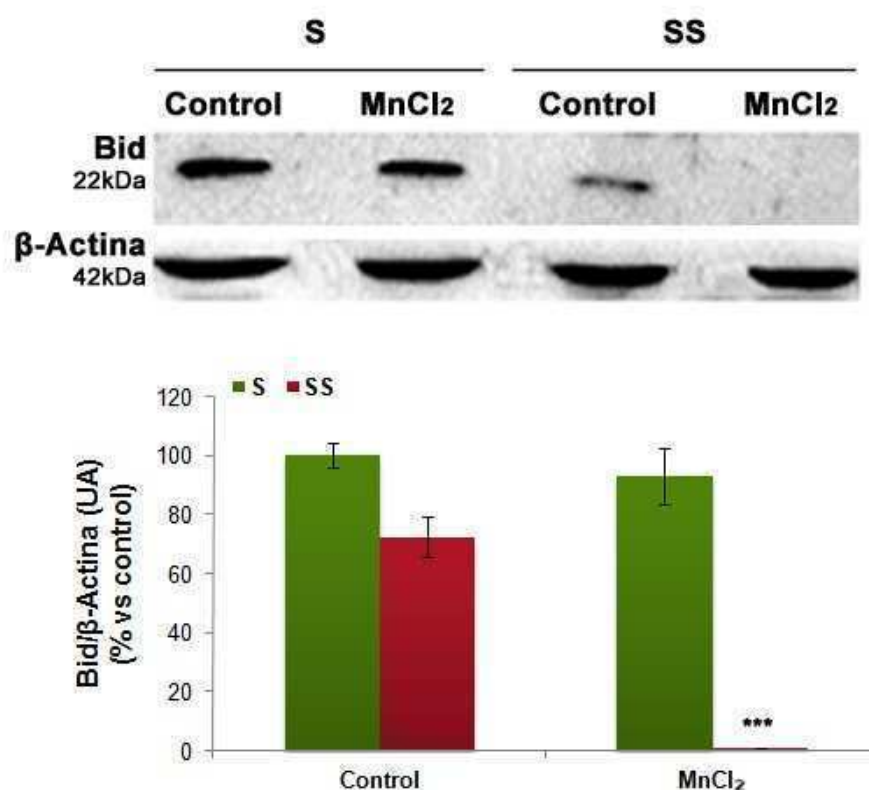


Figura 22. El MnCl₂ induce el clivaje de la proteína pro-apoptótica Bid
Determinación de los niveles de Bid en lisados totales mediante western blot. El resultado es promedio de dos experimentos independientes \pm SEM. *** $p < 0.001$ vs control SS.

4.2.2. El Mn induce la activación de la caspasa 8 en la mitocondria

Otra característica de las células tipo II descrita más recientemente, se basa en el hecho de que la cardiolipina residente en la membrana mitocondrial funciona

como una plataforma de anclaje, oligomerización y activación de la caspasa 8 donde esta enzima forma un complejo con Bid. Estos eventos que ocurren con posterioridad a la activación de Fas son necesarios para una respuesta apoptótica eficiente de las células tipo II (Gonzalvez et al., 2008; Schug et al., 2011).

Por este motivo, se decidió analizar la localización subcelular de la caspasa 8 en nuestro sistema de estudio, para lo cual se realizó un fraccionamiento subcelular seguido de análisis western blot (**Figura 23**). Se observó que tanto para las células control como para las expuestas a Mn en presencia de suero, las proformas de la caspasa 8 se encontraban presentes en ambas fracciones y que el Mn no produjo ninguna modificación en los niveles de la enzima. La localización citoplasmática de la caspasa 8 está ampliamente reportada y se conoce además que interacciona con la mitocondria tanto en condiciones fisiológicas como apoptóticas (Gonzalvez et al., 2008).

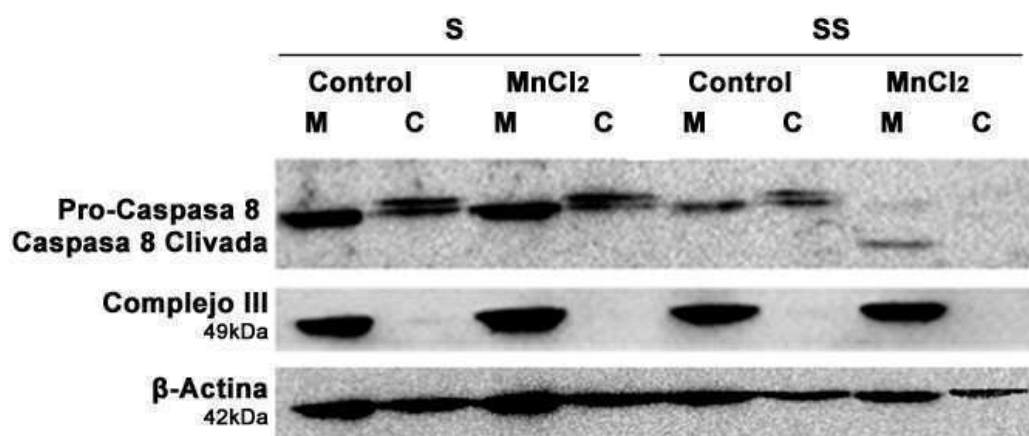


Figura 23. Activación de la caspasa 8 en la mitocondria

Análisis western blot de fracciones enriquecidas en mitocondrias (M) y citosólicas (C) de células tratadas con Mn en presencia (S) y ausencia (SS) de suero. Las membranas fueron lavadas y reprobadas para la realización de controles de carga. Para ello se emplearon los anticuerpos anti- Complex III subunit core 1- OxPhos (Complejo III) para la fracción mitocondrial y anti- β - Actina para la fracción citosólica.

En particular, cuando las células se expusieron a Mn en ausencia de suero se observó el clivaje casi total de la pro-caspasa 8 en la fracción mitocondrial. Un

aspecto a resaltar es la presencia predominante de una de las isoformas de la pro-caspasa 8 en las fracciones mitocondriales que de acuerdo a la migración en el inmunoblot, correspondería a la pro-caspasa 8 de 53kDa. Lo que nos resultó sorprendente es la ausencia de señal de caspasa 8 en la fracción citosólica de células expuestas a Mn. Si bien Gonzalvez et al. (2008) señalan que esta enzima puede ser procesada tanto en el DISC como en la mitocondria, es bien conocido que en las células Tipo II, la activación de la caspasa 8 en el DISC es limitada y necesita del paso de amplificación mediado por la mitocondria.

En resumen, el clivaje de Bid y el reclutamiento de la caspasa 8 a la mitocondria demuestran la existencia de un nexo entre la Vía Extrínseca y la Intrínseca, en la apoptosis inducida por Mn en células C6.

Por lo tanto, una vez establecido la participación de la vía Fas-L/Fas/caspasa 8/ clivaje de Bid, se procedió investigar las proteínas involucradas en la Vía Intrínseca o Mitocondrial.

4.2.3. Activación de la caspasa 9

La caspasa 9 es la caspasa iniciadora de la Vía Apoptótica Mitocondrial. Existen evidencias de la participación de esta enzima en la apoptosis inducida por CdCl₂ en células C6 (Wätjen y Beyersmann, 2004) y en células PC12 incubadas con MnCl₂ empleadas como modelo de estudio de EP (Shibata et al., 2009).

En nuestro sistema, se analizaron mediante análisis western blot los niveles de expresión de la caspasa 9, empleando un anticuerpo que reconoce la banda correspondiente a la proforma de 47kDa. Los resultados indicaron que el tratamiento con Mn durante 24hs indujo el clivaje de la pro-caspasa 9, traducido en una marcada disminución de la señal (**Figura 24A**).

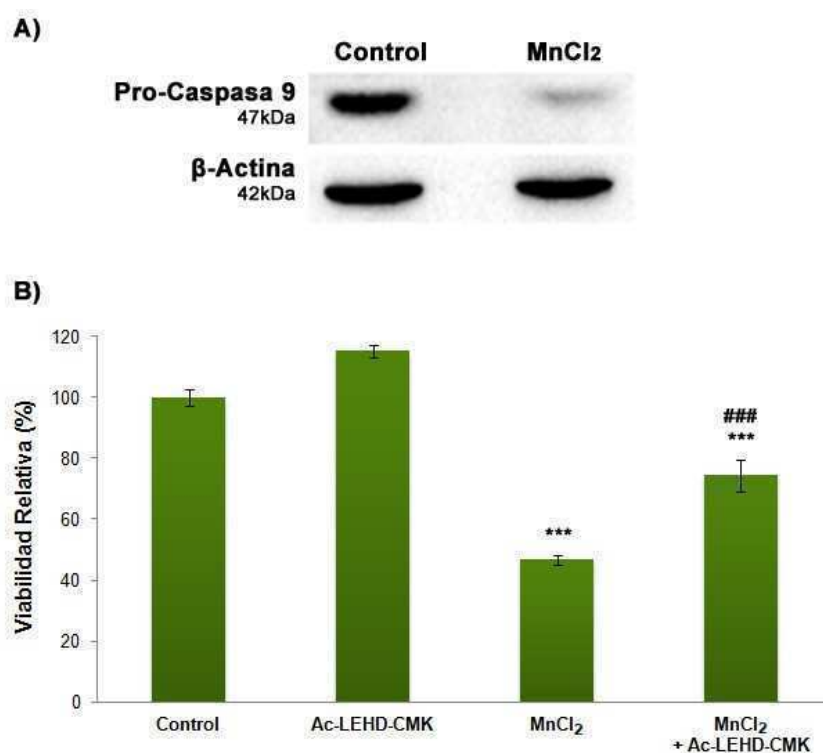


Figura 24. Activación de la caspasa 9

A) Análisis western blot de los niveles de la pro-caspasa 9. Se muestra un experimento representativo de cuatro ensayos realizados. **B)** El inhibidor de caspasa 9 (Ac-LEHD-CMK, 10 μ M) previno parcialmente la muerte celular inducida por Mn medida mediante el ensayo de MTT. Se graficó el promedio de 8 réplicas \pm SEM. *** p <0,001 vs. Control; ### p <0,001 vs. Mn.

Por otra parte, para determinar la relevancia de la actividad de la caspasa 9 en la señalización de muerte por Mn, las células se pre-incubaron durante 1h con el inhibidor específico de dicha caspasa (Ac-LEHD-CMK, 10 μ M) y se midió la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Los resultados obtenidos indicaron que el inhibidor logró prevenir el efecto citotóxico del Mn, obteniéndose una recuperación parcial de la viabilidad celular que alcanzó el valor de $74 \pm 5\%$ (p <0,01), a diferencia del 90% obtenido al inhibir a las caspasas 3 y 8 (**Figura 24B**).

4.2.4. Rol del mPTP

Uno de los eventos característicos de la vía apoptótica mitocondrial es la formación y apertura del mPTP (Tait y Green, 2010).

El mPTP es un complejo proteico integrado por VDAC, ANT y ciclofilina D que se ubica en sitios de contacto entre la MME y la MMI, de manera que comunica a la matriz mitocondrial con el citoplasma. Este es un canal proteico que permite el paso de solutos de un peso molecular inferior a 1,5 kDa de forma no selectiva, dando lugar al colapso del $\Delta\psi_m$ y a la liberación de factores que ejecutan el programa apoptótico. Es por ello que el control de la permeabilidad de la membrana mitocondrial resulta crucial para la supervivencia y destino celular. Existen inhibidores farmacológicos de este poro que pueden ser potenciales agentes terapéuticos frente al daño por isquemia/reperfusión, trauma y enfermedades neurodegenerativas (Waldmeier et al., 2003; Rama Rao y Norenberg, 2004).

La Ciclosporina A (CsA) es un inhibidor farmacológico que impide la formación del mPTP secuestrando a uno de sus componentes, la ciclofilina D. Su acción citoprotectora frente a la apoptosis ha sido demostrada en numerosos modelos celulares (Broekemeier et al., 1989; Waldmeier et al., 2003). No obstante, debe tenerse en cuenta que la CsA es normalmente utilizada en el tratamiento de enfermedades autoinmunes por ser un supresor de la actividad de los linfocitos T y otros tipos celulares (Trajković et al., 1998). En este sentido, Zupanska et al. (2005) han determinado que la CsA 16 μ M induce muerte en líneas celulares de glioma humano (T98G, U373-MG y U87-MG). Resultados similares obtuvieron Mosieniak et al. (1997) empleando CsA 62 μ M en células C6. Por lo tanto, para evaluar si el Mn induce la apertura del mPTP empleando CsA se realizó previamente una curva dosis-respuesta para establecer la concentración adecuada que no produzca citotoxicidad en las células C6 (**Figura 25A**). Se estableció como concentración óptima la de 1 μ M, ya que concentraciones superiores a ésta resultaron ser citotóxicas. Posteriormente se analizó el efecto de CsA sobre la muerte celular inducida por Mn. Los resultados obtenidos demostraron que la pre-incubación con

CsA logró prevenir en un $35 \pm 2\%$ ($p < 0,01$) la pérdida de viabilidad celular inducida por Mn (**Figura 25B**) en concordancia con experimentos realizados en cultivos primarios de astrocitos de rata que indican que el Mn^{3+} induce la apertura de mPTP (Rama Rao y Norenberg, 2004; Rama Rao et al., 2007).

Si bien estos hallazgos muestran que la apertura del mPTP está involucrada en los efectos citotóxicos del Mn, la recuperación parcial obtenida sugiere que existen mecanismos alternativos que contribuyen a la injuria mitocondrial.

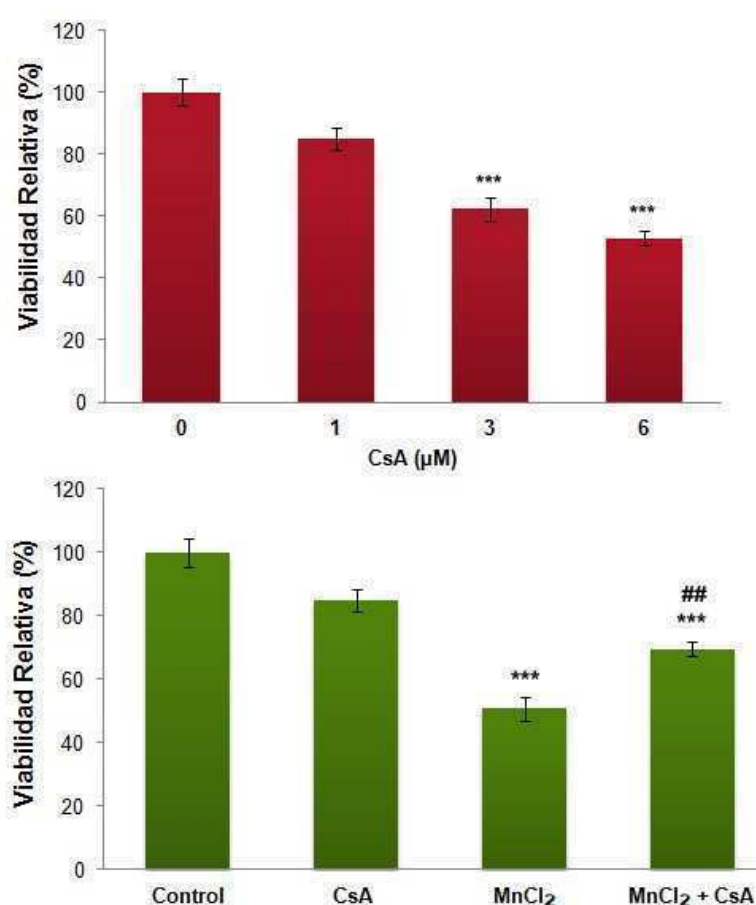


Figura 25. El $MnCl_2$ induce la apertura del mPTP

A) Curva dosis-respuesta de CsA. **B)** Efecto de CsA ($1\mu M$) sobre la viabilidad celular medido por el ensayo de MTT. En cada caso se graficó el promedio de 8 réplicas \pm SEM. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. control; * $p < 0,05$ vs. Mn.

4.2.5. Liberación del citocromo c

Entre los factores pro-apoptóticos liberados desde el EIM al citoplasma, el citocromo c fue uno de los primeros reportados. Una vez en el citosol, el citocromo

c promueve la formación del apoptosoma y consecuente activación de la pro-caspasa 9 (Tait y Green, 2010).

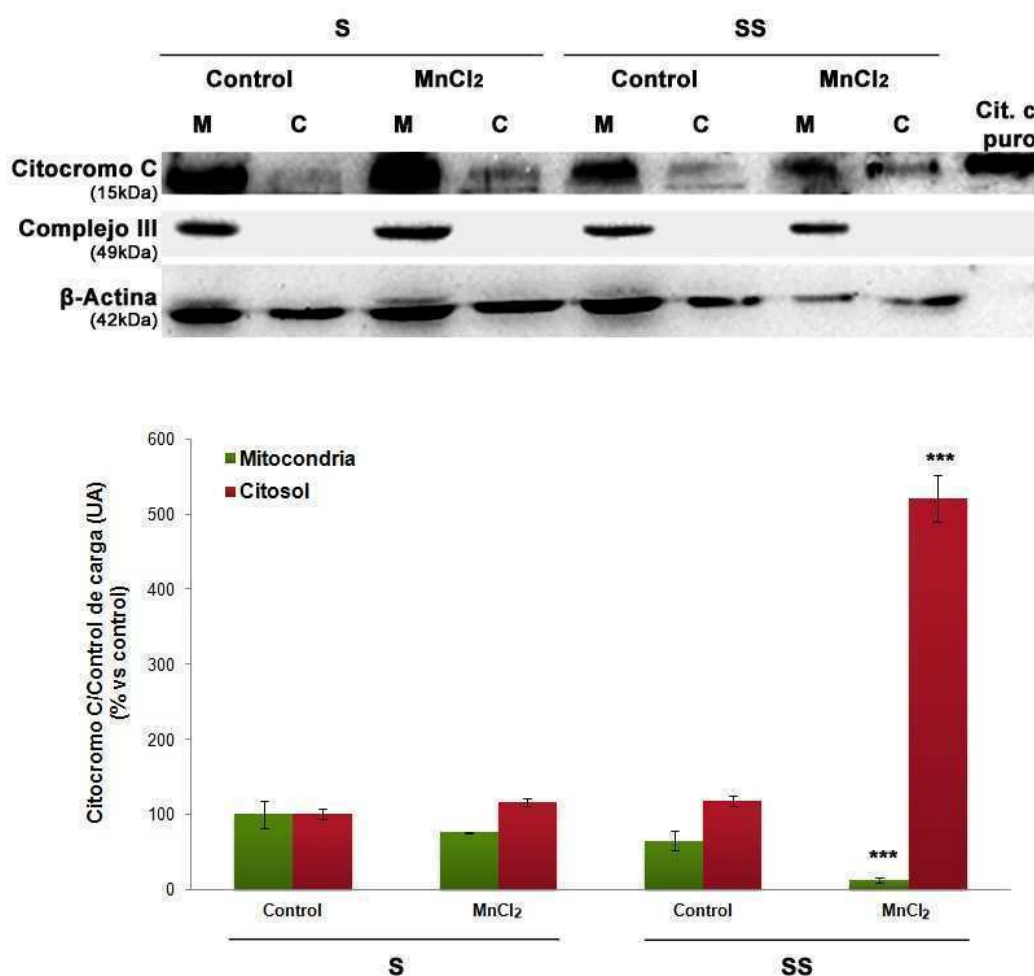


Figura 26. El MnCl₂ induce la liberación del citocromo c al citosol

Se realizó un fraccionamiento subcelular para aislar fracciones enriquecidas en mitocondrias (M) y citosólicas (C) de células tratadas con Mn en presencia (S) y ausencia (SS) de suero, seguido de análisis western blot. Se utilizó citocromo c puro como patrón de migración en el gel de poliacrilamida. Las membranas fueron lavadas y reprobadas para la realización de controles de carga. Para ello se emplearon los siguientes anticuerpos: anticuerpo anti-Complex III subunit core 1- OxPhos (Complejo III) para la fracción mitocondrial y anti-β-Actina para la fracción citosólica.

Por lo tanto, se analizó en nuestro sistema la localización del citocromo c mediante fraccionamiento subcelular seguido de análisis western blot. Los resultados indicaron que la presencia del citocromo c en la fracción enriquecida en mitocondrias disminuyó en un $87 \pm 3\%$ ($p < 0,001$) por efecto del Mn en ausencia de suero. Así mismo, la aparición de la señal en la fracción citosólica correspondiente al mismo

tratamiento se incrementó 5,2 veces con respecto a su control ($p < 0,001$). Por otra parte, no hubo cambios en los niveles de citocromo c presente en las fracciones mitocondriales de células control sin suero y de aquellas incubadas con Mn en presencia de suero (**Figura 26**).

Estos hallazgos concuerdan con los descriptos por González et al. (2008) donde se determinó que la incubación de astrocitos primarios de corteza de rata con Mn 1mM durante 24hs promueve la liberación casi completa (84%) del citocromo c desde la mitocondria hacia el citosol.

4.2.6. Rol de los miembros de la familia Bcl-2

La familia de proteínas Bcl-2, constituida por miembros pro- y anti-apoptóticos, desempeña un rol clave en la regulación de la vía apoptótica mitocondrial (Chipuk et al., 2010). Entre ellos, Bax ejerce una función inductora de apoptosis mediada por su traslocación y oligomerización en la MME promoviendo la permeabilización de dicha membrana y permitiendo la liberación de factores pro-apoptóticos desde esta organela. Precisamente, la forma truncada de Bid induce la oligomerización de Bax. Por otra parte, la proteína Bcl-2 previene la activación de la vía intrínseca de muerte a través de la formación de heterodímeros con miembros pro-apoptóticos de su misma familia (Chipuk et al., 2010).

Para investigar el rol de estos miembros de la familia Bcl-2 en nuestro modelo, se analizaron en primer lugar los niveles de expresión de Bcl-2 y Bax en lisados totales. Los resultados indicaron que el Mn disminuyó en un $49 \pm 9\%$ ($p < 0,01$) los niveles de Bcl-2 e incrementó en un $33 \pm 6\%$ ($p < 0,05$) los niveles de Bax con respecto a sus controles (**Figura 27A**).

Cuando se estudiaron las fracciones subcelulares se observó que la exposición a Mn indujo un marcado incremento tanto en los niveles de Bax (4,3

veces) como en los de Bcl-2 (5 veces) en la fracción mitocondrial. Este efecto estuvo acompañado por una disminución del 50% en los niveles de Bax ($p < 0,01$) y una casi por completa desaparición de la expresión de Bcl-2 en las fracciones citosólicas ($p < 0,001$) (**Figura 27B**). Cabe destacar que el peso molecular de la proteína Bcl-2 hallada en los lisados totales y en las fracciones citosólicas corresponde a 26kDa. Sin embargo, el fragmento presente en las fracciones mitocondriales de células tratadas con Mn resultó ser de menor peso molecular (23kDa). Existen evidencias que indican que Bcl-2 puede ser clivada por las caspasas 3 y 8 (Cheng et al., 1997; Zhu et al., 2007). Este clivaje resulta en la pérdida del dominio BH4 amino-terminal lo cual podría inhibir su actividad anti-apoptótica y/o convertirlo en una molécula pro-apoptótica “tipo-Bax”.

El conjunto de resultados obtenidos en este apartado demuestran que el Mn activa la vía mitocondrial de muerte y produce un cambio en los niveles de proteínas Bcl-2 y Bax de modo tal de favorecer el proceso apoptótico.

4.2.7. Participación de p53

El gen supresor de tumores *p53* codifica para la proteína p53 encargada de modular funciones celulares tales como la transcripción génica, la síntesis y reparación del ADN, el arresto del ciclo celular, la senescencia y la apoptosis.

Sus niveles aumentan significativamente frente a diversos estímulos de estrés, incluyendo radiación ionizante y UV, hipoxia, privación de factores de crecimiento, activación de oncogenes y presencia de drogas citotóxicas (Slee et al., 2004).

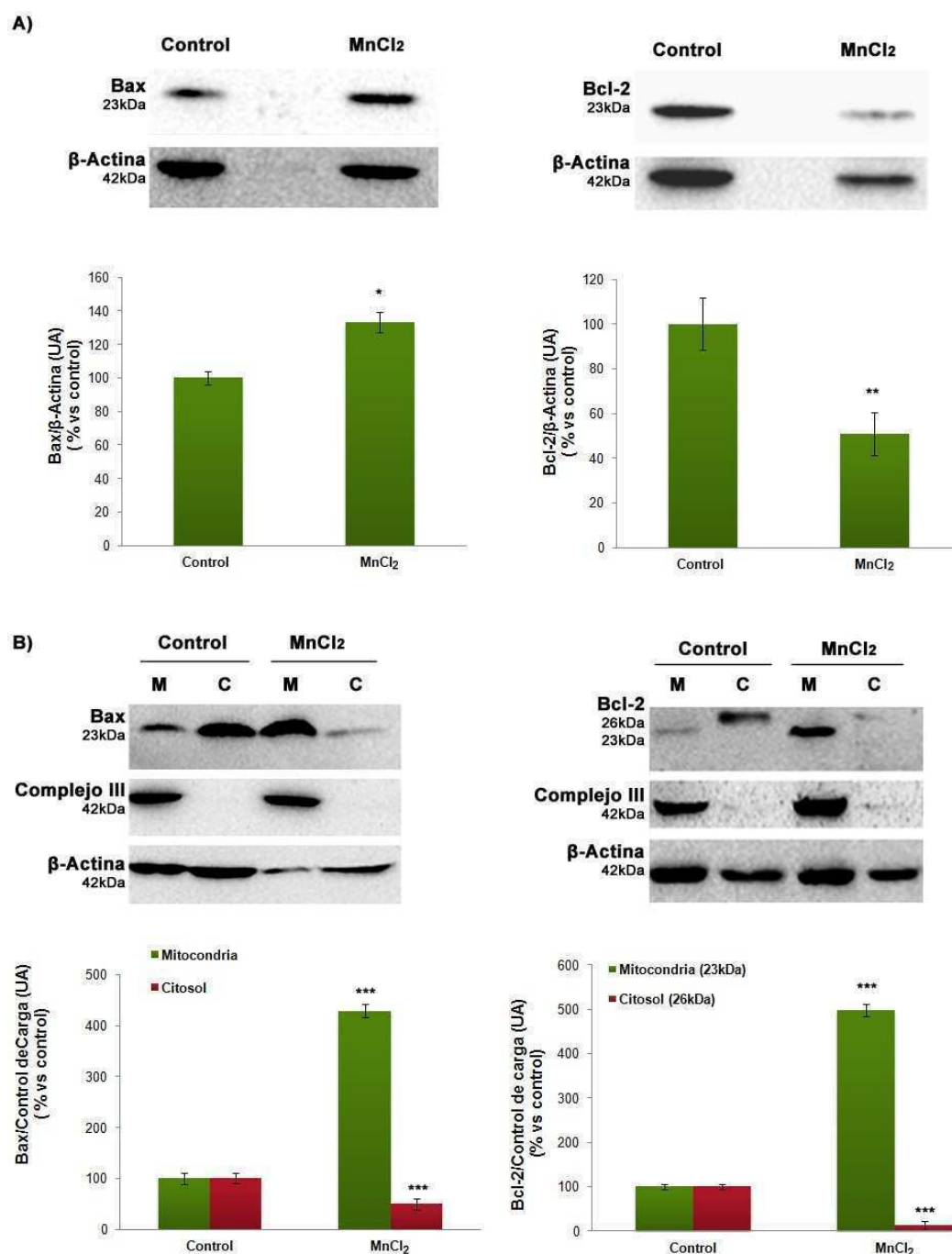


Figura 27. Rol de los miembros de la familia Bcl-2 en la apoptosis inducida por MnCl₂

Niveles de expresión de Bax y Bcl-2 en lisados celulares totales (A-B) y fracciones enriquecidas en mitocondrias (M) y citosólicas (C) (C-D). Las muestras se separaron en un gel SDS-PAGE 12% y se revelaron mediante el empleo de anticuerpos policlonales específicos para cada proteína. Las membranas fueron lavadas y reprobadas para la realización de controles de carga. Para ello se emplearon los siguientes anticuerpos: en la fracción mitocondrial, anticuerpo anti- Complejo III subunit core 1- OxPhos (Complejo III), y en la fracción citosólica, anti- β -Actina. Los gráficos de barras representan las cuantificaciones de la intensidad relativa de las bandas en unidades arbitrarias. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ vs control.

La fosforilación de la proteína p53 la libera de su asociación con Mdm2 permitiéndole ejercer su función como factor de transcripción. Como tal, aumenta la expresión de genes relevantes para la reparación del daño al ADN, inhibe la progresión a través del ciclo celular y/o promueve la apoptosis. Esta última función la ejerce por aumento en la expresión de genes pro-apoptóticos como PUMA, Noxa, Bax, Apaf-1 y Fas o mediante la inhibición de la expresión de genes anti-apoptóticos, como Bcl-2 y Bcl-x_L (Slee et al., 2004). Por otra parte, se han reportado para p53 actividades independientes de su función como factor de transcripción que incluyen su interacción directa con proteínas de la familia Bcl-2. De esta manera, aunque p53 ha sido implicado en ambas vías apoptóticas, influye de manera predominante sobre la vía mitocondrial donde también puede promover la MOMP (Vousden y Lane, 2007).

Dado que p53 regula la expresión de genes vinculados a la función mitocondrial y al estrés oxidativo, se ha propuesto su participación en la disfunción de dicha organela asociada a enfermedades neurodegenerativas tales como EP, Alzheimer y Huntington (Vousden y Lane, 2007; Chang et al., 2011).

Teniendo en cuenta que hemos descripto la participación de proteínas para las cuales p53 actúa como factor de transcripción, se procedió al análisis de sus niveles de expresión en lisados totales de células expuestas a Mn (**Figura 28**). Se observó que el Mn aumenta dramáticamente los niveles de p53 en condiciones de ausencia de SFB. Si bien está descripto que las células C6 expresan p53, no se observaron niveles detectables de la misma en el resto de las condiciones experimentales ensayadas. Por lo tanto, la robusta inducción de los niveles de p53, sumada a los anteriores resultados, sugiere que ésta proteína estaría asociada al proceso apoptótico.

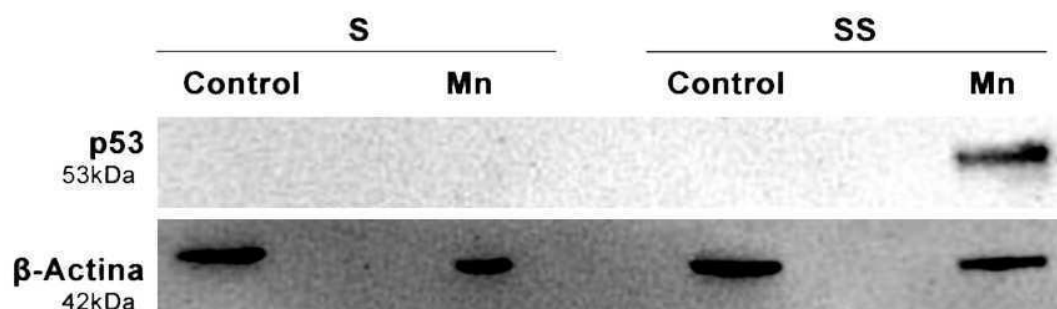


Figura 28. Niveles de p53

Se determinaron los niveles de p53 mediante Western. Las muestras analizadas provienen de lisados totales de células incubadas en presencia (S) y ausencia de suero (SS) y expuestas a Mn durante 24hs. Resultado representativo de 4 experimentos independientes.

5. Citotoxicidad del Mn y dinámica mitocondrial

Las mitocondrias son organelas morfológicamente dinámicas, que se dividen y se fusionan formando grandes redes de túbulos interconectados dentro de la célula. En células sanas, las mitocondrias mantienen su morfología gracias a un estricto balance entre los eventos de fusión y fisión. El estudio del equilibrio fusión/fisión representa uno de los abordajes más excitantes en el campo de la fisiología mitocondrial y es de data muy reciente. Este balance altamente dinámico no solo controla la morfología de la mitocondrias y su número, sino que también impacta sobre la función y distribución de estas organelas. Por esta causa, no resulta sorprendente que las anomalías en la dinámica mitocondrial constituyan un importante mecanismo implicado en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la EP, Alzheimer y Huntington (Su et al., 2010).

Como ya se mencionó, las mitocondrias desempeñan un rol relevante en la progresión de la apoptosis. Durante la misma, las redes mitocondriales sufren un drástico remodelamiento que transforma los largos filamentos interconectados en pequeñas esferas. Si bien hay acuerdo en cuanto a este proceso, existen controversias en lo referente al rol de una fusión disminuida y/o una fisión aumentada, en la progresión de la cascada apoptótica mitocondrial. Por otra parte,

está establecido que la fisión mitocondrial ocurre en el mismo marco temporal que la activación de Bax y la MOMP, lo cual da lugar a la liberación de citocromo c y otras proteínas apoptogénicas desde el EIM al citoplasma. Sin embargo, no existe aún un consenso acerca de si la fisión mitocondrial ocurre antes, después o de manera simultánea a la MOMP (Martinou y Youle, 2006).

Dado que hemos demostrado que la vía mitocondrial juega un rol protagónico en la apoptosis inducida por Mn, resultó de gran interés abordar el estudio de los efectos de este metal sobre la dinámica mitocondrial y sobre los niveles de expresión de proteínas involucradas en los eventos de fusión y fisión. Adicionalmente se analizó el rol de estas proteínas en la apoptosis.

5.1. El Mn induce disipación del potencial de membrana y fragmentación de las redes mitocondriales

Para encarar este abordaje experimental se empleó el reactivo fluorescente MitoTracker Red CMXRos (75nM) el cual ingresa a las mitocondrias y queda retenido en aquellas que conservan un $\Delta\psi_m$ normal en tanto que se libera al citoplasma cuando hay disrupción de dicho potencial. De esta manera, la observación, mediante microscopía de fluorescencia, de células cargadas con este colorante nos permitió analizar el efecto del Mn sobre la red de túbulos interconectados que forman las mitocondrias y sobre el $\Delta\psi_m$.

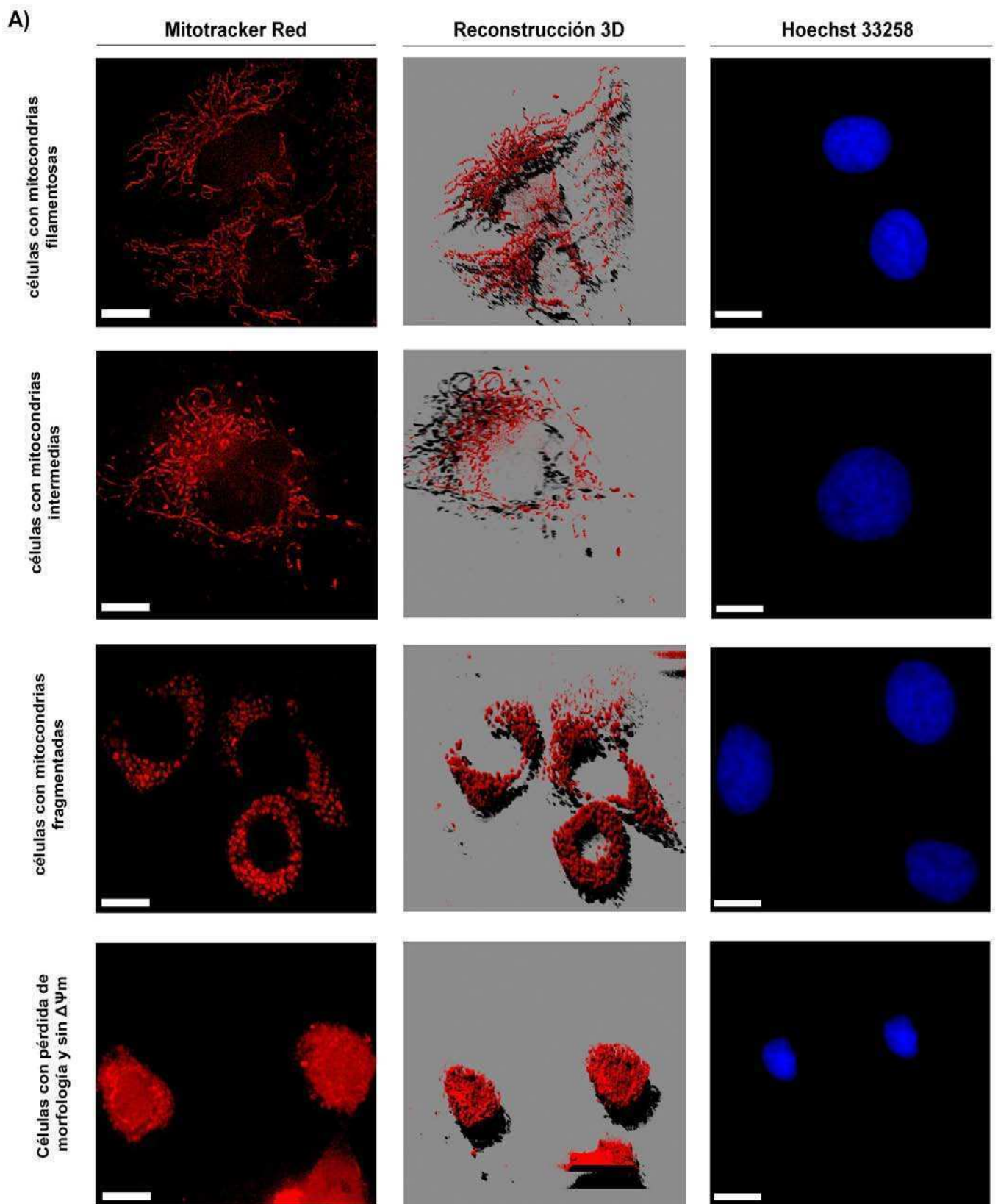
Con respecto a la morfología mitocondrial, se estableció una clasificación tomando como base las reportadas en la bibliografía (Duvezin-Caubet et al., 2006; Jendrach et al., 2008). Se diferenciaron cuatro categorías de células: células con mitocondrias filamentosas (normales), células con mitocondrias intermedias (mitocondrias tubulares con regiones globulares-hinchadas), células con mitocondrias fragmentadas (globulares) y células redondeadas presentando pérdida

completa de la morfología normal y una dramática disipación del $\Delta\psi_m$, reflejada por un marcado aumento en la tinción citoplasmática. Por otra parte, se llevaron a cabo reconstrucciones tridimensionales de las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia, según describen Olichon et al. (2003). El efecto tridimensional permite una simulación de volumen, gracias a la restauración por deconvolución de una serie de 30-35 imágenes adyacentes. Dichas imágenes se toman a un campo visual y luego se les aplica el logaritmo de *Maximun Likelihood Estimation* empleando el software *Huygens Deconvolution*. Estas imágenes tridimensionales permitieron la visualización con mayor detalle y calidad de los cambios morfológicos que ocurren en las mitocondrias de las células C6 expuestas a Mn (**Figura 29A**).

Los resultados obtenidos al realizar el recuento de células acorde a la clasificación mencionada anteriormente se muestran en la **Figura 29B**. En las células control, ya sea en medio con ó sin suero, las mitocondrias formaban una extensa red de filamentos dispersos por toda la superficie celular, un patrón característico de este tipo celular. La exposición a Mn en medio carente de suero condujo a un incremento en la fisión mitocondrial determinado por una disminución del $60 \pm 12\%$ ($p < 0,001$) en el número de células presentando mitocondrias filamentosas, un aumento de 2 y 5 veces en el número de células presentando mitocondrias en estado intermedio y fragmentado respectivamente ($p < 0,01$) y un incremento de 6 veces ($p < 0,001$) en el número de células redondeadas con disipación del $\Delta\psi_m$. Estas últimas fueron las únicas que exhibieron además condensación y en algunos casos hasta fragmentación de la cromatina consistente con el proceso de muerte celular apoptótica. Estos resultados sugieren que la disfunción en el balance fusión/fisión ocurriría río arriba de la activación de las caspasas efectoras responsables de la condensación y fragmentación del ADN. Un evento característico de las mitocondrias fragmentadas es el de agruparse como

agregados perinucleares (Sheridan y Martin, 2010) lo cual se visualiza claramente en la **Figura 29A**. En presencia de SFB, no se observaron efectos del Mn sobre los parámetros analizados.

Existen reportes que indican que la disipación del $\Delta\phi_m$ compromete la maquinaria de fusión mitocondrial conduciendo a un aumento de la fragmentación (Legros et al., 2002). Por este motivo, se analizó el efecto del inhibidor CsA utilizando Mitotracker Red y contabilizando células bajo el mismo criterio de clasificación descrito anteriormente. Se observó que la CsA (1 μ M) ejerció un efecto protector sobre las mitocondrias que se traduce en un 90% ($p < 0,001$) de aumento en el número de células con mitocondrias conservadas (filamentosas) y una disminución del 30%, 80% y 25% ($p < 0,001$) en el número de células con mitocondrias intermedias, fragmentadas y células con pérdida del $\Delta\phi_m$ respectivamente, en comparación con las células tratadas con Mn (**Figura 29B**). Estos resultados en conjunto indican que el Mn altera el balance entre los procesos de fusión/fisión induciendo la fragmentación de la red mitocondrial y que la disipación del $\Delta\phi_m$ cumple un rol en este efecto.



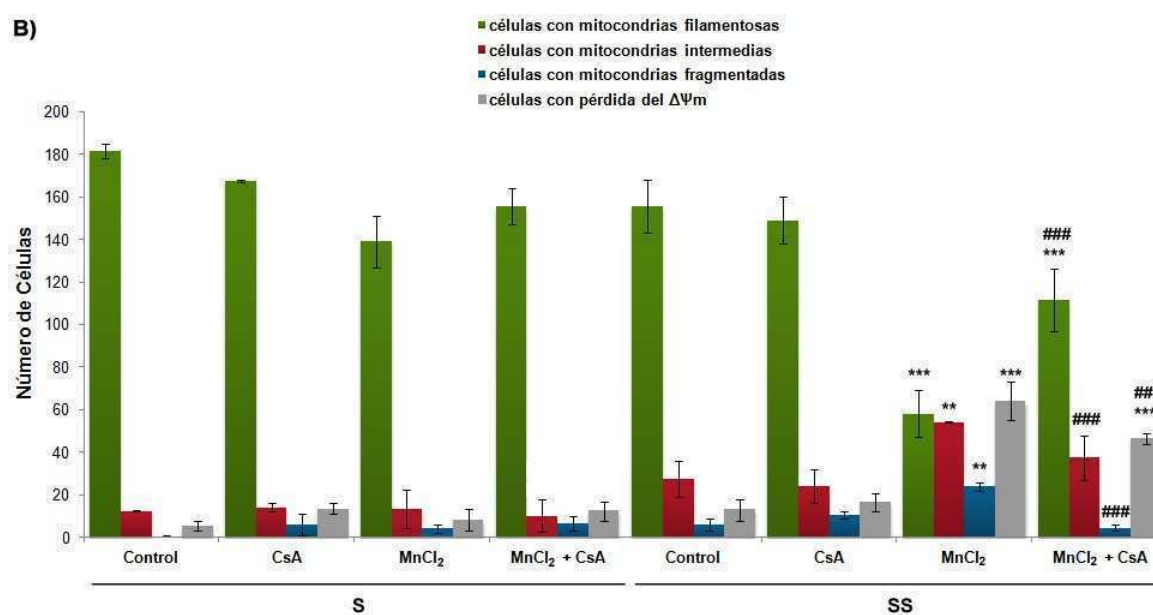


Figura 29. El MnCl₂ induce alteraciones en la morfología mitocondrial y pérdida del $\Delta\psi_m$

A) Microscopía de fluorescencia: luego de 24hs de exposición a Mn, las células se incubaron durante 30min a 37°C con el reactivo MitoTracker Red CMXRos (75nM). Los preparados se fijaron con PFA 4% y se observaron con un microscopio de fluorescencia. Se establecieron tres categorías de células de acuerdo a la morfología mitocondrial: filamentosas, intermedias y fragmentadas. Por otra parte, se distinguieron células con pérdida de morfología y disipación del $\Delta\psi_m$ (Barra: 10 μ M; Aumento: 63X. Aumento: 63X. De cada imagen de fluorescencia se realizaron reconstrucciones 3D que corresponden a simulaciones de volumen realizadas con el Huygens Deconvolution Software. Los núcleos de las células incubadas Mitotracker Red no corresponden a los teñidos con el reactivo Hoechst 33258 sino a otra de las repeticiones del ensayo (Barra: 10 μ m; Aumento: 100X). Aumento: 100X. **B)** Cuantificación: se contabilizaron 200 células por tratamiento y se clasificaron de acuerdo a las categorías establecidas. El resultado es promedio de tres experimentos independientes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. control y ### $p < 0,001$ vs. Mn. S: suero. SS: sin suero.

5.2. Proteínas reguladoras de la fusión y la fisión mitocondrial

Una vez demostrado el compromiso de la dinámica mitocondrial nos interesó profundizar los estudios en este campo analizando en primer lugar el efecto de la exposición a Mn sobre los niveles de expresión de dos proteínas clave: la proteína de fusión Opa-1 y la de fisión Drp-1. Seguidamente se estudió el papel desempeñado por ambas proteínas en el proceso apoptótico.

5.2.1. Opa-1

La proteína Opa-1 está encargada de modular el proceso de fusión y controlar la arquitectura de las crestas mitocondriales regulando las uniones y el diámetro entre ellas. Existen numerosos trabajos centrados en el estudio de esta proteína en distintas líneas celulares: neuroblastoma (Wang et al., 2009), cultivos primarios de neuronas (Loucks et al., 2009), miocitos cardíacos H9C2 (Chen et al., 2009), HeLa (Baricault et al., 2007) y hepatocitos (Yamaguchi et al., 2008). Sin embargo, si bien se cuenta con información acerca de la función de Opa-1 en tejidos del SNC (Bette et al., 2005) hasta donde conocemos, aún no existen publicaciones que describan el rol de Opa-1 en células gliales en modelos de enfermedades neurodegenerativas.

5.2.1.1. El Mn induce el clivaje y liberación al citoplasma de Opa-1

Nosotros abordamos esta temática analizando en primer lugar los niveles de expresión de Opa-1 en lisados celulares totales mediante western blot, empleando un anticuerpo monoclonal que reconoce los residuos 708-830 correspondientes al dominio GTPasa efector.

El inmunoblot reveló la presencia de dos bandas de PM ~107 y ~94 kDa con igual expresión en ambos controles, como también en los lisados provenientes de células expuestas a Mn en presencia de suero. La incubación con Mn en ausencia de suero, indujo el clivaje y/o la disminución de la expresión de las dos formas de Opa-1 evidenciándose además la aparición de una banda de ~71kDa (**Figura 30A**). El doblete de bandas de alto PM coincide con los datos de bibliografía referentes a células de origen nervioso (Olichon et al., 2002; Bette et al., 2005; Ju et al., 2005; Loucks et al., 2009 y Wang et al., 2009; Ganapathy, 2011). Estos autores reportaron en distintos modelos experimentales la presencia de dos bandas cuyo PM se encontraba entre 80 y 100kDa. Por otra parte, trabajos realizados en células HeLa

demonstraron la presencia de 5 bandas dentro del mismo rango de PM (Olichon et al., 2002; Baricault et al., 2007; Griparic et al., 2007). Sin embargo, la banda de PM ~71kDa, correspondiente a un producto de clivaje, fue únicamente descrita por Loucks et al. (2009) en neuronas granulares de cerebelo de rata incubadas con Toxina B (*C.difficile*) y concentraciones de K^+ 5mM (5K), condiciones que inducen la vía apoptótica intrínseca. Estos autores propusieron que este fragmento era incapaz de oligomerizar y contribuir con el sellado y estructura de las crestas mitocondriales. Evidentemente, esta banda de ~71kDA es un producto difícil de detectar y de hecho nosotros no pudimos lograr reproducibilidad en este aspecto a lo largo de los experimentos.

En base a estos resultados y a los hallazgos de Song et al. (2007) quienes proponen que la disrupción del $\Delta\phi m$ lleva no sólo al procesamiento sino también a la degradación de las isoformas largas de Opa-1, decidimos realizar el análisis de los western blot empleando como parámetro la variación en los niveles de las bandas de alto PM, en concordancia con lo encontrado en la casi totalidad de las publicaciones.

Se ha reportado que Opa-1 es procesada en 8 variantes de splicing y que cambios en el balance entre las isoformas largas y las cortas afectan el proceso de fusión (Ishishara et al., 2006). Un incremento en el procesamiento de Opa-1 conduciendo a la presencia de mayores niveles de la proteína soluble ocurre después de la pérdida del $\Delta\phi m$ y/o la inducción de la apoptosis resultando en una extensiva fragmentación mitocondrial y disrupción de la arquitectura de las crestas. Esta fragmentación puede prevenirse por sobreexpresión de las isoformas largas de Opa-1 (Ishishara et al., 2006; Palmer et al., 2011).

Cuando se analizó la localización subcelular de Opa-1 se encontró que el Mn indujo la liberación de Opa-1 desde la mitocondria hacia el citoplasma, como se demuestra por la disminución de la señal en la fracción enriquecida en mitocondrias

(~60%; $p < 0,01$) y el aumento en los niveles citosólicos (~128 y 160%; $p < 0,001$) (Figura 30B).

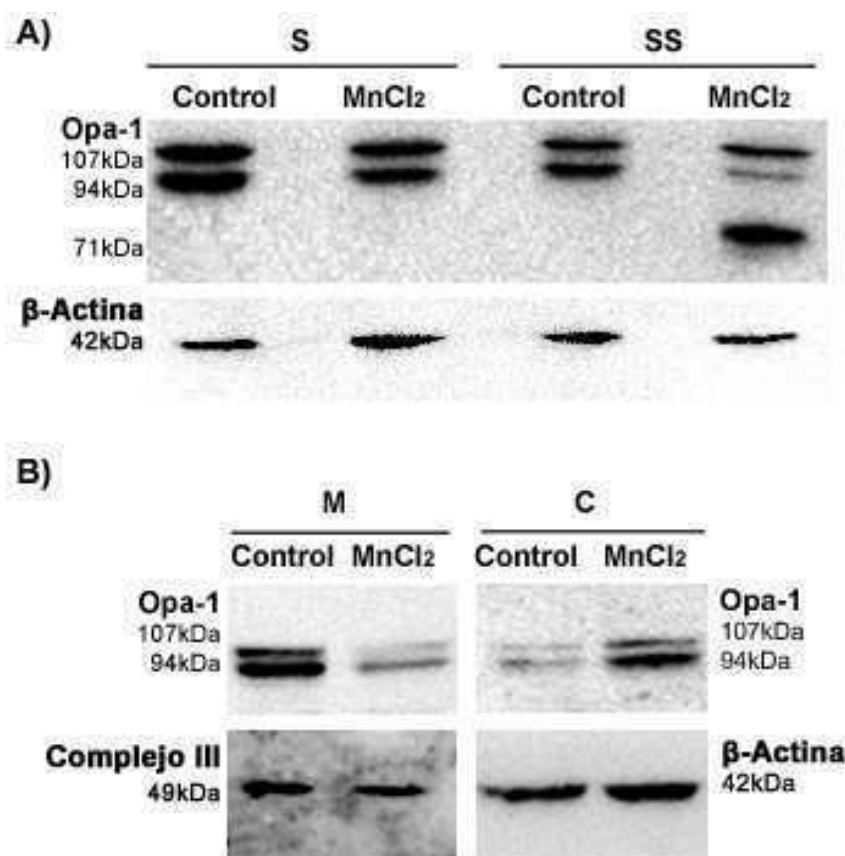


Figura 30. El MnCl₂ induce el procesamiento de Opa-1 y su liberación al citoplasma
A) Clivaje de OPA-1: Niveles de Opa-1 presentes en lisados totales de células C6 tratadas con Mn en presencia (S) y ausencia (SS) de suero. El resultado es representativo de cuatro experimentos independientes. **B)** Localización subcelular de Opa-1: las células se incubaron con Mn en ausencia de suero y luego de 24hs se realizó un fraccionamiento subcelular para aislar fracciones enriquecidas en mitocondrias (M) y citosólicas (C). Las membranas fueron lavadas y reprobadas para control de carga empleando el anticuerpo anti-Complejo III subunit core 1- OxPhos (Complejo III) para la fracción mitocondrial y el anticuerpo anti- β -Actina para la fracción citosólica. El resultado es representativo de tres experimentos independientes.

5.2.1.2. Rol del mPTP y de las ROS en el procesamiento de Opa-1

En el presente trabajo hemos demostrado que el Mn induce la generación de ROS los cuales resultan letales para la célula induciendo la disipación del $\Delta\psi_m$ lo cual impacta a nivel del mPTP. La apertura del mPTP es un proceso que

compromete a las membranas interna y externa de las mitocondrias, conduciendo a un incremento de su permeabilidad y al desencadenamiento de una segunda oleada de generación de ROS como consecuencia del desacople de la cadena transportadora de electrones (Mattson y Kroemer, 2003).

Con el objeto de evaluar si la apertura del mPTP tenía un impacto sobre el procesamiento de Opa-1 se pre-incubaron las células con CsA (1 μ M) y se analizaron los niveles de proteína mediante western blot. Los resultados obtenidos muestran que la CsA previno el clivaje de ambas isoformas de Opa-1 en un 55 y 24% respectivamente ($p < 0,01$) (**Figura 31A**). Esto ubicaría a la MOMP en un paso previo al procesamiento de dicha proteína, en concordancia con lo demostrado en la **Figura 29B**.

Para estudiar el efecto de las ROS sobre el procesamiento de Opa-1 las células se pre-incubaron con GSH 1mM por ser uno de los antioxidantes que resultó más efectivo en prevenir la muerte celular inducida por Mn (**Figura 17B**). El GSH logró prevenir en un 42 y 47% ($p < 0,01$) el clivaje de Opa-1 inducido por Mn en las isoformas de ~107 y ~94kDa respectivamente. Este efecto puede ser debido a que el GSH previene la muerte celular neutralizando las ROS (**Figura 17**) y como consecuencia la cascada de eventos que la acompaña (**Figura 31B**).

Los resultados de la **Figura 31** permitirían concluir que la apertura del mPTP, la disipación del $\Delta\psi_m$ y la generación de ROS en células expuestas a Mn, son eventos que ocurren río arriba del procesamiento de Opa-1 y la consecuente promoción de la fisión mitocondrial.

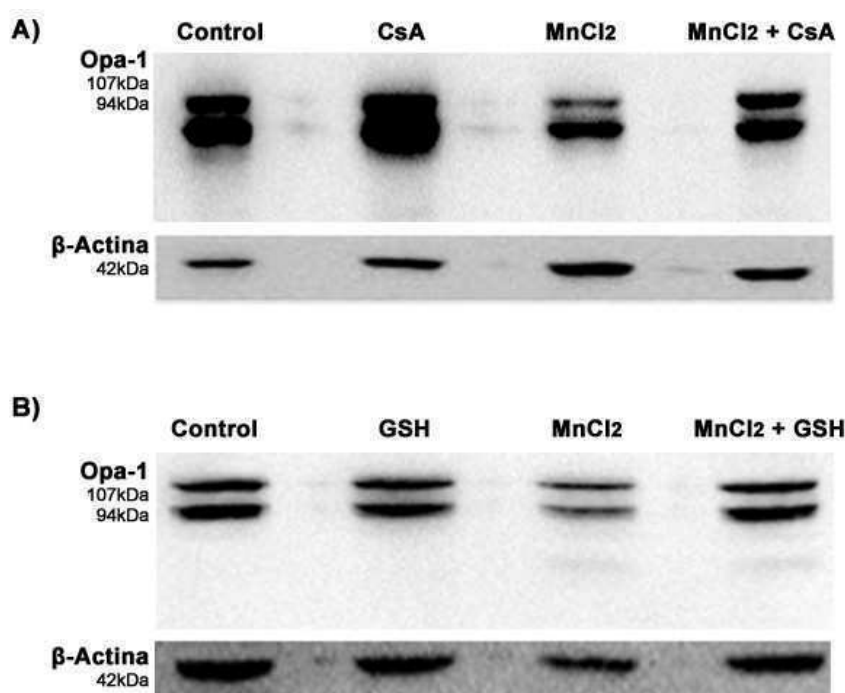


Figura 31. Rol del mPTP y de las ROS en el clivaje del Opa-1

Las células fueron preincubadas durante 1h con CsA 1 μ M (A) y GSH 1mM (B) y luego expuestas a Mn. Las membranas se lavaron y reprobaron con anti- β -Actina como control de carga. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

5.2.1.3. La activación de la caspasa 8 interviene en el clivaje de Opa-1

Teniendo en cuenta los resultados previos que demuestran que la caspasa 8 sería iniciadora de la señal de muerte inducida por Mn y que además, tiene localización mitocondrial, se estudió si el clivaje de Opa-1 era dependiente de la activación de esta caspasa. La pre-incubación con el inhibidor de caspasa 8 (z-IETD-FMK, 10 μ M) previno el procesamiento de Opa-1 y disminuyó en un 90% la señal del fragmento de ~71kDa (**Figura 32**). Cabe destacar que para detectar el producto de clivaje y las formas de alto PM en el inmunoblot, tuvieron que llevarse a cabo revelados a diferentes tiempos. Así, en tiempos breves, se detectaron las diferencias en los niveles de las formas de ~107 y ~94kDa, mientras que un tiempo de revelado mayor, permitió evidenciar la banda de ~71kDa.

Por otra parte, nuestros resultados se asemejan a los obtenidos por Loucks et al. (2009) quienes estudiaron el efecto de inhibidores de las caspasas 3, 8 y 9 sobre el clivaje de Opa-1 en neuronas granulares de cerebelo de rata. Estos investigadores lograron prevenir el procesamiento de Opa-1 al inhibir a las caspasas 3 y 8, mientras que no obtuvieron efecto al inhibir a la caspasa 9, en línea con el hecho de que la caspasa 9 actúa río debajo de la cadena de eventos que tienen lugar sobre la mitocondria.

El resultado de la **Figura 32** es concluyente en vincular a la cascada de eventos apoptóticos con la maquinaria de fusión mitocondrial.

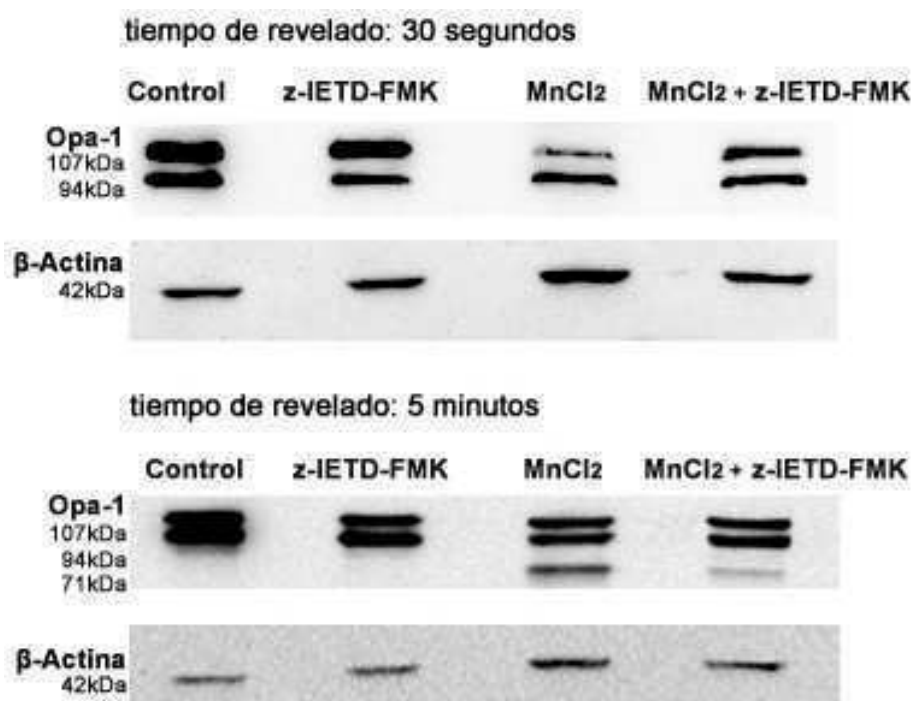


Figura 32. Efecto de la caspasa 8 sobre el clivaje de Opa-1

Las células se pre-incubaron durante 1h con el inhibidor de caspasa 8 (Z-IETD-FMK, 10 μ M) y luego se expusieron a Mn. Las membranas se lavaron y reprobaron con anti- β -Actina como control de carga.

5.2.1.4. Rol de Opa-1 en la apoptosis inducida por Mn

Para demostrar de manera más concluyente que Opa-1 participa en la vía de señales apoptótica inducida por Mn, se realizaron experimentos de sobre-expresión

de esta proteína. Para ello, las células C6 se transfectaron transientemente con los plásmidos WT Opa-1 cDNA y con la mutante Q297V Opa-1 cDNA. Se puso a punto la metodología de transfección en nuestras células, empleando GFP cDNA como marcador y la eficiencia de transfección fue evaluada mediante microscopía de fluorescencia contabilizándose más de 80% de células con expresión de la proteína GFP.

La mutante Q297V se caracteriza por tener una sustitución del aminoácido glutamina 297 por el aminoácido valina, incluido en el dominio GTPasa (295-470) de Opa-1 y en consecuencia la proteína resultante carece de actividad GTPasa. Sin embargo, exhibe ganancia de otra actividad, que consiste en la estabilización de los complejos de Opa-1 (Sato et al., 2002; Yamaguchi et al., 2008). Además, se ha propuesto que esta mutante Q297V mimetiza la forma de Opa-1 que lleva el GTP unido lo cual permitiría la formación de complejos constitutivos de Opa-1, impidiendo de esta forma, el desensamblaje de la estructura de las crestas mitocondriales (Yamaguchi et al., 2008).

En primer lugar, se analizaron los niveles de Opa-1 en células transfectadas con pcDNA3 WT OPA1 y pcDNA3 Q297V Opa-1 en ausencia y presencia de Mn. En ambos casos, se observó un marcado aumento en la expresión de las isoformas de Opa-1 en las células transfectadas, con respecto a sus contrapartes expuestas a Mn **(Figura 33A)**.

Cabe destacar que en el caso de la transfección con Opa-1 WT, no se detectaron niveles más elevados de Opa-1 con respecto a los niveles endógenos del control (transfectado con vector pcDNA3 vacío). Si bien esto no es lo esperable, Yamaguchi et al. (2008) transfectando células 293T en forma transiente con los mismos plásmidos, obtuvieron una alta eficiencia de transfección pese a no detectar en los inmunoblots diferencias entre los niveles de Opa-1 exógenos y endógenos.

Aún así, bajo estas condiciones, demostraron mediante ensayo de TUNEL, que la sobre-expresión de Opa-1 fue suficiente para prevenir la apoptosis inducida por la adición de Bim recombinante.

Seguidamente, para identificar el rol que tiene la proteína Opa-1 en la apoptosis inducida por Mn, se evaluaron se evaluaron tres parámetros diferentes: viabilidad celular por MTT, morfología mitocondrial utilizando Mitotracker Red y conteo de núcleos apoptóticos empleando Hoechst 33258.

En la **Figura 33B** se observa que ambos plásmidos fueron igualmente efectivos en prevenir la muerte celular inducida por Mn (35 ± 3 y $40 \pm 2\%$ respectivamente; $p < 0,001$).

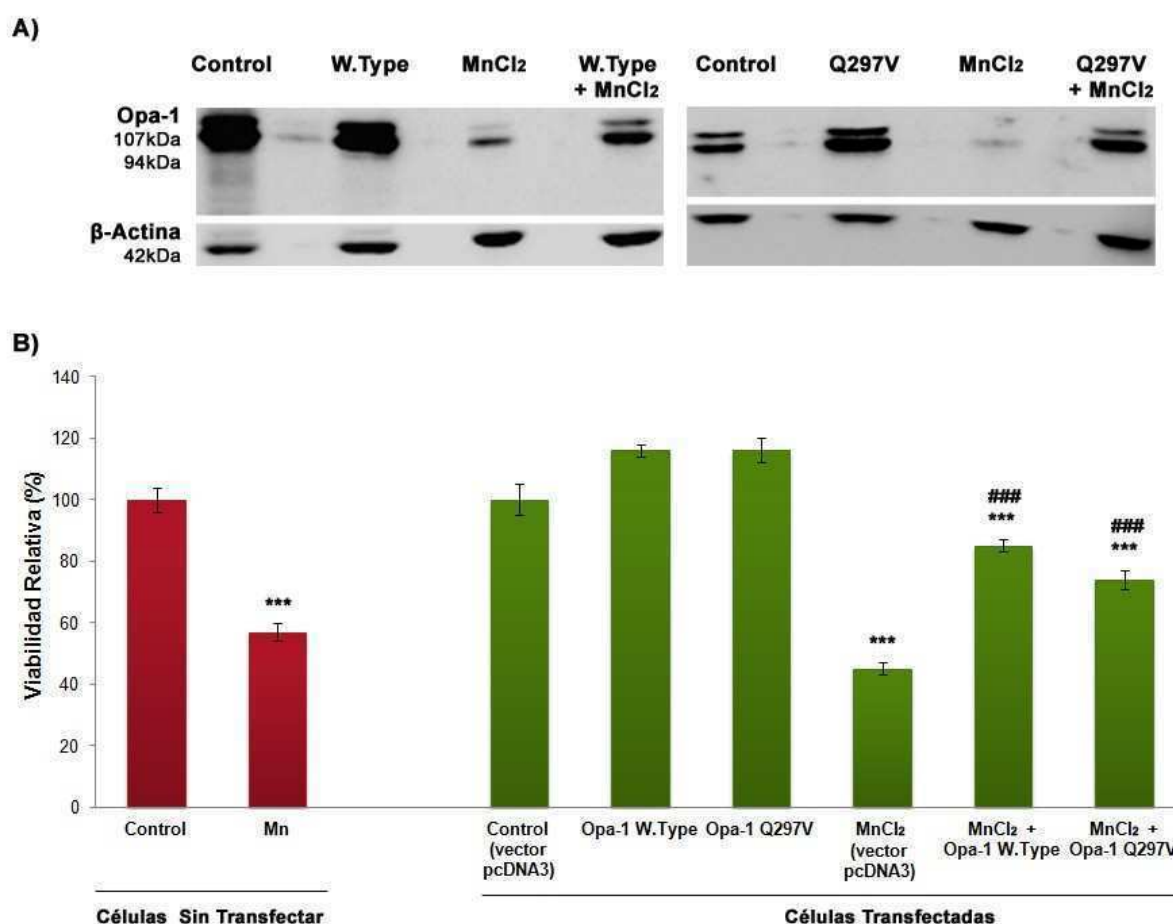


Figura 33. Efecto de la sobre-expresión de WT y Q297V Opa-1 sobre la viabilidad celular

Luego de 24hs de transfección, las células se incubaron con Mn durante 24hs adicionales. **A)** Controles de transfección. **B)** Ensayo de MTT. Se grafica el promedio de 8 réplicas \pm SEM. *** $p < 0,001$ vs control respectivo; ### $p < 0,001$ vs Mn.

El conteo de células empleando Mitotracker Red indicó que las transfecciones con los plásmidos WT y Q297V ejercieron un efecto protector sobre las mitocondrias encontrándose un 51 y 46% ($p < 0,01$) de aumento en el número de células con mitocondrias conservadas (filamentosas) y una disminución de 48 y 56% ($p < 0,01$) en el número de células con pérdida del $\Delta\psi_m$ respectivamente, en comparación con las células tratadas con Mn (**Figura 34**).

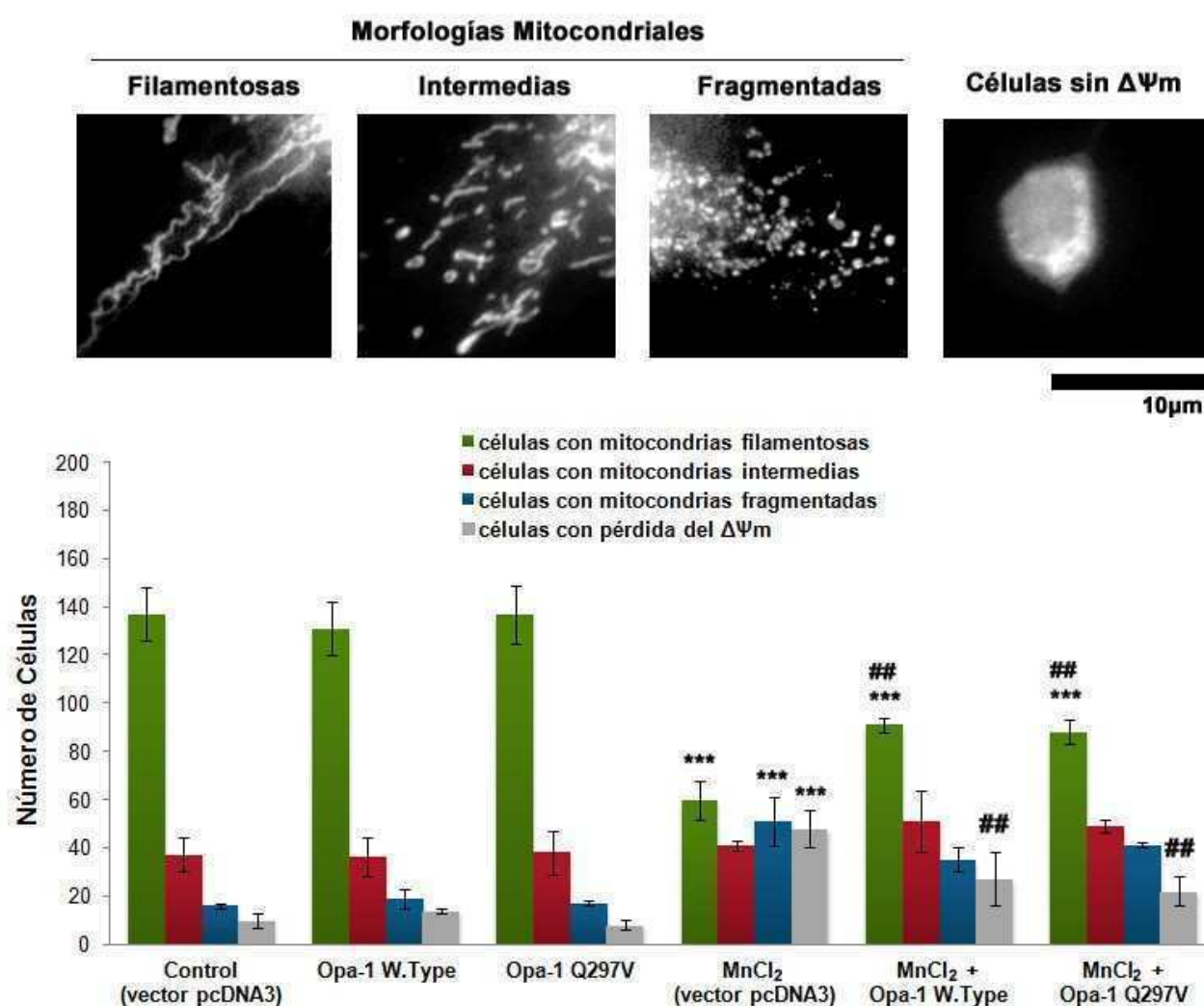


Figura 34. Efecto de la sobre-expresión de WT Opa-1 y Q297V Opa-1 sobre la morfología mitocondrial y el $\Delta\psi_m$

Luego de 24hs de transfección, las células se trataron con Mn 750μM en ausencia de suero durante otras 24 hs. Posteriormente, éstas fueron incubadas con reactivo fluorescente MitoTracker Red (75nM). Las fotografías representan a las tres categorías de células establecidas de acuerdo a la morfología mitocondrial: filamentosas, intermedias y fragmentadas (Barra: 10μm; Aumento: 63X). Por otra parte, se distinguieron células con pérdida del $\Delta\psi_m$. Se contaron células 200 células para cada tratamiento. *** $p < 0,001$ vs control respectivo; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ vs Mn.

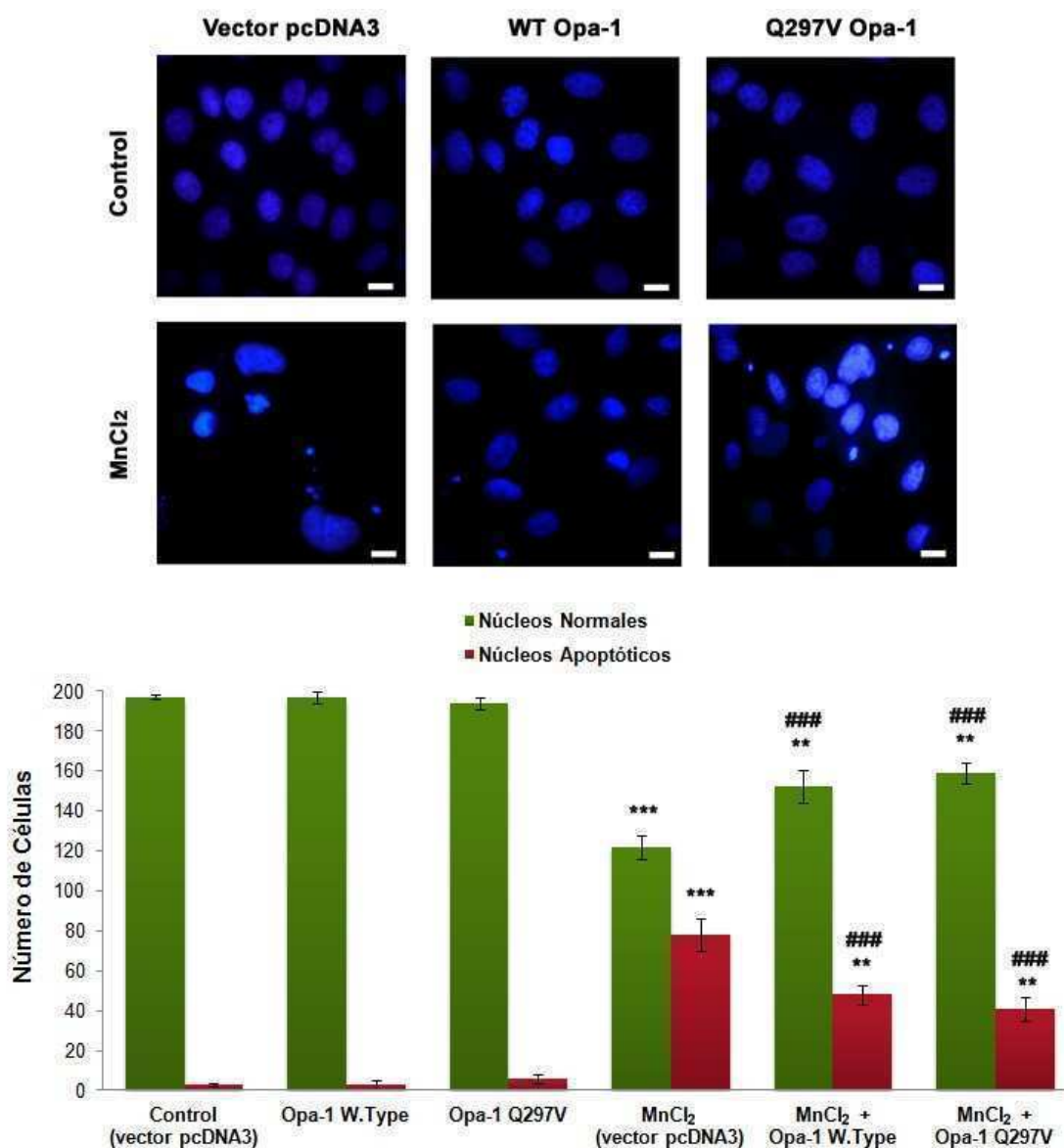


Figura 35. Efecto de la sobre-expresión de WT y Q297V Opa-1 sobre la morfología nuclear

Las células se tiñeron con el reactivo de Hoechst 33258 y se contabilizaron núcleos normales y núcleos apoptóticos (condensados y fragmentados) (Barra: 10 μ m; Aumento 100X). *** $p < 0,001$ vs. control respectivo; #### $p < 0,001$ vs. Mn.

En cuanto a la morfología nuclear, las células control presentaron núcleos normales con tinción homogénea de la cromatina. Por otra parte, aquellas tratadas con Mn exhibieron un incremento del $62 \pm 7\%$ de núcleos apoptóticos, lo cual se atenuó en células que sobre-expresaban WT y Q297V Opa-1, ya que la tranfección con ambos plásmidos previno en un $30 \pm 7\%$ la condensación y fragmentación nuclear (**Figura 35**), en concordancia con el valor de recuperación de la viabilidad

(Figura 33). Estos resultados en conjunto demuestran que el Mn induce un desbalance en el equilibrio fusión/fisión mitocondrial que resulta en un aumento de la fragmentación mitocondrial implicando a la proteína Opa-1 cuyo procesamiento contribuye a la progresión de la cascada apoptótica.

5.2.3. Drp-1

La fisión mitocondrial requiere de la participación de la proteína Drp-1, una GTPasa perteneciente a la familia de dineínas (Landes y Martinou, 2011).

La proteína Drp-1 es actualmente estudiada en varios modelos neurodegenerativos y se ha establecido que tiene un rol importante en EP, Alzheimer y Huntington, mientras que aún queda por esclarecer su acción en la ELA (Liesa et al., 2009; Reddy et al., 2010). En base a estos antecedentes el siguiente objetivo consistió en investigar si Drp-1 estaba involucrada en la señalización de muerte inducida por Mn.

5.2.3.1. El Mn induce un aumento en la expresión de Drp-1 y su translocación a la mitocondria

En una primera etapa se analizó el efecto del Mn sobre los niveles de Drp-1 mediante western blot de lisados celulares totales (**Figura 36A**). Se determinó que el Mn aumentó drásticamente ($150 \pm 12\%$; $p < 0,001$) los niveles de expresión de esta proteína. La banda detectada presentó un PM de $\sim 83\text{kDa}$, de acuerdo con lo establecido para la isoforma de cerebro (Park et al., 2011).

La localización de Drp-1 es principalmente citosólica aunque también se la detecta en altos niveles en la mitocondria y más precisamente en puntos concretos o “foci” discretos en la MME algunos de los cuales corresponderán a futuros sitios de escisión (Landes y Martinou, 2011). Sin embargo, en respuesta a ciertos estímulos

(ej. incremento de calcio en el citoplasma o apoptosis) aumenta la translocación de Drp-1 hacia la mitocondria y consecuentemente, incrementa la fisión.

Para evaluar la posible translocación de la proteína Drp-1 en nuestro sistema, se llevaron a cabo dos técnicas: fraccionamiento subcelular seguido de western blot e inmunocitoquímica.

En la **Figura 36B** se observa que el Mn produjo una disminución ($66\pm 8\%$) de la señal de Drp-1 en la fracción citosólica y un correspondiente aumento ($40\pm 12\%$) en la fracción mitocondrial ($p < 0,001$). En acuerdo con los antecedentes descriptos, aún en condiciones normales se detecta señal de Drp-1 en la fracción mitocondrial, lo cual resulta esperable dado que las redes mitocondriales se ensamblan y desarman constantemente.

El aumento en la translocación de Drp-1 a la mitocondria en células expuestas a Mn se confirmó mediante inmunocitoquímica (**Figura 36C**). El grado de co-localización se determinó empleando el *coeficiente de correlación de Pearson (Rr)* y el *coeficiente de solapamiento de Manders (R)*, además de dos tipos de mapas: *Colour Scatter Plot* y *Display Frequency Scatter Plot (Materiales y Métodos)*.

En ambos controles se detectó la presencia de Drp-1 tanto en el citoplasma como en puntos específicos ó “foci” a lo largo de las redes tubulares. Por otra parte, en las células incubadas con Mn en ausencia de suero, los “foci” ya no se visualizaban como puntos concretos, lo cual reflejó un aumento de moléculas de Drp-1 translocadas a la mitocondria, representado por un incremento del color amarillo-naranja indicador de co-localización (“merge”). Por su parte, los coeficientes de Pearson y Manders resultaron ser ambos mayores al resto de los tratamientos, es decir más cercanos al valor de 1 ($p < 0,01$).

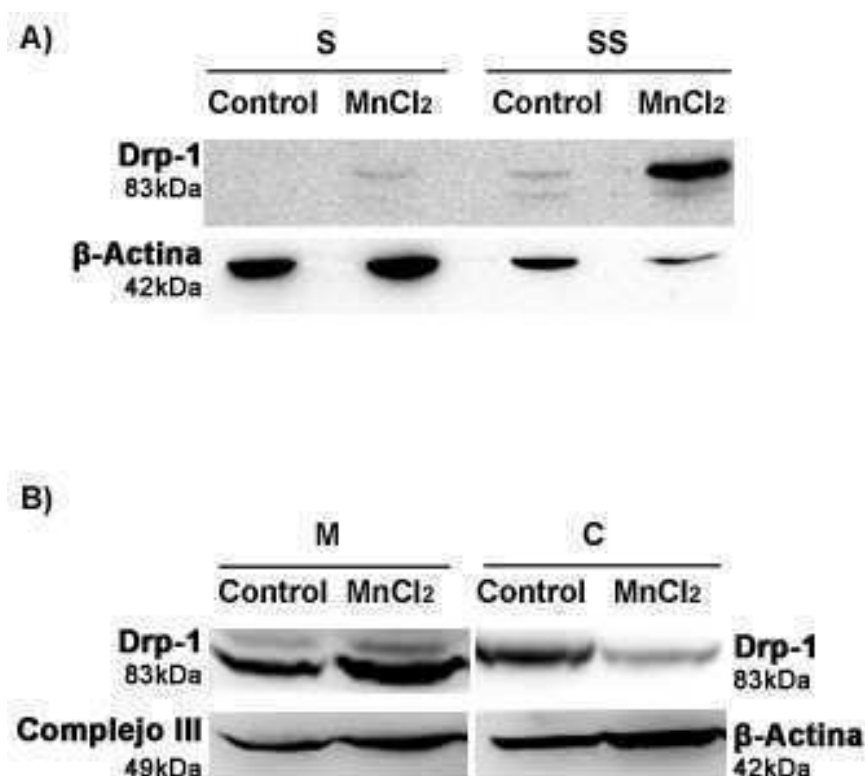


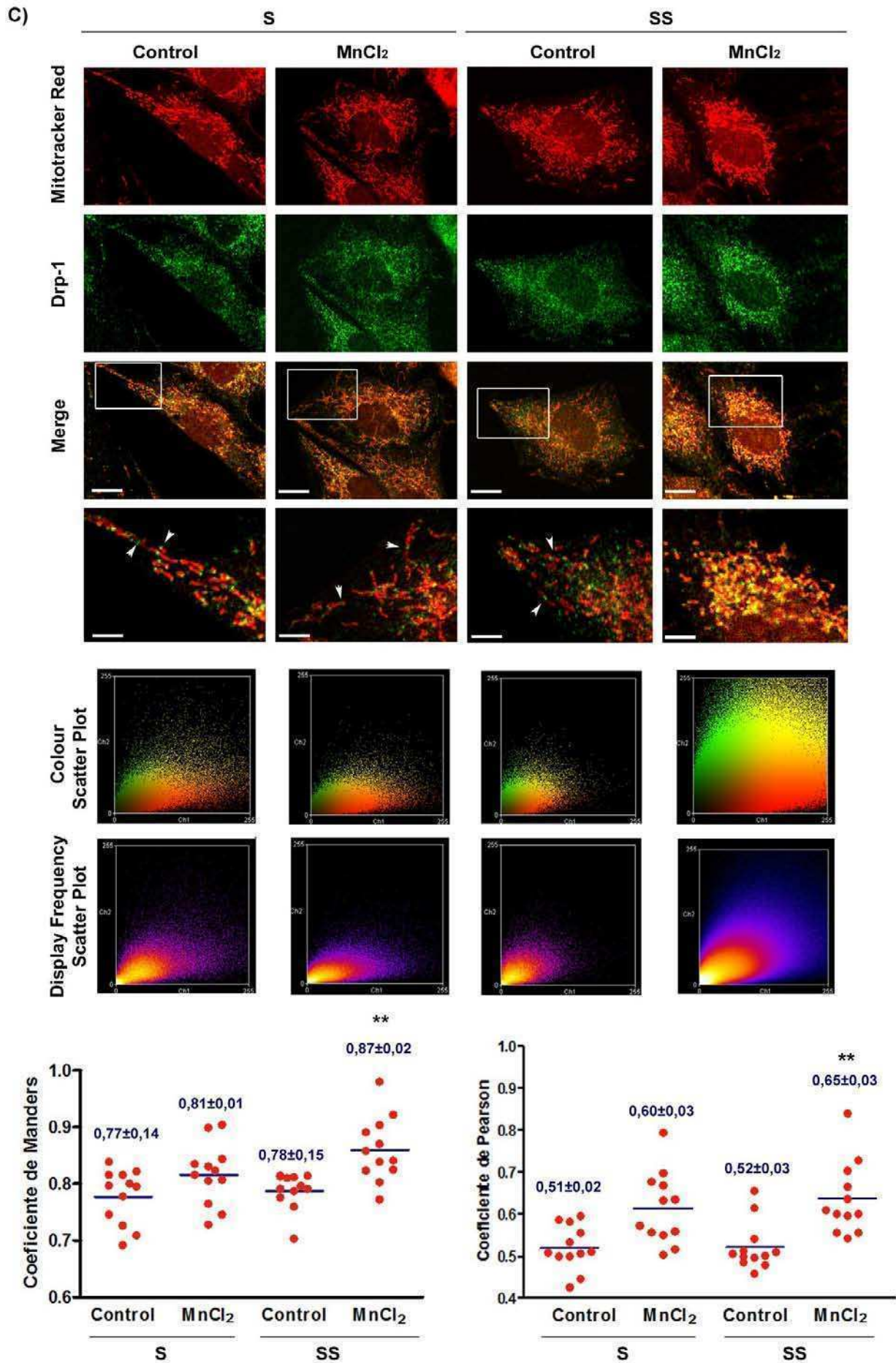
Figura 36. Aumento de la expresión y translocación de Drp-1 en la apoptosis inducida por MnCl₂

A) Análisis western blot de lisados totales de células expuestas a Mn en presencia (S) y ausencia (SS) de suero. El resultado es representativo de dos experimentos independientes.

B) Las células se incubaron con Mn en ausencia de suero y luego de 24hs se realizó un fraccionamiento subcelular para aislar fracciones enriquecidas en mitocondrias (M) y citosólicas (C). Las membranas fueron lavadas y reprobadas para control de carga empleando para la fracción mitocondrial, el anticuerpo anti-Complejo III subunit core 1-OxPhos (Complejo III) y para la fracción citosólica, el anticuerpo anti- β -Actina. El resultado es representativo de dos experimentos independientes.

C) Inmunocitoquímica: Se muestra una imagen representativa para cada tratamiento en el siguiente orden de arriba hacia abajo: Imágenes celulares: Drp-1 (verde), Mitotracker Red (rojo), merge (amarillo-naranja). Dentro de las imágenes de merge se indican áreas seleccionadas que se muestran en detalle en el panel inferior. Barra: 10 μ m; Aumento: 63X. Flechas blancas: puntos concretos (“foci”) de localización de Drp-1 en las mitocondrias. Mapas de co-localización: “Colour Scatter Plot” y “Display Frequency Scatter Plot”. Además, se muestran gráficos de dispersión en los cuales se indican los valores promedio de los coeficientes de Pearson y Manders calculados en 12 células (puntos rojos) correspondientes a 4 campos visuales elegidos aleatoriamente. **P<0,01 vs control respectivo.

(Continúa en la siguiente página)



Además, se determinó un mayor grado de colocación en el “*Colour Scatter Plot*”, donde la nube amarilla-naranja es mayor al resto de los tratamientos (al igual que la imagen del “merge”) y en el “*Display Frequency Scatter Plot*”, se observa un aumento de colores cálidos, lo cual indicó un incremento de combinación de los píxeles rojos con los verdes (**Figura 36C**).

En conjunto los resultados sugieren que el Mn induce un aumento en los niveles de expresión de Drp-1, además de su translocación hacia la mitocondria donde está encargada de promover la fisión.

5.2.3.2. Rol de Drp-1 en la apoptosis inducida por Mn

La maquinaria de división mitocondrial está compuesta e influenciada por diversos factores, pero el mejor candidato como blanco farmacológico resulta ser Dnm-1(levaduras)/Drp-1(mamíferos) ya que es considerada una diana de pequeñas moléculas moduladoras de la fisión. Esto es así debido a varias características particulares de la proteína, tales como la unión a GTP y su hidrólisis y el auto-ensamblaje, siendo este último mediado por cambios conformacionales de la proteína, que pueden ser afectados positiva o negativamente por pequeñas moléculas efectoras (Lackner y Nunnari, 2010).

Cassidy-Stone et al. (2008) han identificado a una pequeña molécula inhibidora de la fisión mediada por Dnm-1 en levaduras, a la cual denominaron *Mdivi-1* (Inhibidor de la división mitocondrial-1). Este compuesto también es capaz de inhibir Drp-1 en células COS-7 de mamíferos, lo cual demuestra que el mecanismo de fisión está conservado entre las especies.

El mecanismo de inhibición de *Mdivi-1* consiste en atenuar los primeros pasos de la fisión, que involucran el auto-ensamblaje de moléculas de Drp-1. Específicamente, *Mdivi-1* se une de manera selectiva al pool de moléculas de Drp-1

que se encuentran sin ensamblar en el citoplasma y promueve la acumulación de un tipo de conformación incapaz de polimerizar. El auto-ensamblaje de Drp-1 es un paso crítico para la función de esta proteína, por lo que Mdivi-1 es entonces postulado como un inhibidor de la actividad GTPasa y finalmente un bloqueante eficaz de la fisión mitocondrial.

Dado que Mdivi-1 es capaz de inhibir la apoptosis, se ha propuesto como droga terapéutica en base a estudios llevados a cabo en modelos de accidente cerebro vascular, infarto de miocardio y enfermedades neurodegenerativas como EP, Alzheimer y Huntington (Lackner y Nunnari, 2010 y referencias allí citadas).

Por su parte, Cassidy-Stone (2008) han descrito a Mdivi-1 como una herramienta útil para identificar el rol de Drp-1 en la vía intrínseca, demostrando la inhibición de la liberación de citocromo c en células de mamíferos. Estos autores propusieron que la concentración de Mdivi-1 óptima para lograr la inhibición del 50% en la actividad de Drp-1 en levaduras se encuentra entre 1-10 μ M, mientras que con 50 μ M se obtiene un bloqueo total en células COS-7. Para evaluar entonces la importancia de la función de Drp-1 en la fisión dependiente de Mn en células C6, se realizó en primer lugar una curva dosis-respuesta en el rango de concentraciones 0,0001-100 μ M del inhibidor en presencia y ausencia de Mn (**Figura 37**). Los resultados obtenidos indicaron que las concentraciones empleadas por Cassidy-Stone et al. (2008), correspondientes a un rango entre 10 y 100 μ M resultaron ser citotóxicas en tanto que las concentraciones que lograron una restitución parcial (30%) de la viabilidad celular, se encontraban entre 0,0001 y 0,1 μ M. Curiosamente, este porcentaje se ubicó en el mismo rango que el encontrado al inhibir otros eventos relacionados con la vía mitocondrial, como lo son la participación del mPTP y la actividad de la caspasa 9.

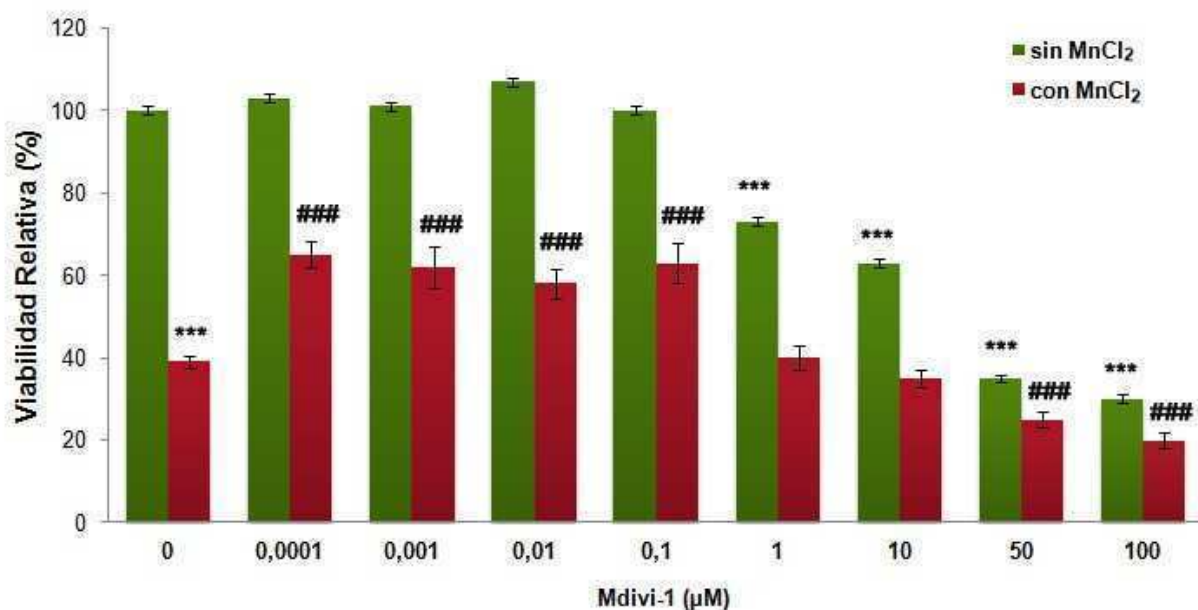


Figura 37. La inhibición de la actividad de Drp-1 previene parcialmente la citotoxicidad inducida por MnCl₂

Ensayo de MTT. Los resultados son promedio de 8 réplicas \pm SEM. *** $p < 0,001$ vs control, ### $p < 0,001$ vs. Mn.

En base a la curva de concentraciones de Mdivi-1 ensayadas previamente, se eligió trabajar con la menor concentración que produjo efecto protector (0,0001µM) analizando su efecto sobre la integridad de las redes mitocondrias, el $\Delta\phi_m$ y la morfología nuclear.

Empleando el método de tinción con Mitotracker Red, encontramos que la pre-incubación con Mdivi-1 0,0001µM resultó en un aumento de $121 \pm 9\%$ ($p < 0,001$) en el número de células con mitocondrias filamentosas y una disminución del $43 \pm 1\%$ y $44 \pm 13\%$ ($p < 0,001$) en el número de células con mitocondrias fragmentadas y células con pérdida del $\Delta\phi_m$ respectivamente (**Figura 38**).

En cuanto a la morfología nuclear, la pre-incubación con Mdivi-1 atenuó el efecto del Mn ya que previno en un $51 \pm 3\%$ ($p < 0,001$) la condensación y fragmentación nuclear (**Figura 39**).

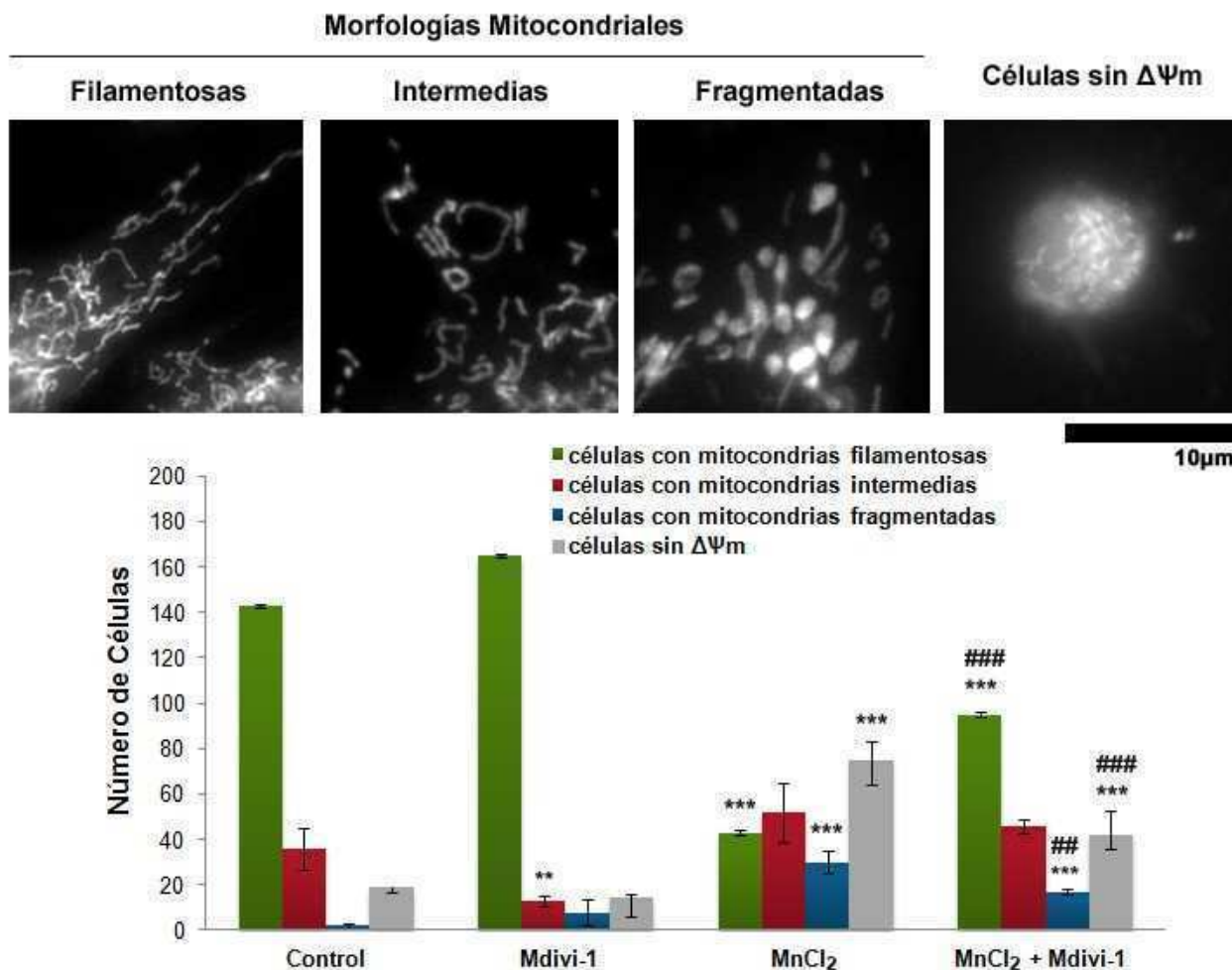


Figura 38. Efecto de la inhibición de Drp-1 sobre la morfología mitocondrial y el $\Delta\psi_m$

Las células fueron pre-incubadas con Mdivi-1 0,0001 μM durante 1h y luego expuestas a Mn. Luego de 24hs de tratamiento, las células se incubaron con MitoTracker Red (75nM). Las fotografías representan a las tres categorías de células establecidas para la morfología mitocondrial: filamentosas, intermedias y fragmentadas. Por otra parte, se distinguieron células con pérdida del $\Delta\psi_m$. Se contaron células 200 células para cada tratamiento. Barra: 10 μm ; Aumento: 63X. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs control respectivo; #### $p < 0,001$ vs. Mn.

Estos últimos resultados proveen evidencias concluyentes que avalan un rol para la proteína de fisión mitocondrial Drp-1 en la regulación de la apoptosis inducida por Mn.

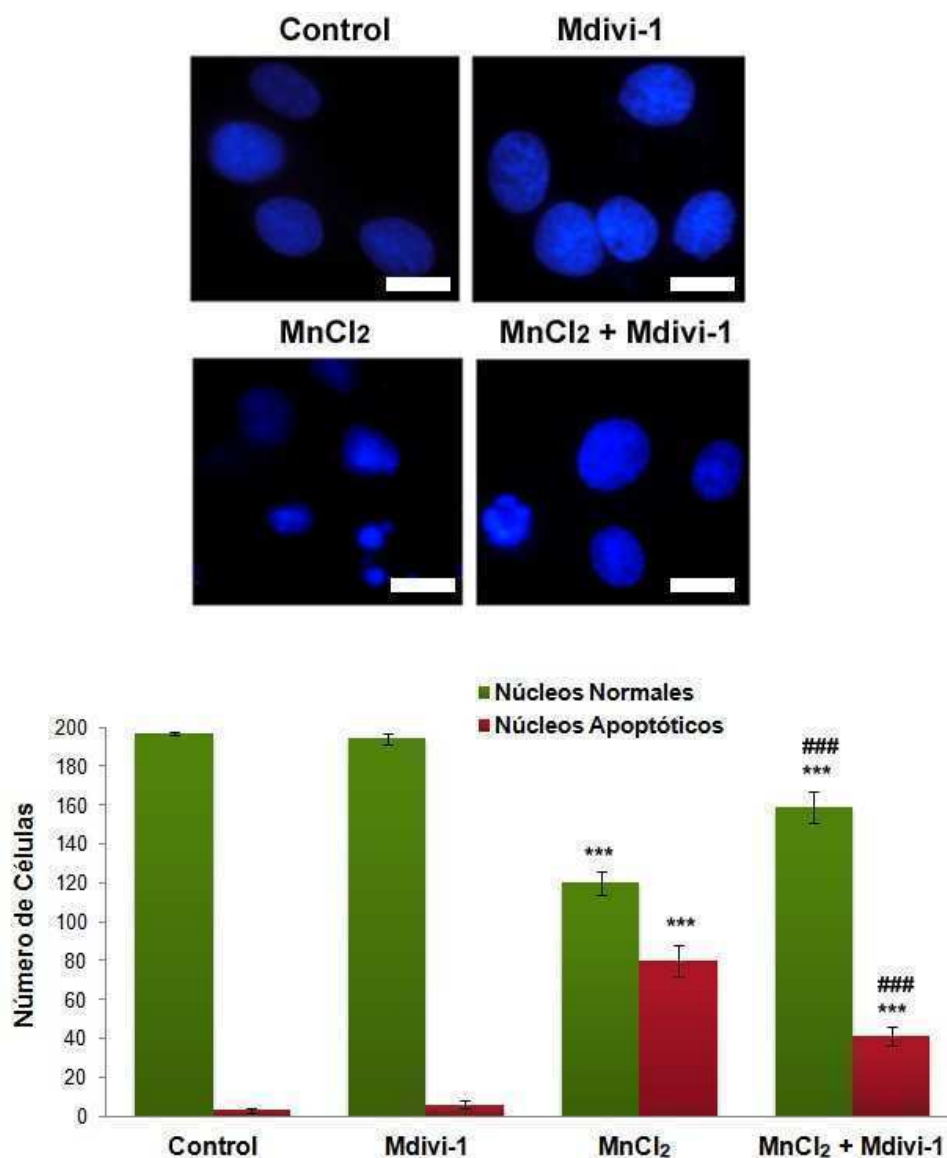


Figura 39. Efecto de la inhibición de Drp-1 sobre la morfología nuclear
 Se empleó el reactivo Hoechst 33258 y se contabilizaron núcleos normales y núcleos apoptóticos (condensados y fragmentados). Barra: 10 μ m; Aumento: 100X. *** p <0,001 vs. control respectivo; #### p <0,001 vs. Mn.

5.2.3.3. CsA previene la translocación de Drp-1 inducida por Mn

Durante la apoptosis, la translocación de Drp-1 está mediada por la desfosforilación de la serina 637 por acción de la fosfatasa calcineurina. Por otra parte, la CsA, además de inhibir la formación del mPTP, bloquea la acción de la calcineurina (Cereghetti et al., 2010). El mecanismo por el cual la CsA inhibe a la calcineurina involucra su unión a la ciclofilina A en el citoplasma formando un

complejo que se une e inactiva al sitio activo de la calcineurina (Eckstein et al., 2005). Además, la ciclofilina A está asociada a la dinamitina, uno de los componentes del complejo motor molecular de dineína, responsable del movimiento retrógrado de las proteínas (entre ellas Drp-1) a lo largo de los microtúbulos. Por lo tanto la CsA, al unirse a ciclofilina A, estaría inhibiendo tanto la desfosforilación de Drp-1 como su transporte a través de los motores moleculares (Cereghetti et al., 2010).

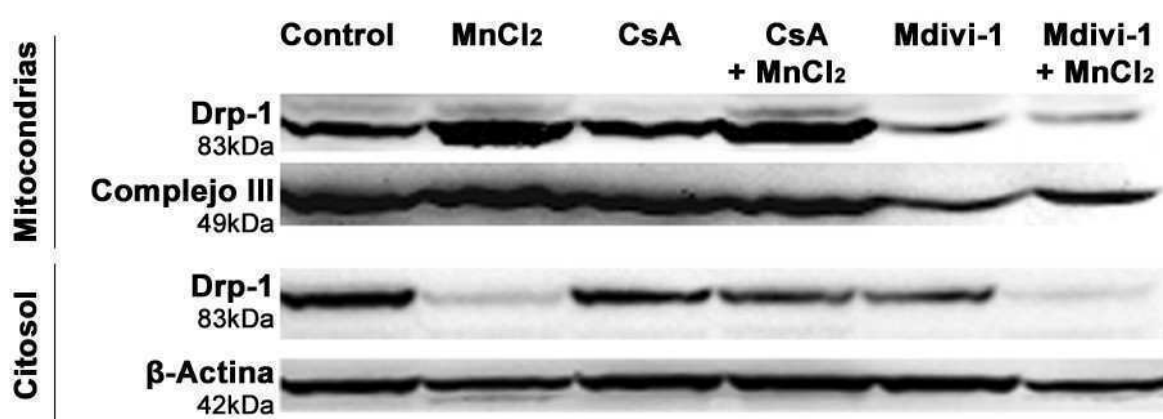


Figura 40. Efecto de la CsA sobre la translocación de Drp-1 a la mitocondria

Luego de la exposición a Mn se realizó un fraccionamiento subcelular obteniéndose la fracción enriquecida en mitocondrias y la citosólica. Las membranas fueron lavadas y reprobadas para su respectivo control de carga, empleando en la fracción mitocondrial, el anticuerpo anti-Complex III subunit core 1- OxPhos (Complejo III) y en la fracción citosólica, el anticuerpo anti- β -Actina. Las calles 5 y 6 representan el control de eficiencia de Mdivi-1. El resultado es representativo de dos experimentos independientes.

Se analizó entonces el efecto de CsA sobre la translocación de Drp-1 a la mitocondria (**Figura 40**). En el caso de células pre-incubadas con CsA y expuestas a Mn, los niveles de Drp-1 en la fracción citosólica estuvieron en el rango del control indicando que este inhibidor interfiere con la translocación de Drp-1 a la mitocondria.

Estudios *in vivo*



6. Estudios *in vivo*

En esta sección se evaluó en primer lugar el efecto citotóxico del Mn inyectado en forma aguda en el estriado de ratas Sprague Dawley.

Los primeros ensayos *in vivo* se llevaron a cabo en el Departamento de Toxicología de la Universidad de Cagliari, Italia, bajo la dirección de la Dra. Micaela Morelli, donde se dedican al estudio de modelos animales de Parkinson. Durante mi estadía en dicho laboratorio, adquirí experiencia en la utilización del protocolo de inyección usualmente empleado por este grupo de investigación. Este consistió en inyectar MnCl₂ (1 μmol disuelto en 1 μl de solución fisiológica estéril) en el cuerpo estriado del hemisferio izquierdo (tratado) y el mismo volumen de solución salina en el hemisferio derecho (control). Dicho protocolo contribuye a disminuir el efecto de variabilidad entre animales comparando el hemisferio tratado vs el control dentro de un mismo sujeto experimental. Los grupos experimentales y tratamientos se detallan en la **Tabla 3**. La dosis empleada fue seleccionada en base a los trabajos de Zhao et al. (2008) quienes desarrollaron un modelo de Manganismo en ratas.

Tiempo de exposición a MnCl ₂	N	Observaciones
24hs	4	Pasadas las 24hs o los 7 días todos los animales estaban en buen estado y sin alteración de la locomoción.
7 días	4	

Tabla 3. Inyección intra-estriado

Se inyectó 1 μmol (1 μl) de MnCl₂ intra-estriado en el hemisferio izquierdo y 1 μl de NaCl 0,9% en el hemisferio derecho.

6.1. El Mn induce daño en el estriado

En primera instancia se realizó un examen histológico de la zona estriatal realizando en los cortes coronales una tinción de Nissl (**Figura 41**). La inyección

intra-estriatal de 1 μ mol de Mn causó una lesión distintiva en el estriado en los animales expuestos a dicho metal durante 7 días (**Figura 41A y B**). En contrapartida, los animales tratados con Mn durante 24hs no reflejaron cambios morfológicos. La observación de los cortes indicó que la exposición a Mn durante 7 días indujo una moderada pérdida de masa celular en comparación con el control salino lo cual se manifiesta por una menor tinción de violeta de cresilo en el hemisferio izquierdo. A mayor aumento puede apreciarse una reducción del volumen celular y presencia de núcleos picnóticos, procesos posiblemente asociados a la ocurrencia de muerte celular apoptótica. La presencia de núcleos apoptóticos en el hemisferio tratado fue corroborada con la tinción de Hoechst 33258 (**Figura 42**).

6.2. El Mn induce alteración de los niveles de expresión de Opa-1 y Drp-1

Posteriormente, se investigó el patrón de expresión de las proteínas de fusión Opa-1 y de fisión Drp-1 en el tejido estriatal mediante análisis inmunohistoquímico.

Se observó que en el hemisferio control, las células del estriado presentaron inmunoreactividad tanto para Opa-1 como para Drp-1. En los animales sacrificados a las 24hs post-inyección, no se detectaron diferencias en la intensidad de la reactividad en el área tratada con respecto del control. Sin embargo, en los animales expuestos a Mn durante 7 días, se observó una disminución en la señal de Opa-1 de acuerdo a lo obtenido en los estudios *in vitro*. Contrariamente, se detectó una bajada en la inmunoreactividad de Drp-1 en el estriado tratado con Mn (**Figura 43**).

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que el Mn induce muerte celular en el estriado acompañado de variaciones en los niveles de expresión de proteínas involucradas en los procesos de fusión/fisión mitocondrial.

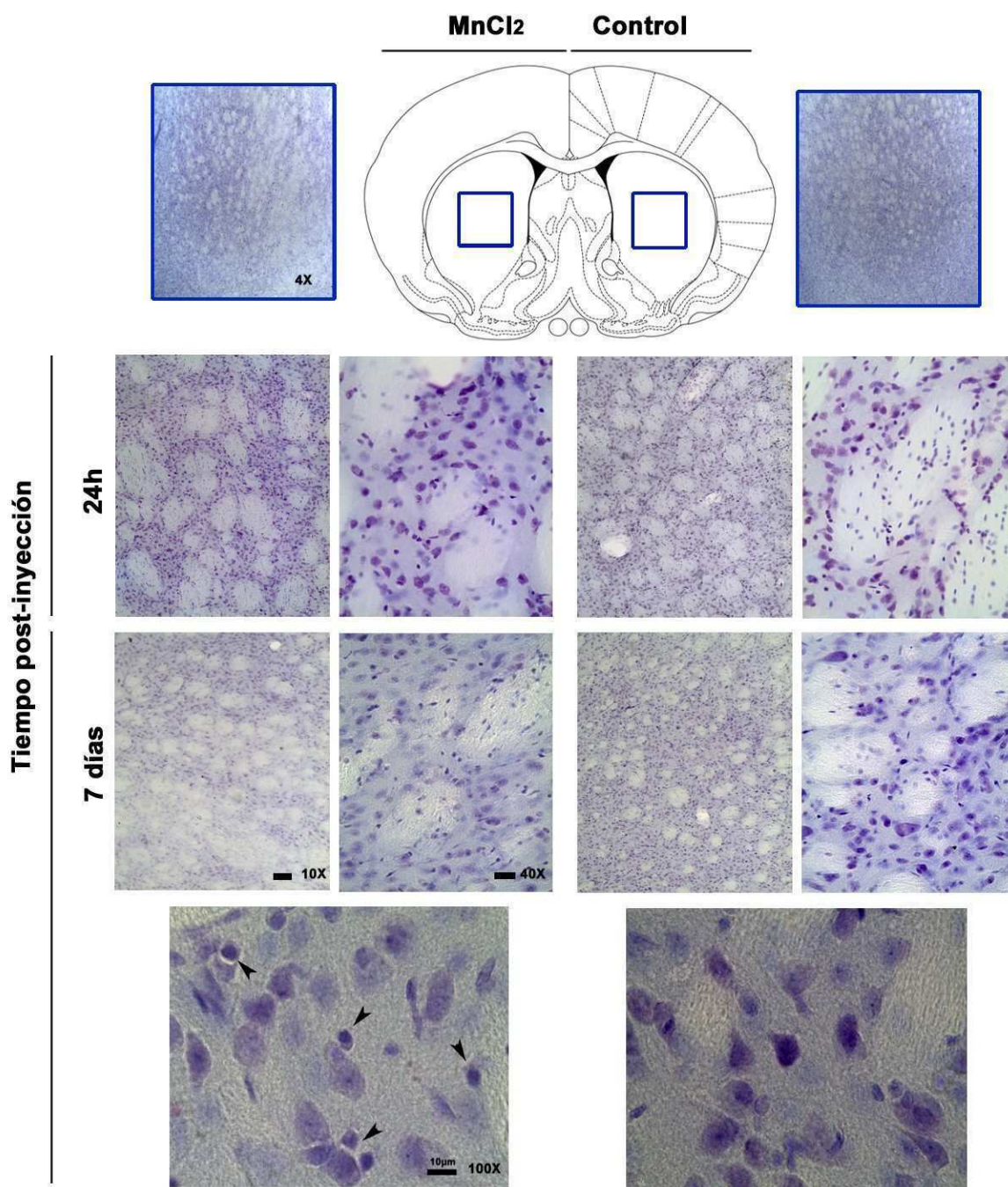


Figura 41. Tinción de Nissl

Imágenes representativas de las secciones coronales teñidas con violeta de cresilo mediante microscopía óptica. En el esquema superior del corte coronal se indica el área analizada mediante un recuadro azul. Las flechas señalan células con reducción de volumen y núcleos picnóticos. Barra: 10µm; Aumentos: 10X, 40X y 100X.

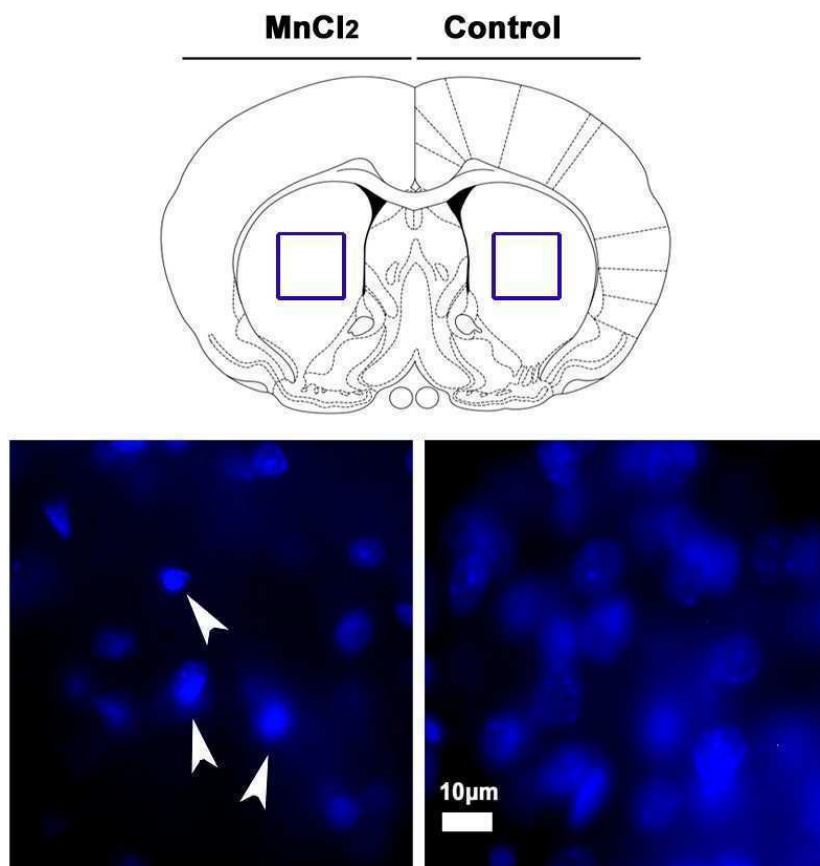


Figura 42. Efecto del Mn sobre la morfología nuclear

Imágenes representativas de las secciones coronales correspondientes a animales expuestos a Mn durante 7 días. Los cortes fueron teñidos con Hoechst 33258 y observados mediante microscopía de fluorescencia. En el esquema superior del corte coronal se indica el área analizada mediante un recuadro azul. Las flechas señalan núcleos con cromatina condensada, típicos de un evento apoptótico. Además, puede apreciarse una moderada disminución de la masa celular por efecto del Mn. Barra: 10µm; Aumentos: 10X, 40X y 100X.

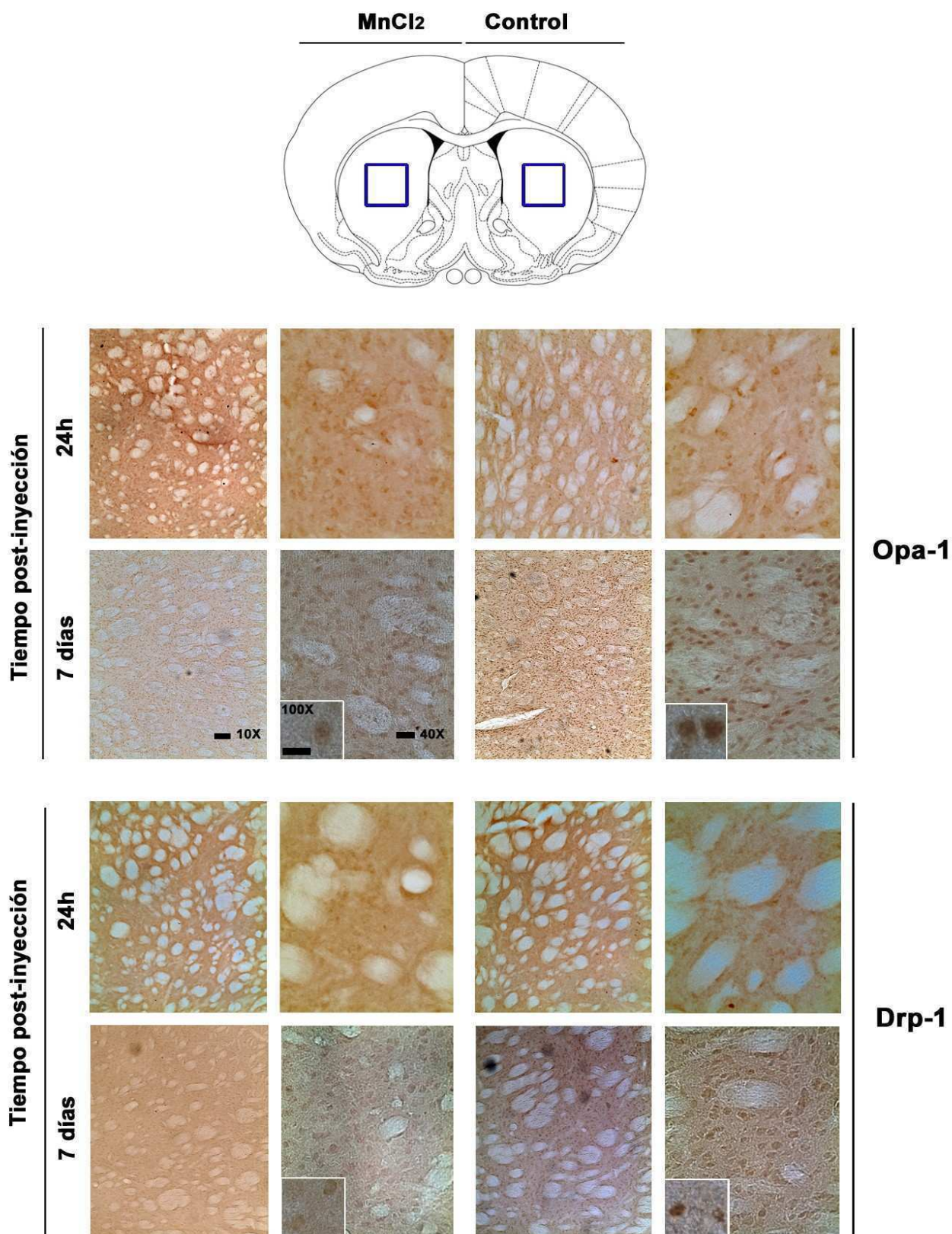


Figura 43. Expresión de Opa-1 y Drp-1 en estriado

Imágenes representativas de inmunohistoquímicas de Opa-1 y Drp-1 analizadas mediante microscopía óptica. En el esquema superior del corte coronal se indica mediante un recuadro azul el área que ha sido fotografiada. Barra: 10µm; Aumentos: 10X, 40X y 100X.

Discusión

1. El Mn induce muerte celular activando las vías apoptóticas extrínseca e intrínseca

Es bien conocido que una de las particularidades del cerebro es la de concentrar metales tales como el Fe, Pb, Hg, Mn y Cu, que frecuentemente se localizan en la astrogliia (Tiffany-Castiglioni y Qian, 2001). Los astrocitos representan el principal sitio de regulación homeostática y almacenamiento de Mn en el cerebro (Aschner et al., 1992). Sin embargo, la acumulación anormal de Mn en estas células interfiere con sus funciones normales dando lugar a una generación aumentada de ROS y a un incremento en la liberación de citoquinas pro-inflamatorias y neurotóxicas, los cuales impactan nocivamente sobre las neuronas (Zhang et al., 2009). Adicionalmente, los astrocitos mismos pueden ser inducidos a morir por apoptosis (González et al., 2008).

Experimentos realizados en diferentes líneas celulares demuestran que el Mn es un metal neurotóxico. En particular en nuestro laboratorio hemos demostrado que el Mn induce muerte celular apoptótica en cultivos primarios de astrocitos corticales de rata (González et al., 2008). Sin embargo, a pesar de que en los últimos años se ha avanzado considerablemente en el conocimiento del rol de la astrogliia en la neurotoxicidad inducida por Mn, aún resta mucho por elucidar acerca de las cascadas de señalización que participan en la muerte de la astrogliia.

Para la realización de este trabajo de tesis, se empleó la línea C6 de astrocitoma de rata como modelo *in vitro* con el fin de caracterizar los eventos moleculares involucrados en la apoptosis inducida por Mn. En este marco, cabe resaltar que se ha reportado previamente que las células C6 conservan muchas de las características de la astrogliia normal y han sido consideradas como un modelo experimental apropiado para el estudio de mecanismos moleculares y celulares

involucrados en la neurotoxicidad inducida por metales pesados (Prasad, 1983; Tiffany-Castiglioni et al., 1998).

Nuestros resultados demostraron que las células C6 son sensibles a la exposición al Mn. La comparación en las medidas de viabilidad celular empleando dos ensayos diferentes (MTT y Neutral Red) (**Figura 15**) mostró un mayor porcentaje de muerte celular en el caso de la técnica de Neutral Red, para todas las concentraciones estudiadas. Si bien en primera instancia estas diferencias podrían adjudicarse al hecho de estar empleando dos técnicas diferentes, no se puede descartar la posibilidad de que los lisosomas sean más susceptibles al Mn que las mitocondrias. Aunque el consenso general es que el Mn se acumula preferentemente en las mitocondrias acorde a lo reportado por Wedler et al. (1989), Suzuki et al. (1983) encontraron una mayor concentración de este metal en fracciones lisosomales de homogenatos de cerebro con respecto a las fracciones mitocondriales luego de 24hs de inyección intraperitoneal de acetato de Mn en ratones. Estos autores propusieron que es posible que los lisosomas de células del cerebro desempeñen un rol importante en el metabolismo del Mn y en el desarrollo de la toxicidad por parte de este metal. La importancia del rol de los lisosomas radica en su posibilidad de actuar como un sistema celular de defensa primario, evitando un daño inmediato, por ejemplo, a las mitocondrias, que son organelas primordiales para la supervivencia y funcionamiento adecuado de la célula. En este sentido, en nuestro laboratorio se han encontrado evidencias de la participación de los lisosomas en la muerte apoptótica de células C6 expuestas a Mn (Gorojod et al., 2009, 2010).

Las ROS son moléculas generadas normalmente como resultado del metabolismo del oxígeno que desempeñan roles cruciales en la señalización celular. Sin embargo, cuando los niveles de ROS exceden la capacidad redox celular

(condiciones de EO), resultan deletéreos para las células. El Mn puede catalizar la oxidación de dopamina y otras catecolaminas, conduciendo a la generación de ROS tales como anión superóxido, radical hidroxilo y peróxido de hidrógeno los cuales causan neurotoxicidad y muerte neuronal. En astrocitos expuestos a Mn, existen también evidencias que demuestran la generación de ROS (Chen y Liao, 2002; Liao et al., 2006; Milatovic et al., 2007; González et al., 2008). En particular, la acumulación de Mn en la mitocondria de los astrocitos interfiere con la cadena respiratoria contribuyendo a una producción excesiva de ROS y a la disfunción de esta organela, proceso asociado a enfermedades neurodegenerativas tales como la EP y el Manganismo (Zhang et al., 2003; Huang y Manton, 2004).

Las células tumorales suelen tener niveles más altos de ROS que sus contrapartes normales y pese a ello son capaces de sobrevivir y proliferar, lo que indicaría que estas especies reactivas tienen un rol importante en ambos procesos (Martin et al., 2006, 2007). No obstante, la exposición a niveles incrementados de especies reactivas, también las lleva a la muerte. En este trabajo nosotros demostramos que el Mn induce la generación de ROS de manera dosis-dependiente en células de astrocitoma C6 (**Figura 17A**). La pre-incubación de estas células con los antioxidantes (MEL, ASA, GSH y NAC) previno parcialmente la disminución en la viabilidad inducida por Mn (**Figura 17B**) demostrando que las ROS son responsables de la muerte celular. Prabhakaran et al. (2009) empleando GSH y NAC en la línea inmortalizada MES 23.5 de glioma-neuroblastoma expuesta a Mn 600 μ M y Yoon et al. (2011) utilizando NAC, GSH y análogos de ASA, en células SK-N-MC de neuroblastoma humano expuestas a Mn 1mM, obtuvieron resultados similares. Particularmente, en el último trabajo se encontró que los análogos de ASA probablemente regulan la toxicidad del Mn previniendo sus efectos nocivos sobre la función mitocondrial.

Un hallazgo inesperado obtenido en los ensayos empleando MEL fue su efecto en disminuir la viabilidad celular en ausencia de Mn. En base a este resultado se realizaron estudios detallados de los efectos de esta hormona sobre las células C6 que demostraron que la MEL induce apoptosis mediada por la caspasa 3 y adicionalmente ejerce efectos antiproliferativos en presencia de SFB (Sapienza, 2011). Estos resultados avalan la propuesta de que la MEL podría ser empleada como un efectivo agente anti-cáncer (Sainz et al., 2003; Martin et al., 2006).

Una situación similar se obtuvo al incubar con NAC 20mM, que acorde a los resultados de Martin et al. (2007), indujo muerte de las células C6. Según estos autores, NAC induce arresto del ciclo celular en G₀/G₁ y reduce los niveles de actividad de Akt y NFκB, proteínas relacionadas a la proliferación celular. En cambio, en presencia de Mn logró revertir el efecto citotóxico de este metal, alcanzando un valor de viabilidad similar al control correspondiente. Esto indica que pese a su capacidad antiproliferativa, en presencia de exceso de ROS, ejerce su acción antioxidante con una alta efectividad.

Existen reportes que indican que el Mn induce muerte celular por apoptosis en diferentes tipos celulares: células B humanas (Schantz et al., 1999 y El Mchichi et al., 2007), neuronas dopaminérgicas SN4741 (Chun et al., 2001), células PC12 de feocromocitoma (Hirata, 2002), fibroblastos embrionarios de ratón NIH3T3 (Oubrahim et al., 2002), cultivos primarios de astrocitos corticales de rata (González et al., 2008; Yin et al., 2008), células madre neurales embrionarias de rata (Tamm et al., 2008), células MES 23.5 de neuroblastoma-glioma murino (Prabhakaran et al., 2009), cultivos primarios de neuronas corticales (Xu et al., 2009) y células T98G de glioblastoma humano (Park y Park, 2010).

En el presente trabajo se demuestra que el Mn induce apoptosis en las células C6 caracterizada por disminución en el volumen celular, burbujeo de la

membrana plasmática y presencia de núcleos con cromatina condensada y fragmentada, eventos morfológicos característicos de este tipo de muerte (**Figura 16 y Figura 18**). La confirmación definitiva de la ocurrencia de muerte celular apoptótica se obtuvo en base a estudios a nivel bioquímico y molecular. En este sentido, hemos demostrado la activación de las caspasas efectoras 3 y 7 y el clivaje de su sustrato PARP-1, lo que provee evidencia del desencadenamiento de una vía dependiente de caspasas (**Figura 19**). Estos resultados son consistentes con los hallados previamente en nuestro laboratorio empleando astrocitos corticales de rata (González et al., 2008) y con los reportados por Park y Park (2010) quienes describieron la activación de caspasa 3 en células de glioblastoma humano expuestas a Mn.

Es bien conocido que las Vías Extrínseca e Intrínseca convergen en las caspasas efectoras 3/7 (Tait y Green, 2010). Si bien la mayoría de los estudios referentes a la neurodegeneración relacionada a la EP han sido abordados desde el punto de vista de la Vía Intrínseca, existen antecedentes en cerebros de pacientes *post mortem* con EP, de la activación de la caspasa 8 y en un modelo murino de EP inducida por MPTP donde la modulación de la Vía Extrínseca fue capaz de reducir la pérdida de neuronas dopaminérgicas. Por otra parte, el estudio de Ho et al. (2009), empleando tejido estriatal de pacientes con EP genética (con una mutación en la proteína LRRK2) y cultivos primarios de neuronas corticales de ratón sobre-expresando la proteína LRRK2 con una mutación “missense”, ha hallado una relación directa entre la mutación causante de EP y la activación de la vía extrínseca de muerte celular. Teniendo en cuenta este escenario y considerando que la acumulación de Mn en el cerebro da lugar a una patología de tipo parkinsoniana, se estudió la participación de la Vía Extrínseca en nuestro modelo de Manganismo. El Mn indujo un significativo incremento en los niveles de Fas-L y activó la caspasa

iniciadora 8. Consistente con estos resultados, la proteína quimera Fas-Fc, que secuestra a Fas-L e impide la activación del receptor Fas endógeno, así como el inhibidor de caspasa 8, previnieron casi por completo la muerte inducida por Mn (**Figuras 20 y 21**). Estos resultados sumados a la inhibición del clivaje de PARP-1 y de la aparición de núcleos apoptóticos por parte del inhibidor de caspasa 8, demuestran la participación del sistema Fas/Fas-L/caspasa 8 en la apoptosis inducida por Mn e indican que la activación de Fas ocurre en un punto apical en la cascada de señales. Si bien El Mchichi et al. (2007), han reportado la activación de la caspasa 8 en células B de linfoma humano expuestas a Mn 400µM nosotros hemos descrito por primera vez (Alaimo et al., 2011) en forma detallada los eventos moleculares participantes de la Vía Extrínseca en un modelo de Manganismo.

Una vez desencadenada la Vía Extrínseca pueden tener lugar dos caminos de señalización y cuál de éstos se desencadenará, dependerá de los niveles de DISC y de activación de la caspasa 8. En el caso de las células tipo I, están implicadas grandes cantidades de DISC y de caspasa 8 activa. Esto trae aparejado el clivaje en forma directa de las caspasas efectoras por parte de la caspasa 8. Por otro lado, las células tipo II contienen bajos niveles de DISC y baja producción de caspasa 8 activa. Por lo tanto, en este escenario, se requiere una amplificación de la señal que tiene lugar gracias al nexo que la caspasa 8 establece con la vía mitocondrial y que está mediado por el clivaje de Bid. En un trabajo reciente, el grupo de Gottlieb (Gonzalvez et al.; 2008; Schug et al., 2011) ha descrito la presencia de la caspasa 8 activa (p43-p10) en la mitocondria de células tipo II. Más específicamente, los autores señalan que la forma p43-p10 se originaría en el DISC y luego migraría a la mitocondria donde formaría un complejo de andamiaje sobre la cardiolipina en conjunto con Bid. En esta localización además, existiría un pool nativo de moléculas de pro-caspasa 8. Entonces, una vez translocada, la caspasa 8

activa clivaría al pool de zimógenos por el mecanismo denominado “activación inducida por proximidad”. Ahora bien, aparentemente tBid tendría la capacidad de disociarse de dicho complejo y de este modo podría interactuar, por ejemplo, con Bax y/o Bcl-X_L para activar MOMP. En nuestro modelo, una vez probado que el Mn activa a la caspasa 8 (**Figura 21**) e induce el clivaje de Bid (**Figura 22**), nos planteamos determinar la localización subcelular de la caspasa 8. Nuestros resultados coinciden con lo expuesto anteriormente puesto que en las fracciones mitocondriales pudo observarse la presencia de ambas isoformas de la pro-caspasa 8 en condiciones basales las cuales sufrieron clivaje en presencia de Mn (**Figura 23**). Por lo tanto, los hallazgos obtenidos hasta el momento, nos permitirían especular que en nuestro modelo la caspasa 8 se activaría a nivel del DISC desencadenando la señalización de muerte. Sin embargo, no podemos excluir la posibilidad de que la caspasa 8 sea activada a través de una vía lisosomal, de acuerdo a lo reportado por Baumgartner et al. (2007) y a resultados de nuestro laboratorio (Gorojod et al., 2010). En consecuencia, el mecanismo preciso responsable de la activación de la caspasa 8 bajo nuestras condiciones experimentales aún no se encuentra elucidado y necesita de posteriores investigaciones. No obstante, los resultados obtenidos sumados al clivaje de Bid demuestran la existencia de un nexo entre la Vía Extrínseca y la Intrínseca, en la apoptosis inducida por Mn en células C6.

Habiendo establecido este escenario, resultó evidente que los ensayos posteriores debían focalizarse en el estudio de los eventos mitocondriales. Este objetivo tiene fundamento además en reportes previos que han indicado que la neurotoxicidad por Mn se caracteriza por la disfunción mitocondrial tanto en neuronas como en células gliales (Galvani et al., 1995; González et al., 2008; Yin et al., 2008; Benedetto et al., 2009; Yoon et al., 2011). Además, se ha establecido que

entre los múltiples mecanismos moleculares que comparten la EP y el Manganismo, la disfunción mitocondrial juega un rol relevante (Benedetto et al., 2009).

En este sentido, se determinó en primer lugar que el Mn indujo la activación de la caspasa 9 (**Figura 24A**). Hasta el momento sólo existe un reporte que describe la activación de esta caspasa en células C6 expuestas a CdCl₂ 10-20µM (Wätjen y Beyersmann, 2004) y en células PC12 incubadas con Mn 500µM. Por otra parte, el efecto parcial que tuvo el inhibidor de caspasa 9 en la prevención de la muerte celular (**Figura 24B**) se ajustaría a la hipótesis de que la caspasa 8 tiene un rol apical en el desencadenamiento de la señal apoptótica y que ésta amplificaría a través de la Vía Mitocondrial.

Durante la apoptosis, el citocromo c se libera de la mitocondria, un evento que está modulado por la familia de proteínas Bcl-2. La liberación del citocromo c se produce por la apertura de diferentes clases de poros (mPTP y Bax/Bax) en la membrana mitocondrial. Una vez en el citoplasma, forma parte del complejo apoptosoma: citocromo c, ATP/dATP, Apaf-1 y caspasa 9 (Tait y Green, 2010). Por lo tanto, habiendo establecido la participación de la caspasa 9 en nuestra cascada de muerte y con el propósito de obtener evidencias adicionales de la activación de la vía intrínseca, estudiamos la liberación de citocromo c. Los resultados obtenidos confirmaron que el Mn indujo la liberación de esta hemoproteína en concordancia con lo reportado para astrocitos corticales de rata (González et al., 2008) (**Figura 26**).

Como se ha descrito anteriormente, la desestabilización de la membrana mitocondrial está asociada a la pérdida de su potencial debido a la permeabilización de la misma. En mitocondrias, la CsA se une a la ciclofilina D, uno de los componentes del mPTP, impidiendo de esta manera la formación del poro (Broekemeier et al., 1989). Aún más, se postula que el bloqueo de la formación del

mPTP tiene un potencial prometedor como intervención farmacológica, en la protección y restitución de las funciones mitocondriales en enfermedades neurodegenerativas. Además, un punto a considerar al momento de diseñar drogas de este tipo, es que éstas deben cruzar la barrera hematoencefálica con el fin de alcanzar las células cerebrales e ingresar en ellas. En este marco, se ha determinado que la CsA administrada vía intraperitoneal en ratones con ELA, logra acumularse en el cerebro y la médula espinal indicando que esta molécula es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica a una dosis que no presenta acción inmunosupresora (Kirkinezos et al., 2004). Esto es un punto a destacar ya que la CsA es un medicamento inmunosupresor ampliamente usado en el trasplante de órganos para reducir la actividad del sistema inmunitario del paciente y el riesgo de rechazo del órgano. Por otra parte, investigaciones llevadas a cabo con diferentes inhibidores del mPTP, han revelado que la CsA es un potencial candidato para la llamada “medicina mitocondrial” (Du y Yan, 2010).

Basados en los antecedentes descriptos, se diseñó un estudio con el fin de investigar si la CsA era capaz de proteger a las células C6 de la muerte inducida por Mn. El ensayo de viabilidad empleando MTT mostró que las CsA (1 μ M) logró prevenir de modo parcial (~30%) el efecto citotóxico indicando un rol para el mPTP en nuestro modelo. Curiosamente, este efecto fue de la misma magnitud que el obtenido con el inhibidor de la caspasa 9. Ahora bien, para poder completar un esquema de señalización de muerte en el que la mitocondria estaría implicada, era necesario profundizar sobre otros parámetros involucrados en esta vía. Por esta razón, se evaluó la participación de los miembros de la familia Bcl-2, importantes reguladores de la Vía Intrínseca (Chipuk et al., 2010).

Los miembros de la familia Bcl-2 interactúan de una forma dinámica para regular la apoptosis. La proteína Bcl-2 bloquea la apoptosis inducida por una gran

variedad de estímulos, mientras que Bax puede heterodimerizar con Bcl-2 y bloquear su acción anti-apoptótica (Du et al., 2011). Aún más, Bcl-2 se localiza predominantemente en la mitocondria, regulando la integridad de la membrana de esta organela y la liberación de citocromo c. Contrariamente, Bax se encuentra en el citoplasma y en respuesta a un estímulo apoptótico es redistribuido a la mitocondria (Chipuk et al., 2010). Los estudios de los niveles proteicos demostraron que el Mn conduce a un desbalance en la relación Bax/Bcl-2 que favorece la promoción de la muerte celular. Esto se reflejó por un incremento en los niveles de expresión de Bax y una disminución en los de Bcl-2, lo cual era esperable estando en presencia de un proceso apoptótico (**Figura 27A**). Cuando se analizó la distribución subcelular de estas proteínas, encontramos que el Mn aumentó los niveles mitocondriales de Bax y de un fragmento de Bcl-2 de menor PM (23kDa) que el presente en la fracción citosólica (26kDa), el cual probablemente posea acciones proapoptóticas tal como se discutió en la sección Resultados. Por lo tanto, el análisis de los niveles proteicos en lisados totales así como la localización de los dos miembros de la familia Bcl-2 respaldan la activación de la vía mitocondrial en nuestro sistema.

Es bien conocido que la proteína p53 promueve la apoptosis vía la expresión de genes relevantes a nivel mitocondrial: PUMA, Noxa, Bax y Apaf-1 o mediante la inhibición de la expresión de proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2 y Bcl-x_L (Slee et al., 2004). Nuestro análisis de los niveles de expresión de p53 en las células C6, determinó un drástico aumento por exposición a Mn (**Figura 28**). Una inducción de p53 por parte del Mn fue también reportada por Zhao et al. (2008) en un modelo de toxicidad en pulmón, empleando células A549 de adenocarcinoma humano de epitelio alveolar expuestas a Mn 500µM. En dicho modelo, el incremento en los niveles de p53 se asoció a un arresto del ciclo celular en Go/G1 y S. En nuestro caso, si bien mucho resta por estudiar acerca de la acción de esta proteína, es

probable que el dramático aumento detectado en sus niveles, esté asociado a su acción apoptótica, posiblemente estimulando la expresión de proteínas tales como Bax y Fas descritas anteriormente, además de la MAPK JNK, cuyos niveles incrementados se han detectado previamente en nuestro laboratorio en células C6 expuestas a Mn (Cortina, 2006). En conjunto, los resultados descritos son compatibles con la participación de la Vía Apoptótica Mitocondrial dependiente de caspasas.

Las mitocondrias juegan un rol crucial en la apoptosis integrando señales de muerte a través de los miembros de la familia Bcl-2 y coordinando la activación de caspasas por medio de la liberación de factores apoptogénicos, tales como el citocromo c, como resultado de la MOMP. Durante los últimos años, a estos procesos se le sumaron otros, que ocurren durante la apoptosis y que se relacionan con el estudio de la dinámica mitocondrial (Martinou y Youle, 2006).

2. Efectos del Mn sobre la dinámica mitocondrial

Las mitocondrias son organelas morfológicamente dinámicas que se fusionan y se fisionan continuamente formando desde redes interconectadas hasta pequeñas unidades individuales (Sheridan y Martin, 2010). Durante la apoptosis, la red mitocondrial se fragmenta, lo que resulta en un mayor número de mitocondrias más pequeñas. Este fenómeno usualmente ocurre río arriba de la activación de caspasas y cercano a la translocación de Bax, a la MOMP y a la liberación de citocromo c (Martinou y Youle, 2006), lo que indica la existencia de un nexo entre cambios en la morfología mitocondrial y la apoptosis.

En nuestro modelo, el Mn indujo la disipación del $\Delta\psi_m$ además de cambios en la morfología mitocondrial que predecían la ocurrencia de un desbalance del equilibrio fusión/fisión, con predominio de este último evento. En efecto, se observó

disrupción de las redes mitocondriales con conversión de las formas filamentosas en estructuras redondeadas, las cuales tendían a aglomerarse en el espacio perinuclear (**Figura 29**). En relación a esto último, trabajos previos realizados en fibroblastos L929 murino y en células HeLa demostraron que las mitocondrias fragmentadas originadas a partir del colapso de la extensa red que normalmente abarca toda la célula, se redistribuyen formando un patrón perinuclear (De Vos et al., 1998; Sheridan et al., 2008). Skulachev (2001) ha sugerido que este fenómeno podría constituir una estrategia diseñada por la célula para transportar proteínas pro-apoptóticas presentes en el EIM. De esta forma, dichas proteínas se ubicarían en el escenario específico donde tendrían lugar los eventos culminantes de la muerte celular apoptótica.

Nuestros hallazgos basados en el estudio de la morfología mitocondrial y la cuantificación de distintas subclases de morfologías nos permiten afirmar que en la apoptosis de células C6 inducida por Mn existe una alteración de la dinámica mitocondrial lo cual se correlaciona con lo descrito en otros modelos de enfermedades neurodegenerativas como la EP, Huntington, Alzheimer, ELA, Charcot-Marie-Tooth, entre otras (Bossy-Wetzel et al., 2003; Liesa et al., 2009; Santos et al., 2010). Por otra parte, cabe destacar que el Mn indujo un incremento significativo de células con apariencia redondeada, en las cuales el Mitotracker Red se encontraba difundido en el citoplasma. Este tipo de células corresponde a un estadio avanzado de la apoptosis dado que presentaban núcleos con condensación y fragmentación de la cromatina (**Figura 29**).

Si bien en estudios anteriores, se ha descrito que el Mn induce la disrupción del $\Delta\psi_m$ (Yin et al., 2008, González et al., 2008, Yoon et al., 2011) hasta donde sabemos este es el primer trabajo que realiza un análisis exhaustivo que contempla

los cambios morfológicos que sufren las mitocondrias durante la apoptosis inducida por Mn.

Durante la apoptosis, la fisión mitocondrial ocurre dentro del mismo marco temporal en el que Bax oligomeriza en la mitocondria y ocurre la MOMP. Aunque el mecanismo preciso de la MOMP es aún un tema de debate, generalmente está aceptado que las proteínas Bax y “Bax-like” son requeridas para este proceso. En la búsqueda de un nexo entre la MOMP y la fisión mitocondrial, muchos investigadores han intentado determinar cuál de ellos ocurre primero o si lo hacen al mismo tiempo, tema que aún no se ha esclarecido (Martinou y Youle, 2006). En nuestro caso, nos planteamos determinar si la pérdida del $\Delta\psi_m$ estaba asociada a los cambios en la morfología mitocondrial. Para ello, empleamos el inhibidor del poro mPTP, CsA 1 μ M. El exceso de fisión mitocondrial inducido por Mn fue notoriamente prevenido por este compuesto (**Figura 29**), lo que permite sugerir que la apertura del mPTP y la consecuente despolarización de la membrana mitocondrial, constituyen un paso previo a la ocurrencia de una fragmentación exacerbada. En concordancia con estos hallazgos, Tan et al. (2011) han determinado una correlación entre la disipación del $\Delta\psi_m$ y la fragmentación exacerbada. Estos autores indujeron un aumento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} con el ionóforo aBr-A23187 en cultivos primarios de astrocitos de rata. El mismo produjo fisión de las redes mitocondriales, proceso que pudo ser prevenido por CsA (1 μ M). Por otra parte, Legros et al. (2002), empleando células HeLa expuestas a diferentes tratamientos que inducían la pérdida del $\Delta\psi_m$ demostraron que éstos conducían a la inhibición de la fisión mitocondrial. Por otra parte, los hallazgos de la **Figura 40** sugieren que la CsA inhibe a la translocación de Drp-1, proceso que también estaría involucrado a la inhibición de la fisión. Por lo tanto, la CsA ejercería su efecto protector actuando a dos niveles: disminuyendo la

disipación del $\Delta\psi_m$ por inhibición del mPTP e inhibiendo la fisión por disminución en la translocación de Drp-1.

La identificación de las proteínas involucradas en la regulación y mantenimiento de la morfología mitocondrial ha revelado el rol crucial de la dinámica mitocondrial en la fisiología celular. Es por ello que defectos en las proteínas de fusión y fisión mitocondrial resultan en la desregulación de las funciones celulares y en la mayoría de los casos, culminan con la muerte celular, tal como se observa en numerosos desórdenes neurodegenerativos (Palmer et al., 2011). Si bien están identificadas las proteínas clave intervinientes en la fusión y fisión, aún existen controversias en cuanto al mecanismo implicado en sus funciones. Por otra parte, el panorama se complica aún más cuando se contempla que estas proteínas tienen roles no solo en la dinámica mitocondrial sino también en la apoptosis (Wasilewski y Scorrano, 2009; Palmer et al., 2011).

Como ya se mencionó, la formación de distintos poros en la MME como respuesta a un estímulo apoptótico, permite la liberación de proteínas pro-apoptóticas al citosol. Sin embargo, no sólo este evento regula la liberación sino que la morfología de las crestas mitocondriales juega también un rol relevante en la compartimentalización de algunos de estos efectores de muerte celular y por lo tanto, de su liberación al citosol. Así, la dinámica y remodelamiento de las crestas mitocondriales constituye un potencial punto de control de la apoptosis intrínseca, y por lo tanto de intervención terapéutica, en la cual los componentes de la dinámica mitocondrial podrían desempeñar un rol relevante.

En nuestro modelo, el primer blanco de estudio a nivel molecular fue Opa-1. Esta proteína participa en el proceso de fusión y en el mantenimiento de la arquitectura de las crestas mitocondriales (Palmer et al., 2011). El perfil de expresión de Opa-1 en las células C6 expuestas a Mn, reveló la presencia de dos bandas de

107 y 94kDa acorde al rango reportado en la mayoría de las publicaciones (80-100kDa) (**Figura 30A**). Esto se correlaciona con los hallazgos de Olichon et al. (2002), quienes han descrito la expresión de Opa-1 en tejidos de cerebro, corazón, hígado, y músculo esquelético de rata, en linfocitos humanos y en las líneas células HeLa y NIH-3T3. Este trabajo demostró que si bien existían 8 variantes de splicing alternativo de Opa-1, la cantidad de bandas detectadas dependía de la especie y tejido estudiado.

Por otra parte, nuestros resultados mostraron que el Mn indujo el procesamiento de Opa-1 determinado por la aparición de un fragmento de menor PM (~71kDa) (**Figura 30**), que carece de actividad GTPasa (Loucks et al., 2009) y que explicaría el aumento en la fragmentación mitocondrial observada. De todos modos, no puede descartarse la posibilidad de que, además de ocurrir el clivaje de la proteína, los niveles de expresión de Opa-1 estén disminuídos.

En la mayoría de los trabajos, se describe la desaparición o reducción de las isoformas de Opa-1 de alto PM como consecuencia del clivaje de alguna proteasa que actúa preferentemente frente a un estímulo apoptótico. Sin embargo, Loucks et al. (2009), hallaron un producto de clivaje de PM ~71kDa en neuronas granulares de cerebelo de rata deprivadas de concentraciones de potasio despolarizantes (5K). Este trabajo y el nuestro representan los dos únicos antecedentes hasta el momento que reportan la presencia de este fragmento en modelos de fisión mitocondrial aumentada.

La proteasa PARL promueve el procesamiento de Opa-1 a una forma soluble que se ubica en el EIM y que oligomeriza con las formas de Opa-1 ancladas a la MMI controlando el diámetro inter-crestas. Contrariamente, el fragmento de 71~kDa resulta incompetente para la formación de estos oligómeros (Loucks et al., 2009). Estos y otros autores, se han planteado cuál podría ser entonces la proteasa que

genera el fragmento incompetente soluble incapaz de formar oligómeros. En este marco, Ishihara et al. (2006) empleando células HeLa postularon a la metaloproteasa de matriz (m-AAA ó paraplegina) como la posible candidata para clivar a Opa-1. De todos modos, aún no se ha alcanzado un consenso general en este sentido, ya que no se conoce con exactitud el rol de las proteasas-AAA sobre la proteína Opa-1 (Jourdain y Martinou, 2009).

Al analizar la distribución subcelular de Opa-1 encontramos que la exposición a Mn resultaba en la liberación de las formas de alto PM de Opa-1 desde la mitocondria hacia el citoplasma lo cual podría potencialmente explicar la inducción de la fragmentación mitocondrial ejercida por el Mn (**Figura 30B**). Ju et al. (2008), empleando cultivos de células ganglionares de retina procedentes de ratones sufriendo glaucoma, observaron fisión mitocondrial y alteración de la arquitectura de las crestas. Además, analizando fracciones subcelulares mediante análisis western blot observaron que las isoformas largas de Opa-1 eran clivadas en formas de menor PM y liberadas al citoplasma. Además, al igual que en nuestro caso, han detectado señal de isoformas de alto PM en la fracción citosólica. Los experimentos llevados a cabo empleando CsA nos han permitido establecer la participación crítica del mPTP y la MOMP sobre la morfología mitocondrial en la apoptosis inducida por Mn. En un nuevo ensayo, estudiando el efecto de este inhibidor sobre los niveles de OPA-1, demostramos que el bloqueo del mPTP previene el procesamiento de Opa-1 inducido por Mn (**Figura 31A**). Estos resultados están avalados por los obtenidos por Baricault et al. (2007) quienes demostraron que la pérdida del $\Delta\psi_m$ y el clivaje de Opa-1 inducidos por la adición de Ca^{2+} a cultivos de células HeLa, podían ser prevenidos por CsA.

Estos hallazgos contribuyen a la elucidación de los eventos temporales que tienen lugar durante la apoptosis y en conjunto con los resultados de la **Figura 29B**,

sugieren que la MOMP precede a la fisión mitocondrial y al remodelamiento interno de la crestas.

La apertura del mPTP es responsable de varios efectos, entre ellos, el incremento drástico en los niveles de ROS (Mattson y Kroemer, 2003). Cuando se analizó el efecto del GSH sobre los niveles de Opa-1, se observó que este antioxidante previene parcialmente el procesamiento de Opa-1 (**Figura 31B**). Baricault et al. (2007) estudiaron el efecto de NAC sobre el clivaje de Opa-1 inducido por estaurosporina y lonidamina (un inductor de la apertura del mPTP) en células HeLa. Sin embargo, en este caso, el clivaje de Opa-1 no estuvo mediado por la generación de ROS intracelulares. Por otra parte, Wu et al. (2011) irradiando células ASTC-a-1 de adenocarcinoma pulmonar humano y células COS-7 de riñón de mono, con un láser de baja potencia para producir incremento en los niveles de ROS intracelulares, encontraron que el EO mitocondrial mediado por Drp-1 y Fis-1 causa un desbalance en el equilibrio fusión/fisión que resulta en la fragmentación de las mitocondrias y contribuye a la disfunción mitocondrial y celular.

Loucks et al. (2009) han reportado la localización mitocondrial de la pro-caspasa 8 y de su forma activa en la apoptosis inducida por CIK (5K) en neuronas granulares de cerebelo de rata. Ellos proponen que frente al estímulo apoptótico, una caspasa de localización mitocondrial, que podría ser la caspasa 8, activaría a una proteasa del EIM, la cual a su vez sería la encargada de clivar a Opa-1 generando el fragmento incompetente de ~71kDa. Hasta el momento, en nuestro modelo, nos encontrábamos frente a un escenario bastante similar: la detección del producto de clivaje de ~71kDa y la descripción del papel relevante de la caspasa 8 en la señalización de muerte, además de su localización mitocondrial (**Figura 23**). En base a ello, investigamos el efecto de la inhibición de la actividad de la caspasa 8

sobre el procesamiento de Opa-1 y encontramos que el inhibidor z-IETD-FMK previno marcadamente el clivaje de Opa-1 (**Figura 32**).

En la mitocondria existen dos pools de citocromo c: un pool soluble en el EIM (15% del citocromo c total) y un pool mayor confinado a las crestas mitocondriales. Martinou y Youle (2006) proponen un modelo temporal en los eventos mitocondriales que tienen lugar en la apoptosis. En él, luego de la MOMP, la mitocondria sufre remodelamientos en su estructura interna que incluyen la disrupción de la arquitectura de las crestas la cual está controlada por los oligómeros de Opa-1. Este proceso contribuye a la relocalización del citocromo c hacia el EIM, facilitando su liberación al citoplasma a través de los poros en la MME.

En nuestra investigación, con el fin de establecer de manera más rigurosa el rol de Opa-1 en la apoptosis inducida por Mn, se transfectaron las células C6 con los plásmidos WT y Q297V Opa-1. Acorde a lo reportado por Yamaguchi et al. (2008), ambos plásmidos contribuirían a la estabilización de los oligómeros que forman las proteínas Opa-1, impidiendo el desmantelamiento de la estructura de las crestas mitocondriales. Cuando evaluamos el rol de Opa-1 en la apoptosis, encontramos que actuaba como una proteína bi-funcional, es decir, como promotora de la fusión y como anti-apoptótica. Esta afirmación se fundamenta en su capacidad de prevenir la muerte celular (**Figura 33**), la fragmentación de las redes mitocondriales y la disipación del $\Delta\psi_m$ (**Figura 34**) y la aparición de núcleos con características apoptóticas inducidas por Mn (**Figura 35**). Estos resultados sugieren que, la sobre-expresión de Opa-1 contribuiría a aumentar la estabilización de los complejos de Opa-1 en células expuestas a Mn, previniendo la liberación del citocromo c asociado a las crestas mitocondriales y por consiguiente la cadena de eventos posteriores. Resultados similares fueron reportados por Yamaguchi et al. (2008), quienes han determinado que la transfección de células 293T con los plásmidos WT Opa-1 y

mutante Q297V previnieron la apoptosis inducida por adición de Bim recombinante, evaluada mediante ensayo de TUNEL. Estos investigadores encontraron que el efecto de la proteína mutante en la inhibición de la apoptosis era más potente que el correspondiente a la WT, a diferencia de nuestros ensayos que muestran efectos similares para ambos plásmidos. La acción antiapoptótica de Opa-1 ha sido reportada previamente por Lee et al. (2004) y Frezza et al. (2006). En este último trabajo, la sobre-expresión de Opa-1 en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) previno la activación de la vía intrínseca apoptótica inducida por H₂O₂ 1mM, etopósido 2μM, estaurosporina 2μM y pcDNA3.1-tBid, evaluado mediante citometría de flujo empleando Anexina-V-Alexa568. Por otra parte, Lutz et al. (2009) han recreado un modelo de parkinsonismo autosómico recesivo por mutación en el gen parkina en células SH-SY5Y de neuroblastoma humano. En este modelo han hallado que la pérdida del fenotipo mitocondrial filamentoso era prevenida por la sobre-expresión de Opa-1, lo que sugiriendo que una disminución de la fusión o un incremento de la fisión están asociados a la falta de función de la proteína parkina.

En los hallazgos descritos en la **Figura 34**, llama la atención la prevención ejercida por Opa-1 sobre la pérdida del $\Delta\psi_m$. Esto parecería indicar que los eventos asociados a la actividad de fusión preceden a la MOMP, lo cual en principio parece contradecir los resultados obtenidos en la **Figura 29**. Sin embargo, estos efectos podrían ser la consecuencia de lo reportado por Olichon et al. (2007), quienes demostraron que las isoformas de Opa-1 que contienen al exón 4 no sólo modulan la actividad de fusión sino que también mantienen el $\Delta\psi_m$. En este punto cabe resaltar que en nuestro caso, la isoforma de la proteína sobre-expresada corresponde a una de las que porta el exón 4. Además, el proceso de fusión permite la recuperación de mitocondrias que han perdido el $\Delta\psi_m$ a través del intercambio de material con organelas sanas. De todos modos aún resta mucho por investigar para arribar al

esclarecimiento de la cadena de eventos temporal que gobierna estos procesos. Lo más probable es que este escenario dependa del tipo celular y de la situación fisiológica particular en que se encuentre la célula.

Durante la apoptosis, la activación de proteínas BH3-only (como por ejemplo tBid) y la apertura de poros en la mitocondria (mPTP o Bax/Bak) provoca la desestabilización de los oligómeros de Opa-1 resultando en el remodelamiento de la MMI y de las crestas mitocondriales (Campello y Scorrano, 2010). Así, dado que en nuestro modelo tienen lugar la activación de Bid y un aumento en la expresión de Bax, es posible que estas proteínas estén contribuyendo a los efectos observados.

Como ya se ha mencionado, la proteína Drp-1 desempeña un rol crítico en la fisión mitocondrial. El proceso de fisión depende de la translocación de Drp-1 desde el citoplasma a la mitocondria, donde se une en la MME a su molécula adaptadora Fis-1. Una vez allí, oligomeriza y constriñe a la organela produciendo su fisión (Reddy et al., 2010; Palmer et al., 2011). Si bien existen antecedentes que describen la presencia de mitocondrias fragmentadas en enfermedades neurodegenerativas, sólo dos de ellas, relacionadas a la enfermedad de Alzheimer y EP, han abordado el estudio del rol de Drp-1 y de Opa-1 (Wang et al., 2009; Cui et al., 2010).

En nuestro modelo, el Mn aumentó dramáticamente los niveles de expresión de Drp-1 (**Figura 36A**). Aún más, frente al estímulo apoptótico, la señal de Drp-1 se vió incrementada en la fracción enriquecida en mitocondrias con una correspondiente disminución en la fracción citosólica (**Figura 36B**). Además, mediante inmunocitoquímica hemos demostrado que el Mn induce un significativo aumento en la co-localización de las señales de Drp-1 y Mitotracker Red en las mitocondrias (**Figura 36C**). Esta translocación avala el aumento encontrado en la fisión mitocondrial.

Leininger et al. (2006) y Men et al. (2009) trabajando en cultivos primarios de neuronas de ganglios espinales y células ISN-1 de insulinoma de rata expuestos a un estímulo que induce la vía intrínseca mediante la producción de ROS, detectaron un incremento en los niveles de expresión de Drp-1 además de su translocación a la mitocondria. De manera similar, Karbowski et al. (2002) detectaron mediante inmunocitoquímica la translocación de Drp-1 en células COS-7 expuestas a estaurosporina 2 μ M.

El rol de Drp-1 en la apoptosis fue estudiado por primera vez por Frank et al., (2001). Estos autores sobre-expresaron una dominante negativa (Drp-1K38A) en células COS-7 y por exposición a estaurosporina demostraron que Drp-1 tenía un rol crítico en la disrupción mitocondrial asociada a la cascada de eventos apoptóticos, ya que esta mutante lograba evitar la fragmentación excesiva, la pérdida del $\Delta\psi_m$ y la liberación de citocromo c. Posteriormente, este rol fue confirmado por otros grupos de investigación empleando estrategias de sobre-expresión o silenciamiento (Martinou y Youle, 2006 y referencias allí citadas; Gomez Lázaro et al., 2008; Men et al., 2009; Wu et al., 2011).

En nuestro trabajo, para determinar el rol de Drp-1 en la apoptosis inducida por Mn utilizamos un reactivo novedoso llamado Mdivi-1, un inhibidor específico de la actividad GTPasa de Drp-1 y bloqueante eficaz de la fisión mitocondrial caracterizado por Cassidy-Stone (2008). Estos autores compararon el efecto inhibitorio de Mdivi-1 con los resultados de Frank et al. (2001) y sus hallazgos permitieron afirmar que las acciones preventivas de Mdivi-1 resultaron ser de la misma magnitud que los obtenidos empleando dominantes negativas o siRNA Drp-1.

En nuestro modelo, Mdivi-1 0,0001 μ M ejerció un efecto protector sobre la muerte celular (**Figura 37**), la integridad del $\Delta\psi_m$ y la morfología mitocondrial (**Figura 38**) y previno la aparición de núcleos apoptóticos (**Figura 39**). Este conjunto

de resultados nos permite concluir que Drp-1 es parte de la maquinaria que promueve la apoptosis inducida por Mn en las células C6.

Es importante señalar que la concentración de Mdivi-1 empleada en nuestros estudios fue considerablemente menor a la empleada por Cassidy-Stone et al. (2008). Por su parte, Cui et al. (2010) han trabajado en un modelo de EP en neuronas dopaminérgicas humanas determinando que 10 μ M de Mdivi-1 resultaba ser una concentración óptima para el mantenimiento de los niveles de ATP, integridad del $\Delta\psi_m$ y estado normal de las redes mitocondriales. Posiblemente la concentración óptima a emplear sea una función del tipo celular y/o del estímulo aplicado.

Como ya se mencionó, durante la apoptosis, la translocación de Drp-1 está mediada por la defosforilación de la serina 637 catalizada por la fosfatasa calcineurina la cual es inhibida por CsA (Cereghetti et al., 2008). Por otra parte, Xu et al. (2009) han demostrado que en la apoptosis inducida por Mn 400 μ M en cultivos primarios de neuronas corticales de rata, se producía liberación de Ca²⁺ al citoplasma desde los depósitos intracelulares. En nuestro modelo, la preincubación de las células C6 con CsA indujo un aumento en los niveles citosólicos de Drp-1 lo cual sugiere la participación de la calcineurina en nuestro sistema como promotor de la translocación de Drp-1 (**Figura 40**). No obstante, este resultado constituye sólo una primera evidencia de la participación de esta enzima y se requiere de posteriores ensayos para su confirmación.

El conjunto de resultados de esta sección permiten concluir que las proteínas Opa-1 y Drp-1 están encargadas de regular la apoptosis inducida por Mn en las células C6.

3. Estudios *in vivo*

La exposición crónica al Mn da lugar a la acumulación de este metal en los ganglios basales, afectando preferentemente al globo pálido y al estriado (Olanow, 2004). Si bien se cuenta con numerosos estudios *in vitro* que demuestran la participación de eventos apoptóticos en el mecanismo de neurotoxicidad por Mn, pocos son los estudios realizados *in vivo*. En este sentido, Quintanar et al. (2011) monitorearon la inducción de muerte celular por Mn (0,1 μ mol) en tejido estriatal y de globo pálido, demostrando la activación de la caspasa 3 y de la calpaína. Además, Zhao et al. (2009) probaron que el Mn (1 μ mol) indujo la producción de óxido nítrico e interleuquinas por parte de la glia y microglia activadas. Ambos estudios se han realizado inyectando MnCl₂ intra-estriado, mediante un protocolo que ha sido adoptado para nuestros experimentos.

En esta Tesis, se analizó en primera instancia el daño producido por 1 μ mol de Mn en el tejido estriatal mediante la tinción de Nissl y Hoechst 33258 (**Figura 41 y 42**). Las ratas tratadas expuestas a Mn durante 7 días exhibieron daño en el tejido implicando una disminución moderada de la masa celular, sumado a la presencia de núcleos picnóticos. Quintanar et al. (2011) han detectado el mismo efecto en el estriado, pero a diferencia nuestra, la lesión se hizo evidente a las 8hs de tratamiento con Mn 0,1 μ mol mientras que a las 24hs el tejido se encontraba severamente dañado presentando también núcleos picnóticos y células polimórficas. Si bien la concentración de Mn y el tiempo de exposición al metal fueron menores a los empleados en nuestro modelo, debe considerarse que los animales de Quintanar et al. (2008) recibieron inyección de en ambos hemisferios, en tanto que los nuestros fueron inyectados con Mn en uno de los hemisferios actuando el otro como control.

Otro de los objetivos a evaluar en los experimentos *in vivo* se concentró en el estudio de las proteínas que regulan los procesos de fusión y fisión, ya que hasta el

momento, no existen reportes realizados en modelos de Manganismo. En nuestro trabajo, hemos demostrado alteraciones en la expresión de las proteínas asociadas a estos eventos en el tejido estriatal. Precisamente, se han hallado niveles reducidos de inmunomarcación de Opa-1 y Drp-1 por efecto del Mn. De acuerdo a los resultados establecidos en los estudios *in vitro*, era esperable la disminución de la expresión Opa-1 pero no la de Drp-1. Sin embargo, resultados similares fueron reportados por Wang et al. (2009) realizando inmunohistoquímicas de Opa-1, Mfn-1, Mfn-2, Drp-1 y Fis-1 en cerebros de pacientes *post-mortem* que padecían la enfermedad de Alzheimer. Sus estudios revelaron disminución en los niveles de expresión total de Opa-1, Mfn-1, Mfn-2 y Drp-1 y un aumento en Fis-1. Si bien para estos autores, los resultados correspondientes a Drp-1 tampoco eran los esperados, mediante fraccionamiento subcelular de homogenatos de cerebro, detectaron que si bien los niveles totales de Drp-1 se reducen, en las fracciones mitocondriales, estaban aumentados. Finalmente, concluyen que existía un patrón de expresión alterado en las proteínas de fisión/fusión en cerebro de pacientes que contribuía con la disfunción mitocondrial y neurodegeneración *in vivo*. En otro estudio, Kim et al. (2010), analizando mediante inmunohistoquímica muestras de pacientes *post-mortem* que padecían Huntington, han detectado incremento en los niveles de expresión de Drp-1 y disminución de Mfn-1.

Finalmente, si bien nuestros resultados son preliminares y aún resta definir en qué tipo celular se producen este tipo de alteraciones, constituyen el primer reporte que describe la desregulación de la dinámica mitocondrial en un modelo *in vivo* de Manganismo. Nuestros experimentos a futuro consistirán en la realización de doble-inmunomarcación con el fin de determinar si existe expresión diferencial de Opa-1 y Drp-1 en astrocitos y/o neuronas, los cuales serán identificados mediante los marcadores específicos de cada tipo celular, GFAP y Neu-N respectivamente.

Conclusiones

En esta Tesis Doctoral hemos demostrado que:

Estudios *in vitro*

- La exposición a Mn de las células C6 de astrocitoma de rata indujo muerte celular de manera dosis dependiente. Sin embargo, en presencia de suero, el Mn no ejerció efecto citotóxico en el rango de concentraciones ensayado (200-1000 μ M).
- El Mn indujo un aumento en la generación de ROS los cuales están implicados en la muerte celular tal como se demostró mediante el estudio del efecto protector de diferentes antioxidantes. Por otra parte, la privación de suero por sí sola no generó un incremento significativo en los niveles de ROS.
- La exposición a Mn indujo retracción de los procesos celulares, contracción citoplasmática y pérdida de la morfología fibroblástica. Además, la muerte celular tuvo lugar a través de un proceso apoptótico, demostrado por la condensación y fragmentación de la cromatina, clivaje de PARP-1 y activación de las caspasas 3/7.
- Se estableció por primera vez la participación de la Vía Extrínseca en la apoptosis inducida por Mn, implicando la señalización Fas/Fas-L/caspasa 8.
- La Vía Extrínseca describta amplificaría la señal apoptótica estableciendo un vínculo con la Vía Intrínseca. Esto fue demostrado por el clivaje de la proforma de Bid y el reclutamiento de la caspasa 8 a la mitocondria.
- La participación de la Vía Intrínseca se demostró mediante la apertura del mPTP, disipación del $\Delta\psi_m$, activación de la caspasa 9, liberación de citocromo c y desbalance en la relación Bax/Bcl-2 a favor de la promoción de la muerte celular.

- Se observó un incremento drástico en los niveles de expresión de p53 lo cual sugeriría un rol para esta proteína en la inducción de la apoptosis.
- Se ha demostrado que el Mn induce un desbalance del equilibrio fusión/fisión, llevando a una fragmentación exacerbada de las redes mitocondriales.
- El análisis a nivel molecular de la proteína de fusión Opa-1 y de la proteína de fisión Drp-1 demostró que el Mn produjo el procesamiento y una disminución significativa en los niveles de expresión de Opa-1, además de un incremento en los niveles de Drp-1 y su translocación a la mitocondria, donde induce fragmentación.
- Los resultados obtenidos empleando células transfectadas con plásmidos WT y una mutante de ganancia de función Opa-1, permitieron sugerir que ésta proteína además de su papel en la fusión mitocondrial, desempeña un rol anti-apoptótico. La prevención de la muerte celular, de la disrupción de las redes mitocondriales, de la disipación del $\Delta\psi_m$ y de la aparición de núcleos apoptóticos por sobre-expresión de Opa-1 avalan esta conclusión. Esta función anti-apoptótica podría estar mediada por la estabilización de los complejos Opa-1 como consecuencia de la sobre-expresión de la proteína, lo cual llevaría al mantenimiento de las uniones entre las crestas mitocondriales y por lo tanto, contribuiría al bloqueo de la liberación de citocromo c.
- Por su parte, la inhibición específica de Drp-1, permitió demostrar su acción en la promoción de la fisión y consecuentemente en la muerte celular.
- Finalmente, nuestros estudios comparando los diferentes parámetros tanto en presencia como ausencia de SFB demuestran que la privación de suero por si misma no ejerce acción alguna confirmando el hecho de que los efectos observados reflejan exclusivamente la acción del Mn.

Hasta aquí, los resultados presentados en esta tesis permiten describir las vías de señales moleculares implicadas en la apoptosis inducida por Mn en células C6 que se ilustran en la **Figura 44**.

Estudios in vivo

- El tratamiento de las ratas durante 7 días con $MnCl_2$ inyectado en el tejido estriatal, uno de los ganglios basales afectado en el Manganismo, produjo una lesión en el tejido visualizada por una disminución en la tinción de Nissl, lo que indica una menor población celular.
- Los resultados hallados mediante inmunohistoquímica indicaron alteraciones en la expresión de las proteínas Opa-1 y Drp-1, la cual sugiere un desbalance del equilibrio fusión/fisión mitocondrial.

En resumen, los hallazgos de este trabajo nos permiten afirmar que hemos avanzado significativamente en la elucidación de las cascadas de eventos moleculares que tienen lugar en la apoptosis inducida por Mn en células de astrocitoma C6 de rata. Los resultados son de importancia relevante pues contribuyen al conocimiento de los mecanismos moleculares que podrían estar operando en el Manganismo y en consecuencia, al planeamiento de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de esta patología, con la posibilidad de hacerla extensiva a la EP y quizá a otras patologías neurodegenerativas. Dichas estrategias estarían dirigidas a los diferentes blancos moleculares descritos en este trabajo de modo de proteger a los astrocitos y consecuentemente a las neuronas de los efectos deletéreos ejercidos por el Mn.

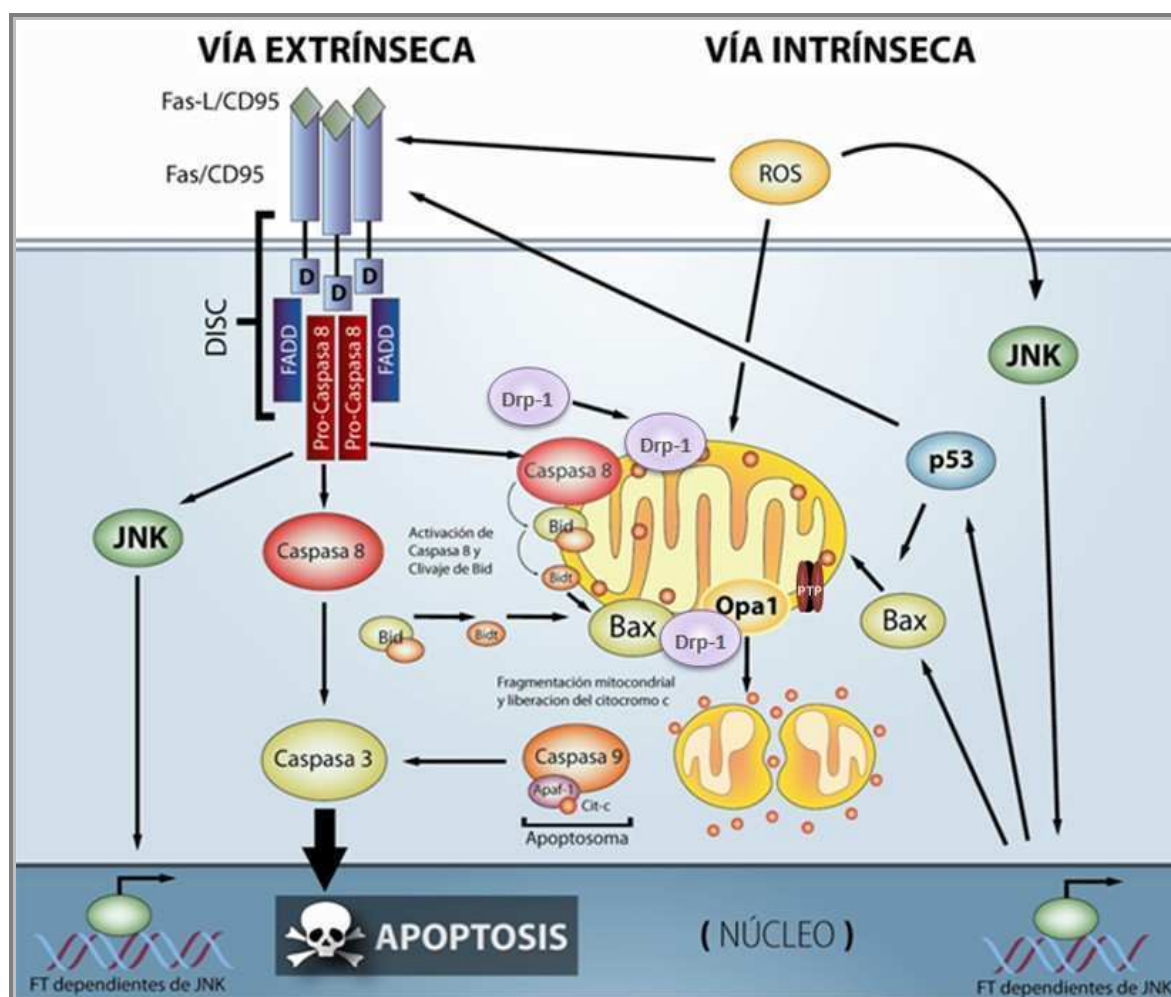


Figura 44. Modelo de señalización apoptótica inducida por Mn en células C6

El Mn activa la Vía Extrínseca a través del sistema Fas/Fas-L/caspasa 8. La caspasa 8 puede activar directamente a las caspasa 3/7 y también puede clivar Bid a la forma tBid el cual actúa conectando esta vía con la Intrínseca de modo de amplificar la señal de muerte. Dado que hemos detectado a la pro-caspasa 8 y a su forma activa en la mitocondria, es posible que la activación de Bid sea llevada a cabo en dicha organela. La activación de la Vía Mitocondrial involucra la participación de miembros pro-apoptóticos como Bax, lo cual tiene consecuencias negativas sobre el potencial de membrana y sobre la arquitectura de las crestas mitocondriales, sumado a un desbalance de la dinámica mitocondrial que conduce a un incremento de la fisión. Esto último está dado por clivaje e inactivación de Opa-1, así como por el incremento en los niveles de Drp-1 y su translocación a la mitocondria. Como consecuencia, se libera citocromo c, entre otros factores apoptogénicos, que una vez en el citoplasma, promueve la formación del apoptosoma donde se recluta la pro-caspasa 9. Esta sufre un auto-procesamiento dando lugar a su forma activa, lo que culmina con el clivaje y activación de las caspasa 3/7. Por otra parte, p53 actúa como un sensor de estrés y daño inducido por Mn. Los niveles incrementados de p53 podrían promover la transcripción de proteínas pro- apoptóticas (ej. Fas-L, Bax) o de JNK (quinasa de estrés). (El esquema es propiedad del laboratorio de Apoptosis en el Sistema Nervioso / Nano-Oncología, FCEN, UBA).

Bibliografía

- Alaimo A., Gorjod, R.M. y Kotler M.L. (2011). The Extrinsic and the Intrinsic Apoptotic Pathways are Involved in Manganese toxicity in rat astrocytoma C6 cells. *Neurochem. Int.* 59: 297-308.
- Allen N. J. y Barres B. A. (2009). Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature.* 457:675-7.
- Arnoult D. (2007). Mitochondrial fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 17:6-12.
- Aruoma O. I., Halliwell B., Hoey B.M. y Butler J. (1989). The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide and hypochlorous acid. *Free Radic. Biol. Med.* 6: 593-597.
- Ashkenazi A. y Dixit V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 281: 1305-1308.
- Aschner M., Gannon M. y Kimelberg H.K. (1992). Manganese uptake and efflux in culture rat astrocytes. *J. Neurochem.* 58:730-5.
- Aschner J.L. y Aschner M. (2005). Nutritional aspects of manganese homeostasis. *Mol Aspects Med.* 26(4-5):353-62.
- Aschner M. (2006). The transport of manganese across the blood-brain barrier. *Neurotoxicology.* 27(3):311-4.
- Au C., Benedetto A. y Aschner M. (2008). Manganese in eukaryotes: the role of DMT-1. *Neurotoxicology.* 29(4): 569-576.
- Autret A. y Martin S.J. (2009). Emerging role for members of the Bcl-2 family in mitochondrial morphogenesis. *Mol. cell rev.* 36(3):355-63.
- Baricault L., Ségui B., Guégand L., Olichon A., Valette A., Larminat F. y Lenaers G. (2007). OPA1 cleavage depends on decreased mitochondrial ATP level and bivalent metals. *Exp Cell Res.* 313(17):3800-8.
- Baumgartner H.K., Gerasimenko J.V., Thorne C., Ashurst L.H., Barrow S.L., Chvanov M.A., Gillies S., Criddle D.N., Tepikin A.V., Petersen O.H., Sutton R., Watson A.J.M. y Gerasimenko O.V. (2007). Caspase-8-mediated apoptosis induced by oxidative stress is independent of the intrinsic pathway and dependent on cathepsins. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 293: G296-G307.
- Benda C. (1898). Ueber die Spermatogenese der Vertebraten und höherer Evertbraten, II. Theil: Die Histogenese der Spermien. *Arch Anat Physiol.* 73:393-398.
- Benda P., Lightbody J., Sato G., Levine L. y Sweet W. (1968). Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science.* 61(839):370-1.
- Benedetto A., Au C. y Aschner, M. (2009). Manganese-Induced Dopaminergic Neurodegeneration: Insights into Mechanisms and Genetics Shared with Parkinson Disease. *Chem. Rev.* 109, 4862-4884.
- Bette S., Schlaszus H., Wissinger B., Meyermann R. y Mittelbronn M. (2005). OPA1, associated with autosomal dominant optic atrophy, is widely expressed in the human brain. *Acta Neuropathol.* 109: 393-399.

- Borenfreund E. y Puerner J.A. (1985). Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology letters*. 24(2-3):119-24.
- Borner, C. (2003) The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol. Immunol.* 39:615-647.
- Bossy-Wetzel E., Barsoum M.J., Godzik A., Schwarzenbacher R. y Lipton S.A. (2003). Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr Opin Cell Biol.* 15(6):706-16.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Broekemeier K. M., Dempsey M. E. y Pfeiffer D. R. (1989). Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 264:7826-7830.
- Brooks C., Wei Q., Feng L., Dong G., Tao Y., Mei L., Xie Z.J. y Dong Z. (2007). Bak regulates mitochondrial morphology and pathology during apoptosis by interacting with mitofusins. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 104(28):11649-54.
- Campello S. y Scorrano L. (2010). Mitochondria shape changes: orchestrating cell pathophysiology. *EMBO Rep.* 11(9):678-84.
- Cassidy-Stone A., Chipuk J.E., Ingerman E., Song C., Yoo C., Kuwana T., Kurth M.J., Shaw J.T., Hinshaw J.E., Green D.R. y Nunnari J. (2008). Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. *Dev Cell.* 14(2):193-204.
- Cereghetti G.M. y Scorrano L. (2006). The many shapes of mitochondrial death. *Oncogene.* 25(34):4717-24.
- Cereghetti G.M., Stangherlin A., Martins de Brito O., Chang C.R., Blackstone C., Bernardi P. y Scorrano L. (2008). Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105(41):15803-8.
- Cereghetti G.M, Costa V. y Scorrano L. (2010). Inhibition of Drp1- dependent mitochondrial fragmentation and apoptosis by a polypeptide antagonist of calcineurin. *Cell Death and Diff.* 17: 1785-1794
- Chaitanya G.V., Steven A.J. y Babu P.P. (2010). PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal.* 22; 8:31.
- Chance B., Sies H. y Boveris A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59(3): 527-605.
- Chang J.R., Ghafouri M., Mukerjee R., Bagashev A., Chabrashvili T., y Sawaya B.E. (2011). Role of p53 in Neurodegenerative Diseases. *Neurodegenerative Dis* (DOI: 10.1159/000329999).
- Checkoway H. (2010). Documenting neurotoxicity from occupational manganese exposure. *Occup Environ Med.* 67(6):362-3.
- Chen C.J. y Liao S.L. (2002). Oxidative stress involves in astrocytic alterations induced by manganese. *Exp Neurol.* 175(1):216-25.

- Chen H. y Chan D.C. (2009). Mitochondrial dynamic, fusion, fission, movement and mitophagy in neurodegenerative diseases. *Hum. Mol. Genet.* 18 (R2):R169-76.
- Chen L., Gong Q., Stice J.P. y Knowlton A.A. (2009). Mitochondrial OPA1, apoptosis, and heart failure. *Cardiovasc Res.* 84(1):91-9.
- Cheng E. H., Kirch D.G., Clem R.J., Ravi R., Kastan MB., Bedi A., Ueno K. y Hardwick J.M. (1997). Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science.* 278, 1966-1968.
- Chipuk J.E., Moldoveanu T., Llambi F., Parsons M.J. y Green D.R. (2010). The Bcl-2 family reunion. *Mol cell.* 37(3):299-310.
- Chun H.S., Lee H. y Son J.H.(2001). Manganese induces endoplasmic reticulum (ER) stress and activates multiple caspases in nigral dopaminergic neuronal cells, SN4741. *Neurosci Lett.* 316(1):5-8.
- Cipolat S., Martins de Brito O., Dal Zilio B. y Scorrano L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101(45):15927-32.
- Cortina E. (2006). Rol de la Hemo Oxigenasa-1 en la muerte celular inducida por manganeso en células de glioma C6. Cascadas de señales. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas, FCEN-UBA.
- Cory S. y Adams J.M. (2002).The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.*2(9):647-56.
- Couper J. (1837). On the effects of black oxide of manganese when inhaled in the lungs. *Br. Ann. Med. Pharmacol.* 1:41-42.
- Crawford E.D. y Wells J.A. (2011). Caspase substrates and cellular remodeling. *Annu Rev Biochem.* 80:1055-87.
- Cui M., Tang X., Christian W.V., Yoon Y. y Tieu K. (2010). Perturbations in mitochondrial dynamics induced by human mutant PINK1 can be rescued by the mitochondrial division inhibitor mdivi-1. *J Biol Chem.* 285(15):11740-52.
- D'Amelio M., Cavallucci V. y Cecconi F. (2010). Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death Differ.* 17(7):1104-14.
- Danial N.N. y Korsmeyer S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell.* 116(2):205-19.
- de Lau L.M. y Breteler M.M. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 5(6):525-35.
- De Vos K., Goossens V., Boone E., Vercaemmen D., Vancompernelle K., Vandenaabeele P., Haegeman G., Fiers W. y Grooten J. (1998). The 55-kDa tumor necrosis factor receptor induces clustering of mitochondria through its membrane-proximal region. *J. Biol. Chem.* 273: 9673-9680.
- Desole M.S., Sciola L., Delogu M.R., Sircana S., Migheli R. y Miele E. (1997).Role of oxidative stress in the manganese and 1-methyl-4-(2'-ethylphenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced apoptosis in PC12 cells. *Pharmacol. Res.* 36(4):285-92.
- Detmer S.A. y Chan D.C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(11):870-9.

- Dobson A.W., Erikson K.M. y Aschner M. (2004). Manganese neurotoxicity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1012:115-28.
- Du H. y Yan S.S. (2010). Mitochondrial medicine for neurodegenerative diseases. *Int J Biochem Cell Biol.* 42(5):560-72.
- Du H., Wolf J., Schafer B., Moldoveanu T., Chipuk J.E. y Kuwana T. (2011). BH3 domains other than Bim and Bid can directly activate Bax/Bak. *J Biol Chem.* 286(1):491-501.
- Duvezin-Caubet S., Jagasia R., Wagener J., Hofmann S., Trifunovic A., Hansson A., Chomyn A., Bauer M.F., Attardi G., Larsson N.G., Neupert W. y Reichert A.S. (2006). Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology. *J Biol Chem.* 281(49):37972-9.
- Eckstein L.A., Van Quill K.R., Bui S.K., Uusitalo M.S. y O'Brien J.M. (2005). Cyclosporin A inhibits calcineurin/nuclear factor of activated T-cells signaling and induces apoptosis in retinoblastoma cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46(3):782-90.
- Edinger A.L. y Thompson C.B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16(6):663-9.
- El Mchichi B., Hadji A., Vazquez A. y Leca G. (2007). p38 MAPK and MSK1 mediate caspase-8 activation in manganese-induced mitochondria-dependent cell death. *Cell Death Differ.* 14(10):1826-36.
- Ferrer I., Blanco R., Cutillas B. y Ambrosio S. (2000) Fas and Fas-L expression in Huntington's disease and Parkinson's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 26(5):424-33.
- Ferrer I., Puig B., Krupinski M. y Carmona M. (2001). Fas and Fas ligand expression in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 102(2):121-31.
- Ferri K.F. y Kroemer G. (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat. Cell Biol.* 3(11):E255-63.
- Frank S., Gaume B., Bergmann-Leitner E.S., Leitner W.W., Robert E.G., Catez F., Smith C.L. y Youle R.J. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev. Cell.* 1(4):515-25.
- Frezza C., Cipolat S., Martins de Brito O., Micaroni M., Beznoussenko G.V., Rudka T., Bartoli D., Polishuck R.S., Danial N.N., De Strooper B. y Scorrano L. (2006). OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell.* 126(1):177-89.
- Fujita E., Egashira J., Urase K., Kuida K. y Momoi T. (2001). Caspase-9 processing by caspase-3 via a feedback amplification loop in vivo. *Cell Death Differ.* 8(4):335-44.
- Fulda S., Galluzzi L. y Kroemer G. (2010). Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9(6):447-64.
- Galli S., Jahn O., Hitt R., Hesse D., Opitz L., Plessmann U., Urlaub H., Poderoso J.J., Jares-Erijman E.A. y Jovin T.M. (2009). A new paradigm for MAPK: structural interactions of hERK1 with mitochondria in HeLa cells. *PLoS One.* 4(10):e7541.
- Galluzzi L., Vitale I., Abrams J.M., Alnemri E.S., Baehrecke E.H., Blagosklonny M.V., Dawson T.M., Dawson V.L., El-Deiry W.S., Fulda S., Gottlieb E., Green D.R.,

- Hengartner M.O., Kepp O., Knight R.A., Kumar S., Lipton S.A., Lu X., Madeo F., Malorni W., Mehlen P., Nuñez G., Peter M.E., Piacentini M., Rubinsztein D.C., Shi Y., Simon H.U., Vandenabeele P., White E., Yuan J., Zhivotovsky B., Melino G. y Kroemer G. (2011). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* doi: 10.1038/cdd.2011.96.
- Galvani P., Fumagalli P. y Santagostino A. (1995). Vulnerability of mitochondrial complex I in PC12 cells exposed to manganese. *Eur. J. Pharmacol.* 293: 377-383.
- Ganapathy P.S., Perry R.L., Tawfik A., Smith R.M., Perry E., Roon P., Bozard B.R., Ha Y. y Smith S.B. (2011). Homocysteine-mediated modulation of mitochondrial dynamics in retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52(8):5551-8.
- Giaume C., Kirchhoff F., Matute C., Reichenbach A. y Verkhratsky A. (2007). Glia: the fulcrum of brain diseases. *Cell Death Differ.* 14(7):1324-35.
- Gomez-Lazaro M., Bonekamp N.A., Galindo M.F., Jordán J. y Schrader M. (2008). 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) induces Drp1-dependent mitochondrial fragmentation in SH-SY5Y cells. *Free Radic. Biol. Med.* 44(11):1960-9.
- Gonzalez L. (2006). Muerte celular apoptótica inducida por manganeso en astrocitos de rata: Participación de la vía mitocondrial. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas, FCEN-UBA.
- Gonzalez L., Juknat A.A., Venosa A., Verrengia N. y Kotler M.L. (2008). Manganese activates the mitochondrial apoptotic pathway in rat astrocytes by modulating the expression of proteins of the Bcl-2 family. *Neurochemistry Int.* 53:408-415.
- Gonzalez F., Schug Z.T., Houtkooper R.H., MacKenzie E.D., Brooks D.G., Wanders R.J., Petit P.X., Vaz F.M. y Gottlieb E. (2008). Cardiolipin provides an essential activating platform for caspase-8 on mitochondria. *J. Cell Biol.* 183(4):681-96.
- Gorojod R. M., Alaimo A., Sapienza C. y Kotler M. L. (2009). Rol de la vía lisosomal en la muerte celular inducida por manganeso. *Medicina.* 69 (1): 242 (Resumen/ LV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología y XLII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental).
- Gorojod R. M., Alaimo A., Sapienza C. y Kotler M. L. (2010). Participación de la vía lisosomal- autofágica en la injuria celular inducida por manganeso. *Medicina.* 70(2):163 (Resumen/ LV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología y XLII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental).
- Griparic L., Kanazawa T. y Van der Bliek A.M. (2007). Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *J. Cell Biol.* 178(5):757-64.
- Guilarte T.R. (2010). Manganese and Parkinson's disease: a critical review and new findings. *Environ Health Perspect.* 118(8):1071-80.
- Guyton A. (1995). *Anatomía y Fisiología del Sistema Nervioso.* 2^{da} Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid. España. ISBN: 9789500608718.

- Hafeman D., Factor-Litvak P., Cheng Z., Van Geen A. y Ahsan H. (2007). Association between manganese exposure through drinking water and infant mortality in Bangladesh. *Environ. Health Perspect.* 115(7):1107-12.
- Hashimoto T., Kikkawa U. y Kamada S. (2011). Contribution of caspase(s) to the cell cycle regulation at mitotic phase. *PLoS One.* 6(3):e18449.
- Hill H.D. y Straka J.G. (1988). Protein determination using bicinchoninic acid in the presence of sulfhydryl reagents. *170(1):203-8.*
- Hirata Y. (2002). Manganese-induced apoptosis in PC12 cells. *Neurotoxicol Teratol.* 24(5):639-53.
- Ho C.C., Rideout H.J., Ribe E., Troy C.M. y Dauer W.T.(2009).The Parkinson disease protein leucine-rich repeat kinase 2 transduces death signals via Fas-associated protein with death domain and caspase-8 in a cellular model of neurodegeneration. *J. Neurosci.* 29(4):1011-6.
- Hom J. y Sheu S.S. (2009). Morphological dynamics of mitochondria - A special emphasis on cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.* 46(6):811-20.
- Huang H. y Manton K.G. (2004). The role of oxidative damage in mitochondria during aging: a review. *Front. Biosci.* 9: 1100-1117.
- Ishihara N., Fujita Y., Oka T. y Mihara K. (2006). Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J.* 25(13):2966-77.
- Jendrach M., Mai S., Pohl S., Vöth M. y Bereiter-Hahn J. (2008). Short- and long-term alterations of mitochondrial morphology, dynamics and mtDNA after transient oxidative stress. *8:293-304.*
- Jourdain A. y Martinou J.C. (2009). Mitochondrial outer-membrane permeabilization and remodelling in apoptosis. *Int. J. Biochem.Cell Biol.* 41(10):1884-9.
- Ju W.K., Misaka T., Kushnareva Y., Nakagomi S., Agarwal N., Kubo Y., Lipton S.A. y Bossy-Wetzel E. (2005). OPA1 expression in the normal rat retina and optic nerve. *J. Comp. Neurol.* 488(1):1-10.
- Ju W.K., Kim K.Y., Lindsey J.D., Angert M., Duong-Polk K.X., Scott R.T., Kim J.J., Kukhmazov I., Ellisman M.H., Perkins G.A. y Weinreb R.N. (2008). Intraocular pressure elevation induces mitochondrial fission and triggers OPA1 release in glaucomatous optic nerve. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49(11):4903-11.
- Juknat A.A., Mendez M., Quaglino A., Fameli C. Mena M. y Kotler, M. (2005) Melatonin prevents hydrogen peroxide-induced Bax expression in cultured rat astrocytes. *J. Pineal Res.* 38: 84-92.
- Kandel E.R., Schwartz J.H. y Jessell T. M. (2000). *Principles of Neural Science.* 4th Edition. The McGraw Hill Companies, Inc. New York. United States of America. ISBN: 0838577016.
- Karbowski M., Lee Y.J., Gaume B., Jeong S.Y., Frank S., Nechushtan A., Santel A., Fuller M., Smith C.L. y Youle R.J. (2002). Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J. Cell Biol.* 159(6):931-8.

- Kataoka T., Schröter M., Hahne M., Schneider P., Irmeler M., Thome M., Froelich C.J. y Tschopp J. (1998). FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J. Immunol.* 161(8):3936-42.
- Kerr J.F., Wyllie A.H. y Currie A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 26(4):239-57.
- Kim J., Moody J.P., Edgerly C.K., Bordiuk O.L., Cormier K., Smith K., Beal M.F. y Ferrante R.J. (2010). Mitochondrial loss, dysfunction and altered dynamics in Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 19(20):3919-35.
- Kirkinezos I.G., Hernandez D., Bradley W.G. y Moraes C.T. (2004). An ALS mouse model with a permeable blood-brain barrier benefits from systemic cyclosporine A treatment. *J. Neurochem.* 88(4):821-6.
- Klion F.M y Schaffner F. (1966). The ultrastructure of acidophilic "Councilman-like" bodies in the liver. *Am. J. Pathol.* 48(5):755-67.
- Korsmeyer S.J. (1992). Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood.* 80: 879-886.
- Koseki T., Inohara N., Chen S. y Nunez G. (1998). ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 5156-5160.
- Kotler M. L., Rodríguez C., Sainz R. M., Antolin I. y Menendez-Pelaez, A. (1998). Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J. Pineal Res.* 24: 83-89.
- Kroemer G., Galluzzi L. y Brenner C. (2008). Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol Rev* 87: 99-163.
- Kuznetsov A.V., Hermann M., Saks V., Hengster P. y Margreiter R. (2009). The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41(10):1928-39.
- Lackner L.L y Nunnari J. (2010). Small Molecule Inhibitors of Mitochondrial Division: Tools that Translate Basic Biological Research into Medicine. *Chem. Biol.* 17(6):578-83.
- Landes T. y Martinou J.C.(2011). Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the role of mitochondrial fission. *Biochim Biophys Acta.* 1813(4):540-5.
- Lavrik I.N., Golks A. y Krammer P.H. (2005). Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J. Clin. Invest.* 115(10):2665-72.
- Lee Y.J., Jeong S.Y., Karbowski M., Smith C.L. y Youle R.J. (2004). Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol. Biol. Cell.* 15(11):5001-11.
- Legros, F., Lombes, A., Frachon, P. y Rojo, M. (2002). Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol. Biol. Cell.* 13: 4343-4354.

- Leininger G.M., Backus C., Sastry A.M., Yi Y.B., Wang C.W. y Feldman E.L. (2006). Mitochondria in DRG neurons undergo hyperglycemic mediated injury through Bim, Bax and the fission protein Drp1. *Neurobiol Dis.* 23(1):11-22.
- Liao S.L., Ou Y.C., Chen S.Y., Chiang A.N. y Chen C.J. (2007). Induction of cyclooxygenase-2 expression by manganese in cultured astrocytes. *Neurochem Int.* 50(7-8):905-15.
- Liesa M., Palacín M. y Zorzano A. (2009). Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol. Res.* 89:799-845.
- Loucks F.A., Schroeder E.K., Zommer A.E., Hilger S., Kelsey N.A., Bouchard R.J., Blackstone C., Brewster J.L. y Linseman D.A. (2009). Caspases indirectly regulate cleavage of the mitochondrial fusion GTPase OPA1 in neurons undergoing apoptosis. *Brain Res.* 1250:63-74.
- Lutz A.K., Exner N., Fett M.E., Schlehe J.S., Kloos K., Lämmermann K., Brunner B., Kurz-Drexler A., Vogel F., Reichert A.S., Bouman L., Vogt-Weisenhorn D., Wurst W., Tatzelt J., Haass C. y Winklhofer K.F. (2009). Loss of parkin or PINK1 function increases Drp1-dependent mitochondrial fragmentation. *J. Biol. Chem.* 284(34):22938-51.
- Martín V., Herrera F., Carrera-Gonzalez P., García-Santos G., Antolín I., Rodríguez-Blanco J. y Rodríguez C. (2006). Intracellular signaling pathways involved in the cell growth inhibition of glioma cells by melatonin. *Cancer Res.* 66(2):1081-8.
- Martín V., Herrera F., García-Santos G., Antolín I., Rodríguez-Blanco J. y Rodríguez C. (2007). Signaling pathways involved in antioxidant control of glioma cell proliferation. *Free Radic Biol Med.* 42(11):1715-22.
- Martinou J.C y Youle R.J. (2006). Which came first, the cytochrome c release or the mitochondrial fission?. *Cell Death and Diff.* 13: 1291-1295.
- Mattson M.P. (2000). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1(2):120-9.
- Mattson M.P. y Kroemer G. (2003). Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. *Trends Mol. Med.* 9(5):196-205.
- Milatovic D., Yin Z., Gupta R.C., Sidoryk M., Albrecht J., Aschner J.L. y Aschner M. (2007). Manganese induces oxidative impairment in cultured rat astrocytes. *Toxicol. Sci.* 98: 198-205
- Men X., Wang H., Li M., Cai H., Xu S., Zhang W., Xu Y., Ye L., Yang W., Wollheim C.B., Lou J. (2009). Dynamin-related protein 1 mediates high glucose induced pancreatic beta cell apoptosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41(4):879-90.
- Menendez-Pelaez A., Poeggeler B., Reiter R.J., Barlow-Walden L., Pablos M.I. y Tan D.X.J *Cell Biochem.* (1993). Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *53(4):373-82.*
- Montgomery D.L. (1994). Astrocytes: Form, Functions, and Roles in Disease. *Vet. Pathol.* 31:145-167.

- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". *J. Immunol. Meth.* 65:55-63.
- Mosieniak G., Figiel I., Kaminska B. (1997). Cyclosporin A, an immunosuppressive drug, induces programmed cell death in rat C6 glioma cells by a mechanism that involves the AP-1 transcription factor. *J. Neurochem.* 68(3):1142-9.
- National Academy of Sciences (NAS). (2001). Dietary References Intakes dor Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Panel on Micronutrients, Subcommittees on Upper Reference Levels of Nutrients and of Interpretation and Use of Dietary Reference Intakes, and the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Available form: <http://www.nap.edu/openbook.php?isbn=0309072794>.
- Nisoli E. y Carruba M.O. (2006). Nitric oxide and mitochondrial biogenesis. *J. Cell Sci.* 119 (Pt 14):2855-62.
- Oberhammer F., Fritsch G., Schmied M., Pavelka M., Printz D., Purchio T., Lassmann H., Schulte-Hermann R.(1993).Condensation of the chromatin at the membrane of an apoptotic nucleus is not associated with activation of an endonuclease. *J. Cell Sci.* 104 (Pt 2):317-26.
- Olanow C.W. (2004). Manganese-induced parkinsonism and Parkinson's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1012:209-23
- Olichon A., Emorine L.J., Descoins E., Pelloquin L., Brichese L., Gas N., Guillou E., Delettre C., Valette A., Hamel C.P., Ducommun B., Lenaers G. y Belenguer P. (2002). The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett.* 523(1-3):171-6.
- Olichon A., Baricault L., Gas N., Guillou E., Valette A., Belenguer P. y Lenaers G. (2003). Loss of OPA1 perturbates the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278(10):7743-6.
- Olichon A., Elachouri G., Baricault L., Delettre C., Belenguer P. y Lenaers G. (2007). OPA1 alternate splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis. *Cell Death Differ.* 14(4):682-92.
- Otera H. y Mihara K. (2011). Discovery of the membrane receptor for mitochondrial fission GTPase Drp1. *Small Gtpases.* 2(3):167-172.
- Oubrahim H., Chock P.B., Stadtman E.R. (2002). Manganese (II) induces apoptotic cell death in NIH3T3 cells via a caspase-12-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 277(23):20135-8.
- Oubrahim H., Stadtman E.R., Chock P.B. (2001). Mitochondria play no roles in Mn (II)-induced apoptosis in HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98(17):9505-10.
- Page B., Page M. y Noel C. (1993). A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in vitro. *Int. J. Oncol.* 3:473-476.
- Palmer C.S., Osellame L.D., Stojanovski D., Ryan M.T. (2011). The regulation of mitochondrial morphology: Intricate mechanism and dynamic machinery. *Cell. Signal.* 23:1534-1545.

- Pan J., Zhao Y. X., Wang Z. Q., Jin L., Sun Z. K. y Chen S. D. (2007). Expression of FasL and its interaction with Fas are mediated by c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway in 6-OHDA-induced rat model of Parkinson disease. *Neurosci. Lett.* 428, 82-87.
- Park E.J. y Park K. (2010). Induction of oxidative stress and inflammatory cytokines by manganese chloride in cultured T98G cells, human brain glioblastoma cell line. *Toxicol. In Vitro.* 24(2):472-9.
- Park S.W., Kim K.Y., Lindsey J.D., Dai Y., Heo H., Nguyen D.H., Ellisman M.H., Weinreb R.N. y Ju W.K. (2011). A selective inhibitor of drp1, mdivi-1, increases retinal ganglion cell survival in acute ischemic mouse retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52(5):2837-43.
- Parkinson J. (1817). An essay on the shaking palsy. Available: <http://www.gutenberg.org/files/23777/23777-h/23777-h.htm>.
- Paxinos G. y Watson C. (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Inc. San Diego, California, 92101-4495, USA.
- Pop C. y Salvesen G. (2009). Human Caspases: Activation, Specificity, and Regulation. *J. Biol. Chem.* 284(33):21777.
- Prabhakaran K., Chapman G.D. y Gunasekar P.G. (2009). BNIP3 up-regulation and mitochondrial dysfunction in manganese-induced neurotoxicity. *Neurotoxicology.* 30(3):414-22.
- Prasad K. N. (1983). Use of cultures of neuroblastoma and glioma as a model system to study the heavy metal-induced neurotoxicity. In *In Vitro Toxicity Testing of Environmental Agents, Current and Future Possibilities. Part A.* (A. R. Kolber, T. J. Hughes, North Atlantic Treaty Organization, T. K. Wong, and L. D. Grant), 1st ed., 421-472. Plenum Publishing Corporation, New York.
- Quintanar L., Montiel T., Márquez M., González A., Massieu L. (2011). Calpain activation is involved in acute manganese neurotoxicity in the rat striatum in vivo. *Exp Neurol.* Article in press.
- Rabin O., Hegedus L., Bourre J.M. y Smith Q.R. (1993). Rapid brain uptake of manganese (II) across the blood brain barrier. *J. Neurochem.* 61: 509-517.
- Rama Rao K.V. y Norenberg M.D. (2004). Manganese induces the mitochondrial permeability transition in culture astrocytes. *J. Biol. Chem.* 279(31):32333-8.
- Rama Rao K.V., Reddy P.V., Hazell A.S. y Norenberg M.D. (2007). Manganese induces the cell swelling in cultured astrocytes. *Neurotoxicology.* 28(4):807-12.
- Reaney S. H. y Smith D. R. (2005). Manganese oxidation state mediates toxicity in PC12 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 205: 271-281.
- Reddy P.H., Reddy T.P., Manczak M., Calkins M.J., Shirendeb U. y Mao P. (2010). Dynamin-related protein 1 and mitochondrial fragmentation in neurodegenerative diseases. *Brain Res. Rev.* 67 (1-2):103-8.
- Reed J.C. (2001). Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends Mol. Med.* 7(7):314-9.
- Reiter R. J. (1991). Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Rev.* 12: 151-180.

- Roche M., Rondeau P., Singh N.R., Tarnus E., Bourdon E. (2008). The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.* 582(13):1783-7.
- Rodier J. (1955). Manganese poisoning in Moroccan miners. *Br. J. Ind. Med.* 12(1):21-35.
- Romijn H.J. (1988). Development and advantages of serum-free, chemically defined nutrient media for culturing of nerve tissue. *Biol. Cell.* 63(3):263-8.
- Roth J.A. (2009). Are there common biochemical and molecular mechanisms controlling manganese and parkinsonism?. *Neuromolecular Med.* 11(4):281-96.
- Rowitch, D.H. y Kriegstein, A.R. (2010). Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature.* 468(7321):214-22.
- Saas P., Walker P.R., Hahne M., Quiquerez A.L., Schnuriger V., Perrin G., French L., Van Meir E.G., de Tribolet N., Tschopp J. y Dietrich P.Y. (1997). Fas ligand expression by astrocytoma in vivo: maintaining immune privilege in the brain?. *J. Clin. Invest.* 99(6):1173-8.
- Sahawneh M.A., Ricart K.C., Roberts B.R., Bomben V.C., Basso M., Ye Y., Sahawneh J., Franco M.C., Beckman J.S. y Estévez A.G. *J. Biol. Chem.* (2010). Cu,Zn-superoxide dismutase increases toxicity of mutant and zinc-deficient superoxide dismutase by enhancing protein stability. 285(44):33885-97.
- Sainz R. M., Mayo J. C., Rodriguez C., Tan D. X., Lopez-Burillo, S. y Reiter R. J. (2003). Melatonin and cell death: Differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 1407–1426.
- Santos R.X., Correia S.C., Wang X., Perry G., Smith M.A., Moreira P.I. y Zhu X. (2010). A synergistic dysfunction of mitochondrial fission/fusion dynamics and mitophagy in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 20(2):S401-12.
- Sapienza C. (2011). Efectos antiproliferativos de la melatonina en células de glioma C6. Implicancia de la muerte celular apoptótica. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas, FCEN-UBA.
- Satoh M., Hamamoto T., Seo N., Kagawa Y. y Endo H. (2003). Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300(2):482-93.
- Scaffidi C., Fulda S., Srivasan A., Friesen C., Li F., Tomaselli K.J., Debatin K.M., Krammer P.H. y Peter M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17:1675-1687.
- Schrantz, N., Blanchard, D. A., Mitenne, F., Auffredou, M. T., Vazquez, A., y Leca, G. (1999). Manganese induces apoptosis of human B cells: caspase-dependent cell death blocked by bcl-2. *Cell. Death. Differ.* 6: 445-453.
- Schug Z.T., Gonzalez F., Houtkooper R.H., Vaz F.M., Gottlieb E. (2011). BID is cleaved by caspase-8 within a native complex on the mitochondrial membrane. *Cell Death Differ.* 18(3):538-48.
- Scorrano L. (2008). Caspase-8 goes cardiolipin: a new platform to provide mitochondria with microdomains of apoptotic signals?. *J. Cell Biol.* 4: 579-581.

- Scorrano L. (2009). Opening the doors to cytochrome c: changes in mitochondrial shape and apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 41(10):1875-83.
- Sheridan C., Delivani P., Cullen S.P. y Martin S.J. (2008). Bax- or Bak-induced mitochondrial fission can be uncoupled from cytochrome C release. *Mol. Cell.* 31:570-585.
- Sheridan C. y Martin S.J. (2010). Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis. *Mitochondrion.* 10(6):640-8.
- Shibata S., Maedab M., Furutab K., Suzukic M., Oh-Hashia K., Kiuchia K. y Hirata Y. (2009). Neuroprotective effects of (arylthio) cyclopentenone derivatives on manganese-induced apoptosis in pc12 cells. *Brain Res.* 218-225.
- Simola N., Fenu S., Baraldi P.G., Tabrizi M.A., Morelli M. (2008). Blockade of globus pallidus adenosine A(2A) receptors displays antiparkinsonian activity in 6-hydroxydopamine-lesioned rats treated with D(1) or D(2) dopamine receptor agonists. *Synapse.* 62(5):345-51.
- Skulachev V.P. (2001). Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power transmitting cables. *Trends Biochem. Sci.* 26(1):23-9.
- Smith K. (2010). Neuroscience: Settling the great glia debate. *Nature.* 468(7321):160-2.
- Slee, E.A., O'Connor, D.J. y Lu, X. (2004). To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene* 23: 2809-2818.
- Song Z., Chen H., Fiket M., Alexander C., Chan D.C. (2007). OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *Cell Biol.* 178(5):749-55.
- Su, B., Wang, X., Zheng, L., Perry, G., Smith, M.A. y Zhu, X. (2010). Abnormal mitochondrial dynamics and neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1802: 135-142.
- Suzuki H., Wada O. y Inoue K. (1983). Role of brain lysosomes in the development of manganese toxicity in mice. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 71: 422-429.
- Suzuki T. y Tsukamoto I. (2005). Manganese-induced apoptosis in hepatocytes after partial hepatectomy. *Eur. J. Pharmacol.* 525(1-3):48-53.
- Tait S.W. y Green D.R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11(9):621-32.
- Takeda A. (2003). Manganese action in brain function. *Brain Res. Rev.* 41: 79-87.
- Tan AR, Cai AY, Dehesi S, Rintoul GL. (2011). Elevated intracellular calcium causes distinct mitochondrial remodelling and calcineurin-dependent fission in astrocytes. *Cell Calcium.* 49(2):108-14.
- Tamm C., Sabri F. y Ceccatelli S. (2008). Mitochondrial-mediated apoptosis in neural stem cells exposed to manganese. *Toxicol. Sci.* 101: 310-320.

- Tatsuta T. y Langer T. (2008). Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing. *EMBO J.* 27(2):306-14.
- Taylor R.C., Cullen S.P. y Martin S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 231-41.
- Tholey G., Ledig M., Mandel P., Sargentini L., Frivold A.H., Leroy M., Grippo A.A. y Wedler F.C. (1988). Concentrations of physiologically important metal ions in glial cells cultured from chick cerebral cortex. *Neurochem. Res.* 12: 45-50.
- Thornberry N.A. y Lazebnik Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science.* 281(5381):1312-6.
- Tiffany-Castiglioni E., Garcia D.M., Wu J.N., Zmudzki J. y Bratton G.R. (1988). Effects of lead on viability and intracellular metal content of C6 rat glioma cells. *J. Toxicol. Environ. Health.* 23(2):267-79.
- Tiffany-Castiglioni E. y Qian Y. (2001). Astroglia as Metal Depots: Molecular Mechanism for Metal Accumulation, Storage and Release. *NeuroToxicology.* 22:577-592.
- Tjalve H y Henriksson J. (1999). Uptake of metals in the brain via olfactory pathways. *Neurotoxicology.* 20:181-95.
- Trajković V., Badovinac V., Janković V. y Mostarica Stojković M. (1999). Cyclosporin A inhibits activation of inducible nitric oxide synthase in C6 glioma cell line. *Brain Res.* 816(1):92-8.
- Utz P.J. y Anderson P. (2000). Life and death decisions: regulation of apoptosis by proteolysis of signaling molecules. *Cell Death Differ.* 7: 589-602.
- Vousden K.H. y Lane D.P. (2007). p53 in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8(4):275-83.
- Waldmeier P.C., Zimmermann K., Qian T., Tintelnot-Blomley M., Lemasters J.J. (2003). Cyclophilin D as a drug target. *Curr Med Chem.* 10(16):1485-506.
- Wang X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 15(22):2922-33.
- Wang X., Su B., Lee H.G., Li X., Perry G., Smith M.A. y Zhu X. (2009). Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 29(28):9090-103.
- Wasilewski M. y Scorrano L. (2009). The changing shape of mitochondrial apoptosis. *Trends Endocrinol. Metab.* 20(6):287-94.
- Wätjen W. y Beyersmann D. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress. (2004). *Biometals.* 17(1):65-78.
- Walz W. (2000). Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem. Int.* 36(4-5):291-300.
- Wedler F.C. y Denman R.B. (1984). Glutamine synthetase: the major Mn(II) enzyme in mammalian brain. *Curr. Top. Cell regul.* 24:153-69.

- Wedler F.C., Ley B.W. y Grippo A.A. (1989). Manganese(II) dynamics and distribution in glial cells cultured from chick cerebral cortex. *Neurochem. Res.* 14(11):1129-35.
- Wei Y., Fan T. y Yu M. (2008). Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 40(4):278-88.
- Westermann B. (2001). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11(12):872-84.
- Wu S., Zhou F., Zhang Z. y Xing D. (2011). Mitochondrial oxidative stress causes mitochondrial fragmentation via differential modulation of mitochondrial fission-fusion proteins. *FEBS J.* 278(6):941-54.
- Xu B., Xu Z.F., Deng Y. (2009). Effect of manganese exposure on intracellular Ca²⁺ homeostasis and expression of NMDA receptor subunits in primary cultured neurons. *Neurotoxicology.* 30(6):941-9.
- Yamaguchi R., Lartigue L., Perkins G., Scott R.T., Dixit A., Kushnareva Y., Kuwana T., Ellisman M.H. y Newmeyer D.D. (2008). Opa1-mediated cristae opening is Bax/Bak and BH3 dependent, required for apoptosis, and independent of Bak oligomerization. *Mol Cell.* 31(4):557-69.
- Yan C.Y., Ferrari G. y Greene L.A. (1995). N-acetylcysteine-promoted survival of PC12 cells is glutathione-independent but transcription-dependent. *J. Biol. Chem.* 270(45):26827-32.
- Yin Z., Aschner J.L., dos Santos A.P. y Aschner M. (2008). Mitochondrial-dependent manganese neurotoxicity in rat primary astrocyte cultures. *Brain Res.* 1203: 1-11.
- Yoon H., Lee G.H., Kim D.S., Kim K.W., Kim H.R. y Chae H.J.(2011).The effects of 3, 4 or 5 amino salicylic acids on manganese-induced neuronal death: ER stress and mitochondrial complexes. *Toxicol. In Vitro.* 25(7):1259-68.
- Zhao P., Zhong W., Ying X., Yuan Z., Fu J. y Zhou Z. (2008).Manganese chloride-induced G0/G1 and S phase arrest in A549 cells. *Toxicology.* 250(1):39-46.
- Zhao F., Cai T., Liu M., Zheng G., Luo W. y Chen J. (2009). Manganese induces dopaminergic neurodegeneration via microglial activation in a rat model of manganese. *Toxicol. Sci.* 107(1):156-64.
- Zhang S., Zhou Z. y Fu J. (2003). Effect of manganese chloride exposure on liver and brain mitochondria function in rats. *Environ. Res.* 93(2):149-57.
- Zhang P., Wong T.A., Lokuta K.M., Turner D.E., Vujisic K. y Liu B. (2009). Microglia enhances manganese chloride-induced dopaminergic neurodegeneration: Role of free radical generation. *Exp. Neurol.* 217: 219-230.
- Zhu J., Yang Y. y Wu J. (2007). Bcl-2 cleavages at two adjacent sites by different caspases promote cisplatin-induced apoptosis. *Cell Research.* 17:441-448.
- Zupanska A., Dziembowska M., Ellert-Miklaszewska A., Gaweda-Walerych K. y Kaminska B. (2005). Cyclosporine A induces growth arrest or programmed cell death of human glioma cells. *Neurochem. Int.* 47(6):430-41.