



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA Y FISICOQUÍMICA
CÁTEDRA DE QUÍMICA GENERAL E INORGÁNICA

TESIS DE DOCTORADO

Estudio de los mecanismos de muerte celular y de protección endógena inducidos por la toxicidad aguda del cobre

Christian Martín Saporito Magriñá

Directora: Prof. Dra. Marisa Gabriela Repetto

2017

La vida es agradable. La muerte es tranquila. Lo problemático es la transición.

Isaac Asimov

Agradecimientos

A la Prof. Dra. Marisa G. Repetto, por todo su trabajo y dedicación en la dirección de mi tesis.

Al Prof. Dr. Drs. h.c. Christoph Borner, por su supervisión y apoyo durante mis estadías en Alemania.

Al Prof. em. Dr. Alberto Boveris por su contribución a mi trabajo mediante productivas charlas y discusiones.

A mis compañeros de laboratorio del grupo de la Prof. Dra. Repetto, especialmente a Rosario Musacco Sebio por las horas de trabajo compartidas.

A mis compañeros de laboratorio del grupo del Prof. Dr. Borner en Alemania, por su buena disposición en las horas de trabajo y los momentos compartidos.

A Lucas Kook por su colaboración con mis experimentos, en el marco de su pasantía en el laboratorio del Prof. Dr. Borner.

Al Dr. Geoffroy Andrieux y la Dra. Melanie Börries por el aporte técnico en la obtención de los resultados de micromatrices de ADN.

Al Prof. Dr. Radi, de la Universidad de la Republica (Uruguay) y a todo su grupo, especialmente a Carolina Prolo y Natalia Ríos, por la recepción en su laboratorio y apoyo en la realización de experimentos para el estudio del estrés oxidativo en cultivos celulares.

A la Secretaria de Relaciones Internacionales de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (UBA) por su apoyo y gestión en la movilidad para mis estadías en el exterior.

A los grupos de trabajo del Prof. Horacio Torti y Prof. Dr. Martin Desimone (Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA) que colaboraron para las determinaciones de absorción atómica.

A la Dra. Alicia Damiano y Dr. Mauricio Castro Parodi por el soporte técnico en las determinaciones electroforéticas realizadas en la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA).

Al Dr. Manuel Rodríguez de la Facultad de Medicina (UBA) por su aporte en mi trabajo con los modelos animales.

A todo el equipo de la Maestría Internacional de Ciencias Biomédicas por su aporte a mi formación de posgrado.

A la Prof. Dra. Susana Llesuy y a todos mis compañeros de la Cátedra de Química General e Inorgánica.

A la Cátedra de Fisicoquímica – IBIMOL por permitirme utilizar su equipamiento para algunos de mis experimentos.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, donde realicé mi doctorado.

A la Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD), por el financiamiento para mis estadías en Alemania.

A la Universidad de Buenos Aires y al Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el financiamiento de mi trabajo a través de los proyectos y becas.

A mis abuelos, mis padres, mis tíos, mi hermana y Rosario.

Los resultados presentados en esta tesis están incluidos en los siguientes trabajos:

- Artículos publicados en revistas internacionales con referato.

Saporito-Magriñá C, Musacco-Sebio R, Acosta JM, Bajicoff S, Paredes-Fleitas P; Boveris A, Repetto M. (2017) Rat liver mitochondrial dysfunction by addition of copper(II) or iron(III) ions. *Journal of Inorganic Biochemistry* 166: 6-11.

Saporito-Magriñá C, Musacco Sebio R, Acosta JM, Bajicoff S,, Paredes-Fleitas P; Reynoso S, Boveris A, Repetto M. (2017) Copper(II) and iron(III) ions inhibit respiration and increase free radical mediated phospholipid peroxidation in rat liver mitochondria: effect of antioxidants. *Journal of Inorganic Biochemistry* 172: 94-99.

- Resúmenes de trabajos presentados en congresos publicados en revistas con referato

Musacco Sebio R, **Saporito Magriñá C**, Acosta JM, Bajicoff S, Paredes Fleitas P, Boveris A, Repetto M. (2015) Disfunción mitocondrial y daño oxidativo por sobrecarga de cobre en mitocondrias aisladas de hígado de rata. *Medicina* 75(2): 153.

Saporito Magriñá C, Borner C, Repetto M. Mecanismo de muerte celular inducida por cobre en hepatocitos primarios y fibroblastos embrionarios murinos. (2015) *Medicina* 75(2): 153.

Musacco Sebio R, **Saporito Magriñá C**, Acosta JM, Bajicoff S, Paredes Fleitas P; Boveris A, Repetto M. (2015) Disfunción mitocondrial y daño oxidativo por sobrecarga de cobre en mitocondrias aisladas de hígado de rata. *Medicina* 75(2): 153.

Musacco Sebio R, **Saporito Magriñá C**, Acosta JM, Bajicoff S, Paredes Fleitas P, Reynoso S, Boveris A, Repetto M. (2016) Copper and iron toxicity in rat liver isolated mitochondria: oxidative stress, antioxidant protection and redox homeostasis. *Medicina* 78(1): 244.

Saporito Magriñá C, Borner C, Repetto M. (2016) The role of glutathione as protective molecule in copper overload. *Medicina* 78(1): 244.

Abreviaturas

$^1\text{O}_2$	oxígeno singulete
7ADD	7-aminoactinomicina-D
ADN	ácido desoxirribonucleico
Ani	anisomicina
ATOX1	chaperona <i>Antioxidant 1</i>
ATP	trifosfato de adenosina
ATP7A	ATPasa transportadora de cobre 7A
ATP7B	ATPasa transportadora de cobre 7B
BCA	ácido bicinconínico
BHA	butilhidroxianisol
BHT	butilhidroxitolueno
BSA	seralbúmina bovina
BSO	butionina sulfoxinina
c.p.s.	cuentas por segundo
CCCP	carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona
CHX	cicloheximida
cm	centímetros
-CO	grupos carbonilo
CP	ceruloplasmina
CTE	cadena de transporte de electrones
Ctr1	proteína transportadora de Cu^{1+}
Cys	cisteína
D.O.	densidad óptica
DCFH	diclorofluoresceína
DCFH-DA	diacetato de diclorofluoresceína
DHE	dihidroetidina
DL_{50}	dosis letal 50
DNP	2,4-dinitrofenol
DNPH	dinitrofenilhidrazina
DPI	difenil-iodonio
DTM	dominio de transmembrana
DTNB	ácido (5,5'-ditio-bis)-2-nitrobenzoico o reactivo de Ellman

DUM	dominio de unión al metal
E°	potencial estándar de reducción
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	ácido etilenglicoltetraacético
EIM	espacio intermembrana
E°'	potencial estándar de reducción en condiciones biológicas
FACS	citometría de flujo activada por fluorescencia
FC	<i>fold change</i> (magnitud del cambio)
FCCP	carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona
FITC	isotiocianato de fluoresceína
GCL	γ-glutamylcisteinilligasa
GPx	glutación peroxidasa
GSH	glutación reducido
GSSG	glutación oxidado
GST	glutación S-transferasa
h	horas
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
HEPES	ácido N-(2-hidroxietyl)piperazina-N'-propanosulfónico
HO•	radical hidroxilo
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (peroxidasa de rábano picante)
HSP	<i>heat shock protein</i> (proteína de choque térmico)
HSR	<i>heat shock response</i> (respuesta al choque térmico)
i.p.	intraperitoneal
kDa	kilodalton
kg	kilogramo
M	molar
mA	miliamperio
MDA	malondialdehído
MDT	<i>multidrug resistant proteins</i>
mg	miligramos
min	minutos
mm	milímetros
mM	milimolar

MT	metalotioneína
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
mtUPR	<i>mitochondrial unfolded protein response</i> (respuesta al mal plegamiento de proteínas mitocondrial)
NAC	N-acetilcisteína
NAD(P)H	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nm	nanómetro
nmol	nanomol
NO	óxido nítrico
NOX	NADPH oxidasa
NS	no significativo
$O_2^{\bullet-}$	anión superóxido
$ONOO^-$	anión peroxinitrito
p/s	penicilina/streptomicina
pb	pares de bases
PBS	<i>buffer phosphate solution</i> (buffer fosfato)
pmol	picomol
Prx	peroxirredoxinas
Q	ubiquinona
Q^{\bullet}	ubisemiquinona
QH_2	ubiquinol
QL	quimioluminiscencia
R^{\bullet}	radical alquilo
r.p.m.	revoluciones por minutos
R=O	cetonas
RE	retículo endoplásmico
RHO	aldehídos
RO^{\bullet}	radical alcoxilo
ROO^{\bullet}	radical (lipo)peroxilo
ROOH	hidroperóxidos orgánicos
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (especies reactivas del oxígeno)
Rot	rotenona
s	segundos

-SH	grupos tioles
SOD	superóxido dismutasa
TBARS	sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
tBOOH	hidroperóxido de ter-butilo
UPR	<i>unfolded protein response</i> (respuesta al mal plegamiento de proteínas)
μM	micromolar

Glosario de genes

ATF4	Factor de transcripción activador 4 (<i>Activating Transcription Factor 4</i>)
BAG#	Atanogen # asociado a BCL2 (BCL2 Associated Athanogene #)
CAT	Catalasa (<i>Catalase</i>)
CCT#	Subunidad # de la chaperonina citoplasmática eucariota (<i>Chaperonin containing TCP1, subunit #</i>)
CLPP	Subunidad proteolítica de la peptidasa de la matriz mitocondrial caseinolítica (<i>Caseinolytic Mitochondrial Matrix Peptidase Proteolytic Subunit</i>)
CRYAA	Cristalina alfa A (<i>Crystallin Alpha A</i>)
CRYAB	Cristalina alfa B (<i>Crystallin Alpha B</i>)
CXCL8	Ligando quimiocina 8 de motivo C-X-C (C-X-C Motif Chemokine Ligand 8)
DDIT#	Transcripto # inducible por daño al ADN (<i>DNA Damage Inducible Transcript #</i>)
DNAJA#	Miembro A # de la familia (Hsp40) de proteínas de choque térmico DNAJ (<i>DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member A #</i>)
DNAJB#	Miembro B # de la familia (Hsp40) de proteínas de choque térmico DNAJ (<i>DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member B #</i>)
DNAJC#	Miembro C # de la familia (Hsp40) de proteínas de choque térmico DNAJ (<i>DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member C #</i>)
EDEM1	Proteína 1 tipo alfa-manosidasa estimuladora de la degradación del ER (<i>ER Degradation Enhancing Alpha-Mannosidase Like Protein 1</i>)
EIF2A	Factor de iniciación de la traducción eucariota 2 alfa (<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 2A</i>)
EIF2AK3	Quinasa 3 del factor de iniciación de la traducción eucariota 2 alfa (<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 3</i>)
ENDO G	Endonucleasa G (<i>Endonuclease G</i>)
ERO1A	Oxidoreductasa 1 alfa del retículo endoplasmico (<i>Endoplasmic Reticulum Oxidoreductase 1 Alpha</i>)
FTH1	Cadena pesada de la ferritina 1 (<i>Ferritin Heavy Chain 1</i>)
FTL	Cadena liviana de la ferritina (<i>Ferritin Light Chain</i>)
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (<i>Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase</i>)

GABARAPL2	Proteína tipo # asociada al receptor de GABA tipo A (<i>GABA Type A Receptor Associated Protein Like #</i>)
GCLC	Subunidad catalítica de la glutamato-cisteína ligasa (<i>Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic Subunit</i>)
GCLM	Subunidad moduladora de la glutamato-cisteína ligasa (<i>Glutamate-Cysteine Ligase Modifier Subunit</i>)
GPX#	Glutación peroxidasa # (<i>Glutathione Peroxidase #</i>)
GSR	Reductasa de disulfuros de glutación (<i>Glutathione-Disulfide Reductase</i>)
GST#	Glutathion S-transferasa # (<i>Glutathione S-Transferase #</i>)
HMOX1	Hemo oxigenasa 1 (<i>Heme Oxygenase 1</i>)
HSF#	Factor de transcripción de choque térmico (<i>Heat Shock Transcription Factor #</i>)
HSFX2	Factor de transcripción de choque térmico, ligado al X 2 (<i>Heat Shock Transcription Factor, X-Linked 2</i>)
HSFY#	Factor de transcripción de choque térmico, ligado al Y # (<i>Heat Shock Transcription Factor, Y-Linked #</i>)
HSFY1P1	Factor de transcripción de choque térmico, ligado al Y 1 pseudogen 1 (<i>Heat Shock Transcription Factor, Y-Linked 1 Pseudogene 1</i>)
HSP90AA1	Miembro 1 de clase A de la familia alfa de proteínas de choque térmico 90 (<i>Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class A Member 1</i>)
HSP90AB1	Miembro 1 de clase B de la familia alfa de proteínas de choque térmico 90 (<i>Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class B Member 1</i>)
HSP90B1	Miembro 1 de la familia beta de proteínas de choque térmico 90 (<i>Heat Shock Protein 90 Beta Family Member 1</i>)
HSPA#	Miembro # de la familia A (Hsp70) de proteínas de choque térmico (<i>Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member #</i>)
HSPB#	Miembro 1 de la familia B (pequeñas) de proteínas de choque térmico (<i>Heat Shock Protein Family B (Small) Member 1</i>)
HSPD1	Miembro 1 de la familia D (Hsp60) de proteínas de choque térmico (<i>Heat Shock Protein Family D (Hsp60) Member 1</i>)
HSPE2	Miembro 1 de la familia E (Hsp10) de proteínas de choque térmico (<i>Heat Shock Protein Family E (Hsp10) Member 1</i>)
HSPH1	Miembro 1 de la familia H (Hsp110) de proteínas de choque térmico (<i>Heat Shock Protein Family H (Hsp110) Member 1</i>)
HYOU1	Regulada por hipoxia 1 (<i>Hypoxia up-regulated 1</i>)
IDH1	Isocitrato deshidrogenasa (NADP(+)) 1 (<i>Isocitrate Dehydrogenase (NADP(+)) 1</i>)
IL#	Interleuquina # (<i>Interleukin #</i>)

IL1RN	Antagonista del receptor de interleuquina 1 (<i>Interleukin 1 Receptor Antagonist</i>)
MAP1LC3A	Cadena liviana 3 alfa de la proteína 1 asociada a microtubulos (<i>Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3 Alpha</i>)
MAP1LC3B	Cadena liviana 3 beta de la proteína 1 asociada a microtubulos (<i>Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3 Beta</i>)
MAP1LC3B2	Cadena liviana 3 beta 2 de la proteína 1 asociada a microtubulos (<i>Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3 Beta 2</i>)
MAP1LC3C	Cadena liviana 3 gama de la proteína 1 asociada a microtubulos (<i>Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3 Gamma</i>)
ME1	Enzima malica 1 (<i>Malic Enzyme 1</i>)
MT1#	Metalotioneina 1# (<i>Metallothionein 1#</i>)
MT2A	Metalotioneina 2A (<i>Metallothionein 2A</i>)
MT3	Metalotioneina 3 (<i>Metallothionein 3</i>)
MT4	Metalotioneina 4 (<i>Metallothionein 4</i>)
NDUFB2	Subunidad B2 de la NADH:Ubiquinona oxidoreductasa (<i>NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Subunit B2</i>)
NQO1	NAD(P)H quinona deshidrogenasa 1 (<i>NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1</i>)
ODF1	Fibra densa externa de la cola de los espermatozoides 1 (<i>Outer Dense Fiber Of Sperm Tails 1</i>)
PGD	Fosfogluconato deshidrogenasa (<i>Phosphogluconate Dehydrogenase</i>)
PMPCB	Subunidad beta procesadora mitocondrial (<i>Mitochondrial Processing Beta Subunit</i>)
PPP1R15A	Subunidad reguladora 15A de la fosfatasa de proteínas 1 (<i>Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 15A</i>)
PRDX1	Peroxisredoxina # (<i>Peroxiredoxin #</i>)
RPS27A	Proteína ribosomal S27a (<i>Ribosomal Protein S27a</i>)
SLC7A11	Miembro 11 de la familia 7 de carriers de solutos (<i>Solute Carrier Family 7 Member 11</i>)
SOD#	Superoxido dismutasa # (<i>Superoxide dismutase #</i>)
SRXN1	Sulfirredoxina 1 (<i>Sulfiredoxin 1</i>)
TCP1	Complejo T 1 (<i>T-Complex 1</i>)
TIMM17A	Translocasa de la membrana interna mitocondrial 17A (<i>Translocase Of Inner Mitochondrial Membrane 17A</i>)
TRAP1	Proteína 1 asociada al receptor de TNF (<i>TNF Receptor Associated Protein 1</i>)

TRIB3	Pseudoquinasa Tribbles 3 (<i>Tribbles Pseudokinase 3</i>)
TXN	Tiorredoxina (<i>Thioredoxin</i>)
TXNRD1	Tiorredoxina reductasa 1 (<i>Thioredoxin Reductase 1</i>)
UBA52	Producto de fusion 1 del residuo 52 de la proteína ribosomal-ubiquitina A (<i>Ubiquitin A-52 Residue Ribosomal Protein Fusion Product 1</i>)
UBB	Ubiquitina B (<i>Ubiquitin B</i>)
UBC	Ubiquitina C (<i>Ubiquitin C</i>)
UGT1A#	Miembro A# de la familia 1 de UDP glucuronosiltransferasas (<i>UDP Glucuronosyltransferase Family 1 Member A#</i>)
XBP1	Proteína 1 de union a la caja X (<i>X-Box Binding Protein 1</i>)
YME1L1	ATPasa tipo YME1 1 (<i>YME1 Like 1 ATPase</i>)

Índice de Contenidos

Introducción	1
1. Cobre: función biológica, metabolismo y toxicidad	2
1.1. Generalidades	2
1.2. Homeostasis intracelular del cobre	3
1.3. Comparación del contenido de cobre en órganos humanos y de ratas	9
1.4. Patologías asociadas al metabolismo del cobre	9
1.4.1. Enfermedad de Menkes	9
1.4.2. Enfermedad de Wilson	9
1.4.3. Participación del cobre en las enfermedades neurodegenerativas	12
2. Metabolismo del oxígeno, radicales libres y estrés oxidativo.....	13
2.1. Oxígeno y radicales libres	13
2.2. Concepto de estrés oxidativo.....	14
2.3. Mecanismos de producción de especies reactivas del oxígeno	16
2.4. Parámetros alterados relacionados al estrés oxidativo en pacientes con enfermedad de Wilson.....	19
2.5. Respuesta antioxidante mediada por Nrf2	19
3. Potenciales blancos intracelulares en la toxicidad del cobre	20
3.1. Mitocondria: Estructura y función	20
3.2. Apoptosis	26
3.3. Proteostasis	28
3.3.1. Respuesta de choque térmico	30
3.3.2. Estrés del retículo endoplásmico	31
3.3.3. Estrés en el plegamiento proteico mitocondrial.....	32
3.3.4. Ubiquitinación y degradación de proteínas por el proteasoma.....	34
3.4. Autofagia	35
Hipótesis.....	37
Objetivo	39
Materiales y métodos.....	41
1. Modelos experimentales <i>in vivo</i>	42
1.1. Sobrecarga aguda de cobre.....	42
1.2. Preparación de las muestras	42
1.2.1. Preparación de homogeneizados	42

1.2.2. Aislamiento de mitocondrias	43
2. Modelos experimentales <i>in vitro</i>	44
2.1. Toxicidad del Cu y protección antioxidante en mitocondrias aisladas de hígado de rata	44
2.2. Toxicidad del Cu en diferentes cultivos celulares	44
2.2.1. Lisado celular	45
3. Determinaciones de estrés y daño oxidativo	45
3.1. Determinación de quimioluminiscencia de órgano <i>in vivo</i>	45
3.2. Oxidación de proteínas medida como contenido de carbonilos	46
3.3. Oxidación de fosfolípidos medida como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)	47
3.4. Antioxidantes endógenos no enzimáticos	48
4. Determinación de tioles totales y tioles de bajo peso molecular	48
5. Producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) detectada mediante sondas fluorescentes.....	49
5.1. Oxidación de la diclorofluoresceína (DCFH) evaluada por citometría de flujo (FACS).....	49
5.2. Producción de H ₂ O ₂ detectada por la sonda Amplex Red.....	50
5.3. Oxidación de la dihidroetidina (DHE) evaluada por citometría de flujo (FACS).....	51
6. Determinaciones de la función mitocondrial.....	51
6.1. Consumo de oxígeno	51
6.2. Actividad de los complejos respiratorios mitocondriales I y II	53
6.3. Respiración mitocondrial en cultivos celulares en tiempo real	54
7. Viabilidad celular basada en la reacción del MTT	55
8. Citometría de flujo.....	55
9. Micromatrices de ADN (chips de ADN)	57
10. Electroforesis SDS-PAGE.....	58
11. Actividad de caspasa 3	59
12. Determinación de los niveles de Cu.....	59
12.1. En muestras de hígado	59
12.2. En lisados celulares.....	60
13. Determinación de la concentración de proteínas	60
13.1. Método de Lowry	60

13.2. Método de BCA	61
13.3. Método de Bradford.....	61
14. Agregados proteicos por turbidimetría	62
15. Análisis estadístico.....	62
16. Reactivos químicos	62
Resultados y discusión.....	63
Capítulo 1: Toxicidad del cobre: estrés oxidativo en hígado y función mitocondrial	64
1.1. Toxicidad del cobre en ratas.....	65
1.1.1. Curva de supervivencia luego de una intoxicación aguda con cobre	65
1.1.2. Acumulación hepática de cobre	66
1.1.3. Daño oxidativo y disminución del contenido de glutatión generados por la sobrecarga de cobre en hígado	67
1.1.4. Efectos de la sobrecarga de iones Cu a nivel intracelular. Estudios en mitocondrias de hígado	68
1.2. Interacción del cobre con estructuras biológicas y especies reactivas del oxígeno generadas en mitocondrias aisladas. Estudios <i>in vitro</i>	71
1.2.1. Estudio de la interacción directa del cobre con biomoléculas en mitocondrias aisladas	72
1.2.2. Estudio de la interacción del cobre con las especies reactivas del oxígeno	76
1.3. Discusión	80
Capítulo 2: Sobrecarga de cobre en células: estrés oxidativo y efecto protector del glutatión.....	90
2.1. Efecto del estrés oxidativo generado por la sobrecarga de cobre sobre la respiración mitocondrial en células en cultivo	91
2.1.1. Viabilidad celular en células Vero, J774A.1 y BAEC expuestas a altas concentraciones de cobre.....	91
2.1.2. Producción de H ₂ O ₂ en células J774A.1 expuestas al cobre	92
2.1.3. Análisis morfológico de células J774A.1 expuestas al cobre	93
2.1.4. Función mitocondrial en células J774A.1 expuestas al cobre.....	94
2.2. Estrés oxidativo y efecto protector del glutatión en distintas células expuestas a concentraciones tóxicas de cobre.....	94
2.2.1. Viabilidad celular en distintas células incubadas con cobre.....	95
2.2.2. Acumulación de cobre en distintas células incubadas con cobre	96
2.2.3. Producción de oxidantes en distintas células incubadas con cobre	97

2.2.4. Producción de anión superóxido en distintas células incubadas con cobre	97
2.2.5. Prevención del estrés oxidativo por inhibidores de la síntesis proteica en células SV40MEFs incubadas con cobre	98
2.2.6. Efecto de inhibidores de la síntesis proteica en la viabilidad celular en células SV40MEFs incubadas con cobre	101
2.2.7. Efecto de inhibidores de la síntesis proteica sobre el estrés oxidativo en células 3T9MEFs incubadas con cobre	102
2.2.8. Contenido de grupos tioles totales y glutatión en distintas células incubadas con cobre.....	103
2.2.9. Efecto del agregado de N-acetilcisteína, glutatión o glutatión oxidado sobre la viabilidad celular en distintas células incubadas con cobre	104
2.2.10. Depleción del glutatión intracelular por el agregado del inhibidor de la síntesis de glutatión BSO.....	105
2.2.11. Efecto del contenido de grupos tioles intracelulares sobre la viabilidad celular en distintas células incubadas con cobre.....	106
2.3. Discusión	108
Capítulo 3: Perfil transcripcional en células BEAS-2B y HCT116 expuestas a concentraciones tóxicas de cobre.....	117
3.1. Alteración del perfil de transcripción en células expuestas a cobre	118
3.2. Análisis individual de genes cuya transcripción se encuentra alterada por la sobrecarga de cobre	119
3.2.1. Transcripción de genes involucrados en el mantenimiento de la proteostasis.....	120
3.2.2. Transcripción de genes involucrados en procesos autofágicos	128
3.2.3. Transcripción de metalotioneínas.....	129
3.2.4. Transcripción de interleuquinas	130
3.2.5. Transcripción de genes bajo control transcripcional de Nrf2.....	132
3.2.6. Transcripción de genes que regulan la concentración de H ₂ O ₂	133
3.3. Estudio de los procesos celulares alterados por la sobrecarga de cobre mediante GSEA.....	134
3.4. Discusión	140
Capítulo 4: Efecto protector del glutatión frente a la interacción entre el cobre y las proteínas	145
4.1. Formación de agregados de ovoalbúmina en presencia de Cu ²⁺	146
4.2. Formación de agregados de seroalbúmina bovina en presencia de Cu ²⁺	147

4.3. Efecto del Cu^{2+} sobre la formación de puentes disulfuro en proteínas	147
4.4. Formación de agregados de seroalbúmina bovina por el agregado de metales con distinta configuración electrónica externa	148
4.5. Efecto de la co-incubación de Cu^{2+} con Fe^{2+} o Zn^{2+} sobre la viabilidad celular	149
4.6. Efecto protector del GSH frente a la interacción directa entre las proteínas y el cobre	149
4.7. Efecto protector del GSSG frente a la interacción directa entre las proteínas y el cobre	150
4.8. Discusión	151
Capítulo 5: Rol de la apoptosis en la muerte celular inducida por sobrecarga de cobre	155
5.1. Fosforilación de JNK en células incubadas con concentraciones tóxicas de cobre	156
5.2. Fosforilación de MKK7 y MKK4 en células incubadas con concentraciones tóxicas de cobre	157
5.3. Efecto de la quinasa JNK sobre la viabilidad celular en células 3T9MEFs expuestas a concentraciones tóxicas de cobre	157
5.4. Parámetros apoptóticos en células SV40MEFs expuestas a concentraciones tóxicas de cobre	158
5.5. Efecto de las proteínas Bax y Bak sobre la viabilidad celular en células SV40MEFs expuestas a concentraciones tóxicas de cobre	160
5.6. Efecto de las caspasas sobre la viabilidad celular en células SV40MEFs expuestas a concentraciones tóxicas de cobre	160
5.7. Parámetros apoptóticos en células HeLa expuestas a concentraciones tóxicas de cobre	162
5.8. Parámetros apoptóticos en células BEAS-2B expuestas a concentraciones tóxicas de cobre	164
5.9. Parámetros apoptóticos en células Hepa1-6 expuestas a concentraciones tóxicas de cobre	166
5.10. Parámetros apoptóticos en células HCT116 expuestas a concentraciones tóxicas de cobre	167
5.11. Efecto de la exposición a distintas concentraciones de cobre sobre la morfología de hepatocitos murinos primarios	169
5.12. Efecto de la sobrecarga de cobre sobre la viabilidad celular de hepatocitos murinos primarios	171
5.13. Parámetros apoptóticos en hepatocitos murinos primarios expuestos a concentraciones tóxicas de cobre	172

5.14. Comparación entre la morfología apoptótica clásica y la morfología en hepatocitos murinos primarios expuestos a concentraciones toxicas de cobre ..	174
5.15. Discusión	174
Discusión general	180
Conclusión.....	187
Resumen	190
Referencias bibliográficas	194

Índice de figuras

Figura 1.	4
Figura 2.	5
Figura 3.	6
Figura 4.	7
Figura 5.	17
Figura 6.	17
Figura 7.	21
Figura 8.	24
Figura 9.	28
Figura 10.	29
Figura 11.	31
Figura 12.	35
Figura 13.	36
Figura 14.	46
Figura 15.	47
Figura 16.	48
Figura 17.	50
Figura 18.	51
Figura 19.	53
Figura 20.	54
Figura 21.	55
Figura 22.	56
Figura 23.	66
Figura 24.	66
Figura 25.	68
Figura 26.	69
Figura 27.	70
Figura 28.	70
Figura 29.	71
Figura 30.	73
Figura 31.	74
Figura 32.	74
Figura 33.	75
Figura 34.	76
Figura 35.	77
Figura 36.	78
Figura 37.	79
Figura 38.	79
Figura 39.	88
Figura 40.	91
Figura 41.	92
Figura 42.	93

Figura 43.	93
Figura 44.	94
Figura 45.	96
Figura 46.	96
Figura 47.	97
Figura 48.	98
Figura 49.	99
Figura 50.	100
Figura 51.	101
Figura 52.	102
Figura 53.	103
Figura 54.	104
Figura 55.	105
Figura 56.	106
Figura 57.	108
Figura 58.	119
Figura 59.	146
Figura 60.	147
Figura 61.	148
Figura 62.	148
Figura 63.	149
Figura 64.	150
Figura 65.	150
Figura 66.	153
Figura 67.	153
Figura 68.	156
Figura 69.	157
Figura 70.	158
Figura 71.	159
Figura 72.	160
Figura 73.	161
Figura 74.	163
Figura 75.	165
Figura 76.	166
Figura 77.	168
Figura 78.	170
Figura 79.	171
Figura 80.	172
Figura 81.	173
Figura 82.	174
Figura 83.	183
Figura 84.	184
Figura 85.	189

Índice de tablas

Tabla 1.....	8
Tabla 2.....	9
Tabla 3.....	14
Tabla 4.....	16
Tabla 5.....	22
Tabla 6.....	44
Tabla 7.....	120
Tabla 8.....	121
Tabla 9.....	122
Tabla 10.....	122
Tabla 11.....	123
Tabla 12.....	124
Tabla 13.....	125
Tabla 14.....	126
Tabla 15.....	126
Tabla 16.....	127
Tabla 17.....	128
Tabla 18.....	128
Tabla 19.....	129
Tabla 20.....	130
Tabla 21.....	131
Tabla 22.....	133
Tabla 23.....	134
Tabla 24.....	136
Tabla 25.....	137

Introducción

1. Cobre: función biológica, metabolismo y toxicidad

1.1. Generalidades

El cobre (Cu) es un metal de transición y uno de los veintitrés elementos de la tabla periódica que se hallan presentes en los seres vivos (Repetto y Boveris, 2012; Chang, 1999). En los mamíferos, es un micronutriente esencial que participa en numerosos procesos fisiológicos críticos, entre los cuales se encuentran la cicatrización de heridas, la angiogénesis, la protección frente a agentes oxidantes, la síntesis de neurotransmisores y la modulación del crecimiento en células normales y tumorales, entre otros. Muchos de estos procesos se basan en la alta reactividad del metal y su capacidad de ciclar entre dos estados redox: Cu^{2+} y Cu^{1+} . Por ejemplo, la enzima citocromo oxidasa (COX) emplea esta propiedad del Cu de forma crítica en la respiración aeróbica mitocondrial. Este metal también actúa como cofactor de la enzima dopamina β -hidroxilasa en la biosíntesis de neurotransmisores y, mediante la actividad de la enzima peptidilglicina α -amidantemonooxigenasa, en la síntesis de neuropéptidos. El Cu forma parte del sitio activo de la enzima Cu,Zn-superóxidodismutasa (SOD1), la cual es esencial en acelerar la dismutación citosólica del anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). La lisil oxidasa dependiente de Cu produce el entrecruzamiento del colágeno en la matriz extracelular y el tejido conectivo durante la cicatrización de heridas, metástasis y crecimiento. Sin embargo, a pesar de la participación clave del Cu en el funcionamiento celular, éste puede a su vez inhibir la actividad de muchas enzimas.

Con respecto a la reactividad química del Cu, éste es capaz de interactuar con una gran variedad de proteínas que contengan azufre, nitrógeno u oxígeno. Por otro lado, la ya mencionada capacidad del metal de ciclar entre sus dos estados de oxidación puede dar origen a especies fuertemente oxidantes como el radical hidroxilo (HO^{\bullet}) (Kaplan y Maryon, 2016), por medio de la reacción de Fenton (Fenton, 1894).

Dada la alta reactividad del Cu, es de esperar que la fracción de metal libre dentro de la célula se encuentre en concentraciones extremadamente bajas. Se estima que, en condiciones fisiológicas, la concentración intracelular de Cu libre es menor a 10^{-18} M (Rae y col., 1999), volviéndolo indetectable.

1.2. Homeostasis intracelular del cobre

El Cu en mamíferos debe ser adquirido en la dieta. La ingesta diaria recomendada según la IOM (del inglés *Institute of Medicine*) de Cu es de 0,9 mg . día⁻¹ para hombres y mujeres, mientras que el límite superior de ingesta es de 10 mg . día⁻¹. Luego de ser ingerido, el Cu disuelto en el quimo ácido alcanza el intestino delgado donde se absorbe más del 50%. Sin embargo, pequeñas cantidades del metal pueden ser absorbidas en el estómago. En la luz intestinal, el Cu se encuentra como Cu²⁺ y, para poder ingresar al enterocito, éste debe ser previamente reducido a Cu¹⁺ en un proceso que no está completamente comprendido. Se postula que los antioxidantes presentes en los alimentos serían capaces de mediar esta reacción química. Sin embargo, las proteínas Dcytb, una reductasa putativa de Fe³⁺, y Steap1 han sido propuestas como mediadores de la reducción de Cu²⁺ a Cu¹⁺, previo al ingreso del metal a la célula principalmente a través de la proteína transportadora de Cu (Ctr1). No obstante, la proteína transportadora de metales divalentes 1 (DMT1) también permite el ingreso de Cu²⁺ y de Cu¹⁺ en células específicas (Knutson, 2007).

Ctr1 fue identificada inicialmente en *Saccharomyces cerevisiae* (Dancis y col., 1994) y luego se identificó el homólogo humano hCtr1 (Zhou y col., 1997), pudiendo rescatar levaduras mutantes que carecían de Ctr1 endógena. El homólogo murino de hCtr1 es idéntico en un 92% (Lee y col., 2000). Si bien Ctr1 posee un papel importante en el transporte de Cu, los mutantes que no poseen hCtr1, aún conservan entre un 15-20% de su capacidad de captar el metal. Por esto es posible que existan otros mecanismos de transporte de Cu aún no identificados. Las proteínas Ctr1 son proteínas integrales de membrana que poseen tres dominios transmembrana (DTM) y múltiples ligandos capaces de unir Cu (predominantemente histidina, cisteína y metionina). Estos ligandos se ubican en el dominio extracelular N-terminal, en el dominio extracelular de DTM2 y en el dominio intracelular C-terminal. Este transportador funciona como homotrímero con forma de cono que atraviesa la membrana lipídica. Ctr1 posee un poro estrecho que permite la entrada de Cu¹⁺ desde el lado extracelular de la membrana, de aproximadamente 8 Å y un poro más grande de 22 Å del lado citosólico (De Feo y col., 2009; Aller y Unger, 2006) (Fig. 1).

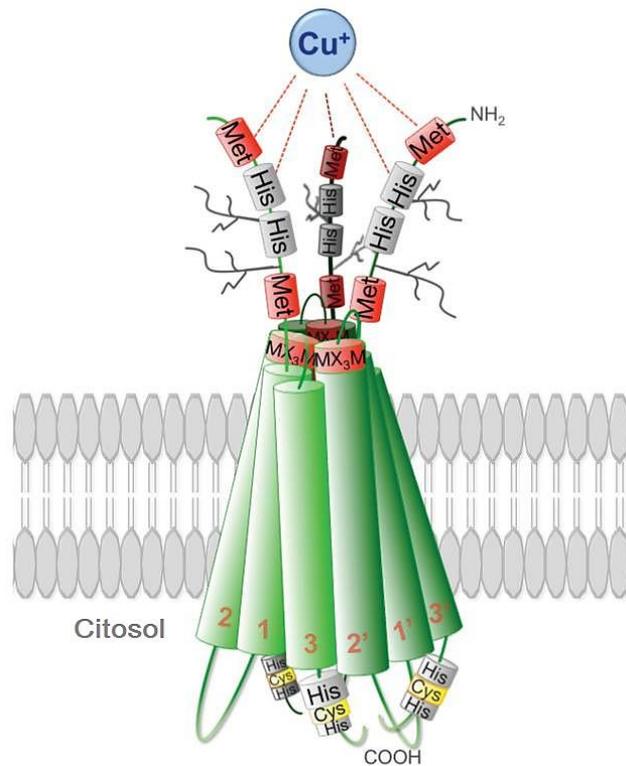


Figura 1. Estructura de Ctr1. El Cu^{1+} es captado desde el espacio extracelular por distintos residuos capaces de ligar el metal (Tomado y adaptado de Öhrvik y Denis, 2014).

Actualmente se cree que los residuos de metionina en el dominio extracelular unen reversiblemente al Cu^{1+} , permitiendo así la translocación del metal de un ligando metionina al siguiente y promoviendo el desplazamiento del metal en forma unidireccional hacia el interior de la célula. El mecanismo por el cual el Cu^{1+} atraviesa Ctr1 es, en última instancia, determinado por una combinación entre el gradiente de concentración del metal y cambios conformacionales y en el campo electrostático del transportador (Öhrvik y Denis, 2014).

Luego de atravesar la membrana, los iones Cu^{1+} permanecen unidos al transportador por el motivo His-Cys-His en el dominio C-terminal de la proteína, a la espera de una molécula capaz de unir al metal (De Feo y col., 2009). Una vez que el metal ingresa al citosol, éste es captado por proteínas o moléculas pequeñas que limitan drásticamente los potenciales blancos con los cuales podría interactuar el Cu. Es notable la cantidad de mecanismos puestos en juego para prevenir el incremento de la concentración de Cu libre.

La chaperona de cobre *antioxidant-1* (ATOX1) es un polipéptido pequeño de 68 aminoácidos y 7,4 kDa en humanos. Esta proteína es una importante chaperona que participa en el transporte intracelular de Cu y permite el movimiento del metal hacia las ATP-etas transportadoras de Cu ATP7A o ATP7B, involucradas en la extrusión del metal fuera de la célula. En su estructura, posee un sitio de unión a Cu formado por un par de cisteínas ubicadas en el sitio CxxC (Hattori y Lutsenko, 2013). La proteína posee una estructura tipo ferredoxina $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ en donde las α -hélices se ubican en el mismo lado frente a la β -hoja plegada antiparalela (Fig. 2). El sitio de unión a Cu en ATOX1 está ubicado en el primer bucle expuesto al solvente ($\beta 1$ - $\alpha 1$). Los iones Cu^{1+} son capaces de unirse a este sitio con una constante de formación K_f de $5,6 \times 10^{17}$ (Arnesano y col., 2001), tanto en un entorno lineal como trigonal. En el último caso, el tercer ligando es provisto por tioles solubles, como el glutatión (GSH).

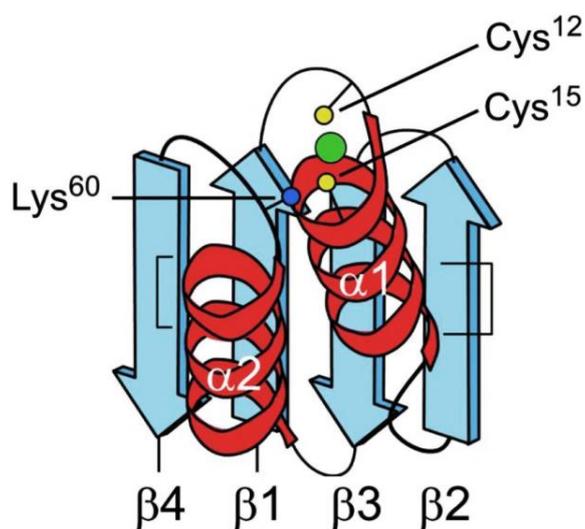


Figura 2. Diagrama de ATOX1 humana. La esfera verde corresponde a un ion Cu unido a los tioles correspondientes a las cisteínas 12 y 15 en el motivo MTCXGC (Tomado y adaptado de Hattori y Lutsenko, 2013).

Las proteínas transmembrana ATP7A y ATP7B, también conocidas como proteína de la enfermedad de Menkes y proteína de la enfermedad de Wilson respectivamente, tienen un papel esencial en la distribución a nivel sistémico del Cu. Estas proteínas presentan un alto grado de homología entre ellas (aproximadamente 60% de identidad aminoacídica). Ambas poseen ocho segmentos transmembrana que forman un paso a través de la membrana para permitir el pasaje de Cu. El extremo N-terminal posee seis dominios de unión a

metal (DUM), donde cada uno posee la secuencia conservada GMxCxxC (donde x es cualquier aminoácido) (La Fontaine y col., 2010) (Fig. 3).

ATP7A y ATP7B se encuentran en las membranas *trans*-Golgi en donde median la inserción de Cu en proteínas de la vía secretoria como la ceruloplasmina (CP) (Nyasae y col., 2007). Frente a un aumento de la concentración de Cu, estas proteínas se translocan a la membrana plasmática en vesículas donde el Cu ha sido previamente extruido. El metal es luego excretado al medio por exocitosis. Cuando la concentración de Cu disminuye, ATP7A o ATP7B son recicladas al Golgi.

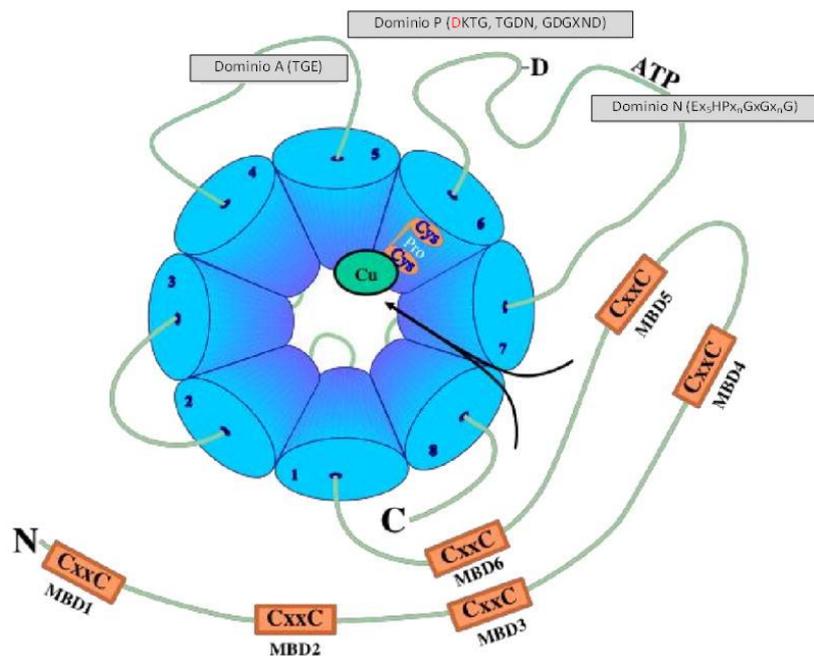


Figura 3. Diagrama esquemático de la estructura de las ATPasas dependientes de Cu ATP7A y ATP7B (Tomado y adaptado de La Fontaine y col., 2010).

ATP7A está presente en numerosos tipos celulares. En los enterocitos, esta enzima tiene un papel esencial en la extrusión de Cu hacia la circulación portal, permitiendo así su ingreso al organismo. Desde ahí, el metal es transportado hacia el hígado, unido principalmente a albúmina y transcupreína (Liu y col., 2007). Por su parte, ATP7B se encuentra presente en un espectro mucho más restringido de células, ubicándose principalmente en los hepatocitos. Sin embargo, el papel de esta proteína en el metabolismo del Cu no es menor. Una vez que el metal ingresa al hepatocito, éste es rápidamente complejoado por ATOX1 en el citosol y transportado hacia ATP7B. ATP7B luego bombea el Cu hacia la red *trans* Golgi

para la síntesis de CP o para su excreción en el fluido biliar y posterior eliminación en las heces. Al carecer de ATP7A, los hepatocitos dependen exclusivamente de ATP7B para la eliminación de Cu de la célula (Fig. 4).

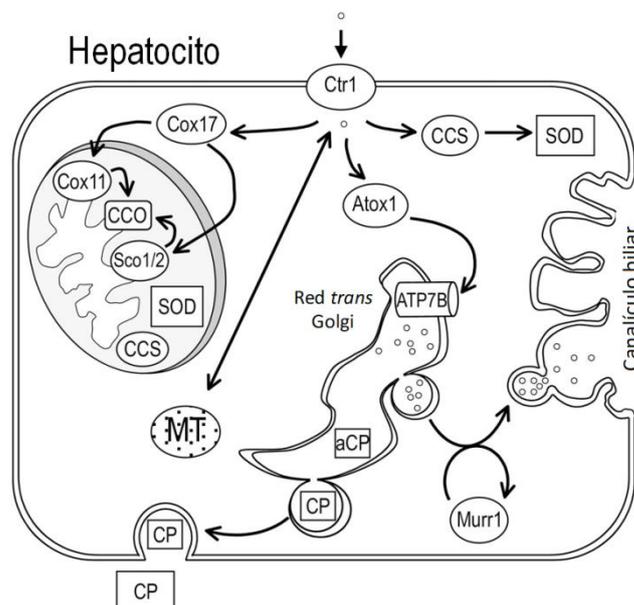


Figura 4. Esquema del tráfico intracelular de Cu en células que expresan ATP7A o ATP7B (Tomado y adaptado de Prohaska y Gybina, 2004).

La CP es un miembro de la familia multicobre-oxidasa, una familia de proteínas conservadas evolutivamente que utiliza el Cu para acoplar la oxidación de sustratos a la reducción de O_2 a H_2O . Esta proteína es sintetizada por el hígado y posee seis átomos de Cu en su estructura. La CP es secretada al torrente sanguíneo y transporta la mayor parte del Cu en circulación sistémica (más del 95%).

Es importante remarcar que a pesar de unir la gran mayoría del Cu en la circulación, esta proteína no participa en la distribución de Cu a los tejidos (Hellman y Gitlin, 2002). De hecho, en el trastorno genético autosómico recesivo conocido como aceruloplasminemia, donde la de CP sérica es indetectable y la concentración de Cu en suero en consecuencia es muy baja, no se observa un desbalance en el metabolismo de Cu en los tejidos. En cambio, esta patología se caracteriza por una sobrecarga de Fe, debido a la participación de esta enzima como oxidasa en el metabolismo de este metal (Roberti y col., 2011).

En la Tabla 1 se resumen las principales proteínas involucradas en el tráfico de Cu junto a una breve descripción de su función.

Tabla 1. Resumen de las proteínas involucradas en el tráfico intracelular de cobre

Nombre abreviado	Nombre completo	Función
Dcytb	Citocromo B duodenal	Reductasa putativa capaz de reducir el Cu^{2+} extracelular a Cu^{1+}
Steap1	Metaloreductasa Steap1	Reductasa de membrana capaz de reducir el Cu^{2+} extracelular a Cu^{1+}
Ctr1	Transportador de cobre 1	Principal transportador de membrana que media la captación celular de Cu^{1+}
DMT1	Transportador de metales divalentes 1	Transportador de membrana que media la captación celular de Cu^{2+} , entre otros metales divalentes
Atox1	Proteína antioxidante 1	Media el tráfico intracelular de Cu y su transporte hacia la red <i>trans</i> Golgi
MT	Metalotioneína	Proteína con un alto contenido de cisteínas que une y mantiene inactivos diversos metales como Cu y Zn
CP	Ceruloplasmina	Oxidasa de Fe dependiente de Cu. Transporta la mayor parte del Cu en circulación sistémica
CCS	Chaperona de cobre para la superóxido dismutasa	Chaperona que participa en la incorporación del Cu al sitio activo de la SOD1
SOD1	Superóxido dismutasa 1	Enzima clave en catalizar la dismutación del anión $\text{O}_2^{\bullet -}$ citosólico
Cox17	Chaperona de cobre para la citocromo C oxidasa	Chaperona involucrada en la incorporación del Cu a la CCO
Sco1/2	Proteína de ensamblaje de la citocromo C oxidasa 1/2	Chaperona involucrada en la incorporación del Cu a la CCO
CCO	Citocromo C oxidasa	Proteína transmembrana involucrada en la respiración mitocondrial
Murr1	Contenedora de dominio de metabolismo de cobre 1	Facilita la excreción biliar de Cu
ATP7A	ATPasa transportadora de cobre alfa	Bomba de Cu que lo incorpora a la red <i>trans</i> Golgi. Se encuentra presente en diversas células como los enterocitos
ATP7B	ATPasa transportadora de cobre beta	Bomba de Cu que lo incorpora a la red <i>trans</i> Golgi. Se encuentra presente principalmente en hepatocitos

Es destacable la manera en la que el Cu es incorporado por la célula en cada proceso específico donde el metal es requerido, evitando en todo momento el incremento en la concentración de iones Cu libres.

1.3. Comparación del contenido de cobre en órganos humanos y de ratas

En términos generales, el transporte y metabolismo del Cu en humanos y ratas es bastante similar. Si bien pueden existir diferencias cuantitativas en los sistemas capaces de transportar el metal, los contenidos de Cu en hígado y cerebro de humanos y ratas son comparables (Tabla 2).

Tabla 2. Contenido de Cu en hígado y cerebro de humanos y ratas.

Órgano	Contenido de Cu ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ peso seco de órgano)	
	Humanos	Ratas
Hígado	15-55 (Yang y col., 1989)	61-88 (Barrow y Tanner, 1989)
Cerebro	13-60 (Faa y col., 2001)	≈ 15 (Prohaska, 1987)

1.4. Patologías asociadas al metabolismo del cobre

1.4.1. Enfermedad de Menkes

En 1962, John Menkes describió una enfermedad caracterizada por retardo en el crecimiento, neurodegeneración y alteraciones peculiares en el cabello. En 1993, la ATP7A fue clonada e identificada como la proteína causante de este trastorno recesivo ligado al X. Esta proteína es esencial para la extrusión del Cu a través de la membrana basal del enterocito hacia la circulación portal. La actividad disminuida de esta enzima produce una marcada disminución del contenido de Cu a nivel sistémico y en consecuencia, graves trastornos en el desarrollo debido a la falta de actividad de las múltiples enzimas dependientes de Cu.

1.4.2. Enfermedad de Wilson

La enfermedad de Wilson es un trastorno autosómico recesivo del metabolismo del Cu que resulta en la toxicidad del metal. En 1912 Wilson Kinnier describió como “enfermedad lenticular progresiva” a un trastorno hepático con características morfológicas particulares. A principios de 1990 se estableció el rol

del Cu en la patología y en 1993 se identificó el gen de la proteína defectiva responsable de la enfermedad como ATP7B.

ATP7B resulta esencial para la incorporación del Cu en la CP y también en la excreción biliar del metal. Debido a esto, la actividad disminuida de esta proteína conduce a la acumulación de Cu en los hepatocitos.

La enfermedad de Wilson es una enfermedad hepática que comprende desde anomalías bioquímicas hasta hepatitis aguda, falla hepática aguda y cirrosis con hipertensión portal (Roberts y Schilsky, 2008). También se observan síntomas neurológicos como el síndrome rígido acinético (similar a la enfermedad de Parkinson), la pseudoesclerosis dominada por temblores, ataxia y el síndrome distónico (Svetel y col, 2001). Los pacientes adultos pueden presentar alteraciones psiquiátricas como paranoia, depresión y esquizofrenia (Svetel y col., 2009). La presencia de depósitos observables de Cu como anillos color marrón en la córnea, mejor conocidos como anillos de Kayser-Fleischer, es común en pacientes con enfermedad de Wilson.

A nivel bioquímico, suele observarse una disminución en los valores séricos de CP ya que la ATP7B es necesaria para su síntesis. Los valores normales de CP sérica se encuentran entre 20-50 mg . dL⁻¹, mientras que en pacientes homocigotas para la enfermedad de Wilson, la concentración de esta proteína se encuentra por debajo de 20 mg . dL⁻¹. Sin embargo, algunos pacientes mantienen valores normales de CP sérica (Roberts y Schilsky, 2008).

Debido a que aproximadamente el 90% del Cu circulante se encuentra unido a CP, en los pacientes con enfermedad de Wilson suele observarse una disminución de la concentración sérica de Cu. Sin embargo, la concentración de Cu libre en el suero de estos pacientes se encuentra incrementada por encima de 25 µg . dL⁻¹, siendo los valores normales de Cu libre inferiores a 15 µg . dL⁻¹. En ciertas situaciones como la falla hepática aguda, el Cu en sangre puede incrementarse súbitamente y superar incluso a los valores en pacientes sanos ya que el contenido de metal de las células hepáticas se vuelca a la circulación sistémica (Roberts y Schilsky, 2008).

Actualmente, los tratamientos de la enfermedad de Wilson se basan en la administración de fármacos para controlar los niveles de Cu libre en la sangre y en los tejidos. Los pacientes refractarios al tratamiento médico, con falla hepática fulminante o en estadios terminales de enfermedad hepática deben ser sometidos a un trasplante hepático. Los medicamentos disponibles para el tratamiento farmacológico son D-penicilamina (Walshe, 1956), trientina (Walshe, 1982), cinc (Zn) (Hoogenraad y col., 1979) y tetramolibdato de amonio (Brewer, 2009), aunque este último aún no está disponible comercialmente. La D-penicilamina, trientina y tetramolibdato funcionan complejando al Cu en una forma no tóxica y favoreciendo su eliminación por orina. En cambio, el Zn es un potente inductor de la expresión de metalotioneínas (MT) en los enterocitos. Las MT son capaces de unir ávidamente Cu, retrasando así su ingreso a la circulación sistémica y, al descamarse las células de la pared intestinal, el Cu acumulado en ellas es eliminado en las heces. Es remarcable que la totalidad de los tratamientos disponibles hasta el momento para la enfermedad de Wilson se enfocan a controlar los niveles de Cu, promoviendo su eliminación en orina. Sin embargo, al desconocer las consecuencias a nivel bioquímico de la acumulación intracelular de Cu resulta imposible identificar nuevos blancos terapéuticos una vez que el metal haya ingresado a la célula.

Es claro que el Cu es capaz de interactuar con una gran cantidad de moléculas en formas diversas como reacciones ácido base, equilibrios de formación de complejos, reacciones electroquímicas, etcétera. Sin embargo, al igual que lo que ocurre con distintos metales de transición, el mecanismo molecular por el cual el Cu resulta tóxico para la célula es desconocido (Tamás y col., 2014). Numerosos reportes han mostrado alteraciones en diversos parámetros relacionados con el estrés oxidativo, daño mitocondrial, apoptosis y necrosis, entre otros. Pero debido a su carácter descriptivo, estos trabajos suelen no establecer una relación causa-efecto entre el evento observado y el estímulo. Por lo cual, es posible que muchos de los resultados reportados en casos de toxicidad de Cu sean simplemente eventos colaterales a la muerte de la célula y no su causa. Por ejemplo, el estrés oxidativo ha sido extensamente relacionado a la enfermedad de Wilson por las alteraciones observadas en estos pacientes. Sin embargo, los tratamientos basados en la

administración de antioxidantes no han demostrado ser efectivos (Sinha y col., 2005; Liang y Hong-Fang, 2007).

1.4.3. Participación del cobre en las enfermedades neurodegenerativas

El Cu ha sido relacionado a distintas enfermedades neurodegenerativas con una alta prevalencia en la sociedad. Si bien los mecanismos por los cuales el metal está involucrado en estas patologías no han sido comprendidos en su totalidad, existen numerosos reportes indicando una alteración en el metabolismo del Cu en pacientes con estas enfermedades.

1.4.3.1. El cobre en la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo de carácter progresivo, alterando las funciones motrices y cognitivas, hasta culminar en la muerte del paciente. Esta enfermedad representa el 60-70% de los casos de demencia y a la fecha no existe una cura.

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la pérdida de neuronas y sinapsis en la corteza cerebral y ciertas regiones subcorticales. Al microscopio óptico se puede observar la presencia de placas densas alrededor de las neuronas, formadas por el péptido β -amiloide y restos celulares, también conocidas como placas de amiloide, mientras que en el interior de las células es común encontrar enredos neurofibrilares, formados por la proteína tau hiperfosforilada (Tiraboshi y col., 2004).

Los factores que predisponen a la enfermedad de Alzheimer son múltiples y variados. Si bien el 70% del riesgo de padecer la enfermedad se le atribuye a factores genéticos (Ballard y col., 2011), el sedentarismo y las dietas ricas en lípidos a lo largo de la vida son también factores predisponentes. Experimentalmente, la sobrecarga de iones Cu ha sido relacionada con la enfermedad de Alzheimer. De hecho, se ha observado una correlación positiva entre el deterioro cognitivo y el contenido de Cu libre en sangre a lo largo del tiempo de la enfermedad (Squitti y col., 2009). Un estudio en conejos demostró que el Cu en el agua de bebida puede sortear el hígado contribuyendo directamente al *pool* de Cu libre en sangre (Hill y col., 1986) y por ello el metal en el agua de bebida es más tóxico que cuando el

metal se encuentra presente en los alimentos (Hébert, 1993). Por ello, se ha hipotetizado que la ingesta de concentraciones de Cu mayores a las recomendadas en el agua de bebida en conjunto con otros factores podría ser un factor causal clave en la enfermedad de Alzheimer (Brewer, 2014).

1.4.3.2. El cobre en la enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson es un trastorno degenerativo del sistema nervioso central que afecta fundamentalmente al sistema motor. Estos trastornos motores se originan en base a la muerte neuronal localizada principalmente en los ganglios de la base del cerebro, lo cual afecta drásticamente la secreción de dopamina por parte de las neuronas (Davie, 2008).

Si bien la causa de la muerte celular no es clara, ésta involucra la acumulación de agregados proteicos intracelulares, también conocidos como cuerpos de Lewis. Estos agregados se componen fundamentalmente de la proteína α -sinucleína. Curiosamente, el Cu es capaz de promover la agregación de la α -sinucleína (Rasia y col., 2015) y a su vez el contenido de este metal se ha encontrado incrementado en la sustancia *nigra* de pacientes con enfermedad de Parkinson (Jiménez-Jiménez y col., 2012).

2. Metabolismo del oxígeno, radicales libres y estrés oxidativo

2.1. Oxígeno y radicales libres

El oxígeno es fundamental para la vida de los organismos aerobios ya que por su acción oxidante da lugar a una serie de reacciones químicas a partir de las cuales las células logran obtener energía (Cadenas, 1989).

El alótropo más estable del oxígeno es el dióxígeno, O₂, una molécula diatómica y altamente reactiva. La molécula de O₂ contiene un número par de electrones, sin embargo, dos de ellos se encuentran desapareados, es decir que cada uno de ellos se ubica en un orbital antienlazante (π^*) diferente, poseen spin paralelos, confiriéndole a la molécula propiedades magnéticas de paramagnetismo y alta reactividad (Chang, 1999).

En los organismos eucariotas durante el proceso metabólico celular alrededor del 90 a 95% del O₂ consumido por las células es utilizado en las mitocondrias con el fin de generar energía química bajo la forma de ATP. El porcentaje restante es utilizado para reacciones de oxidación directa no enzimática o por otros sistemas enzimáticos como oxidasas y oxigenasas.

A mediados del siglo XX, se postuló por primera vez que las presiones elevadas de O₂ resultan tóxicas para los animales y que el daño producido es producto de las especies radicalarias derivadas del O₂ en un mecanismo similar al daño producido por los rayos X (Gerschman, 1954). Las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno se producen en condiciones fisiológicas en todas las células y tejidos de los organismos vivos. Estas especies pueden ser radicales libres o no. Un radical libre es toda especie química que posee uno o más electrones no apareados (Halliwell y Gutteridge, 1989). El término especies reactivas del oxígeno o ROS (del inglés *reactive oxygen species*) hace referencia a las distintas especies reactivas radicalarias y no radicalarias derivadas del metabolismo del O₂. Entre las especies radicalarias clásicamente conocidas como ROS se encuentran: anión superóxido (O₂^{•-}), radical hidroxilo (HO[•]), radical alcoxilo (RO[•]), radical peroxilo (ROO[•]), óxido nítrico (NO[•]) entre otras. Sin embargo, existen especies derivadas del O₂ no radicalarias, como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y peroxinitrito (ONOO⁻) (Tabla 3).

Tabla 3. Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno

Radicales	No radicales
Anión superóxido (O ₂ ^{•-})	Hidroperoxilo (ROOH)
Hidroxilo (HO [•])	Peroxinitrito (ONOO ⁻)
Peroxilo (ROO [•])	Ozono (O ₃)
Alcoxilo (RO [•])	Oxígeno singulete (¹ O ₂)
	Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)

2.2. Concepto de estrés oxidativo

En 1985 Helmut Sies definió el estrés oxidativo como un desbalance entre especies con carácter oxidante y especies con carácter reductor en favor de las primeras. De aquí se desprende el concepto de daño oxidativo, donde como consecuencia del estrés oxidativo se observa un incremento en la velocidad de reacciones de peroxidación lipídica y consumo de antioxidantes endógenos. El

daño oxidativo es un proceso irreversible (Boveris y col., 2008) que involucra modificaciones covalentes de macromoléculas y puede en última instancia producir la muerte de la célula (Cadenas y col., 1994).

En 2008, Jones sugirió que el estrés oxidativo podría ocurrir en ausencia de radicales libres y propuso una hipótesis complementaria a la del estrés oxidativo la cual denominó “la hipótesis redox”. Según ésta, el estrés oxidativo ocurre como consecuencia de la disrupción de los circuitos redox tiólicos, los cuales funcionan normalmente en la señalización celular y la regulación fisiológica. El estado redox de los tioles es sensible a los dadores de dos electrones y son a su vez controlados por los sistemas antioxidantes tiorredoxina (Trx), GSH y cisteína (Jones, 2008).

Sin embargo, el concepto clásico del estrés oxidativo ha sido cuestionado por la generalización hecha en base a un enfoque puramente termodinámico respecto a las especies oxidantes y las especies antioxidantes (Sies, 2015). Por ello, éste fue ampliado y redefinido con el tiempo. En 2015 se propuso la existencia de un código redox, donde los procesos celulares están gobernados por *switches* moleculares redox que responden no sólo a potenciales redox, sino que dependen esencialmente de limitaciones cinéticas (Jones y Sies, 2015). Por otro lado, el H_2O_2 y los peróxidos orgánicos (ROOH) son, dentro de las llamadas ROS, las especies cuantitativamente predominantes, por un factor de entre 10 y 10^6 con respecto de las demás (Boveris y col., 2008) (Tabla 2). Por lo tanto, el H_2O_2 se considera una molécula producida de manera endógena fundamental en la activación de estos *switches* moleculares y los desbalances en la producción de especies oxidantes pueden tener consecuencias dramáticas para los procesos celulares (Sies, 2017).

El H_2O_2 es el producto de la reducción divalente del O_2 . El hígado humano sintetiza aproximadamente $50 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ de H_2O_2 , lo cual corresponde a aproximadamente el 2% del consumo de oxígeno total del órgano. El H_2O_2 se origina espontáneamente por la dismutación del O_2^{\bullet} , y la reacción es acelerada drásticamente por la enzima superóxido dismutasa (SOD). El O_2^{\bullet} proviene de diversas fuentes como NADPH oxidasas (Griendling y col., 2000), la respiración aeróbica mitocondrial (Loschen y col., 1974) y por la actividad enzimática de xantina oxidasa, monoamina oxidasa, D-aminoácido oxidasa, entre otras (Sies y col., 1974).

Para prevenir la acumulación de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 existen diversos sistemas que median su degradación. Si bien la SOD es la principal enzima que degrada el $O_2^{\bullet-}$, la concentración de H_2O_2 es controlada por un espectro mucho más amplio de enzimas. Entre éstas podemos mencionar, catalasa, peroxirredoxinas (Prx) (Rhee y col., 2012) y glutatión peroxidasa (GPx) (Brigelius y col., 2013).

Debido a la constante producción y degradación de H_2O_2 , esta molécula se encuentra presente en estado estacionario en una concentración estimada de alrededor 100 nM (Tabla 4). Si bien el H_2O_2 presenta una reactividad relativamente baja en comparación con otras ROS, un incremento en la concentración de esta especie puede resultar tóxico para la célula. Por ejemplo, el H_2O_2 es capaz de inhibir directamente a la enzima aldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Cochrane, 1991), además de dar lugar a la formación de otras ROS más reactivas, como se desarrolla más adelante.

Tabla 4. Concentraciones en estado estacionario y vida media de los intermediarios de las reacciones en cadena mediadas por radicales libres en células de mamíferos (Boveris y col., 2008).

Especie química	Estado estacionario	Vida media ($t_{1/2}$)
	(M)	(s)
$O_2^{\bullet-}$ (intramitocondrial)	10^{-10}	10^{-4}
$O_2^{\bullet-}$ (citosólico)	10^{-11}	10^{-3}
H_2O_2	10^{-7}	0,1
HO^{\bullet}	10^{-16}	10^{-9}
NO	10^{-7}	10^{-2}
ONOO \cdot	10^{-8}	0,5
UQH \cdot	10^{-7}	0,2
R \cdot	10^{-10}	10^{-7}
ROO \cdot	10^{-9}	10^{-5}
1O_2	10^{-15}	10^{-6}
ROOH	10^{-6}	0,1

2.3. Mecanismos de producción de especies reactivas del oxígeno

Existen diversas fuentes para la formación de ROS en las células. Una de ellas, como veremos, es la respiración mitocondrial. Otra fuente de ROS muy descripta en literatura es aquella que tiene lugar en presencia de ciertos metales de transición como catalizadores. Esta última es un claro ejemplo de los peligros de un incremento de la concentración de H_2O_2 , donde mediante la llamada reacción de

Fenton/Haber-Weiss, en presencia de hierro (Fe) o Cu, puede dar lugar a la formación del altamente reactivo HO• (Fenton, 1894; Haber y Weiss, 1934) (Fig. 5).

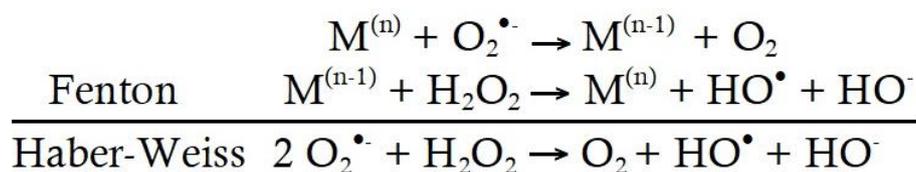


Figura 5. La reacción de Fenton/Haber-Weiss es una de las fuentes celulares de ROS. En esta reacción, los metales de transición como los iones de Fe y Cu catalizan la producción de radical hidroxilo, que es capaz de iniciar la reacción de lipoperoxidación en cadena.

Los radicales libres, como el HO•, participan en un tipo de reacciones químicas que involucran mecanismos de reacción en cadena. Justamente, la peroxidación (o autoxidación) lipídica es una reacción en cadena que ocurre en tres etapas (Fig. 6). En la etapa de iniciación, se forman radicales lipídicos centrados en un átomo de carbono (R•) a partir de la reacción de un radical centrado en oxígeno generado en otra reacción (por ejemplo, en la descomposición de un hidroperóxido) con un ácido graso poliinsaturado (RH o PUFA, por su sigla en inglés) (Burton y Traber, 1990).

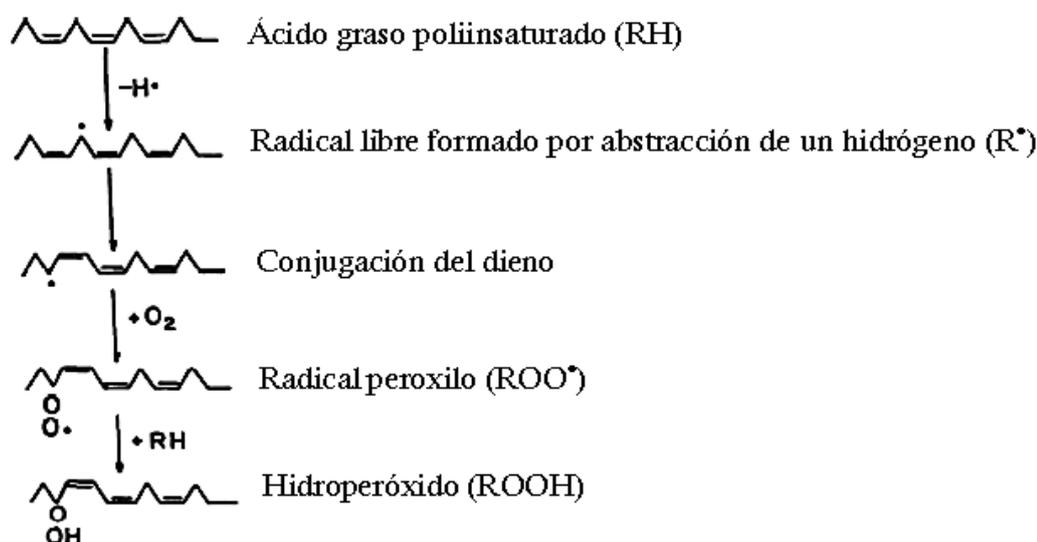
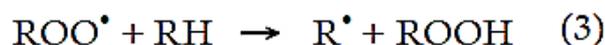
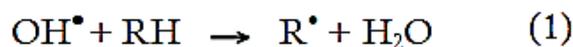


Figura 6. Esquema de la lipoperoxidación de PUFA (Tomado y adaptado de Barber y Bernheim, 1967).

Un R• puede reaccionar rápidamente con O₂ formando un ROO•. Esta especie radicalaria es capaz de abstraer un protón de un PUFA lindante

formándose un hidroperóxido orgánico (ROOH) y generando un nuevo R•, que reinicia el proceso (Ecuaciones 1 a 3). De esta forma se propaga la cadena de peroxidación lipídica, (etapa de propagación) y la reacción no termina hasta que dos especies radicalarias se combinan entre sí para formar un no radical (etapa de terminación).



El ROOH formado durante la etapa de propagación de la reacción de lipoperoxidación en cadena se comporta de manera similar al H₂O₂, pero el grupo peróxido se encuentra fijo en la membrana donde se ubica la cola hidrocarbonada del ácido graso, aunque expuesto al medio acuoso debido a su mayor polaridad. Las trazas de metales Fe²⁺ o Cu¹⁺ pueden producir el clivaje del peróxido formando RO• y HO•. El RO• se comporta de forma muy similar al HO•, siendo una especie altamente reactiva y capaz de promover la lipoperoxidación.

Las modificaciones oxidativas en los ácidos grasos implican una alteración en la microestructura de la membrana así como en sus funciones. La introducción de grupos funcionales hidrofílicos en el núcleo hidrófobo de la membrana altera su permeabilidad y viscosidad y, a medida que el proceso de peroxidación lipídica avanza, se produce un acortamiento de la cola hidrocarbonada de los ácidos grasos. Las reacciones entre especies radicales ocurren en paralelo a las reacciones de propagación de la peroxidación, formando productos estables no radicalarios y el proceso concluye finalmente cuando los dobles enlaces conjugados comienzan a escasear. Sin embargo, en condiciones fisiológicas, no es posible alcanzar esta situación debido a numerosos sistemas enzimáticos y no enzimáticos que se encargan de reparar y reponer constantemente las macromoléculas dañadas de manera de asegurar el correcto funcionamiento de la célula. De esta forma se alcanza un estado estacionario, donde las concentraciones de estos derivados de la lipoperoxidación poseen valores sumamente bajos (Boveris y col., 2008).

2.4. Parámetros alterados relacionados al estrés oxidativo en pacientes con enfermedad de Wilson

Las alteraciones en parámetros relacionados con el estrés oxidativo han sido descritas en casos de enfermedad de Wilson. En un estudio de 38 pacientes con enfermedad de Wilson, 29 con trastornos neurológicos y 9 hermanos asintomáticos, se encontraron alteraciones en diversos parámetros relacionados al estrés oxidativo. El estudio mostró un incremento en los niveles de peroxidación lipídica, disminución del contenido de glutatión reducido (GSH) y disminución de la capacidad antioxidante total frente a pacientes sanos. También se observaron incrementos en la interleuquina-6 (IL-6), la interleuquina-8 (IL-8), la interleuquina-10 (IL-10) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Jayantee y col., 2014), sugiriendo la participación de procesos inflamatorios.

2.5. Respuesta antioxidante mediada por Nrf2

Cuando las células son expuestas a un incremento en la concentración en estado estacionario de oxidantes, éstas pueden adaptarse a la situación de estrés mediante la puesta en marcha de mecanismos que disminuyen la concentración de estas especies. En caso de no poder sobreponerse al estímulo dañino, la permanencia del estrés oxidativo puede llevar a la muerte celular.

Los mecanismos a nivel molecular que dirigen la adaptación frente al estrés oxidativo no están completamente definidos. Sin embargo, el factor de transcripción Nrf2 ha sido descrito recientemente como un factor clave en la respuesta antioxidante.

El factor de transcripción Nrf2 regula los niveles de transcripción de genes involucrados en diversas acciones citoprotectoras. Entre los genes reportados inicialmente bajo control transcripcional de Nrf2 se encuentran: NQO1 (del inglés *NADPH: quinoneoxidoreductase 1*), GST (del inglés *glutathione-S-transferases*), UGT (del inglés *UDP-glucuronosyltransferases*), MDR (del inglés *multidrug resistance-associated proteins*). No obstante, la lista de genes ha sido extendida a genes involucrados directamente en el metabolismo del H₂O₂ como catalasa, SOD y GPx (Jung y Kwak, 2010).

Nrf2 se encuentra normalmente en el citosol, unido a su inhibidor fisiológico Keap1 (del inglés *Kelch ECH-associated protein 1*). La ubiquitina ligasa Cullin 3/Rbx1 promueve la degradación de Nrf2 a través de su interacción con Keap1. En condiciones donde existe un incremento en la producción de especies oxidantes, la oxidación de cisteínas en Keap1 promueven su disociación de Nrf2, el cual se transloca al núcleo y activa la transcripción de sus genes diana (Canning y col., 2015).

Es importante destacar que el estrés oxidativo no es el único estímulo capaz de promover la transcripción mediada por Nrf2, pudiendo éste también disociarse de Keap1 luego de ser fosforilado por distintas quinasas (Cullinan y col., 2003).

3. Potenciales blancos intracelulares en la toxicidad del cobre

3.1. Mitocondria: Estructura y función

Las mitocondrias son organelas suspendidas en el citoplasma de las células eucariotas, compuestas por una doble membrana. La membrana interna delimita la matriz mitocondrial y el compartimiento delimitado entre las membranas interna y externa se denomina espacio intermembrana (EIM). En la mitocondria se lleva a cabo la síntesis de ATP mediante la oxidación de sustratos, empleando la energía liberada en la formación de un enlace de alta energía entre el ADP y el fosfato inorgánico (Pi). La membrana interna de la mitocondria es esencialmente impermeable y permite el pasaje de ciertas moléculas, en caso de que éstas posean un transportador en la membrana o una alta hidrofobicidad. Ciertos sustratos oxidables, tales como el piruvato, malato, glutamato o succinato, alcanzan la matriz a través de estos transportadores y son oxidados posteriormente por enzimas específicas, permitiendo la formación de equivalentes de reducción tales como el NADH. Estos equivalentes de reducción alimentan la maquinaria implicada en la síntesis de ATP. En la membrana interna se encuentra la cadena de transporte de electrones (CTE). La CTE consiste en una serie de complejos proteicos llamados comúnmente complejo I, complejo II, complejo III, complejo IV y complejo V. La energía liberada por los electrones transferidos del NADH al complejo I es acoplada a la extrusión de cuatro protones, H^+ , desde la matriz hacia el EIM. El complejo II oxida directamente al succinato sin extrusión de H^+ . Luego, los

complejos I y II reducidos transfieren sus electrones a la ubiquinona (Q) la cual es reducida a ubiquinol (QH₂). Debido a su alta hidrofobicidad, el QH₂ difunde libremente a lo largo de la membrana permitiendo el transporte de electrones hasta el complejo III. El complejo III reducido transfiere luego sus electrones al citocromo C que se encuentra atrapado en el EIM. Esta transferencia de electrones se acompaña de la traslocación de otros cuatro H⁺ al EIM. El citocromo C reducido transfiere sus electrones al complejo IV y éste reduce finalmente el O₂ a H₂O. El complejo IV bombea dos H⁺ adicionales al EIM. Debido a la impermeabilidad de la membrana interna, la extrusión de H⁺ por la CTE genera un gradiente de H⁺. La energía almacenada en este gradiente es acoplada luego a la formación de un enlace entre el ADP y el Pi por medio del complejo V (Fig. 7) (Mitchell, 1961).

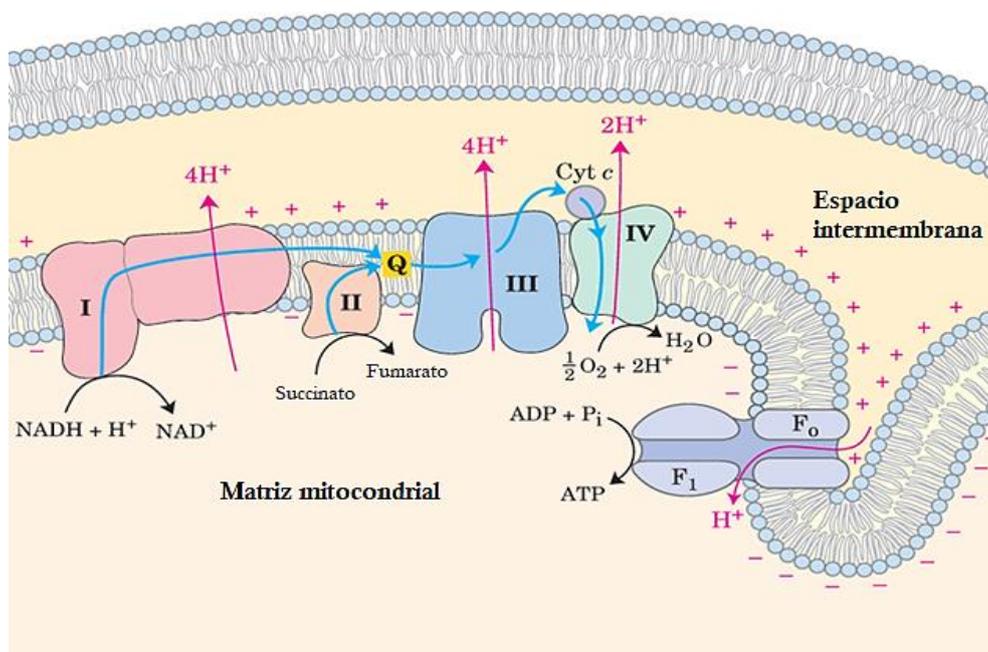


Figura 7. Representación esquemática de la cadena de transporte de electrones (Tomado y adaptado de Nelson y Cox, 2013)

Las mitocondrias aisladas en la fracción mitocondrial son capaces de respirar en presencia de los sustratos apropiados y reducir el O₂ a H₂O. La velocidad de consumo de O₂ depende de la disponibilidad de equivalentes de reducción y agentes desacoplantes. Sobre esta premisa se pueden definir los distintos estados metabólicos de las mitocondrias (Tabla 5).

Tabla 5. Estados metabólicos de las mitocondrias aisladas (Nelson y Cox, 2013)

Estado	Oxígeno	ADP	Sustrato	Consumo de O ₂	Factor limitante
1	disponible	bajo	bajo	lento	ADP
2	disponible	alto	muy bajo	lento	sustrato
3	disponible	alto	alto	rápido	CTE
4	disponible	bajo	alto	lento	ADP
5	no disponible	alto	alto	nulo	oxígeno

Luego de ser aisladas por un procedimiento experimental (Boveris y col., 2002), las mitocondrias poseen sólo pequeñas cantidades de sustratos y ADP. Es por ello que en ausencia de cualquier sustrato exógeno, se observa una velocidad de consumo de O₂ pequeña (Estado 1). El agregado exógeno de ADP incrementa la velocidad de consumo de O₂ ya que activa el complejo V (Estado 2), permitiendo el reingreso de los H⁺ desde el EIM hacia la matriz mitocondrial. De esta forma se disipa el gradiente de protones y el potencial de membrana. Los sustratos exógenos utilizados experimentalmente deben disponer de un transportador de membrana, como es el caso del succinato o poder ingresar a la matriz mitocondrial mediante un sistema de lanzaderas como en el caso del malato, a través de la lanzadera malato-glutamato. Una vez dentro de la matriz mitocondrial, el malato es oxidado por la enzima malato deshidrogenasa produciendo NADH y oxalacetato. El NADH es una molécula capaz de difundir y alcanzar el complejo I, cediendo así un par electrónico a la CTE.

El succinato que ingresa a la matriz mitocondrial es oxidado directamente por el complejo II y sus electrones son incorporados a la CTE sin un intermediario soluble. La adición de succinato o una mezcla de malato y glutamato y ADP produce un marcado incremento del consumo de O₂ (Estado 3). Una vez que la totalidad del ADP ha sido convertida en ATP, el complejo V se inactiva y el pasaje de H⁺ desde el EIM hacia la matriz mitocondrial se detiene. Debido a esto, la membrana se repolariza y el consumo de O₂ disminuye (Estado 4). A medida que las mitocondrias respiran, éstas consumen el O₂ del medio. Una vez que el O₂ se agota, la velocidad de consumo de O₂ disminuye a cero (Estado 5) (Nelson y Cox, 2013).

La reducción del O_2 a H_2O es una reacción que se lleva a cabo en el complejo IV. El mecanismo por el cual se produce esta reacción es particularmente delicado, ya que la reducción parcial del O_2 da origen al O_2^{\bullet} , que en altas concentraciones resulta tóxico para la célula. La reducción del O_2 se produce de tal forma que la molécula de O_2 queda retenida por el complejo IV hasta que ha sido reducida totalmente a H_2O . Si bien de esta forma se previene la formación de O_2^{\bullet} por parte del complejo IV, un porcentaje de electrones pueden llevar a la reducción univalente del O_2 a O_2^{\bullet} en otros sitios de la CTE. La principal fuga de electrones ocurre en el complejo I y el complejo III. El complejo I toma los electrones del NADH en la matriz mitocondrial y son transferidos al anillo isoaloxacina de la flavina mononucleótido (FMN) dentro del complejo, la cual es reducida a FMNH₂. La FMNH₂ es posteriormente oxidada y los electrones son transferidos a través de una serie *clusters* ferrosulfurados hasta alcanzar la ubiquinona (Q), reduciéndola a QH₂ (Voet y col., 2008). El QH₂ ubicado en el núcleo hidrófobo de la membrana lipídica difunde libremente hasta alcanzar el complejo III. Un pequeño porcentaje de los electrones transferidos desde el NADH al FMN, son luego transferidos al O_2 en lugar de al próximo cluster ferrosulfurado, generando de esta forma O_2^{\bullet} (Boveris y Turrens, 1980). Como las reacciones de transferencia de electrones del complejo I ocurren fundamentalmente en la matriz mitocondrial, la totalidad del O_2^{\bullet} producido es liberado a este compartimento. La rotenona (Rot), un inhibidor hidrofóbico del complejo I, se une al sitio de unión de Q en este complejo, bloqueando de esta forma la transferencia de electrones de la CTE. Debido al bloqueo, los sitios electroactivos del complejo I permanecen reducidos y se favorece la reducción univalente del O_2 , formando O_2^{\bullet} .

El QH₂ se encuentra en su forma reducida en la membrana interna de la mitocondria y migra a la membrana externa. El complejo III une al QH₂ en el sitio Q₀ y Q en el sitio llamado Q₁. El QH₂ unido a Q₀ transfiere un electrón al citocromo c1 a través del centro 2Fe-2S, y por medio del citocromo b_L, transfiere un segundo electrón al sitio b_H. El citocromo c1 transfiere luego su electrón al citocromo C. La Q producida por la oxidación de QH₂ es liberada del complejo III, mientras que la Q unida al sitio Q₁ permanece unida. Luego, otro QH₂ se une a Q₀, y transfiere un electrón, por medio del centro 2Fe-2S, al citocromo c1, y transfiere otro electrón, por medio del sitio b_L, al sitio b_H. Finalmente, el citocromo c1

transfiere su electrón al citocromo C. La QH₂, ahora oxidada a Q, es liberada del sitio Q₀, y Q en el sitio Q₁, es reducida a QH₂ y es liberada también (Ferguson y col., 2002). A causa de la naturaleza radicalaria de la especie producida durante la reducción de Q a QH₂, algunos electrones pueden ser transferidos directamente al O₂ para formar O₂^{•-}. El O₂^{•-} producido por el complejo III es liberado al EIM en un 75% mientras que el 25% restante es liberado hacia la matriz mitocondrial. El O₂^{•-} producido por el complejo III puede ser liberado tanto al EIM como a la matriz mitocondrial debido a la posible formación de HOO[•], la forma protonada del O₂^{•-}. Esta especie, al no estar cargada, puede difundir libremente a través de la membrana y alcanzar ambos compartimentos (Muller y col., 2004).

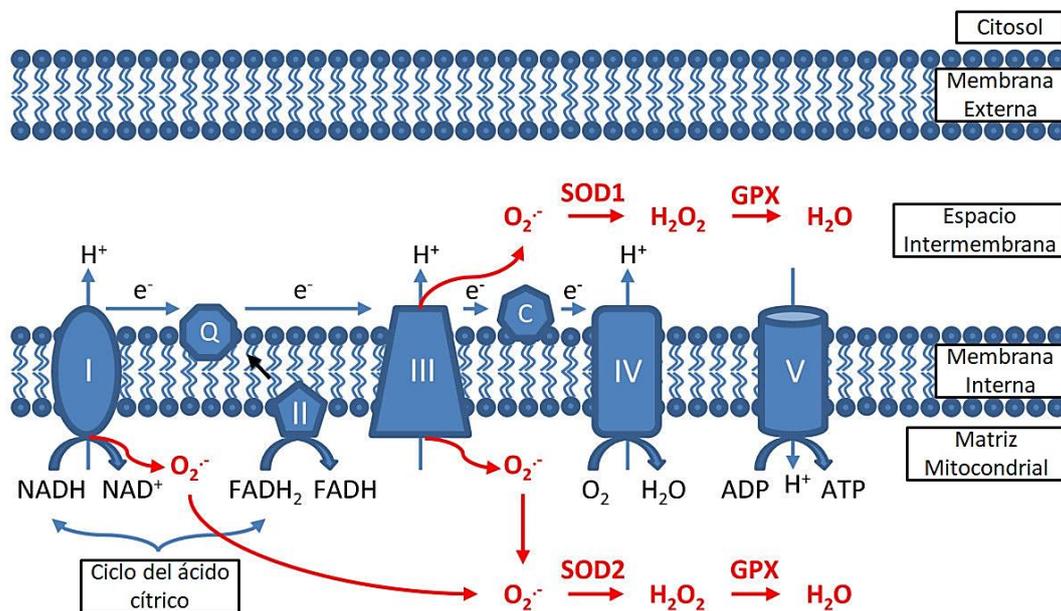


Figura 8. Producción mitocondrial de especies reactivas del oxígeno (Tomado y adaptado de Li y col., 2013)

El porcentaje de electrones que escapan de la CTE es considerablemente bajo, menor al 2% del flujo total de electrones. Sin embargo, esta situación es dependiente del estado metabólico en el cual se encuentran respirando las mitocondrias. En condiciones *in vitro*, las mitocondrias aisladas respirando en estado 4 presentan una membrana interna hiperpolarizada. En este estado metabólico, los sitios electroactivos de los complejos de la CTE se encuentran mayormente reducidos, por lo cual se facilita la reducción parcial del O₂ en los complejos I y III. Esta situación puede revertirse mediante el agregado de ADP

(estado 3) o un agente desacoplante como dinitrofenol (DNP), el carbonilcianuro-4-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) o el carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP).

El O_2^{\bullet} liberado a la matriz mitocondrial dismuta rápidamente formando H_2O_2 y O_2 . Esta reacción es acelerada por la enzima SOD2, de manera que la concentración en estado estacionario alcanzada de O_2^{\bullet} es muy pequeña. La enzima SOD1 presente en el EIM acelera la dismutación del O_2^{\bullet} que alcanza este compartimento (Fridovich, 1978). Al ser una molécula polar y pequeña, el H_2O_2 formado en la matriz mitocondrial es capaz de difundir hacia el EIM. Como se ha visto, el H_2O_2 es una molécula con una vida media relativamente prolongada y baja reactividad. Sin embargo, se ha señalado previamente en este texto que al reaccionar con Fe^{2+} o Cu^{1+} puede dar lugar a la reacción de Fenton y la formación de OH^{\bullet} (Fig. 5).

Paradójicamente, las mitocondrias, la principal fuente celular de ROS, son organelas particularmente susceptibles al daño oxidativo, dado que el 25% de la membrana interna mitocondrial está compuesta de fosfolípidos y alrededor del 30% de estos fosfolípidos son cardiolipina. La cardiolipina es un fosfolípido particular ubicado únicamente en la mitocondria. Este fosfolípido posee una estructura inusual que consiste en dos ácidos fosfatídicos unidos a una molécula de glicerol por los grupos fosfato. Cada ácido fosfatídico contiene dos ácidos grasos los cuales en el caso de la cardiolipina están usualmente altamente insaturados, como es el caso del ácido linoleico. La cardiolipina es conocida por estar estrechamente unida a las proteínas de la membrana mitocondrial y se cree que es esencial para la función proteica. La presencia de dobles enlaces conjugados en este fosfolípido lo vuelve susceptible de reaccionar con electrófilos y sufrir lipoperoxidación, alterando de esta forma la maquinaria de síntesis de ATP (Pope y col, 2008).

Se han reportado alteraciones en la función mitocondrial en pacientes con enfermedad de Wilson. Al comparar la actividad de los complejos mitocondriales en hígado de un grupo de pacientes con enfermedad de Wilson contra pacientes sanos se observó que la actividad de los complejos I, II, III y IV se encuentra disminuida. Los autores sugieren un trastorno en el metabolismo energético en la enfermedad de Wilson como consecuencia del daño oxidativo y la acumulación

mitocondrial de Cu (Gu y col., 2000). Sin embargo, es importante destacar que no está claro si la alteración de la función mitocondrial es una fuerza promotora de la toxicidad del Cu, o si ocurre en paralelo a la muerte celular inducida por la sobrecarga del metal.

3.2. Apoptosis

La apoptosis es un tipo particular de muerte celular con características que la diferencian morfológicamente de la necrosis. El proceso apoptótico comprende una secuencia de cambios que incluyen encogimiento celular, pérdida de las uniones intercelulares, condensación de la cromatina, *budding* celular y, finalmente, la fragmentación y rápida fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por fagocitos profesionales y células lindantes. Una característica de la apoptosis es la degradación del ADN en fragmentos cortos de doble cadena (Enari y col., 1998).

La muerte celular apoptótica depende en gran medida de las caspasas. Estas enzimas, pertenecientes a una familia altamente conservada de cisteín-proteasas, poseen un rol central en la fase de ejecutora de la apoptosis. Actualmente catorce enzimas pertenecientes a esta familia han sido reportadas en mamíferos. Las caspasas pueden ser divididas funcionalmente en dos grupos: las caspasas iniciadoras y las caspasas ejecutoras. Las caspasas iniciadoras son reclutadas por el receptor de muerte (DR, por el inglés *death receptor*) a través del dominio efector de muerte (DED, por el inglés *death effector domain*) (caspasas 8 y 10) o en el citosol por el dominio de reclutamiento de caspasa (CARD, por el inglés *caspase activation and recruitment domains*) (caspasas 2 y 9). La activación de las caspasas iniciadoras produce el clivaje proteolítico de las caspasas ejecutoras, caspasas 3 y 7. El clivaje de las caspasas 3 y 7 produce su activación y estas ejecutan la muerte apoptótica mediante el clivaje de blancos moleculares que incluyen mediadores o reguladores de la apoptosis, proteínas relacionadas con la reparación y el ciclo celular y proteínas del citoesqueleto que luego darán lugar a los cambios morfológicos observables microscópicamente (Elmore, 2007).

La cascada apoptótica puede ser iniciada por un gran número de estímulos y actualmente existe abundante evidencia que indica que el estrés oxidativo y la apoptosis son procesos celulares íntimamente relacionados. Estos diversos

estímulos poseen mecanismos específicos para iniciar el proceso apoptótico que convergen en una secuencia de eventos altamente conservados (Salvesen y col., 1999). Una situación de estrés oxidativo es capaz de producir la muerte de una célula tanto por necrosis como por apoptosis (Zamzami y col., 1995). El agregado de H₂O₂ o hidroperóxido de ter-butilo (tBOOH) en concentraciones subnecróticas han sido reportados como inductores de apoptosis (Hockenbery y col., 1993; Kane y col., 1993).

La apoptosis puede ser dividida en dos grupos, dependiendo del tipo de estímulo que gatille la muerte celular, conocidos como la vía extrínseca y la vía intrínseca. En la vía extrínseca, los ligandos de muerte, como Fas Ligando (FasL), se unen y activan los receptores de muerte, como Fas. El receptor activado, junto con moléculas adaptadoras como la proteína con dominio de muerte asociado a Fas (FADD, por el inglés *Fas-associated death domain*) y la caspasa 8 forman un complejo señalizador inductor de muerte celular (DISC, por el inglés *death-inducing signaling complex*) que activa la caspasa 8. La caspasa 8 activa posteriormente a la caspasa 3 y ésta ejecuta en última instancia la apoptosis (Fig. 9).

La vía intrínseca de la apoptosis involucra fundamentalmente a la mitocondria. La activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia de linfoma de células B 2 (BCL-2): proteína X asociada a BCL-2 (BAX) y antagonista asesino 1 de BCL-2 (BAK) produce la formación de poros a nivel de la membrana mitocondrial externa. Esto permite la salida de proteínas atrapadas en el EIM, como la proteína de unión a la proteína inhibidora de la apoptosis con bajo pI (DIABLO, también conocida como SMAC) y el citocromo c. Los factores proapoptóticos liberados al citosol producen la inhibición de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs, por el inglés *inhibitor of apoptosis proteins*), mientras que el citocromo c permite la activación de la caspasa 9 que luego activa a la caspasa 3. Los eventos que ocurren corriente abajo de la activación de la caspasa 3 son comunes tanto a la vía extrínseca como a la vía intrínseca de la apoptosis (Clarke y Tyler, 2009) (Fig. 9).

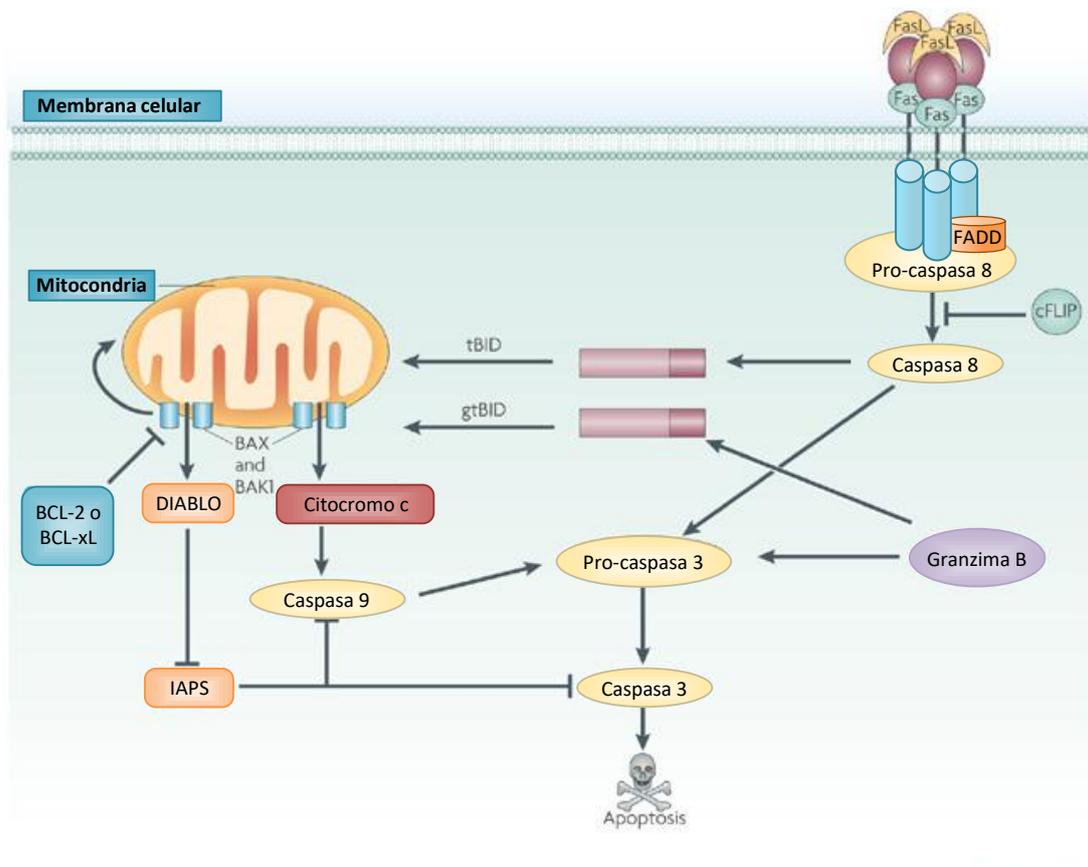


Figura 9. Esquema de la vía intrínseca y la vía extrínseca de la apoptosis (Tomado y adaptado de Clarke y Tyler, 2009).

Es importante remarcar que el estrés oxidativo implica un incremento en las concentraciones en estado estacionario de ciertas especies químicas reactivas capaces de modificar covalentemente macromoléculas presentes en la célula. Estas modificaciones dependen de varios factores como la identidad de estas especies así como la magnitud de aumento en sus concentraciones. Por otro lado, el sitio de origen de estas especies también limita los potenciales blancos oxidables. En conjunto, el estrés oxidativo es capaz de producir modificaciones en macromoléculas a las que se continuará una respuesta celular específica que dependerá de las características fisicoquímicas de las especies químicas presentes y su localización intracelular.

3.3. Proteostasis

Para cumplir una función específica, las proteínas deben alcanzar una conformación estructural denominado estado nativo. Luego de ser sintetizadas por

los ribosomas, las proteínas pasan por distintos estadios intermedios antes de alcanzar esta conformación nativa. Estos estados intermedios de los conformeros pueden ser no funcionales y existir debido a un mínimo en la energía libre. La energía necesaria para pasar de un estado intermedio a la conformación nativa suele ser pequeña, por lo cual es posible que incluso proteínas ya plegadas en su conformación nativa sufran una alteración en su estructura y pierdan su actividad, en especial en situaciones de estrés. Los estados intermedios de plegamiento, incluyendo los conformeros incorrectamente plegados suelen exponer al solvente, residuos hidrófobos que normalmente se encontrarían inaccesibles en la conformación nativa de la proteína. Estos residuos tienden a promover la agregación de las proteínas (Mosser y Morimoto, 2004) (Fig. 10).

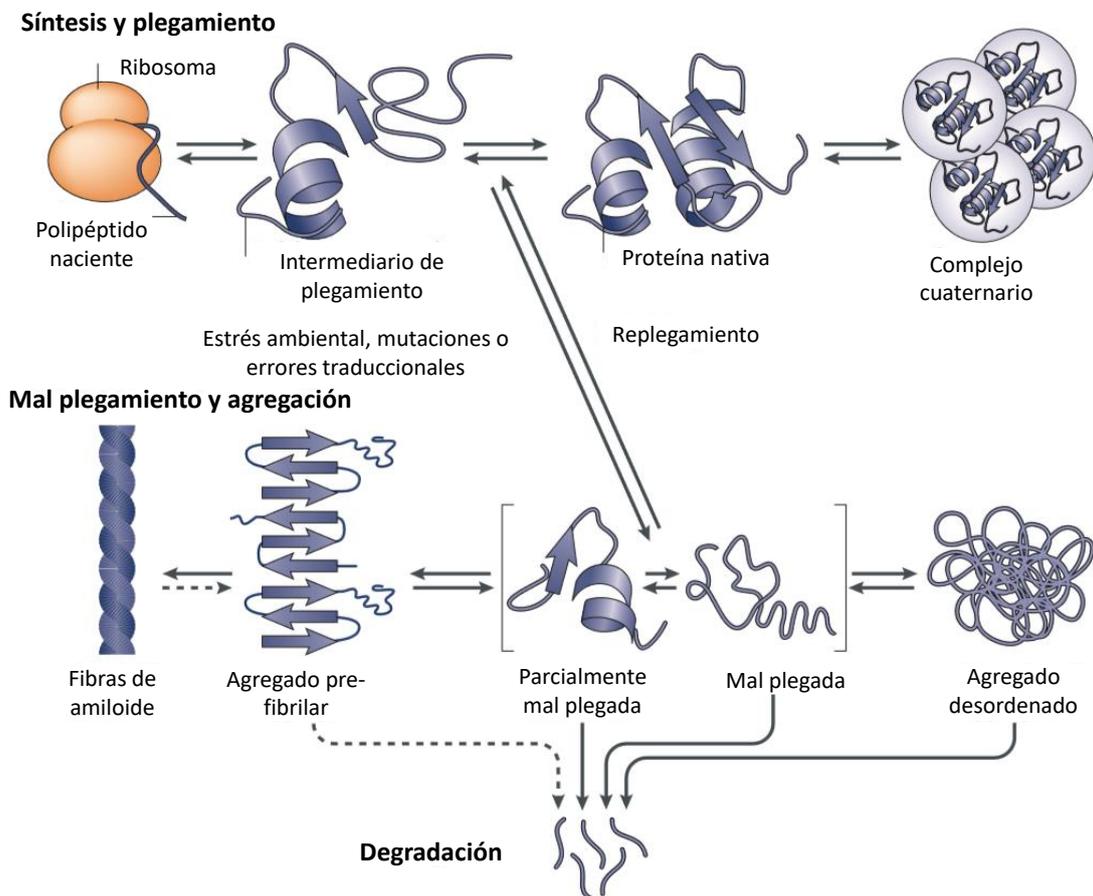


Figura 10. Esquema general del mantenimiento de la homeostasis de las proteínas (Tomado y adaptado de Tyedmers y col., 2010).

El Cu es capaz de formar complejos con los elementos azufre, nitrógeno y oxígeno presentes en las proteínas (Tamás y col., 2014). Por ello, es posible que la

interacción de este metal con las cadenas laterales de las proteínas estabilice estados conformacionales no nativos propensos a agregarse.

Las células han desarrollado mecanismos para el control de calidad de las proteínas. Esto se logra mediante chaperonas moleculares que facilitan el plegamiento de las proteínas y el re-plegamiento de proteínas incorrectamente plegadas (Mosser y Morimoto, 2004).

En caso de que las células detecten una carga elevada de proteínas incorrectamente plegadas, éstas pueden poner en marcha una respuesta para incrementar el replegamiento. Estas respuestas dependen del compartimento donde se origine la alteración de la proteostasis, pudiendo ocurrir por un incremento en la carga de proteínas incorrectamente plegadas en el citosol, en el retículo endoplásmico o en la mitocondria.

3.3.1. Respuesta de choque térmico

Inicialmente, en la década de los sesenta, Ritossa identificó regiones hinchadas, inducidas por altas temperaturas, en los cromosomas de las glándulas salivares de *Drosophila melanogaster* (Ritossa, 1962). En la década siguiente, se demostró que esas zonas abultadas en los cromosomas se debían a una robusta transcripción en genes que codificaban HSPs (del inglés *heat shock proteins*), las cuales funcionaban como chaperonas moleculares.

Las HSPs son proteínas capaces de asistir en el plegamiento de numerosas proteínas mediante la interacción transitoria entre el sitio de unión al sustrato y secuencias peptídicas hidrofóbicas en las proteínas. Las HSPs pueden encontrarse en un estado de baja afinidad por el sustrato cuando la proteína une ATP y un estado de alta afinidad por el sustrato cuando la proteína se encuentra unida a ADP. Es por ello que la unión y la hidrólisis del ATP determinan la unión y posterior liberación del sustrato en su conformación nativa. La participación en el proceso de plegamiento de las HSPs está controlado adicionalmente, por la interacción entre chaperonas pertenecientes a diferentes familias, co-chaperonas que regulan la actividad de las HSPs y factores que promueven el intercambio de nucleótidos (Mayer y Bukau, 2005).

3.3.2. Estrés del retículo endoplásmico

El retículo endoplásmico (RE) es una organela involucrada en promover el correcto plegamiento de las proteínas, la translocación de las proteínas y de llevar a cabo modificaciones postraduccionales en las proteínas. Las perturbaciones en las funciones del retículo endoplásmico resultan en la activación de la UPR (del inglés *unfolded protein response*). La UPR se inicia por la activación de tres proteínas de señalización, IRE1 α (del inglés *inositol-requiring protein 1- α*), PERK (del inglés *protein kinase RNA (PKR) like ER kinase*) y ATF6 (del inglés *activating transcription factor 6*). Cuando la carga de proteínas mal plegadas en el RE es baja, la chaperona HSPA5 (también conocida como BiP o grp87) se encuentra unida a PERK y ATF6 manteniendo a estas proteínas en un estado inactivo. Al acumularse las proteínas mal plegadas, HSPA5 se libera de PERK y ATF6 para promover el correcto plegamiento y en consecuencia PERK y ATF6 se activan. IRE1 α parece interactuar directamente con proteínas incorrectamente plegadas llevando así su activación (Fig. 11).

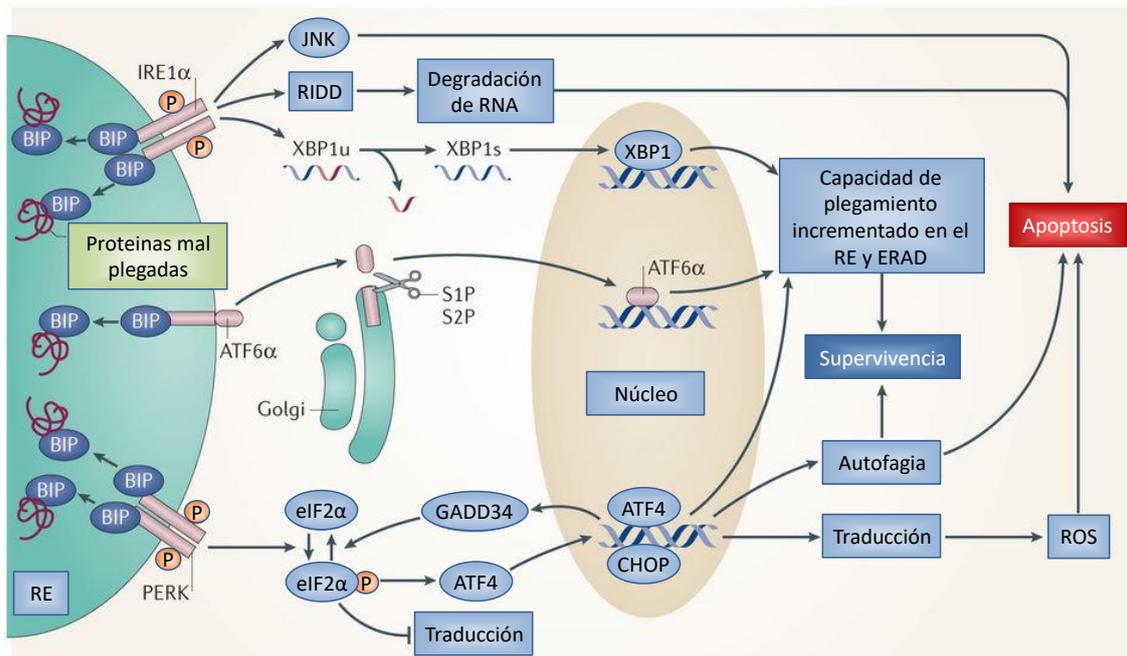


Figura 11. Esquema de las tres ramas de la UPR dependientes de PERK, ATF6 e IRE1 α (Tomado y adaptado de Wang y Kaufman, 2014).

La activación de las tres ramas de la UPR tiene como fin aliviar el estrés del RE mediante la inducción de chaperonas residentes en este compartimento, detener

el ingreso de proteínas al retículo endoplásmico mediante la inhibición de la traducción y estimular el transporte retrogrado de proteínas desde el RE hacia el citosol para su ubiquitinación y posterior destrucción en un proceso llamado ERAD (del inglés *ER-assisted degradation*) (Sano y Reed, 2013).

PERK es la principal proteína involucrada en la atenuación de la traducción de mRNA. Esto se lleva a cabo mediante la fosforilación de eIF2 α (del inglés *eukaryotic translation initiation factor 2*). Adicionalmente, la fosforilación de eIF2 α permite la traducción de genes necesarios para la UPR, como ATF4 (del inglés *activating transcription factor 4*). ATF4 promueve luego la transcripción de DDIT3/CHOP (del inglés *transcriptional factor C/EBP homologous protein*), GADD34 (del inglés *growth arrest and DNA damage-inducible 34*) y ATF3 (del inglés *activating transcription factor 3*). PERK también es capaz de fosforilar a Nrf2 (del inglés *nuclear erythroid 2 p45-related factor 2*), facilitando de este modo su disociación de Keap1 y promoviendo la transcripción de genes bajo control transcripcional de Nrf2 (Sano y Reed, 2013).

IRE1 α es una proteína transmembrana del retículo endoplásmico con actividad quinasas y endonucleasa. Al incrementarse la carga de proteínas incorrectamente plegadas en el retículo endoplásmico, IRE1 se oligomeriza y se autofosforila. El dominio extracelular de IRE1 procesa un intrón en el mRNA de XBP-1 (del inglés *X-box binding-protein 1*). Luego, XBP-1 promueve la transcripción de genes involucrados en la UPR y ERAD (Sano y Reed, 2013).

ATF6 es una proteína de membrana del retículo endoplásmico que, frente a una sobrecarga de proteínas incorrectamente plegadas en este compartimento, se transloca al Golgi. En el Golgi, ATF6 es clivada por las proteasas S1P y S2P. La fracción clivada N-terminal de ATF6 se transloca al núcleo donde se une a elementos de respuesta CRE (del inglés *ATF/cAMP response elements*) y ERSE-1 (del inglés *ER-stress response elements*) (Sano y Reed, 2013).

3.3.3. Estrés en el plegamiento proteico mitocondrial

La mitocondria está compuesta por alrededor de 1500 proteínas. La gran mayoría de estas proteínas son codificadas por el núcleo, mientras que sólo trece

proteínas involucradas en la CTE son codificadas por el ADN mitocondrial. Es por ello que las proteínas sintetizadas en el citosol deben ser transportadas desde este compartimento a su localización en la mitocondria. Debido a que estas organelas poseen una matriz mitocondrial rodeada por el EIM, el transporte de proteínas desde el citosol a hacia la matriz requiere una maquinaria de translocación compleja. Este proceso es llevado a cabo por una translocasa ubicada en la membrana externa (TOM, del inglés *translocase of outer membrane*) y una translocasa ubicada en la membrana interna (TIM, del inglés *translocase of inner membrane*). La maquinaria de translocación reconoce la secuencia MTS (del inglés *N-terminal matrix-targeting sequence*) en proteínas cuyo destino final sea la mitocondria y permiten su ingreso a la matriz mitocondrial en la forma desplegada. Luego, la señal MTS es clivada y las proteínas adquieren su conformación nativa, en un proceso asistido por chaperonas (Neupert y Hermann, 2007).

La maquinaria de asistencia en el plegamiento proteico mitocondrial se compone fundamentalmente de chaperonas mtHSP70s, que facilitan el plegamiento de las proteínas a medida que ingresan a la matriz, y de HSP10-HSP60, las cuales asisten en el plegamiento de las proteínas directamente en la matriz mitocondrial (Chacinska y col., 2009).

Al incrementarse la carga de proteínas incorrectamente plegadas en la mitocondria se pone en marcha la mtUPR (del inglés *mitochondrial unfolded protein response*). Esta respuesta consiste en la estimulación de la transcripción de genes que permitan aliviar el estrés proteostático, tales como YME1L1, PMPCB, TIMM17A, NDUFB2, ENDOG y TXN2, entre otros. Si bien la regulación a nivel transcripcional de la mtUPR no ha sido completamente descrita, el heterodímero formado por el factor de transcripción CHOP y C/EBP β ha sido relacionado a la inducción de estos genes. El factor de transcripción CHOP muestra una fuerte inducción frente al estrés proteotóxico a nivel mitocondrial. Sin embargo, este factor también se induce en la UPR, por lo cual no es específico en la mtUPR (McCullough y col., 2001).

3.3.4. Ubiquitinación y degradación de proteínas por el proteasoma

El proteasoma es una estructura celular presente tanto en el núcleo como en el citosol que permite la degradación de proteínas dañadas, incorrectamente plegadas o simplemente innecesarias. La estructura del proteasoma consiste en cuatro anillos constituidos por siete proteínas cada uno, los cuales se encuentran apilados formando un cilindro con un poro central. Los anillos internos poseen actividad proteasa, mientras que los anillos externos funcionan a modo de compuerta, reteniendo la proteína en el interior del cilindro mientras es degradada en péptidos pequeños de 7-8 aminoácidos. Adicionalmente, los anillos externos poseen la función de reconocer y permitir el acceso al poro central, de las proteínas que han sido marcadas para la degradación proteasómica mediante la conjugación con ubiquitina (Nassif y col., 2014).

La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos que actúa como marca señalizadora para la degradación proteasómica. El grupo carboxilo de la glicina en la posición 76 se conjuga normalmente al grupo amino de la cadena lateral de un residuo de lisina en la proteína blanco. A su vez, la ubiquitina posee residuos adicionales de lisina en su estructura primaria, lo cual permite la formación de cadenas de poliubiquitina.

La marcación por ubiquitina es un proceso altamente modular que requiere tres pasos fundamentales, los cuales permiten una elevada especificidad en la selección de los blancos moleculares. El primer paso consiste en la activación de la molécula de ubiquitina mediante la enzima activadora de ubiquitina (E1). En este paso se emplea la energía liberada por la hidrólisis de ATP y pirofosfato para formar un adenilato de ubiquitina conjugado a la enzima E1. Luego, una cisteína reactiva de E1 forma un enlace tioéster de alta energía con la ubiquitina liberando el AMP. La ubiquitina activada es posteriormente transferida a un residuo cisteína en la enzima conjugadora de ubiquitina (E2). Finalmente E2 es capaz de transferir esa ubiquitina directamente a la proteína diana o puede actuar en cooperación con la enzima ubiquitina ligasa (E3) (Fig. 12).

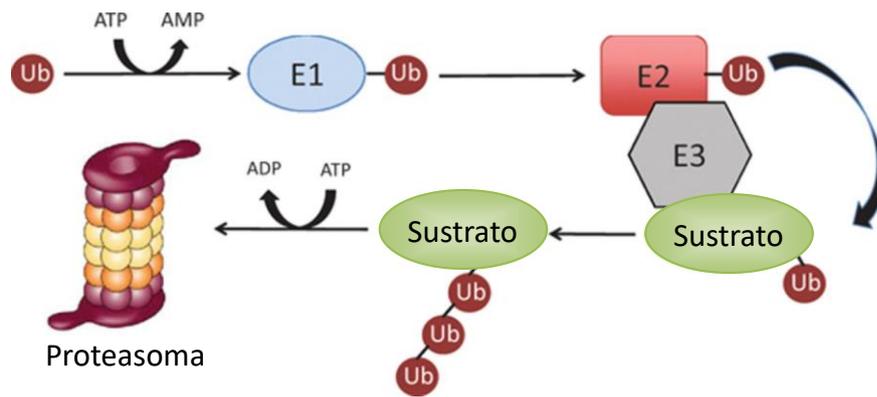


Figura 12. Esquema del proceso de degradación de proteínas por el proteasoma (Tomado y adaptado de Pagan y col., 2013).

Es importante remarcar que la especificidad del sistema de marcación con ubiquitina está dada fundamentalmente por la gran variedad de enzimas E3, las cuales poseen reducidos blancos moleculares y las menos numerosas enzimas E2 que actúan sobre grupos específicos de enzimas E3. En contraste, sólo se conoce una enzima E1, altamente conservada en la evolución (Myung y col, 2001).

3.4. Autofagia

La autofagia es un proceso mediante el cual el contenido citosólico es engullido por una doble membrana y los componentes celulares son degradados y reciclados. La autofagia puede a su vez ser dividida en macroautofagia, microautofagia, CMA (del inglés *chaperone mediated autophagy*) y mitofagia.

La macroautofagia es el proceso autofágico más común, donde los componentes celulares como proteínas o incluso organelas dañadas son engullidos por una vesícula de doble membrana, conocida como autofagosoma.

En condiciones fisiológicas, la autofagia se encuentra inhibida mediante la fosforilación de las quinasas ULK1-2 (del inglés *Unc-51-like kinase*) por mTOR1 (del inglés *mechanistic target of rapamycin*) o AMPK (AMP quinasa). Frente a una disminución de la disponibilidad de aminoácidos o inhibidores farmacológicos de mTOR1, las enzimas ULK1-2 se liberan de la fosforilación inactivante e inicia el proceso autofágico. Las quinasas ULK1-2 forman parte de un complejo multiproteico en el citosol y su activación resulta en la fosforilación y activación de Beclin-1, la cual es parte de un complejo multiproteico diferente, que incluye la enzima VPS34 (Kang y col, 2011). Esta última corresponde a la familia de inositol

3-fosfato quinasa de clase III. Luego, los complejos correspondientes a ULK1-2 y a Beclin-1 activadas se relocalizan al sitio de iniciación de la autofagia, conocido como fagoróforo. La enzima activada VPS34 fosforila el fosfatidilinositol produciendo fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) en la superficie del fagoróforo y esta modificación es empleada como sitio de anclaje para distintas proteínas capaces de unir PI3P, como WIPI2 (del inglés *WD-repeat protein interacting with phosphoinositides*). Luego, WIPI2 es capaz de unir Atg16L (Proikas-Cezanne y col., 2015).

Para llevar a cabo el proceso autofágico es necesaria la unión covalente de Atg12 a Atg5, en una reacción tipo-ubiquitinación. Atg12-Atg5 interactúa luego con Atg16L para formar un complejo tipo ubiquitina ligasa (Hanada y col, 2007). Este complejo une y activa Atg3, la cual une covalentemente las proteínas tipo ubiquitina LC3A-C y GABARAPL1-3, a la fosfatidiletanolamina presente en la superficie de la membrana (Kabeya y col, 2004). La unión de LC3 a la membrana contribuye al cierre del autofagosoma y permite la interacción con diferentes cargos, como p62. Finalmente, el autofagosoma se fusiona con el lisosoma y el contenido es degradado (Cicchini y col., 2015) (Fig. 13).

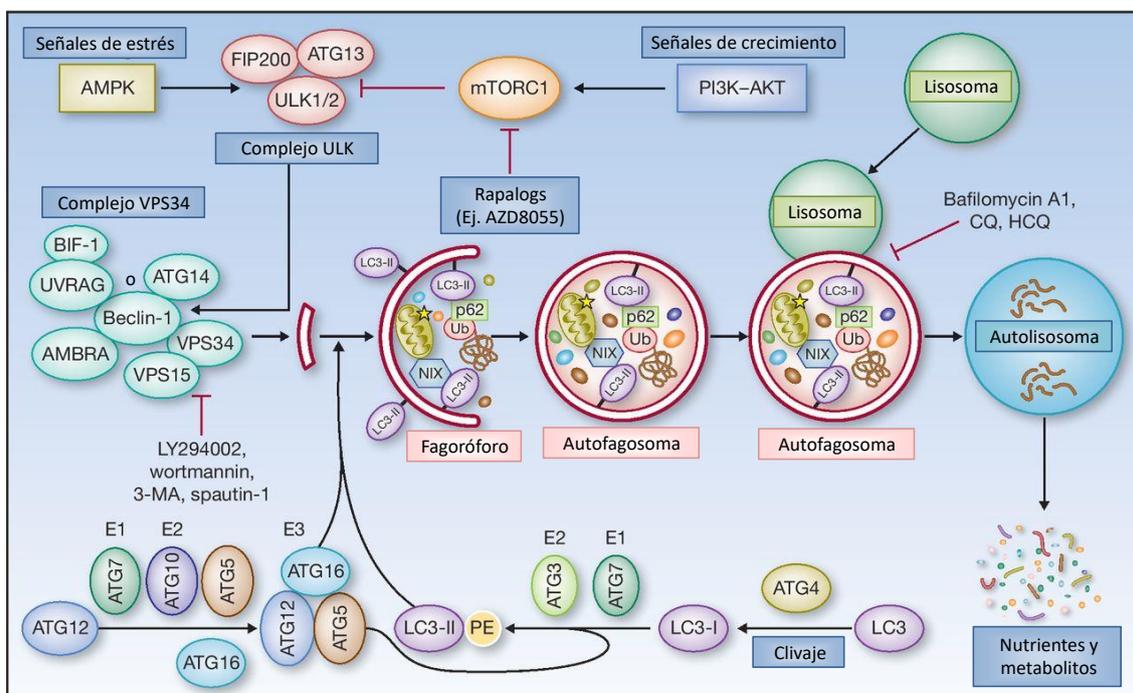


Figura 13. Esquema del proceso autofágico (Tomado y adaptado de Cicchini y col., 2015).

Hipótesis

La sobrecarga celular de iones Cu resulta tóxica y produce en última instancia la muerte de la célula. La capacidad del Cu^{1+} libre de promover la lipoperoxidación en presencia del H_2O_2 producido de manera endógena por la célula genera estrés oxidativo y este proceso puede afectar la función de organelas como la mitocondria. Sin embargo, el estrés oxidativo no es la principal fuerza impulsora de la muerte celular ya que los iones Cu^{1+} o Cu^{2+} podrían interactuar directamente con proteínas alterando su estructura y función, independientemente del carácter pro-oxidante del metal. Finalmente, el deterioro de la función proteica puede llevar a la activación de caspasas y a la muerte apoptótica.

Objetivo

Objetivo general

Determinar la naturaleza de los procesos que dirigen la muerte celular inducida por la sobrecarga aguda de cobre analizando la relevancia de la interacción del metal con la mitocondria, el balance redox celular dado por los grupos tioles y el GSH, la apoptosis, y otros procesos no sospechados que pudieran estar involucrados.

Objetivos específicos

1) Evaluar la función mitocondrial en el daño oxidativo inducido por la sobrecarga aguda de Cu en hígado de rata y en sistemas celulares.

2) Estudiar las consecuencias sobre la funcionalidad mitocondrial de la acción directa de los iones Cu sobre las biomoléculas presentes en estas organelas y la interacción entre las especies $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 producidas por las mitocondrias.

3) Estudiar la participación de los grupos tioles y moléculas antioxidantes en la protección celular frente a la sobrecarga de iones Cu en cultivos celulares.

4) Estudiar mediante el uso de micromatrices de ADN la respuesta genómica frente a una sobrecarga de iones Cu en cultivos celulares, para comprender los procesos celulares afectados.

5) Estudiar la participación de vías apoptóticas en la muerte celular inducida por sobrecarga de iones Cu en cultivos celulares.

Materiales y métodos

1. Modelos experimentales *in vivo*

Las ratas Sprague-Dawley (220 ± 10 g) machos fueron adquiridas en el Bioterio Central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (UBA). Los animales fueron aclimatados en el laboratorio por lo menos 48 horas antes de los experimentos y mantenidos en un ambiente controlado de temperatura (23-25 °C) y humedad (50%) con ciclos alternados cada 12 horas de luz-oscuridad, alojados en jaulas de polipropileno de 43 x 27 x 15 centímetros, en grupos de 3 a 4 animales por jaula. Recibieron una dieta estándar y agua *ad libitum*. Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales y reducir el número de ejemplares utilizados. Los animales fueron manipulados en cumplimiento de las regulaciones bioéticas nacionales (ANMAT) e internacionales (*Guidelines for Ethical Treatment in Animal Experimentation of the American Physiological Society*, BethesEMA, MD, USA) y del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAL) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA (protocolo experimental aprobado según Exp-UBA: 0047226/16, Res.D. n° 3685/16).

1.1. Sobrecarga aguda de cobre

Para estudiar el curso temporal de la sobrecarga del metal, un grupo de animales recibió una única dosis de $5 \text{ mg Cu}^{2+} \cdot \text{kg}^{-1}$ (solución acuosa) intraperitoneal (i.p.) y los sacrificios se realizaron a las 2, 4, 6, 16 y 24 horas (h) post-inyección. A los animales control se les inyectó un volumen igual de solución fisiológica (NaCl 0,9%).

Al cabo del tratamiento, los animales fueron anestesiados con una solución acuosa de uretano 15% p/v ($1,5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) (i.p.). Mientras se encontraban anestesiados, se determinó la quimioluminiscencia *in situ* de hígado. Luego, los animales fueron sacrificados y se les extrajo el hígado.

1.2. Preparación de las muestras

1.2.1. Preparación de homogeneizados

Para la mayoría de las determinaciones realizadas en el modelo de sobrecarga aguda *in vivo* de cobre, se prepararon homogeneizados del órgano según

el protocolo de Boveris y col. (1972). Éste consistió en suspender los hígados extraídos de los animales en solución fisiológica a 0 °C en un baño de hielo y cortarlos en pequeños trozos (2-4 mm de lado) con tijeras. Los cortes de tejido se lavaron tres veces con solución fisiológica para eliminar restos de sangre. Luego fueron suspendidos en buffer fosfato (PBS, por el inglés *phosphate buffer solution*) 30 mM en KCl 120 mM (pH 7,40) en una relación 9:1 (mL . g⁻¹ órgano). Las muestras fueron pesadas antes de comenzar la preparación en una balanza analítica (Ohaus Adventurer, OHAUS Corp, USA) con sensibilidad 0,001 g. La suspensión mantenida a 0 °C en un baño de hielo se homogeneizó en un homogeneizador Potter-Elvehjem y luego se centrifugó a 600 g a 0-2 °C (Sorvall RC, 2Ba, rotor SS34). Luego de 10 minutos (min) de centrifugación, se descartó el *pellet* conteniendo células enteras, eritrocitos, núcleos y restos de tejido; mientras que se conservó el sobrenadante, compuesto por una suspensión de organelas intactas que conforma el homogeneizado.

Para la determinación del contenido de GSH, el homogeneizado se preparó en ácido perclórico (HClO₄) 0,5 M, en una relación 50:1 con el tejido. Al igual que para los homogeneizados anteriores, la muestra se cortó con tijera en pequeños trozos y se homogeneizó en el homogeneizador Potter-Elvehjem en un baño de hielo a 0 °C. Se centrifugó a 600 g por 10 min a 0-2 °C (Sorvall RC, 2Ba, rotor SS34) y se recuperó el sobrenadante, que fue guardado a -20 °C para su uso posterior.

1.2.2. Aislamiento de mitocondrias

Los hígados recién extraídos de los animales se cortaron, pesaron y suspendieron en una solución de manitol 0,23 M, sacarosa 0,07 M, EDTA 1 mM y Tris-HCl 10 mM a pH 7,4 (medio de aislamiento/re-suspensión) en una relación de 5 mL por g de tejido. El tejido fue cortado finamente con tijeras y lavado al menos tres veces. La preparación se pasó por un homogeneizador Potter-Elvehjem en un baño de hielo a 0 °C y se centrifugó a 600 g (Sorvall RC-5C Automatic Superspeed Refrigerated Centrifuge, rotor 09) durante 10 min a 2-4 °C. Se descartó el *pellet* (núcleo, células enteras y otros tejidos no-celulares) y el sobrenadante fue centrifugado nuevamente a 8000 g durante 10 minutos a 2-4 °C. Se descartó el

sobrenadante y el nuevo *pellet* fue re-suspendido en el medio de aislamiento/re-suspensión (Boveris y col., 2002).

2. Modelos experimentales *in vitro*

2.1. Toxicidad del Cu y protección antioxidante en mitocondrias aisladas de hígado de rata

Se obtuvo el hígado de ratas sanas previamente anestesiadas mediante una inyección i.p. de uretano al 15% (1,5 g por kg de peso). Las mitocondrias se aislaron por centrifugación diferencial como se describió previamente en 1.2.2. pero en un buffer de aislamiento/re-suspensión libre de EDTA. Se procedió a evaluar el consumo de oxígeno y daño a fosfolípidos de las mitocondrias expuestas a diferentes concentraciones (10 a 200 μM) de Cu así como también en presencia de sustancias antioxidantes (glutación 4 mM, N-acetilcisteína 4 mM). Se evaluó también la capacidad del metal de interaccionar con los grupos tioles mitocondriales.

2.2. Toxicidad del Cu en diferentes cultivos celulares

Se evaluaron los efectos tóxicos del Cu en células de diferentes líneas y cultivos primarios, que se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Nomenclatura de los tipos celulares utilizados en los cultivos.

Células	Descripción
Líneas celulares	
MEFs	Fibroblastos embrionarios murinos
Hepa1-6	Hepatocitos inmortalizados de hepatoma de ratón
BEAS-2B	Células de epitelio bronquial humano
HeLa	Células inmortales de cáncer de cuello de útero
HCT116	Células epiteliales de carcinoma de colon humano
J774A.1	Macrófagos de ratón BALB/c
Vero	Células epiteliales de riñón de mono verde africano
Cultivo primario	
Hepatocitos	Hepatocitos murinos
BAECs	Células endoteliales de aorta

Las células fueron conservadas e incubadas en estufas de cultivo en una atmósfera humidificada a 37 °C y 5% CO₂ y manipuladas en el flujo laminar. Para

los experimentos, se sembraron en placas en medio DMEN (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*) con suero fetal bovino (FBS) al 10% y penicilina y estreptomina al 1%. La exposición al Cu en el medio de cultivo se logró mediante diluciones en medio DMEN de una solución madre de CuSO_4 100 mM para obtener concentraciones finales de 100 a 3000 μM Cu^{2+} . Para algunos experimentos, se agregó también al medio de cultivo N-acetilcisteína (NAC), glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) en concentraciones finales de 250 a 4000 μM . Para estudiar el rol del GSH, para algunas determinaciones se depletaron las células de este antioxidante con butioninasulfoximina (BSO) 1 mM.

2.2.1. Lisado celular

Para las determinaciones llevadas a cabo en lisados celulares, las células de los cultivos fueron despegadas de la placa con tripsina y lavadas con PBS. Se agregó buffer de lisis (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Tritón X-100, mezcla comercial de inhibidores de fosfatasa, *cocktail* inhibidor de proteasa) en una cantidad de 50 μL cada 5×10^6 células. Luego de 10 min de incubación a 0°C, se centrifugó a 13000 revoluciones por minuto (r.p.m.) por 5 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo.

3. Determinaciones de estrés y daño oxidativo

3.1. Determinación de quimioluminiscencia de órgano *in vivo*

La quimioluminiscencia de órgano *in situ* es un ensayo indirecto no invasivo y no destructivo. Se utiliza para evaluar la peroxidación lipídica *in vivo* en condiciones fisiológicas y se basa en la medida de la emisión de la transición de un electrón desde un estado excitado a un estado basal en las especies $^1\text{O}_2$ y carbonilos excitados, que se produce durante las reacciones en cadena de la peroxidación lipídica. Este procedimiento fue desarrollado por Boveris y col. (1980).

Mediante una cirugía se deja al descubierto el órgano que será expuesto directamente a un detector. Para la lectura de la luz emitida se emplea un contador de fotones diseñado en *Johnson Research Foundation* por Boveris y col. (1980) para esta determinación.

En resumen, la emisión de fotones es proporcional al contenido de la especie excitada $^1\text{O}_2$, que es un indicador de daño oxidativo, de acuerdo a la etapa final de la reacción en cadena de la peroxidación lipídica. Los resultados se expresan en cuentas por segundo (cps; 1 cps corresponde a 10^3 fotones por segundo) por cm^2 de superficie expuesta (hígado).

3.2. Oxidación de proteínas medida como contenido de carbonilos

La oxidación de proteínas fue determinada por la absorbancia a 360 nm del producto de reacción de la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) y los grupos carbonilo de las proteínas en los homogeneizados de hígado (Reznick y Packer, 1994) (Fig. 14). Inmediatamente, se agregaron 2 mL de DNPH $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (en HCl 2,5 M) a 1 mL de homogeneizado (o una dilución de éste) y se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 1 hora, agitando cada 15 min. Al cabo de esta incubación, se agregaron 2,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 20% a cada tubo y se incubó durante 10 min a 0°C en un baño de hielo. Luego, los tubos se centrifugaron en una centrífuga de mesada (Rolco) durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se re-suspendió el *pellet* en TCA 10% y se centrifugó durante 3 minutos. El *pellet* de esta centrifugación se lavó de 3 a 5 veces en una mezcla 1:1 de etanol y acetato de etilo. Por último, el *pellet* se disolvió en 2 mL de una solución de guanidina 6 M (en HCl 2,5 M) y se incubó durante 10 min a 37°C en un baño termostático (baño termostático Vicking Modelo Dubnoff). Se midió la absorbancia de la disolución en un espectrofotómetro (Hitachi, Modelo U-2000) a 360 nm.

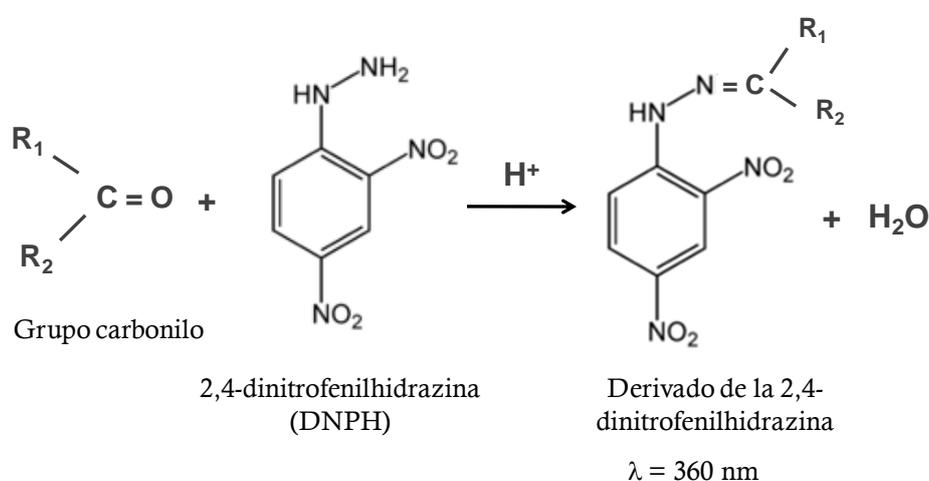


Figura 14. Esquema de la reacción de los grupos carbonilo de las proteínas oxidadas con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar la correspondiente hidrazona.

3.3. Oxidación de fosfolípidos medida como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

La oxidación de fosfolípidos se cuantificó a través de la medida de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en los homogeneizados de hígado de rata (Ohkawa y col., 1976; Fraga y col., 1988) (Fig. 15). El ensayo consistió en tratar 1 mL de la muestra con 0,1 mL de butilhidroxitolueno (BHT) al 4% en etanol a 1 mL. Luego se agregó 1 mL de TCA 20% para precipitar las proteínas y se centrifugó durante 10 min a velocidad media (centrífuga de mesada Rolco). Se recuperó el sobrenadante, al cual se le agregó 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,7% P/V en un tubo nuevo. La mezcla fue calentada a 100 °C (baño termostático Vicking Modelo Dubnoff) durante 60 min y se midió la absorbancia de la solución rosada a 535 nm ($\epsilon = 156 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) en un espectrofotómetro (Hitachi, Modelo U-2000). Los resultados se expresaron como nmol de TBARS por g de órgano o por mg de proteína.

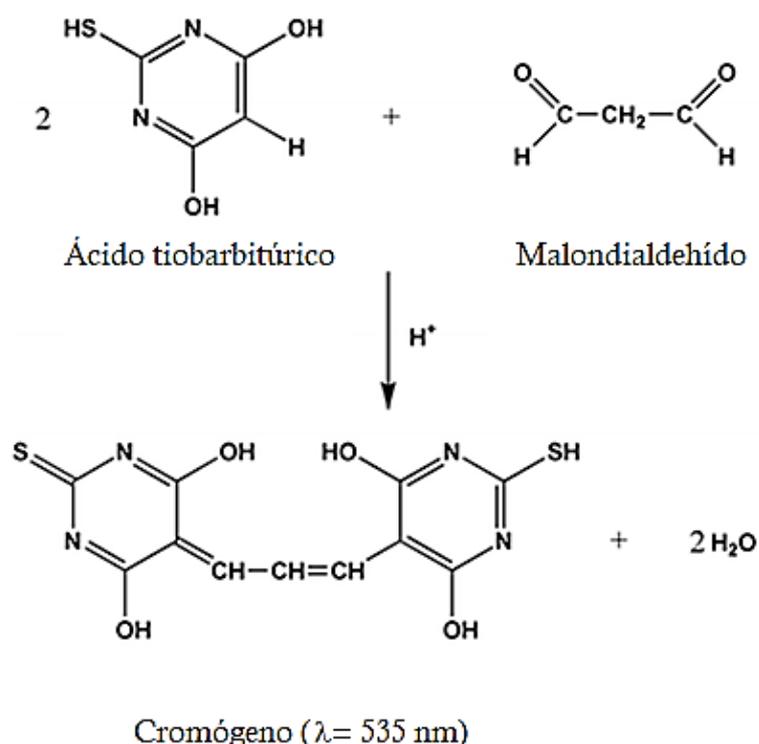
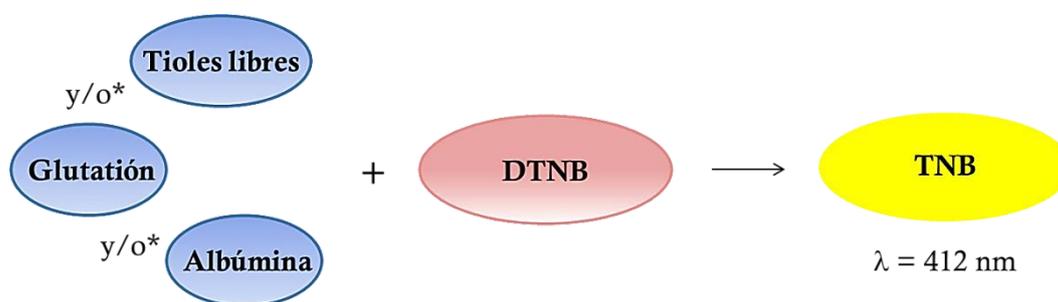


Figura 15. Reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con el malondialdehído (MDA) para formar el derivado de color rosa que se detecta espectrofotométricamente a 535 nm.

En el caso de la medida realizada en mitocondrias, éstas fueron lavadas dos veces con PBS 100 mM para eliminar los restos de manitol y sacarosa del buffer de aislamiento que interferiría en la determinación.

3.4. Antioxidantes endógenos no enzimáticos

El contenido de GSH se puede determinar mediante la reacción descrita para compuestos no proteicos con grupos tioles (-SH) con el ácido (5,5'-ditio-bis)-2-nitrobenzoico (DTNB) para formar el producto 5-tionitrobenzoato (TNB), que puede ser determinado espectrofotométricamente (Tiezte, 1969) (Fig. 16). Al momento de la medida, los homogeneizados de hígado preparados en ácido perclórico 0,5 M fueron neutralizados con K_3PO_4 2 M. El medio de reacción consistió en PBS 100 mM (pH 7,20). El GSH de la muestra (30 μ L de muestra en 1 mL final en la cubeta) fue determinado por su reacción con DTNB para formar TNB ($\epsilon_{412} = 13,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) de color amarillo que se determina espectrofotométricamente (Hitachi, Modelo U-2000) a 412 nm. El resultado se expresa en como $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ de órgano o mM (Akerboom y Sies, 1981).



* según la preparación que se utiliza

Figura 16. Esquema de la reacción de los grupos tioles (-SH) con el ácido (5,5'-ditio-bis)-2-nitrobenzoico (DTNB) para formar el producto 5-tionitrobenzoato (TNB).

4. Determinación de tioles totales y tioles de bajo peso molecular

Para cuantificar los tioles totales en los experimentos *in vitro* en mitocondrias aisladas se utilizó la reacción del DTNB o reactivo de Ellman, descrita en 3.4. Aquí, las mitocondrias fueron aisladas como se describió en 1.2.2. pero resuspendidas en PBS conteniendo Tritón-X-100 al 1%; éste último cumple la función de solubilizar la suspensión y eliminar la turbidez. Luego de 15 minutos de incubación a 0 °C, se centrifugaron a 13600 g y se recuperó el sobrenadante conteniendo los grupos tioles proteicos y no proteicos.

Para determinar los tioles totales o los tioles de bajo peso molecular en cultivos celulares se utilizará un lisado celular (tioles totales) o un lisado celular desproteinizado con ácido perclórico 0,2 M.

La reacción de los grupos tioles de cada tipo de muestra con el DTNB para formar el TNB se cuantificó por espectrofotometría a 412 nm ($\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Ellman, 1959).

5. Producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) detectada mediante sondas fluorescentes

5.1. Oxidación de la diclorofluoresceína (DCFH) evaluada por citometría de flujo (FACS)

Esta determinación se basa en la capacidad del diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) de difundir hacia el interior de las células donde es desacetilada por esterasas a DCFH. Al poseer la DCFH un carácter más hidrofílico que la DCFH-DA, esta no puede volver a salir de la célula. En el citosol, la DCFH es oxidada por especies reactivas del oxígeno (ROS), principalmente H_2O_2 , pero también ROOH , HO^\bullet , ROO^\bullet para producir un compuesto oxidado fluorescente (Fig. 17). La fluorescencia de este producto se mide a $\lambda_{\text{excitación}} = 495 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 529 \text{ nm}$.

Para la determinación por citometría de flujo, el medio de cultivo en las placas es reemplazado por una solución de DCFH-DA $10 \mu\text{M}$ preparada en medio de cultivo fresco. Luego de 45 min de incubación en oscuridad a 37°C , las células fueron lavadas con PBS, y luego despegadas de la placa de cultivo con tripsina. La suspensión celular fue centrifugada a 1200 r.p.m. durante 5 min y el *pellet* fue lavado con PBS en tubos de FACS, para eliminar el medio de cultivo. Luego las células fueron re-suspendidas en 0,2 mL de PBS y analizadas por citometría de flujo (FACScalibur, BD Biosciences). La fluorescencia por célula detectada en FL-1 fue guardada (Burow y Valet, 1987) y los resultados fueron analizados con el *software* FlowJo (Treestar).

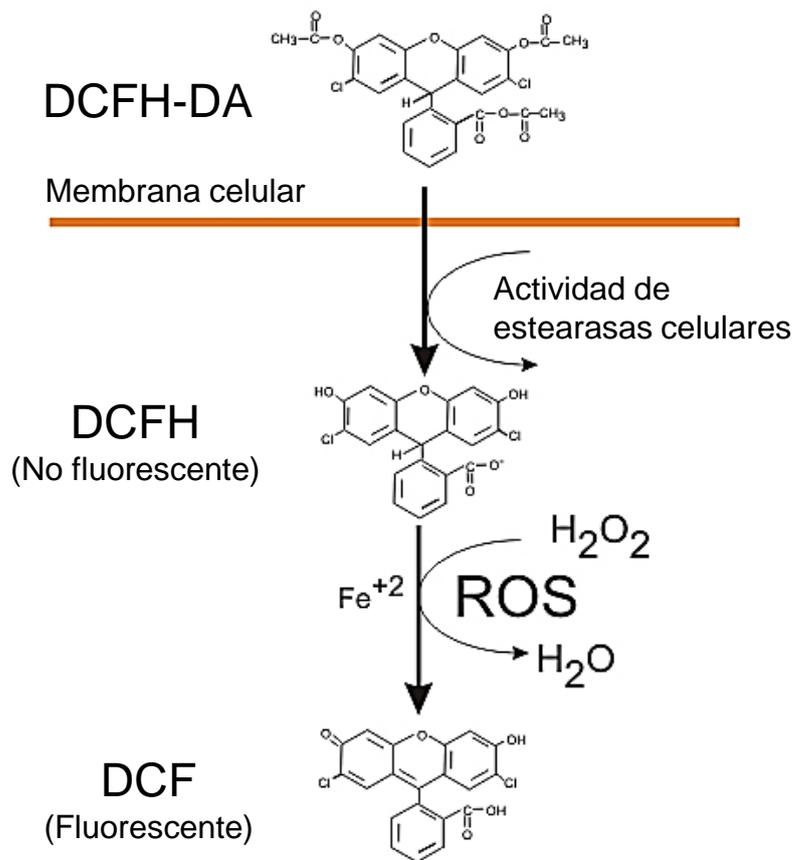


Figura 17. Esquema de la reacción de la DCFH-DA para dar DCF en las células. Tomado y adaptado de <http://www.biotek.com/resources/articles/reactive-oxygen-species.html>

5.2. Producción de H₂O₂ detectada por la sonda Amplex Red

Se llevó a cabo el ensayo fluorométrico basado en la oxidación de la N-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina (Amplex Red) (Zhou y col., 1997). El Amplex Red, un derivado incoloro y no-fluorescente de la hidro-resorufina, es oxidado por H₂O₂ en una relación estequiométrica 1:1, para formar resorufina, que es fluorescente ($\lambda_{\text{ex}}=563$ nm y $\lambda_{\text{em}}=587$ nm) (Fig. 18). Se utilizaron peroxidasa de rábano picante (HRP, del inglés *hot raddish peroxidase*) 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, Amplex Red 50 μM , PMA (4 μL), antimicina 2 μM , rotenona 1 μM y difeniliodonio (DPI) (inhibidor de la NADPH oxidasa) 20 μM para generar diferentes condiciones experimentales y así identificar las especies producidas, responsables de la oxidación de la sonda.

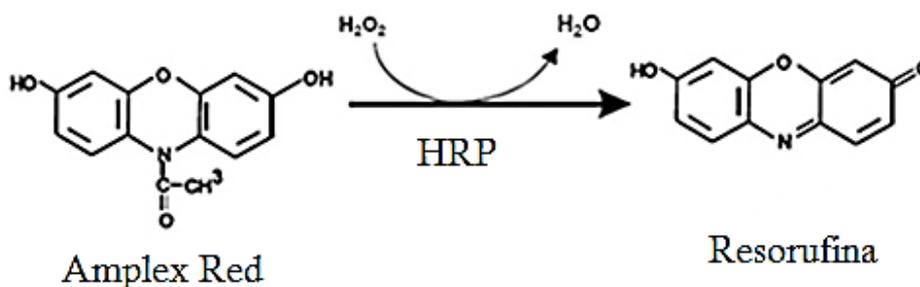


Figura 18. Reacción del Amplex Red con el H_2O_2 para formar resorufina. Tomado y adaptado de http://www.vmi.pitt.edu/EPR-ROS/ROS_services.html

5.3. Oxidación de la dihidroetidina (DHE) evaluada por citometría de flujo (FACS)

La sonda dihidroetidina (DHE) es oxidada a etidina por el O_2^\bullet , se intercala en el ADN y exhibe una intensa fluorescencia roja con una $\lambda_{\text{excitación}}$ de entre 500 y 530 nm y $\lambda_{\text{emisión}}$ de entre 590 a 620 nm. Sin embargo, DHE puede también reaccionar con el O_2^\bullet para formar hidroxietidina, que posee un máximo de emisión a 567 nm (Selimides y col., 2007).

La oxidación de la DHE se determinó por citometría de flujo (Rothe y Valet, 1990). Brevemente, el medio de cultivo en las placas fue reemplazado por una solución de DHE 10 μM preparada en medio de cultivo fresco. Luego de 45 min de incubación a 37 °C, las células fueron lavadas en PBS, y luego despegadas de la placa de cultivo con tripsina. La suspensión celular fue centrifugada a 1200 r.p.m. durante 5 min, y el *pellet* fue re-suspendido en PBS en tubos de FACS, para eliminar el medio de cultivo. Luego las células fueron re-suspendidas en 0,2 mL de PBS y analizadas por citometría de flujo (FACScalibur, BD Biosciences). La fluorescencia detectada en FL-2 fue guardada. Los resultados fueron analizados con el *software* FlowJo (Treestar).

6. Determinaciones de la función mitocondrial

6.1. Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno se midió polarográficamente por respirometría de alta resolución, utilizando un electrodo de oxígeno tipo Clark (Hasantech

Oxygraph System DW1). Para ello, el equipo debió ser calibrado siguiendo las instrucciones del *software*, con medio de reacción para el consumo de oxígeno en agitación para establecer el 100% de oxígeno, dado por la solubilidad del mismo (0,22 mM a 25 °C) y el 0% con una solución saturada de ditionito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). La señal eléctrica es convertida y presentada como $\text{nmol O}_2 \cdot \text{mL}^{-1}$ por el *software*.

El medio de reacción consistió en KCl 120 mM, KH_2PO_4 5 mM, EGTA 3 mM y HEPES 3, ajustado a pH 7,2 con KOH o HCl 1 M. Esta solución se llamó buffer de respiración. Para los modelos experimentales de exposición al Cu *ex vivo* (Sección 2.1) se omitió el agregado de EGTA al medio de reacción.

La preparación del medio de reacción para la medida consiste en cargar el buffer de respiración (volumen final de 1 mL) en la cámara de reacción del electrodo o cubeta, que es tapada. Los sustratos fueron agregados con una jeringa Hamilton a través del orificio del tapón. Para el consumo de oxígeno se emplearon malato 5 mM y glutamato 2 mM (concentración final en la cámara) como sustratos del complejo I o succinato 10 mM como sustrato del complejo II. Por último, se agregó a la cámara la suspensión mitocondrial (50 μL). La mezcla se encuentra constantemente en agitación gracias a un agitador magnético en la cámara de reacción.

En la Figura 19 se ilustra el registro del consumo de oxígeno con este tipo de electrodos.

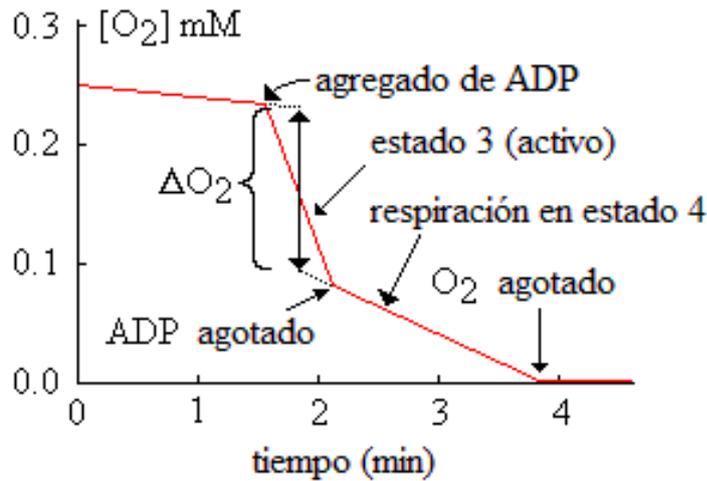


Figura 19 Esquema del registro de la velocidad de consumo de oxígeno. Tomado y adaptado de <http://www.bmb.leeds.ac.uk/illingworth/oxphos/oxygraph.htm>

La medida comienza con el registro de la velocidad de consumo de oxígeno o respiración en estado inactivo o estado 4 (Tabla 3). La respiración en estado activo (consumo de oxígeno en estado 3) se estableció por el agregado de ADP 1 mM. La pendiente correspondiente a 1 min en cada estado (expresada en $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$) permitió calcular el consumo de oxígeno mitocondrial, el cual se expresó como $\text{nat-g O} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. El control respiratorio es el cociente entre la velocidad de consumo de oxígeno en estado 3 y estado 4. Este valor es un parámetro de acople entre la respiración y la fosforilación, cuyos valores se encuentran generalmente entre 3 y 10, dependiendo del sustrato y la calidad de la preparación (Estabrook, 1967).

6.2. Actividad de los complejos respiratorios mitocondriales I y II

La actividad de los complejos mitocondriales I-III y II-III se determinó en una preparación de partículas sub-mitocondriales, que se obtuvo a partir de la suspensión de mitocondrias aisladas del tejido sometida a tres ciclos de congelado y descongelado. La determinación consiste en la medida de la velocidad de reducción del citocromo $c3+$ a citocromo $c2+$, que se sigue espectrofotométricamente a 550 nm durante un minuto a 30 °C. El medio de reacción consistió en PBS 100 mM (pH 7,2) suplementado con NADH 0,2 mM (complejo I) o succinato 5 mM (complejo II), citocromo $c3+$ 25 μM y KCN 0,5 mM (Boveris y col., 2006).

6.3. Respiración mitocondrial en cultivos celulares en tiempo real

Se utilizó el equipamiento, metodología, insumos y *software* de SeaHorse Bioscience®. El analizador Seahorse XF Extracellular Flux Analyzer® permite estudiar el metabolismo respiratorio en células vivas en cultivo, en tiempo real. Para la determinación, basada en una reacción de fluorescencia con especificidad por el oxígeno (O₂), se siguieron las instrucciones del fabricante. Se sembraron 40.000 células J774A.1 por pocillo en placas especiales provistas por SeaHorse Bioscience® y las condiciones descritas por el fabricante. Se utilizan inhibidores que se cargan en la placa, en pocillos que rodean a aquel donde se sembraron las células, que son inyectados por el equipo durante la medida para generar diferentes situaciones, según se describe en la Figura 20. La oligomicina es un inhibidor de la fosforilación oxidativa al inhibir al Complejo V o ATP-sintasa mitocondrial. El carbonilcianuro-4-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) es un desacoplante que actúa despolarizando la membrana mitocondrial interna, eliminando el gradiente de protones que sirve de fuerza motriz para la síntesis de ATP. La antimicina inhibe la transferencia de electrones a nivel del complejo III (Nelson y Cox, 2013).

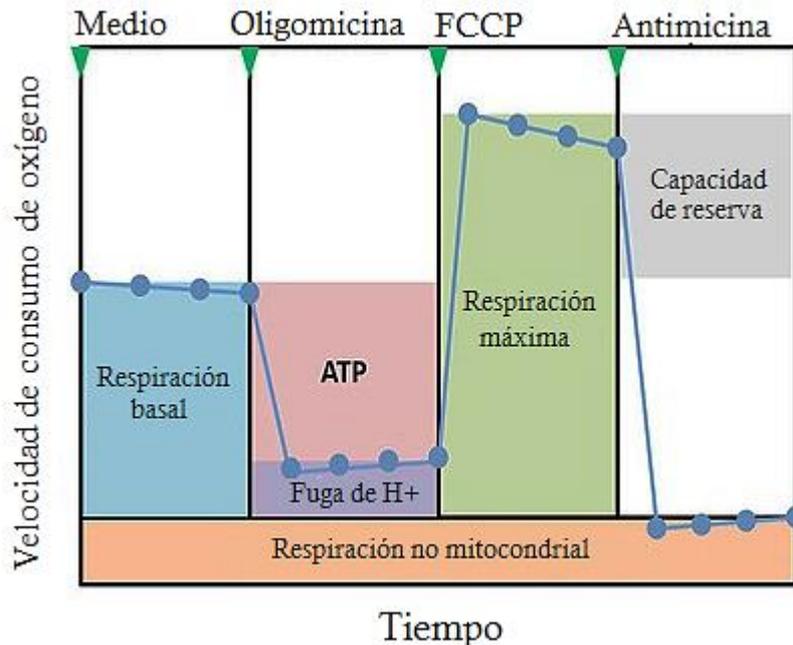


Figura 20. Esquema del registro obtenido luego de una medida en el analizador Seahorse XF Extracellular Flux Analyzer®. Los inhibidores oligomicina, FCCP y antimicina se agregan en pocillos que rodean al pocillo donde se encuentran las células a analizar y son inyectados oportunamente por el equipo para generar diferentes situaciones. Tomado y adaptado de <http://www.agilent.com/>

7. Viabilidad celular basada en la reacción del MTT

Para evaluar la viabilidad en los cultivos celulares se utilizó el ensayo colorimétrico basado en la reacción del metiltiazoltetrazolio (MTT) (Mosmann, 1983). Este ensayo de citotoxicidad se basa en la función mitocondrial, ya que el bromuro de de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) de color amarillo es reducido por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa a formazán de color púrpura (Fig. 21). Esta reacción depende de la oxidación de NADH. La membrana celular es impermeable al formazán y éste puede ser cuantificado por su absorción a 595 nm.

Al momento de realizar la determinación se preparó una solución de MTT 5 mg . mL⁻¹ en PBS 100 mM estéril. Se agregaron 25 µL de esta solución a cada pocillo (200 µL) y las células fueron incubadas durante 2 horas a 37 °C. Luego, se removió cuidadosamente el sobrenadante y los cristales de color violeta se disolvieron en 100 µL de DMSO. Se determinó la absorbancia a 595 nm en un lector de placa (Varioskan Flash). Para la expresión de resultados, la absorbancia de las células tratadas, así como del control positivo, se normalizó al valor del control negativo, que se consideró como 100% de viabilidad.

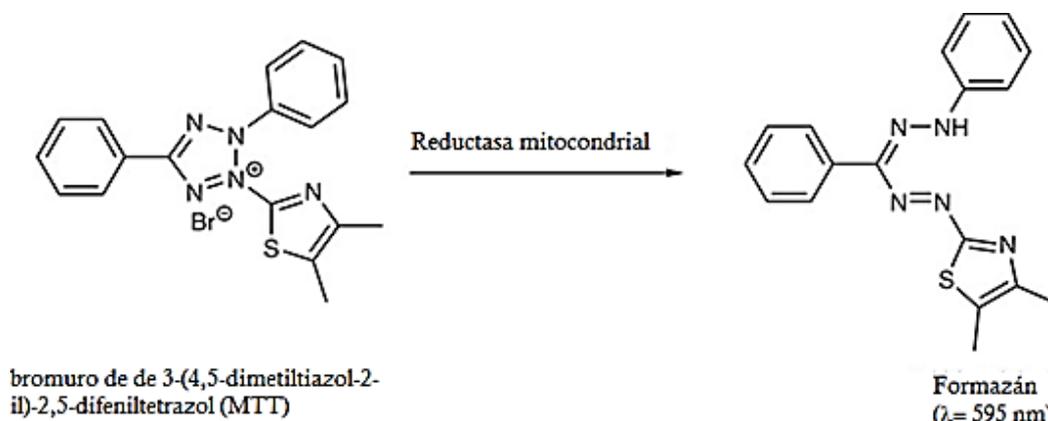


Figura 21. Reacción de MTT para dar formazán en células metabólicamente activas.

Tomado y adaptado de

http://www.nature.com/nprot/journal/v3/n12/fig_tab/nprot.2008.182_F5.html

8. Citometría de flujo

La citometría de flujo constituye una tecnología utilizada para contar, clasificar y marcar células. Consiste en hacer pasar una suspensión celular por un delgado tubo de manera tal que pase una sola célula a la vez. Las células son

impactadas por un rayo de luz láser y en consecuencia se produce la dispersión (FSC, por el inglés *forward scatter*) y transmisión (SSC, por el inglés *side scatter*) de la luz incidente, que al ser reconocida por los detectores lateral y frontal puede ser traducida eventualmente a información acerca de la forma y tamaño de las células. La incorporación de detectores de fluorescencia permite detectar marcas específicas que se hayan hecho a las células, permitiendo clasificarlas por muchas otras características, además de su forma y tamaño. En este caso se habla de citometría de flujo activada por fluorescencia o FACS (por el inglés *fluorescence-activated cell sorting*).

En este caso, las células fueron marcadas para evaluar viabilidad celular y expresión de fosfatidilserina característica de apoptosis. Las células cosechadas y lavadas con PBS fueron incubadas por 15 min con anexina-V unida a isotiocianato de fluoresceína (FITC, por el inglés *fluorescein isothiocyanate*). Justo antes de realizar la medición, se agregó 7-aminoactinomicina-D (7-AAD) a la muestra. La anexina-V se une a la fosfatidilserina cuando esta ha sido traslocada a la cara externa de la membrana celular en señal de que la célula está atravesando un proceso apoptótico. Las células viables excluyen la 7-AAD mientras que las membranas de las células dañadas o muertas permiten su ingreso. Las muestras son medidas por FACS y se pueden distinguir cuatro poblaciones: sin tinción (células vivas), 7-AAD positivo/anexina-V negativo (células necróticas), 7-AAD negativo/anexina-V positivo (células apoptóticas), 7-AAD positivo/anexina-V positivo (necróticas o apoptóticas tardías) (Fig. 22).

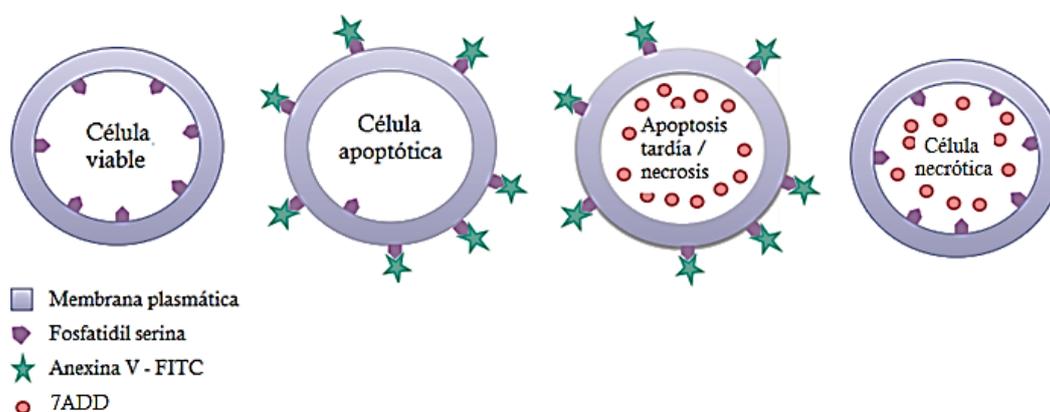


Figura 22. Esquema de la marcación con Anexina-V y 7-AAD. Tomado y adaptado de https://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSVerse_Apoptosis_Detection_App_Note.pdf

Para la determinación, las células fueron tripsinizadas, lavadas con PBS y transvasadas a un tubo para FACS. Se centrifugaron a 2000 r.p.m. por 3 min y se descartó el sobrenadante. Se preparó una mezcla de 2 mL de buffer HEPES 0,01 M (pH 7,4) con cloruro de sodio 0,14 M y cloruro de calcio 2,5 mM (buffer anexina-V) y 2 μ L de anexina-V-FITC (dilución 1/1000) y se agregó de esta mezcla a las células que se encontraban en el tubo de FACS en una relación 1:1. Luego de agitar en el *vortex* e incubar 10 min en la oscuridad, se agregó el IP (20 μ L de stock 50 μ g \cdot mL⁻¹ por cada 200 μ L de mezcla en el tubo de FACS). Finalmente se procedió a analizar las muestras en el equipo de FACS (FACScalibur, BD Biosciences). Anexina-V fue medida en FL-1 y 7-AAD en FL-3. Los resultados fueron analizados con el *software* FlowJo (Treestar).

9. Micromatrices de ADN (chips de ADN)

Las micromatrices o chips de ADN consisten en una superficie sólida a la cual se adhieren miles de secuencias específicas de genes individuales estrechamente comprimidas, cuyo análisis permite el monitoreo simultáneo de la expresión de miles de genes (Schema y col., 1995). La determinación consiste en medir la hibridación de las sondas en el chip con las hebras del ADN desnaturalizado de la muestra. Se utilizan cromóforos y luego se miden los niveles de hibridación por fluorescencia.

Se utilizaron las micromatrices de ADN para determinar la expresión de proteínas en diferentes líneas celulares ante la sobrecarga de iones Cu. Se emplearon GeneChips de Affymetrix, que permiten analizar genomas completos de más de 30.000 genes.

Para analizar la regulación de genes en las células BEAS-2B y HCT116 expuestas al Cu se utilizó una abordaje basado en modelos lineales (lima R/Bioconductor package CITE) (Ritchie y col., 2015). En resumen, las intensidades de ARN normalizadas de los duplicados de las muestras de las células expuestas al Cu durante 2, 4, 6, 12 y 18 horas se compararon con la condición inicial (0 horas). Los genes regulados significativamente se analizaron con el P valor ajustado (Benjamini Hochberg) de 0,001.

10. Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE, del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) es la técnica empleada para separar proteínas según su movilidad electroforética. El SDS es un detergente aniónico que desnaturaliza las proteínas. De esta manera, sin sus estructuras terciarias y secundarias, y con la carga aniónica proporcional a su masa que les confiere el detergente, al aplicar un campo eléctrico las proteínas migran en el gel hacia el ánodo (positivo) de acuerdo a su masa. Las proteínas más pequeñas avanzarán más lejos mientras que las de mayor tamaño quedarán atrás en la corrida (Shapiro y col., 1967). Las proteínas atraviesan primero un gel de apilamiento, de tamaño de poro grande y luego un gel de resolución, con un tamaño de poro menor.

Para la determinación, las células fueron cosechadas con tripsina, centrifugadas a 1200 r.p.m. 5 min y los *pellets* lavados con PBS. Luego, las células fueron lisadas con Tritón-X-100. Los lisados se centrifugaron a 13500 r.p.m. y se recuperó el sobrenadante. Luego de la corrida (200 V, aproximadamente 1 h), las proteínas de los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (400 mA, 1 h) y fueron incubadas posteriormente con el anticuerpo primario correspondiente durante la noche a 4 °C. Se utilizaron anticuerpos contra Caspasa 3 total, H2A γ , Caspasa 3 clivada, JNK, JNK-P, MKK4, MKK7, PARP y β -actina, este último como control de carga. El anticuerpo secundario (conjugado a HRP) se utilizó en una dilución 1/5000 en PBS con Tween 1% (PBST) y seroalbúmina bovina (BSA) 3% durante 1 hora a temperatura ambiente. Las proteínas fueron reveladas por medio de una reacción quimioluminiscente (ECL, por el inglés, *enhanced chemiluminescence*). En primer lugar, se lavó la membrana (3 veces con PBST). Se utilizó el kit comercial Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent® (Amersham, GE Healthcare Sciences) y, según las indicaciones del fabricante, se mezclaron partes iguales de las soluciones A y B. Se expusieron las membranas a la mezcla entre 20 segundos y 10 min y se colocó dentro del *cassette* de revelado. Se reveló en el cuarto oscuro.

11. Actividad de caspasa 3

La determinación de la actividad de caspasa se basa en el clivaje de la acetil Asp-Glu-Val-Asp 7-amido-4-methylcoumarina (Ac-DEVD-AMC) por la caspasa 3, resultando en la liberación de 7-amino-4-metilcoumarina (AMC) que es fluorescente. Las longitudes de onda de excitación y emisión de AMC son 360 nm y 460 nm respectivamente. La concentración de AMC liberada puede ser calculada con una curva de estándares de AMC (Marks y col., 1998).

Se utilizó como muestra el lisado celular en un medio de reacción conteniendo Tris 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, pirofosfato de sodio 5 mM, EGTA 1 mM, fosfato diácido de sodio 20 mM, β -glicerofosfato de sodio 3 mM y fluoruro de sodio 10 mM (pH= 7,4). En fresco se agregaron inhibidores de proteasas, inhibidor de proteasoma e inhibidores de fosfatasa, según corresponda. Se agregó ditiotreititol al 1% para mantener el entorno reductor.

La fluorescencia se siguió durante 30 min en un lector de placa (Tecan), termostaticado a 37 °C.

Para la expresión de resultados, los valores de actividad de caspasa fueron normalizados al valor del control que se considera como 100%.

12. Determinación de los niveles de Cu

El contenido de Cu en las muestras se determinó por espectrofotometría de absorción atómica. Ésta consiste en la desolvatación y atomización de los átomos metálicos de la muestra mediante una llama y nebulizador en una mufla de grafito, seguida de la excitación (promoción de un electrón a un nivel energético superior) mediante lámparas que brillan a través de la llama a diversas longitudes de onda para cada tipo de analito. Así, la cantidad de luz absorbida después de pasar a través de la llama determina la cantidad de analito existente en la muestra (Skoog y col., 2001).

12.1. En muestras de hígado

El contenido de Cu en hígado se determinó utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica Buck, modelo 200 A (BuckScientific, East Norwalk, Connecticut, USA). Alícuotas de aproximadamente 100 mg del órgano fueron

incineradas durante 4 h en una mufla de grafito a 500 °C y fueron digeridas con una solución de HClO₄:HNO₃ (1:1) hasta la desaparición de vapores pardos. Las condiciones para la determinación de Cu fueron: longitud de onda de 324,8 nm; apertura de 0,7 nm, corriente de 1,0 mA con una llama de acetileno. Las muestras fueron pesadas en una balanza Shimadzu AY220 con sensibilidad 0,1 mg. Las micropipetas utilizadas se calibran semanalmente por gravimetría. Los análisis de laboratorio y soluciones estándares son acordes a los estándares ISO17025. El límite de detección de la determinación por absorción atómica fue de 0,025 mg Cu . L⁻¹ y el coeficiente de variación del 2%. La calibración se realizó con soluciones estándar (Merck) de Cu de 0,1 a 3 mg . L⁻¹ (Callaghan y Gutman, 2006). Los resultados se expresaron en µg de metal por g de órgano (peso húmedo) (ppm).

12.2. En lisados celulares

Se utilizó un espectrómetro de masa Buck, modelo 210 VGP (Buck Scientific, East Norwalk, Connecticut, USA). Para la mineralización, se incubaron 0,3 mL del lisado con 0,3 mL de una mezcla 1:1 de peróxido de hidrógeno 35% y ácido nítrico 65% (ultra puro) a 60 °C durante 90 min. Luego, se dejó secar a 85 °C durante 8 h (*overnight*). Los residuos secos se disolvieron en 0,3 mL de HNO₃ 0,1% y se determinó el contenido de Cu en esta solución por absorción atómica en horno de grafito. La inyección de muestra fue de 10 µL. No se utilizaron modificadores de la matriz. Las condiciones para la determinación de Cu fueron: longitud de onda de 324,7 nm; apertura de 0,7 nm, corriente la lámpara de 7 mA, corrección del *background* por lámpara de deuterio, argón como gas protector y área del pico como medida de la absorbancia.

13. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas para la expresión de los resultados se determinó por diferentes metodologías, según la disponibilidad de los distintos laboratorios donde tuvieron lugar los experimentos en este trabajo.

13.1. Método de Lowry

Para la determinación de proteínas en homogeneizados de tejido y mitocondrias aisladas se utilizó el ensayo de Lowry (Lowry y col., 1951). En una primera etapa de la reacción, las proteínas reaccionan con sulfato de cobre en

medio alcalino en presencia de tartrato durante 10 min a temperatura ambiente. Durante esta incubación, se forma un complejo de cobre tetradentado entre cuatro enlaces peptídicos y un átomo de cobre (reacción de Biuret). En una segunda etapa, se agrega una solución de ácido fosfomolibdénico-fosfotúngstico. Este compuesto, llamado reactivo de fenol-Folin, se reduce produciendo un color azul intenso. Se cree que el color es consecuencia de la transferencia de electrones desde el complejo tetradentado del cobre hacia el ácido fosfomolibdénico-fosfotúngstico. El color azul se intensifica durante los primeros 30 min a temperatura ambiente. Se sugiere que durante esta incubación, hay un re-arreglo del complejo azul inicialmente inestable para llegar al complejo azul estable final que tiene la máxima absorbancia (Lowry y col., 1951; Legler y col., 1985). Esta absorción se leyó a 625 nm en un espectrofotómetro (Hitachi, modelo U-2000). Se realizó una curva de calibración con BSA desde 0 a 0,12 mg. Las muestras sin diluir o con una dilución al medio fueron utilizadas en un volumen de 5 μ L en un volumen final igual al de la curva de calibración, 3 mL.

13.2. Método de BCA

Para determinar la concentración de proteínas de algunos de los lisados celulares utilizados en los experimentos *in vitro*, se utilizó el kit comercial ThermoScientific Pierce BCA ProteinAssay®. Esta determinación se fundamenta en la reducción en medio alcalino de Cu^{2+} a Cu^{1+} por las proteínas, con la detección altamente sensible del catión cuproso (Cu^{1+} con ácido bicinconínico (BCA) (Smith y col., 1985). Antes de la determinación, se realizó el lisado de las células. Para ello se utilizó buffer de lisis, como se describió anteriormente o se trató a las células con Tritón. Para esto último, en cada pocillo (conteniendo ya 100 μ L de PBS) se agregaron 5 μ L de Tritón-X 10% y se incubó la placa durante 5 minutos a 30 °C y en agitación a 450 r.p.m. El ensayo se realizó conforme a las instrucciones del fabricante. Al cabo del mismo, la absorbancia de la solución lila se leyó en un lector de placa a 595 nm.

13.3. Método de Bradford

Para la determinación de la concentración de proteínas en lisados provenientes de cultivos celulares, se utilizó también el método de Bradford. Este consiste en la reacción de la sonda *Coomassie Brilliant Blue G-250* con la arginina y

los residuos hidrofóbicos de las proteínas, formando un complejo azul que corre el máximo de absorción de la sonda de 465 nm a 595 nm. Esta última absorbancia se leyó en un lector de placa luego de llevar a cabo la reacción. Se utilizó BSA como proteína estándar para la curva de calibración (Bradford, 1976).

14. Agregados proteicos por turbidimetría

Se estudió la capacidad del cobre y otros metales de formar agregados proteicos espectrofotométricamente por turbidimetría (Quintamar y col., 2016). El medio de reacción consistió en Tris-HCl 10 mM pH 7,40. Se utilizaron soluciones stock 10 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 y $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ que fueron diluidas en el pocillo para obtener la concentración final deseada. Se agregó BSA 1,5 mg \cdot mL⁻¹ al pocillo inmediatamente antes de comenzar la medida. Todas las soluciones utilizadas se encontraban ajustadas a pH 7,4. La mezcla se incubó y analizó en un lector de placa (*Varioskan Flash 96-well plate reader*, Thermo Fisher Scientific) a 37 °C. Para el análisis, se siguió la absorbancia a 412 nm durante 60 min, con lecturas cada 20 segundos y agitación de 5 segundos antes de cada medida. No se detectó turbidez en los controles, que incluyeron al buffer solo, la proteína sola y los iones metálicos en ausencia de proteína. La determinación se realizó por lo menos cuatro veces para cada condición.

15. Análisis estadístico

Los resultados en los textos, figuras y tablas indican el promedio \pm error estándar de la media (ESM) de 3 o 4 experimentos independientes. Se utilizó el software GraphPad InStat3 y se utilizaron el test One-Way ANOVA y el post-test de Dunnet. La significancia se indica por el valor p, donde $p < 0,05$ fue considerado significativo, $p < 0,01$ fue considerado muy significativo y $p < 0,001$ fue considerado extremadamente significativo.

16. Reactivos químicos

Los reactivos químicos utilizados fueron comprados a Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO), Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y Anedra (Research AG S.A.). Otros reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Resultados y discusión

Capítulo 1: Toxicidad del cobre: estrés oxidativo en hígado y función mitocondrial

El daño celular generado por el Cu ha sido relacionado con la alteración de diferentes parámetros que controlan la homeostasis celular. En vista de las numerosas publicaciones que reportan alteraciones en la homeostasis redox debido a la sobrecarga aguda y crónica de Cu, se estudió en principio el papel del estrés oxidativo en la citotoxicidad del metal y su efecto sobre una diana sensible a las modificaciones oxidativas, como son las mitocondrias.

1.1. Toxicidad del cobre en ratas

El efecto de la sobrecarga de iones Cu en hígado se estudió en ratas Sprague-Dawley tratadas con una solución de Cu^{2+} , administrada mediante inyección intraperitoneal (i.p.) ($5 \text{ mg Cu} \cdot \text{kg}^{-1}$).

1.1.1. Curva de supervivencia luego de una intoxicación aguda con cobre

Los animales inyectados con Cu^{2+} mostraron síntomas inespecíficos de estrés, como una pigmentación roja en las fosas nasales y en los ojos, probablemente relacionados con un incremento en la secreción de porfirinas, junto con un oscurecimiento de la piel y aumento de la frecuencia respiratoria.

La mayoría de los animales sobrevivió a la dosis de $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ luego de las 16 horas. Sin embargo, las dosis de $7,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ y $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ resultaron altamente tóxicas para las ratas, observándose una rápida disminución en la supervivencia al transcurrir el tiempo de exposición (Fig. 23).

En las autopsias de los animales tratados con Cu^{2+} se observó una marcada congestión en hígado, pulmones, corazón y riñones, dependiente de la dosis del metal. Las ratas que murieron luego de las 8 horas del tratamiento agudo presentaban una acumulación de aproximadamente 1 a 3 mL de líquido ascítico.

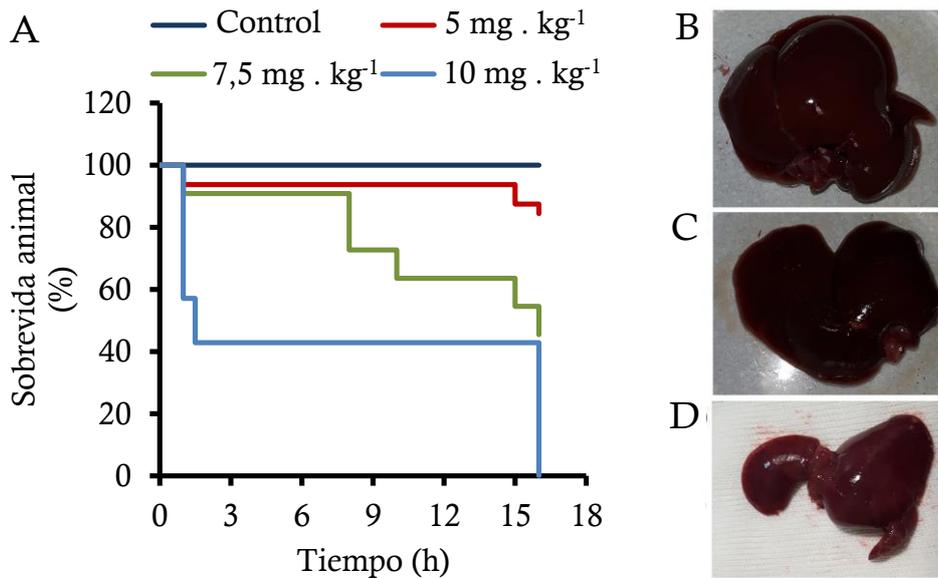


Figura 23. (A) Curva de supervivencia de ratas tratadas con una administración individual de Cu^{2+} . Observación macroscópica del hígado de ratas: (B) control, (C) tratadas con $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$, 24 h y (D) tratadas con $7,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$, 24 h.

1.1.2. Acumulación hepática de cobre

Se observó una acumulación de Cu en hígado dependiente del tiempo luego de la inyección i.p. El metal comenzó a acumularse en el hígado rápidamente dentro de las primeras dos horas tras su administración, manteniendo un aumento sostenido hasta alcanzar un *plateau* alrededor de las 16 horas. El contenido de metal en el hígado a las 16 horas se incrementó aproximadamente 20 veces respecto del contenido en ratas controles (Fig. 24).

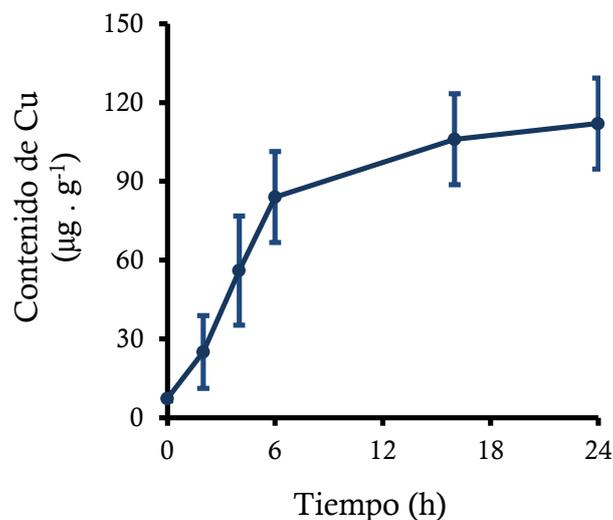


Figura 24. Contenido de Cu en hígado de rata luego de una única inyección i.p. de Cu^{2+} , $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

1.1.3. Daño oxidativo y disminución del contenido de glutatión generados por la sobrecarga de cobre en hígado

La quimioluminiscencia (QL) *in vivo* es una determinación no invasiva que puede emplearse como un indicador sensible del daño oxidativo a membranas fosfolipídicas determinado en tiempo real. Un incremento en este parámetro implica un incremento en la concentración en estado estacionario de $^1\text{O}_2$ y carbonilos excitados.

Se observó en las ratas, luego de recibir una única inyección i.p. de Cu^{2+} , un incremento en la QL espontánea de hígado a las 16 horas del 100 % (Fig. 25A), debido al incremento de la concentración en estado estacionario de $^1\text{O}_2$, uno de los productos de las reacciones de terminación entre radicales $\text{ROO}\cdot$ que ocurren durante la lipoperoxidación. En coincidencia con el incremento en la QL espontánea de hígado, se observó un incremento en los niveles de malondialdehído (MDA) presentes en el homogeneizado de hígado de rata, determinado como TBARS, que corresponde a un incremento del 100% a las 16 horas con la dosis de $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Fig. 25B).

Si bien se observa una ligera tendencia al aumento, el daño oxidativo no se extiende de igual manera a la oxidación de proteínas con la dosis utilizada, ya que el contenido de grupos oxidados en las cadenas laterales de los aminoácidos, determinados como grupos carbonilo ($-\text{CO}$), no se incrementó significativamente (Fig. 25C).

El glutatión (GSH) es una molécula pequeña que posee un rol central en el control del estado redox intracelular. Su grupo $-\text{SH}$ es el principal componente del *pool* de grupos $-\text{SH}$ intracelulares y posee una importante actividad antioxidante. La inyección i.p. de Cu^{2+} (dosis $5 \text{ mg} \text{ Cu}^{2+} \cdot \text{kg}^{-1}$) en ratas produjo una disminución del 70% en el contenido de GSH en hígado luego de 16 horas de la administración del Cu^{2+} (Fig. 25D).

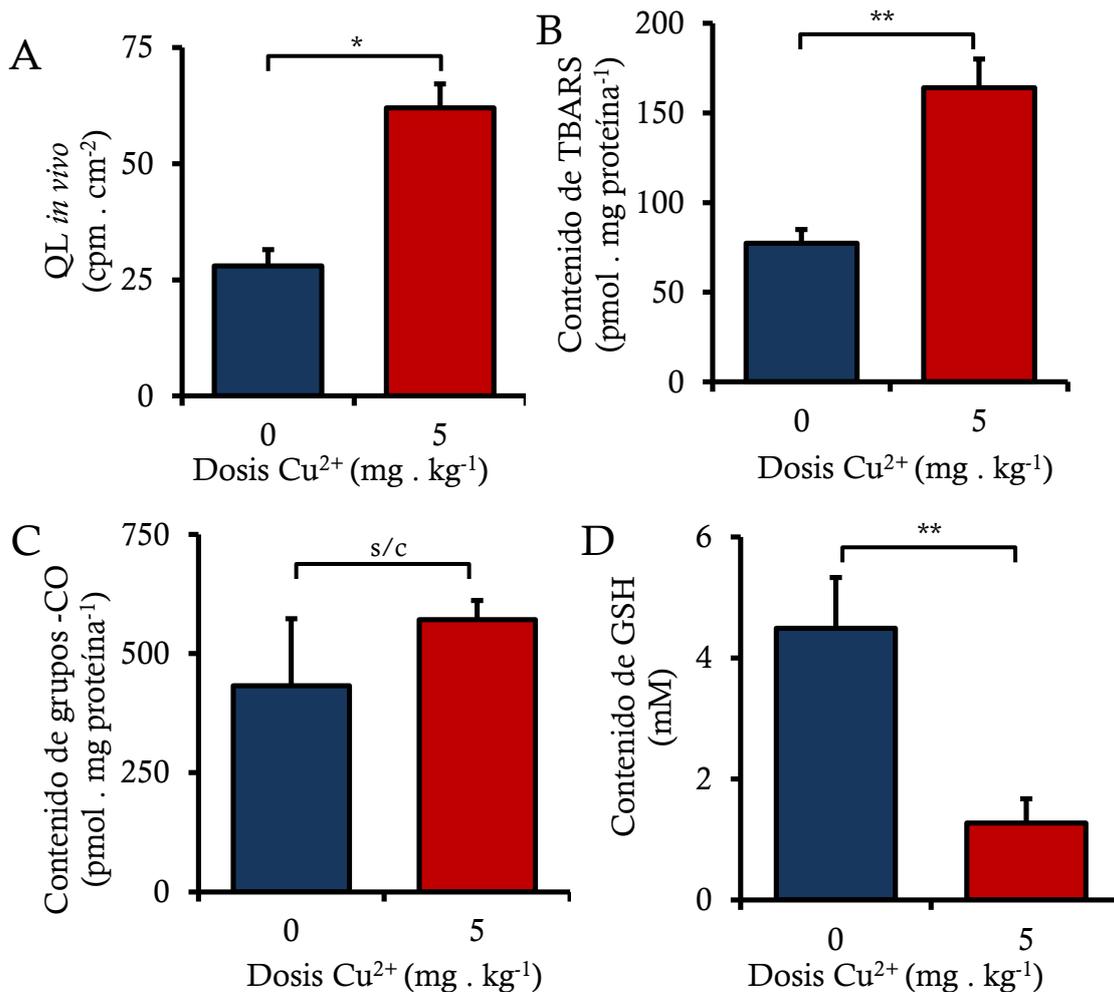


Figura 25. Daño oxidativo en hígado de rata a las 16 horas de la inyección i.p. de una solución de Cu²⁺ 5 mg . kg⁻¹. Los parámetros evaluados fueron (A) Quimioluminiscencia (QL) de hígado *in vivo*; (B) Oxidación de fosfolípidos, medidos como TBARS; (C) Oxidación de proteínas, medido como grupos carbonilos (-CO) y (D) Contenido de GSH. (*, p<0,05; **, p<0,01)

1.1.4. Efectos de la sobrecarga de iones Cu a nivel intracelular. Estudios en mitocondrias de hígado

La lipoperoxidación introduce alteraciones en la microestructura de la membrana plasmática que puede acarrear consecuencias letales para la célula. Por lo tanto, se continuó con el estudio de la función mitocondrial, en vista de que las membranas mitocondriales son particularmente sensibles a la lipoperoxidación por el alto contenido de insaturaciones en sus fosfolípidos.

1.1.4.1. Acumulación de cobre en mitocondrias aisladas de hígado

Se observó un incremento en el contenido de Cu en mitocondrias de hígado de ratas luego de la exposición a una dosis de $5 \text{ mg Cu}^{2+} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Fig. 26).

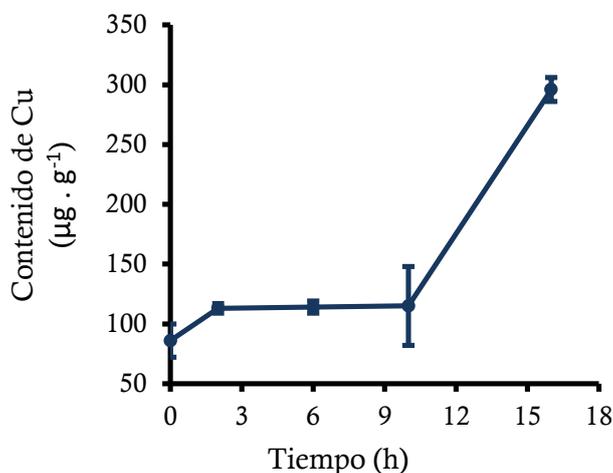


Figura 26. Cinética de la acumulación de Cu en mitocondrias de hígado de rata luego de la administración i.p. de $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de Cu^{2+} .

1.1.4.2. Efecto de la sobrecarga de cobre sobre la función mitocondrial

Si bien se observó un incremento muy significativo en la concentración de Cu en las mitocondrias de hígado de rata expuestas a una dosis de $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a partir de las 10 horas de la administración i.p. de Cu^{2+} , no se evidenció una disminución del consumo de O_2 en mitocondrias de hígado, empleando malato-glutamato como sustrato del complejo I de la cadena respiratoria con esta dosis (Fig. 27).

Tampoco se observa disminución del consumo de O_2 en mitocondrias de hígado empleando succinato como sustrato para el complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial con la dosis de $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Fig. 28).

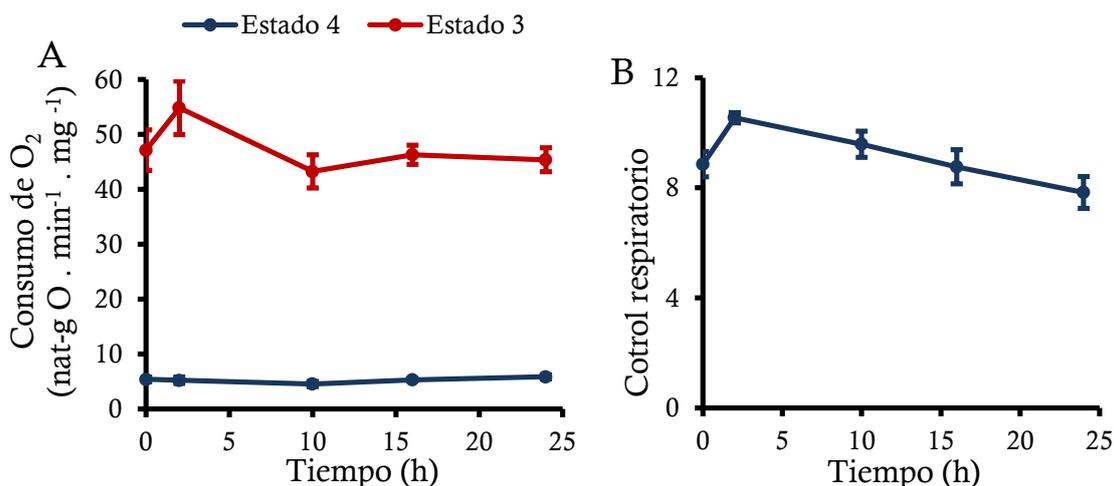


Figura 27. (A) Consumo de O_2 en mitocondrias de hígado de rata luego de la administración i.p. de Cu^{2+} , empleando malato-glutamato como sustrato. (B) Control respiratorio en mitocondrias de hígado de rata luego de la administración i.p. de Cu^{2+} , empleando malato-glutamato como sustrato.

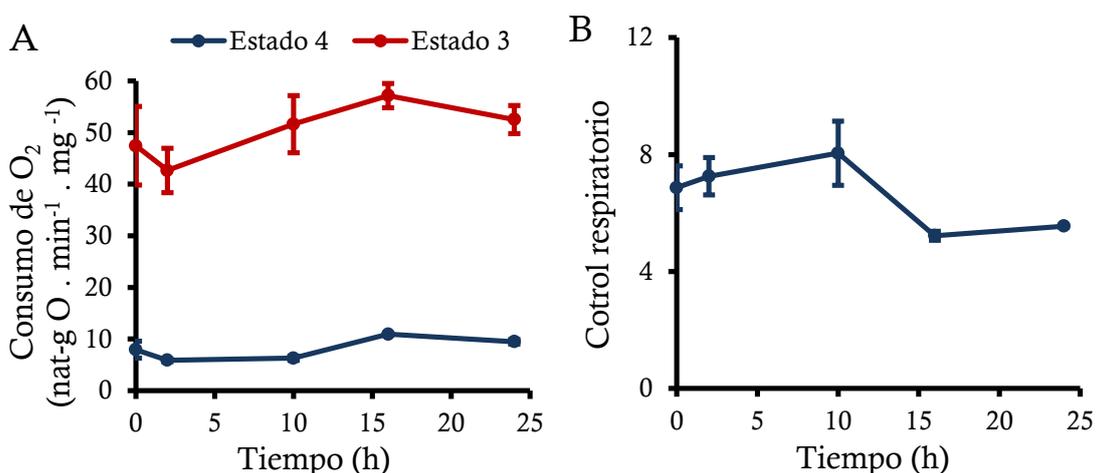


Figura 28. (A) Consumo de O_2 en mitocondrias de hígado de rata luego de la administración i.p. de Cu^{2+} , empleando succinato como sustrato. (B) Control respiratorio en mitocondrias de hígado de rata luego de la administración i.p. de Cu^{2+} , empleando succinato como sustrato.

La actividad de los complejos I y II de la cadena respiratoria mitocondrial tampoco se encontró afectada luego de la administración i.p. de Cu^{2+} (dosis $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) (Fig. 29).

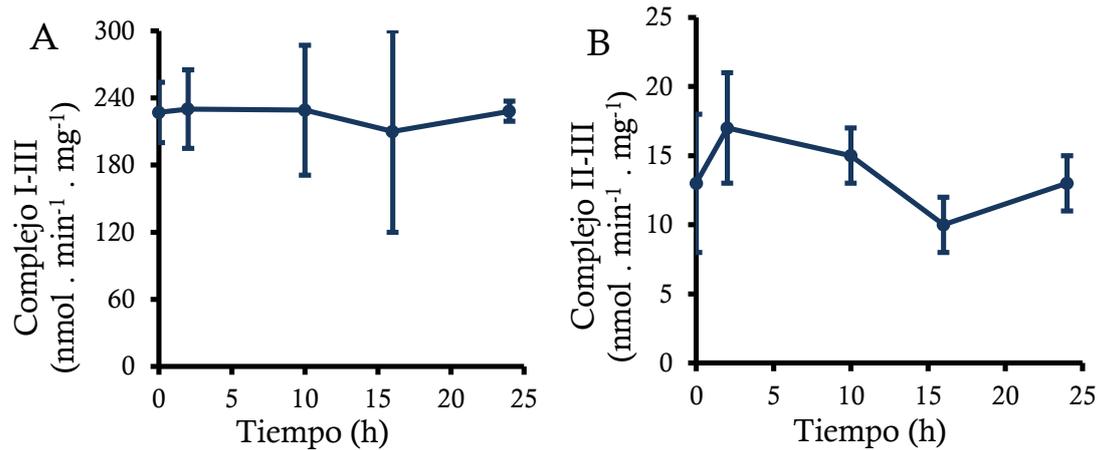


Figura 29. (A) Actividad del complejo I en mitocondrias de hígado de rata luego de la administración i.p. de Cu^{2+} , empleando succinato como sustrato. (B) Actividad del complejo II en mitocondrias de hígado de rata luego de la administración i.p. de Cu^{2+} , empleando succinato como sustrato.

Si bien luego de la sobrecarga de iones Cu en ratas se evidenciaron alteraciones en la homeostasis redox, la fisiología del animal impone limitaciones técnicas en la realización de experimentos más finos, como la dificultad de controlar el estado de oxidación y la concentración de metal en el medio extracelular a lo largo del tiempo, así como la incertidumbre respecto a su localización dentro de los órganos luego de la inyección. Por otro lado, la distribución del Cu a nivel sistémico luego de la inyección i.p. lleva a que ciertos grupos celulares, como las células endoteliales, estén expuestos a concentraciones extremadamente altas de Cu antes de que el metal alcance órganos como el hígado y los riñones. Adicionalmente, las consecuencias del incremento del Cu intracelular podrían estar influenciadas por variables, como inflamación, isquemia o alteraciones cardiovasculares.

1.2. Interacción del cobre con estructuras biológicas y especies reactivas del oxígeno generadas en mitocondrias aisladas. Estudios *in vitro*.

Como se observó en 1.1, la acumulación intracelular de Cu conduce a la alteración de diversos parámetros relacionados al estrés oxidativo. Sin embargo, aún no resulta evidente si el daño oxidativo es producto de la reacción entre el Cu^{1+} y el H_2O_2 o si el metal puede interactuar directamente con estructuras biológicas.

La respiración mitocondrial depende de numerosas proteínas y la integridad de la membrana interna. Por ello, el estudio *in vitro* del efecto de los iones Cu sobre la función mitocondrial permite analizar las reacciones químicas mediante las cuales el metal puede interactuar con estructuras biológicas. Si bien la función mitocondrial no resultó afectada en los modelos animales, estas reacciones químicas pueden ser extrapoladas a otras estructuras biológicas distintas de estas organelas.

1.2.1. Estudio de la interacción directa del cobre con biomoléculas en mitocondrias aisladas

A continuación, se utilizó un sistema de mitocondrias aisladas de hígado de rata expuestas *ex vivo* a Cu^{2+} en diferentes condiciones, a fin de determinar si es posible que este produzca un daño funcional a las estructuras biológicas de manera directa.

1.2.1.1. Efecto del agregado de cobre sobre la función mitocondrial

Se observó que el agregado de Cu^{2+} en concentraciones mayores a 50 μM al medio donde se encuentran las mitocondrias produce una marcada disminución en la respiración en estado 3 (Fig. 30A). Este estado es el que mejor representa la integridad de la cadena respiratoria ya que involucra la máxima velocidad de respiración (Tabla 3). El consumo de O_2 empleando malato-glutamato como sustrato involucra el flujo de electrones por los complejos I, III y IV de la cadena respiratoria. Si bien se observó un incremento en la respiración en estado 4 (Fig. 30A), esto ocurre a concentraciones mucho más altas de Cu^{2+} . Como consecuencia de la disminución en el consumo de O_2 en estado 3, se observó una disminución en el control respiratorio en presencia de malato-glutamato como sustrato (Fig. 30B).

Debido a que la determinación del consumo de O_2 se realizó inmediatamente luego del agregado de Cu^{2+} al medio, es probable que los cambios observados se deban a un efecto directo del metal sobre algún componente de la membrana.

Al emplear succinato como sustrato también se observó una disminución de la respiración en estado 3 (Fig. 30A) y del control respiratorio (Fig. 30B). Al igual

que con malato-glutamato, la determinación del consumo de O₂ se realizó inmediatamente luego del agregado del Cu²⁺ al medio.

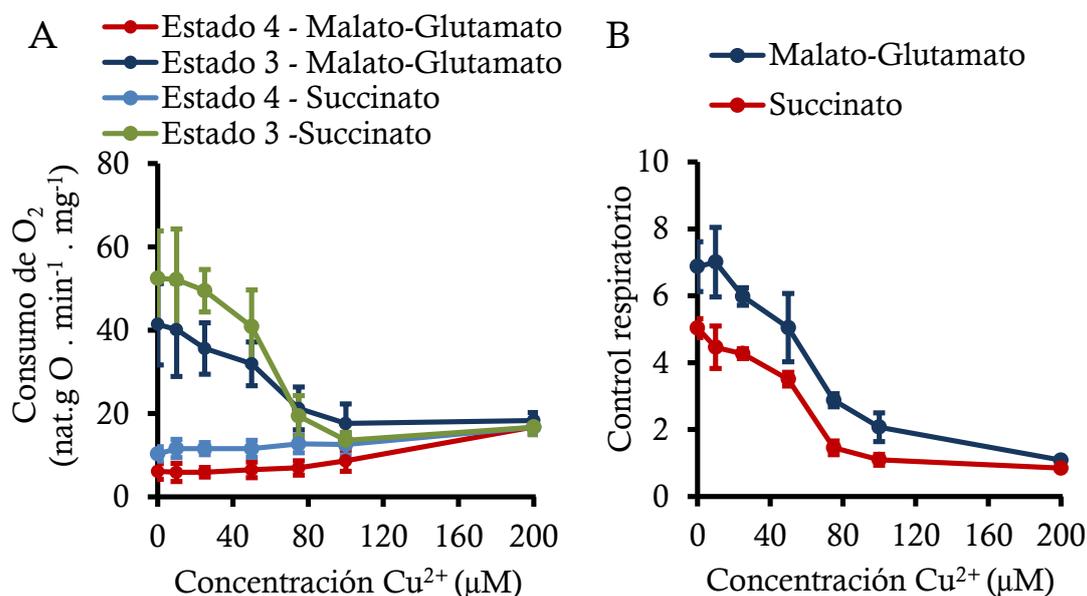


Figura 30. (A) Consumo de O₂ y (B) control respiratorio en mitocondrias aisladas de hígado de rata expuestas *in vitro* a diferentes concentraciones de Cu²⁺. El consumo de O₂ se determinó empleando malato-glutamato o succinato como sustrato de la respiración y la determinación se realizó luego del agregado del metal al medio, sin incubación previa.

1.2.1.2. Reacción entre el cobre y grupos tioles oxidables

Debido a que el Cu²⁺ es una especie moderadamente oxidante ($E^{\circ}_{\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{1+}} = +0,15 \text{ V}$), la exposición directa al metal podría llevar a modificaciones oxidativas en las membranas mitocondriales que medien el daño directo a la organela.

Mediante la reacción del DTNB con los tioles (-SH) remanentes luego del agregado de Cu²⁺, se observó que el metal es capaz de oxidar el -SH presente en el GSH, en la NAC y en la Cys (Fig. 31A).

Por su parte, al incubar un lisado mitocondrial con Cu²⁺, se observó una inmediata oxidación de grupos -SH totales medidos por la reacción con el DTNB (Fig. 31B).

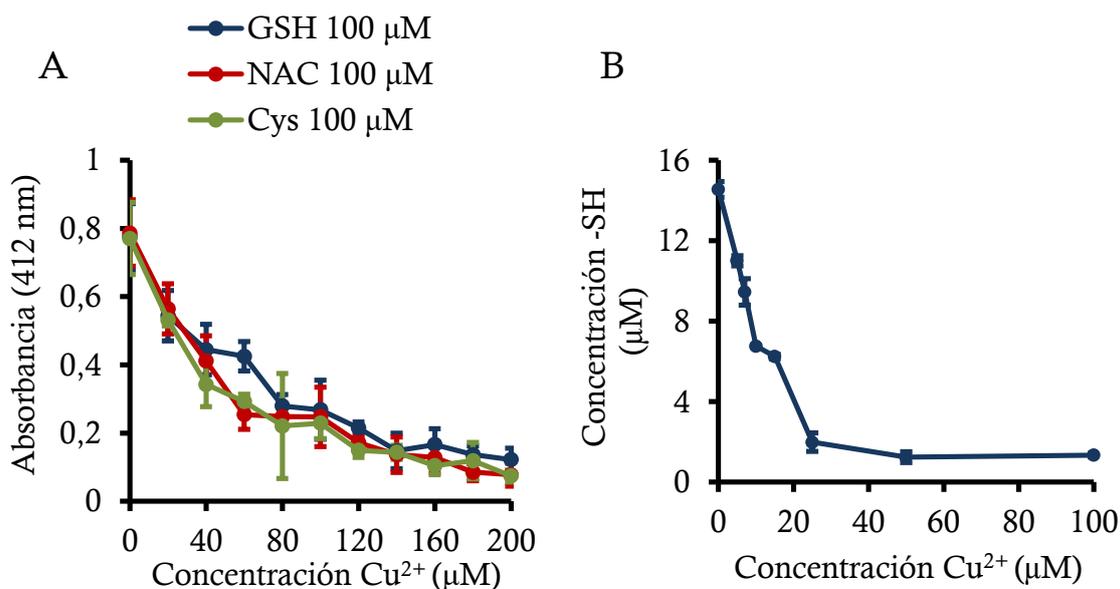


Figura 31. (A) Oxidación *in vitro* del -SH reactivo en GSH, NAC y Cys luego del agregado de Cu²⁺. Reducción *in vitro* del Cu²⁺ a Cu¹⁺. La concentración de grupos -SH para cada grupo es 100 μM. (B) Oxidación *in vitro* de los grupos -SH presentes en mitocondrias aisladas de hígado de rata, luego del agregado de Cu²⁺.

En paralelo a la oxidación de los grupos -SH en las moléculas estudiadas, se observó una reducción del Cu²⁺ a Cu¹⁺ (Fig. 32), al seguir espectrofotométricamente el producto de la reacción entre el Cu¹⁺ y el ácido bicinconínico (BCA).

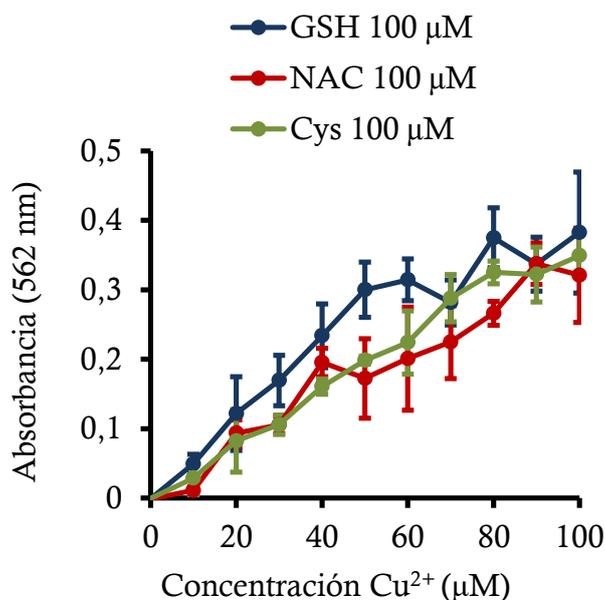


Figura 32. Reducción *in vitro* del Cu²⁺ a Cu¹⁺. La concentración de grupos -SH para cada grupo es 100 μM.

1.2.1.3. Efecto protector de grupos tioles frente al daño a la mitocondria producido de manera directa por el cobre

Al suplementar las mitocondrias con GSH previo al agregado del metal, se logró prevenir completamente la disminución en el consumo de O₂ (Fig. 33A) y control respiratorio (Fig. 33B), indicando que la oxidación de -SH es un blanco de la toxicidad del metal en este modelo *in vitro*.

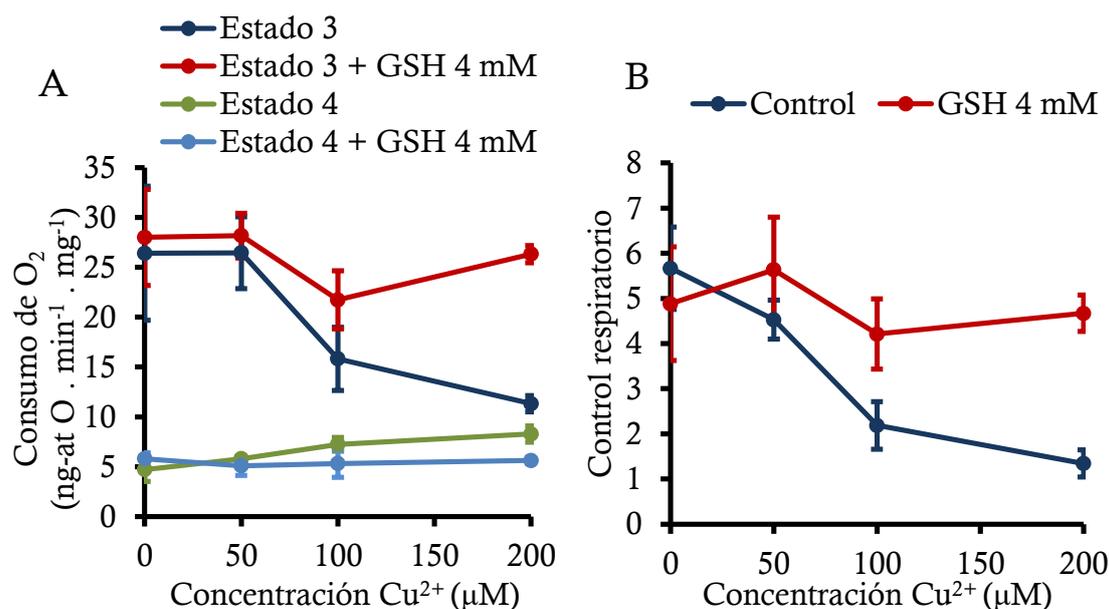


Figura 33. (A) Consumo de O₂ *in vitro* en mitocondrias aisladas de hígado de rata expuestas a Cu²⁺ en presencia y ausencia de GSH y (B) control respiratorio. Como sustrato de la respiración se empleó malato-glutamato. Las mitocondrias fueron suplementadas con GSH 4 mM previo al agregado de Cu²⁺.

El agregado de NAC previo al agregado del metal también resultó efectivo en prevenir la disminución en el consumo de O₂ (Fig. 34A) y el control respiratorio (Fig. 34B) en mitocondrias tratadas con Cu²⁺.

Resulta entonces evidente el efecto directo de altas concentraciones de Cu²⁺ en las membranas mitocondriales y sobre la función respiratoria. Sin embargo, es posible que, al reaccionar el metal con las especies O₂•⁻ y H₂O₂ de manera análoga al mecanismo de acción tóxica propuesto *in vivo*, se potencie drásticamente la toxicidad del mismo.

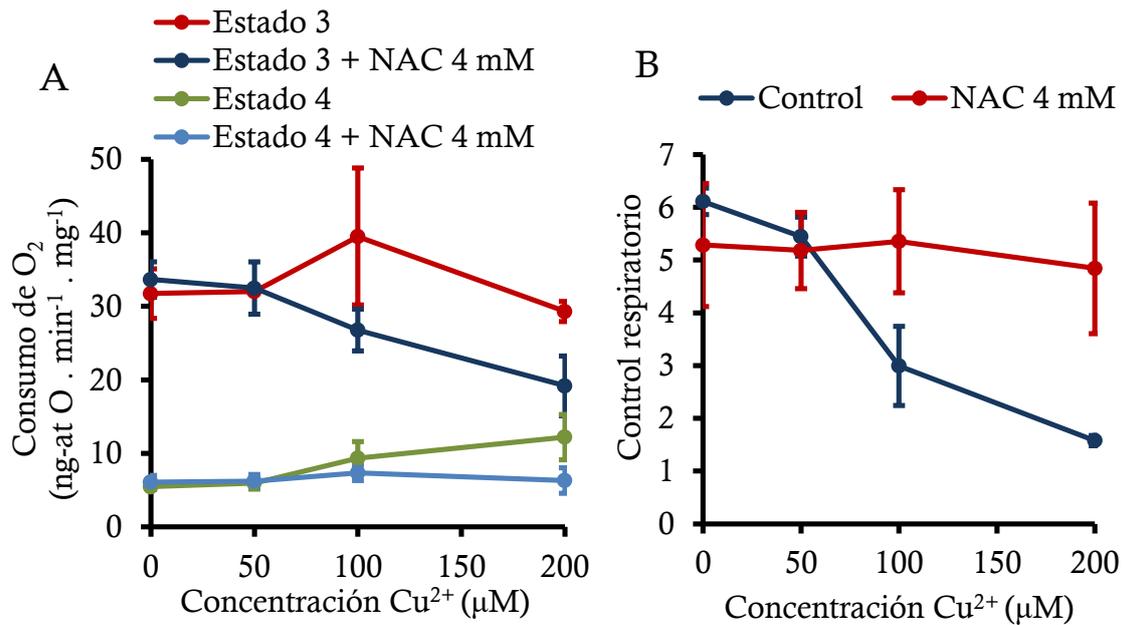


Figura 34. (A) Consumo de O₂ *in vitro* en mitocondrias aisladas de hígado de rata expuestas a Cu²⁺ en presencia y ausencia de NAC y (B) control respiratorio. Como sustrato de la respiración se empleó malato-glutamato. Las mitocondrias fueron suplementadas con NAC 4 mM previo al agregado de Cu²⁺.

1.2.2. Estudio de la interacción del cobre con las especies reactivas del oxígeno

Para estudiar la interacción entre el Cu y las especies O₂^{•-} y H₂O₂ se emplearon mitocondrias aisladas respirando en estado 4 durante la incubación con el metal. Las mitocondrias respirando en este estado metabólico poseen un flujo de electrones lento y una membrana hiperpolarizada, lo cual favorece la formación de O₂^{•-}, que rápidamente dismuta en H₂O₂ y O₂.

1.2.2.1. Efecto de la interacción entre el cobre y las especies reactivas del oxígeno sobre la función mitocondrial

Luego de incubar las mitocondrias aisladas respirando en estado 4 en presencia de Cu²⁺ y utilizando malato-glutamato como sustrato, se observó una disminución en el consumo de O₂ en estado 3. Si bien la concentración de Cu²⁺ necesaria para producir una disminución en la función respiratoria es menor que la necesaria para producir un daño directo sobre la organela, éstas no difieren considerablemente (Fig. 35A). También se observó una ligera disminución del control respiratorio a medida que aumenta la concentración de Cu²⁺ en el medio de incubación (Fig. 35B). Las medidas realizadas a 2 minutos en las figuras

corresponden a la situación sin incubación (como se realizó en 1.2.1.) ya que 2 minutos es el tiempo mínimo que lleva la medida.

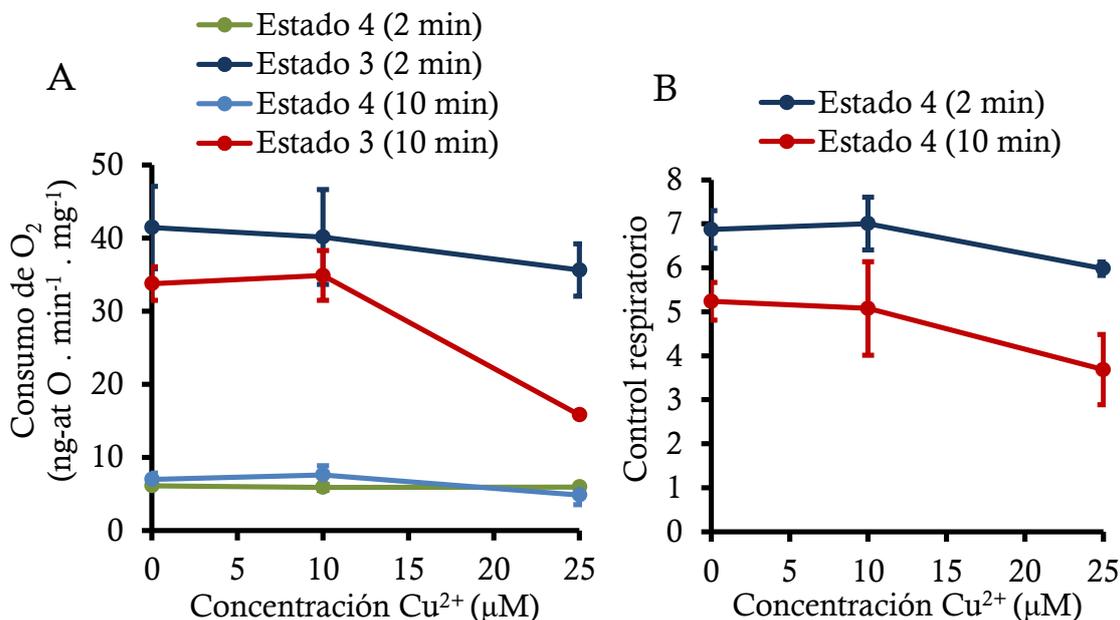


Figura 35. (A) Consumo de O₂ *in vitro* en mitocondrias aisladas de hígado de rata luego de una incubación de 10 min en estado 4 con Cu²⁺. (B) Control respiratorio en mitocondrias aisladas de hígado de rata luego de una incubación de 10 min en estado 4 con Cu²⁺. Se empleó malato-glutamato como sustrato para la respiración.

1.2.2.2. Efecto de la interacción entre el cobre y las especies reactivas del oxígeno sobre la lipoperoxidación

La incubación de mitocondrias respirando en estado 4 con Cu²⁺ produce un incremento en los TBARS que mantiene una correlación con la concentración de metal necesaria para disminuir la función respiratoria luego de la incubación (Fig. 36A). La reacción del Cu²⁺ con el O₂[•] producido como co-producto de la respiración mitocondrial o con otras especies capaces de reducirlo permite luego la reacción del Cu¹⁺ con H₂O₂ para formar HO[•], el cual promueve la lipoperoxidación y el daño oxidativo a las membranas aquí observado.

Es notable que las concentraciones de Cu²⁺ menores a 10 μM no muestran ningún incremento en los TBARS, mientras que a concentraciones mayores a 20 μM parece alcanzarse un *plateau*.

El incremento en los productos finales de lipoperoxidación es consecuencia de la interacción entre las especies producidas por las mitocondrias respirando en

estado 4 y el Cu, ya que al incubar las mitocondrias en estado 1 (ausencia de sustratos para la respiración), no se observan cambios en la lipoperoxidación (Fig. 36B). Es importante remarcar que el flujo de electrones en estado 1 es menor al estado 4, debido a la falta de equivalentes de reducción. Por ese motivo, la producción de $O_2^{\bullet-}$ en estado 1 es baja. Este resultado permite descartar un incremento en los TBARS por el efecto directo del Cu^{2+} sobre las membranas.

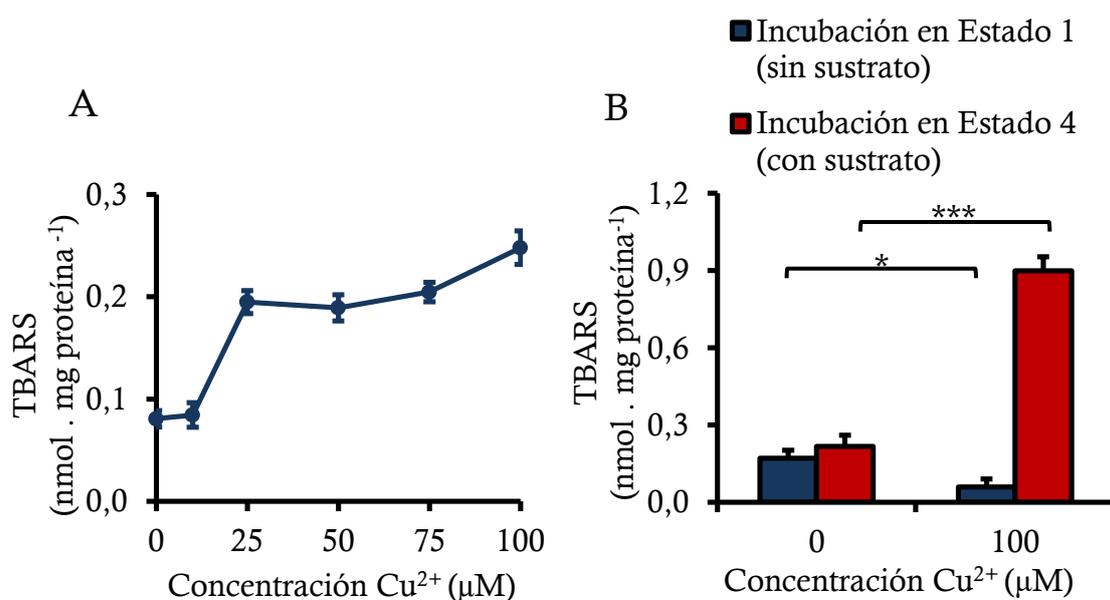


Figura 36. (A) TBARS en mitocondrias aisladas de hígado de rata luego de una incubación de 10 min en estado 4 con Cu^{2+} . (B) TBARS en mitocondrias aisladas de hígado de rata luego de ser incubadas por 30 min en estado 1 o en estado 4. Para las incubaciones en estado 4 se empleó malato-glutamato como sustrato de la respiración. (*, $p < 0,001$)**

1.2.2.3. Efecto protector del GSH y la NAC frente a la disminución del consumo de oxígeno mitocondrial por la incubación con cobre

El agregado de NAC y GSH a las mitocondrias durante la incubación en estado 4 con Cu^{2+} fue capaz de prevenir la disminución del consumo de O_2 (Fig. 37A) y control respiratorio (Fig. 37B). El agregado GSH fue capaz de restaurar el consumo de O_2 a los valores normales, mientras que el efecto de la NAC fue menos marcado.

Es importante destacar que la concentración de Cu^{2+} empleada (25 μM) fue inferior a la requerida para producir una disminución del consumo de O_2 de manera directa. Sin embargo, una fracción de los grupos $-SH$ será igualmente oxidada por la reacción con el Cu^{2+} .

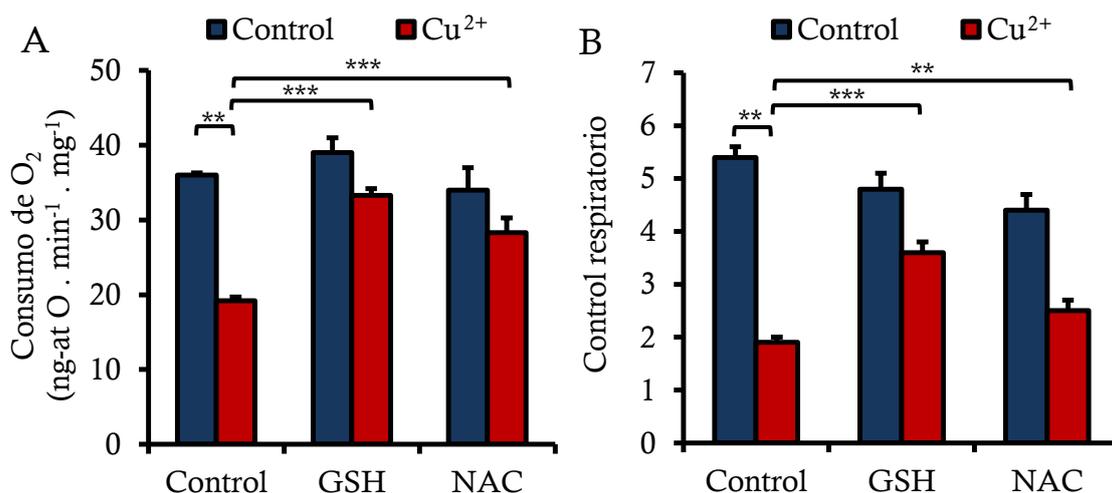


Figura 37. (A) Consumo de O₂ *in vitro* en estado 3 en mitocondrias aisladas de hígado de rata expuestas a Cu²⁺ 25 μM, en presencia y ausencia de GSH o NAC y (B) control respiratorio. Como sustrato de la respiración se empleó malato-glutamato. El GSH y la NAC se emplearon en una concentración 4 mM. (**, p<0,01; ***, p<0,001)

1.2.2.4. Efecto protector del GSH frente a la lipoperoxidación en mitocondrias aisladas incubadas con cobre

La suplementación con GSH (4 mM) previo a la incubación con Cu²⁺ (25 μM) fue capaz de prevenir el incremento en los TBARS. Sin embargo, la NAC (4 mM) no fue igualmente eficiente en prevenir la lipoperoxidación (Fig. 38). Notablemente, el GSH fue capaz de disminuir el incremento en la lipoperoxidación hasta alcanzar los valores del control.

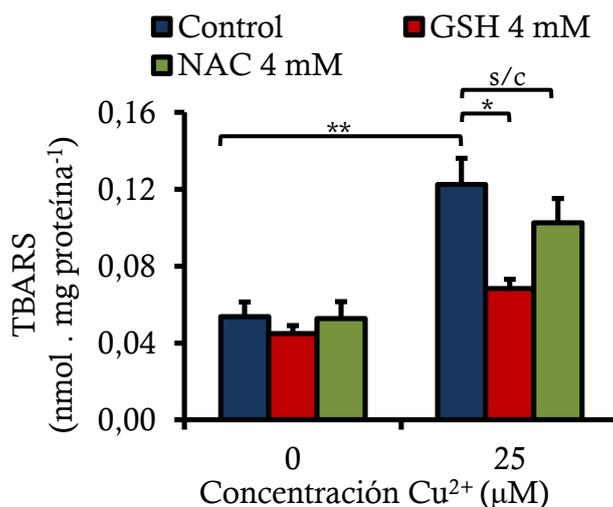


Figura 38. TBARS en mitocondrias aisladas de hígado de rata luego de una incubación de 10 min con Cu²⁺. Las mitocondrias fueron incubadas en estado 4 utilizando malato-glutamato como sustrato. (*, p<0,05; **, p<0,01)

1.3. Discusión

La exposición aguda a altas dosis de Cu en ratas resulta tóxica y produce la muerte de los animales. La inyección i.p. implica una rápida distribución del metal hacia el hígado; luego de su ingreso a las células hepáticas, el Cu debe ser rápidamente acomplejado por chaperonas para su correcta distribución y evitar que participe en reacciones indeseadas para la célula. Un incremento de la fracción libre de iones Cu, entonces, puede conducir a la participación descontrolada del metal en estas reacciones tóxicas para la célula.

En condiciones fisiológicas, el contenido intracelular de Cu se mantiene en estado estacionario debido al constante influjo de metal, principalmente por Ctrl (Lee y col., 2002), y su eflujo por las ATPasas de membrana ATP7A o ATP7B. Por lo tanto, una disminución en la velocidad de extrusión del metal fuera de la célula, como ocurre en el caso de la enfermedad de Wilson, o un incremento en la velocidad de ingreso de metal, como en los modelos animales y celulares aquí utilizados, llevará a un incremento del contenido intracelular de Cu.

Las ratas LEC (del inglés *long Evans cinnamon*) son reconocidas como modelo animal experimental de enfermedad de Wilson, por un defecto genético en la bomba ATP7B (Terada y Sugiyama, 1999). En estos animales, el Cu se acumula en el hígado hasta alcanzar valores superiores a $1000 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ peso seco de órgano, donde se vuelve tóxico, mientras que los valores controles son de aproximadamente $50 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ peso seco de órgano (Malhi y col., 2002). Si bien, a diferencia del trabajo de Malhi, el contenido de metal aquí fue determinado como $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ peso húmedo de órgano, en ambos modelos se observó un incremento en el contenido de metal hepático cercano a 20 veces (Fig. 24). Por lo tanto, desde el punto de vista de la acumulación hepática del metal, la toxicidad del Cu debido al influjo incrementado generado en este modelo sería similar al caso de la enfermedad de Wilson, donde el eflujo se encuentra disminuido.

El incremento del contenido de Cu luego de la inyección i.p. de Cu^{2+} se acompaña de un incremento en la concentración de $^1\text{O}_2$, evidenciado por el aumento de la QL *in vivo*. Esta especie es producto de una reacción de terminación entre dos $\text{ROO}\cdot$, lo cual indica un incremento en la lipoperoxidación. Es por ello

que esta determinación da cuenta del estrés y daño oxidativo hepático. En coincidencia con el aumento de QL *in vivo*, se observó un incremento en el contenido de TBARS, corroborando el daño oxidativo a membranas. Si bien se observó un ligero incremento en la oxidación de proteínas determinada como grupos –CO, éste no es significativo respecto al control (Fig. 25).

El daño oxidativo a biomoléculas podría encontrar su explicación en la capacidad del Cu^{1+} de reaccionar con el H_2O_2 producido de manera endógena por las células, dando origen al radical HO^\bullet (Fenton, 1894; Haber y Weiss, 1934). Esta especie altamente oxidante y con una vida media sumamente corta ($t_{1/2} = 10^{-17}$ s) es capaz de reaccionar inespecíficamente con cualquier molécula con la que entre en contacto. Al poseer el HO^\bullet un carácter altamente electrofílico, esta especie es sumamente eficiente en abstraer un hidrógeno en posición alfa a un doble enlace en un ácido graso ubicado en la membrana, dando origen a un radical alílico e iniciando de esta manera la lipoperoxidación (Halliwell y Chirico, 1993). Sin embargo, atribuir el daño oxidativo al HO^\bullet resulta en una serie de complicaciones debido a que esta especie no se puede determinar en un sistema biológico complejo. Las técnicas disponibles permiten la detección y cuantificación del HO^\bullet en sistemas relativamente definidos, pero en un entorno biológico complejo como la célula, la baja selectividad dificulta la determinación. Es por esto que la existencia del radical HO^\bullet en estos sistemas se evidencia en forma indirecta. Por otro lado, si bien el estrés oxidativo hepático se manifiesta a través del incremento observado en la QL *in vivo*, lo que indica que hubo peroxidación lipídica y emisión de fotones como consecuencia del incremento en la producción de $^1\text{O}_2$, surge el interrogante de si el daño oxidativo observado conduce a la muerte celular.

Las mitocondrias son organelas particularmente sensibles al daño oxidativo. Éstas contribuyen en gran medida a mantener las concentraciones en estado estacionario de las especies O_2^\bullet y H_2O_2 . Sin embargo, al ser al mismo tiempo una fuente importante de estas especies reactivas, las mitocondrias dependen de numerosos sistemas antioxidantes dedicados a preservar su estado redox. Por otro lado, el alto contenido de insaturaciones en los ácidos grasos presentes en la membrana interna es un blanco potencial para las especies electrofílicas promotoras de la lipoperoxidación. Entonces, el entorno oxidante

generado por la sobrecarga de iones Cu debería tener consecuencias funcionales para las mitocondrias. Sin embargo, la respiración mitocondrial determinada en mitocondrias aisladas, luego de la sobrecarga de Cu^{2+} *in vivo*, no se vio afectada (Figs. 27 y 28). Si bien la respiración en estado 3 es un parámetro que refleja de manera sensible la funcionalidad de la cadena respiratoria, éste no presentó cambios al ser determinado ya sea utilizando malato-glutamato así como succinato como sustratos para la respiración. Asimismo, los complejos I y II tampoco mostraron ningún cambio en su actividad (Fig. 29).

Por lo tanto, la sobrecarga de iones Cu es capaz de alterar el estado redox de la célula y producir modificaciones oxidativas en biomoléculas. Sin embargo, no es posible concluir que exista una relación causa-consecuencia entre estas alteraciones a nivel bioquímico y la muerte celular, ya que al desconocer la identidad de las especies que dan origen al daño oxidativo, no es posible prevenir experimentalmente su inducción. Por otro lado, la función mitocondrial se encontró inalterada en el modelo *in vivo* a pesar del incremento en parámetros relacionados con el estrés oxidativo, sugiriendo que la organela no posee un papel central en la toxicidad del metal en la dosis utilizada en este estudio.

Una vez caracterizada la toxicidad aguda del Cu *in vivo*, comprobándose la existencia de alteraciones en la homeostasis redox, se prosiguió a estudiar en modelos *ex vivo* la naturaleza de la interacción del metal con las estructuras biológicas, para lo cual se utilizaron mitocondrias aisladas de hígado de rata suspendidas en medio de respiración.

En la segunda parte de este Capítulo (1.2), se demostró que el Cu^{2+} es capaz de producir un daño directo a las membranas mitocondriales en un modelo *in vitro* (1.2.1), evidenciado por una disminución en la función respiratoria (Fig. 30). Antes de extrapolar estos resultados a una situación *in vivo*, hay que tener en cuenta que en la célula es posible que los blancos moleculares de la toxicidad del Cu^{2+} difieran, de acuerdo a la distribución intracelular del metal. Sin embargo, este modelo *ex vivo* permite estudiar la relación entre la función biológica de una organela y el metal en sus distintos estados de oxidación, así como también la interacción con especies químicas definidas; algo que resulta difícil en entornos biológicos más complejos tales como animales, tejidos o células. Los resultados

obtenidos pueden extrapolarse a otras estructuras celulares, desde un punto de vista químico, pero haciendo las consideraciones pertinentes.

El consumo de O_2 en estado 3 por parte de las mitocondrias aisladas involucra la totalidad de la cadena respiratoria (Tabla 3). En el caso de emplear malato-glutamato como sustratos, cada molécula de NADH formada en la matriz mitocondrial por la oxidación del malato transporta un par de electrones hasta el complejo I, luego éste cede sus electrones a la coenzima Q la cual los transporta hasta el complejo III, los cede al citocromo c y éste finalmente al complejo IV, donde se reduce el O_2 a H_2O (Fig. 7). De esta manera, la disminución en el consumo de O_2 luego del agregado de Cu^{2+} implicaría un daño a alguno o varios de los componentes previamente mencionados. Interesantemente, se observó que al realizar la determinación empleando succinato como sustrato de la respiración también se observa una disminución en el consumo de O_2 en estado 3 a concentraciones de Cu^{2+} similares a los obtenidos con malato-glutamato (Fig. 35). La diferencia al usar succinato como sustrato es que los electrones ingresan a la cadena respiratoria por el complejo II en vez del complejo I, por lo cual el daño producido a la cadena de transporte de electrones por el Cu^{2+} ocurre corriente abajo involucrando los complejos III, IV, V o algún otro componente de la mitocondria necesario para la respiración.

Notablemente, la inhibición del consumo de O_2 ocurre de manera instantánea luego del agregado de Cu^{2+} , sugiriendo una reacción rápida capaz de modificar la estructura y función de las biomoléculas presentes en la organela. Por otro lado, la concentración de metal necesaria para producir un daño resulta considerable, teniendo en cuenta que las fracciones de metal libres en una célula son extremadamente pequeñas. En principio, sería posible que el metal posea una baja reactividad frente a los potenciales blancos moleculares presentes en la mitocondria. Por otro lado, puede suceder que existan sistemas endógenos presentes en la organela capaces de modular la reactividad del metal (por ejemplo, sistemas quelantes capaces de inactivar el metal o grupos reactivos que pueden ser modificados pero sin tener efecto sobre otras estructuras más importantes).

Se observó que el Cu^{2+} es capaz de oxidar los grupos $-SH$ presentes en (GSH, NAC y Cys), reduciéndose a Cu^{1+} (Fig. 31A). Esto es predecible desde un

punto de vista termodinámico ya que de acuerdo con su potencial de reducción, el Cu^{2+} posee cierto carácter oxidante ($E^{\circ}_{\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{1+}} = +0,15 \text{ V}$) mientras que los grupos $-\text{SH}$ presentes en las tres moléculas poseen un marcado carácter reductor ($E^{\circ}_{\text{GSSG}/\text{GSH}} = -0,24 \text{ V}$; $E^{\circ}_{\text{Cistina}/\text{Cys}} = -0,22 \text{ V}$) (Jocelyn, 1967). Por otro lado, resulta interesante que la reacción ocurre rápidamente luego del agregado del metal, indicando que no hay un impedimento cinético para la reacción.

Al incubar un lisado mitocondrial con Cu^{2+} se observa una depleción casi completa de los $-\text{SH}$ totales presentes en la organela, originalmente presentes en el espacio intermembrana (EIM) y la matriz mitocondrial. Es decir, el agregado de Cu^{2+} permitió titular prácticamente la totalidad de los grupos $-\text{SH}$, incluyendo tanto los grupos $-\text{SH}$ proteicos y los grupos $-\text{SH}$ no proteicos (Fig. 31B).

Teniendo en cuenta que el estado de oxidación del Cu^{2+} se puede modular con moléculas portadoras de grupos $-\text{SH}$ como GSH o NAC, se intentó prevenir el efecto del metal sobre el consumo de O_2 suplementando las mitocondrias con estas moléculas. Efectivamente, una concentración de 4 mM de GSH (Fig. 33) o NAC (Fig. 34) en el medio donde se encuentran suspendidas las mitocondrias permitió neutralizar completamente el efecto del metal sobre la respiración mitocondrial.

La capacidad del metal de oxidar grupos $-\text{SH}$ puede tener graves consecuencias para la homeostasis celular ya que la formación de puentes $-\text{S}-\text{S}-$, tanto intra- como intercatenarios, modificaría drásticamente la estructura y actividad enzimática (Siliprandi y col., 1978). Posiblemente sea por esta razón que existen diversas reductasas de membrana que reducen el metal a Cu^{1+} , previo a su ingreso al citosol (González y col., 2008; Shi y col., 2003). Por otro lado, la célula dispone de una alta concentración de grupos $-\text{SH}$ reducidos en su citosol, tanto proteicos como en la forma de GSH. En caso de que el metal ingresara al citosol como Cu^{2+} o bien este fuera oxidado dentro de la célula, el elevado contenido de GSH se encargaría de devolverlo rápidamente a su estado reducido, previniendo la formación indeseada de un puente disulfuro en proteínas. Por este motivo, el carácter reductor del citosol, reflejado en la homeostasis de los grupos $-\text{SH}$, es de vital importancia para controlar la reactividad del metal.

Es asumible entonces que la alta concentración de Cu^{2+} necesaria para producir la disminución en el consumo de O_2 mitocondrial se deba al *pool* de GSH presente en el EIM y la matriz de las mitocondrias aisladas. El grupo $-\text{SH}$ de este GSH resulta titulable y es oxidado al incrementar la cantidad de equivalentes de Cu^{2+} agregados. Luego de oxidar completamente los grupos $-\text{SH}$ solubles no proteicos, deben comenzar a oxidarse los grupos $-\text{SH}$ en proteínas de membrana y en ese momento se observan los cambios en la respiración mitocondrial.

Paralelamente a la reacción del Cu^{2+} con grupos $-\text{SH}$, la reactividad del Cu puede potenciarse por la interacción de este metal con otras especies químicas como el H_2O_2 y el $\text{O}_2\cdot^-$. Para estudiar el efecto del metal sobre las estructuras involucradas en la respiración mitocondrial se trabajó con mitocondrias respirando en estado 4 durante la incubación con Cu^{2+} (Sección 1.2.2.). Es sabido que en esta condición, la membrana interna de la organela se encuentra hiperpolarizada y la producción de las especies H_2O_2 y $\text{O}_2\cdot^-$ resulta elevada. Como se mencionó en la Introducción, el flujo de electrones a través del complejo I implica como reacción colateral la reducción univalente del O_2 a $\text{O}_2\cdot^-$, y esto ocurre en la matriz mitocondrial. El complejo III, por su parte, libera $\text{O}_2\cdot^-$ a la matriz mitocondrial y al EIM. Si bien el $\text{O}_2\cdot^-$ que se origina en la matriz mitocondrial no puede alcanzar el EIM debido a que es una especie cargada, éste rápidamente dismuta en una reacción catalizada por la SOD2 y así, el H_2O_2 generado sí puede difundir a través de la membrana interna y externa mitocondrial (Muller y col., 2004).

El agregado de Cu^{2+} al medio donde se encuentran suspendidas las mitocondrias respirando permite que el metal pueda alcanzar el EIM sin dificultad ya que la membrana externa mitocondrial posee una elevada permeabilidad, fundamentalmente debido a la presencia de canales aniónicos voltaje-dependientes (VDACs, del inglés *voltage-dependent anion channel*) (Mannella y col., 1983). De esta forma, el Cu y las especies involucradas en el ciclado redox, H_2O_2 y $\text{O}_2\cdot^-$, pueden oxidar fosfolípidos y proteínas de la membrana interna, alterando su función y permeabilidad.

En base a los resultados obtenidos, es importante en este momento realizar una observación sobre los distintos mecanismos que permiten el ciclado redox de los metales Fe y Cu. Se estima que a nivel citosólico el Fe^{3+} es reducido a Fe^{2+} por

medio del $O_2\cdot$ (Fong y col., 1976). Sin embargo, debido a que el Cu^{2+} es rápidamente reducido a Cu^{1+} por los grupos $-SH$, es muy probable que los dos metales alcancen su estado de oxidación inferior por reacciones diferentes.

Luego de incubar las mitocondrias respirando en estado 4 con Cu^{2+} , el agregado de ADP permite determinar la velocidad de respiración en estado 3. Al depender el estado 3 de la integridad de la cadena respiratoria, se puede estudiar el efecto de las especies producidas por las mitocondrias respirando y el Cu^{2+} sobre la membrana y las proteínas involucradas en este proceso. El Cu^{2+} produce una disminución en el consumo de O_2 en estado 3, luego de la incubación de las mitocondrias con el metal en estado 4, la cual es dependiente del tiempo de incubación (Fig. 35). Esto se entiende gracias a la reacción de Fenton entre el Cu^{1+} y el H_2O_2 . El $HO\cdot$ generado es capaz de oxidar proteínas y promover la lipoperoxidación, alterando de esta manera la función de la cadena respiratoria. Resulta notable que el daño a las estructuras biológicas, producto de la reacción entre el Cu^{1+} y el H_2O_2 , tiene lugar a concentraciones de Cu^{2+} muy similares a las concentraciones necesarias para producir un daño directo, producto de la oxidación de grupos $-SH$. Por ese motivo es esperable que ambas reacciones tengan lugar simultáneamente.

Adicionalmente, se observó un incremento en los TBARS luego de la incubación en estado 4 con Cu^{2+} (Fig. 36). Es interesante notar, que la curva posee una forma sigmoidea y se observa una fase de latencia a concentraciones menores a $20\ \mu M$ de Cu^{2+} . El GSH presente en el EIM y en la matriz mitocondrial explica la fase de latencia en cuanto al efecto del metal sobre los grupos $-SH$. Sin embargo, al incubar las mitocondrias en estado 4 con Cu^{2+} , el GSH promovería la reducción del metal a Cu^{1+} , facilitando de esta forma la reacción de Fenton. Esto sugiere que el efecto protector del tripéptido, en este caso, debe ser independiente del grupo $-SH$. Naturalmente, existen enzimas capaces hacer uso del GSH para reducir el H_2O_2 (Gpx1-4) y los lipohidroperóxidos orgánicos ROOH (Gpx4). Sin embargo, estas enzimas no resultan relevantes en este modelo, ya que no se dispone de un sistema capaz de regenerar el GSH endógeno, por lo cual la naturaleza del efecto protector del GSH sea probablemente química.

Al suplementar a las mitocondrias respirando en estado 4 en presencia de Cu^{2+} con GSH o NAC 4 mM, se observó una protección considerable por parte del GSH mientras que la NAC sólo ofrecía una ligera protección en la respiración en estado 3 (Fig. 37). Dado que ambas moléculas poseen la misma capacidad de reducir el Cu^{2+} a Cu^{1+} , la diferencia en el efecto debe ser consecuencia de la diferente estructura química: es posible que el GSH esté actuando no sólo como agente reductor sino que también como una molécula quelante, mientras que la NAC no posea esta última característica.

Al ser un metal de transición, el Cu puede ser coordinado por diversos ligandos. Se ha demostrado la formación de complejos estables *in vitro* de Cu tanto de la NAC como el GSH (Zheng y col., 2010; Aliaga y col., 2016). Sin embargo, también se ha reportado que el Cu unido a otros ligandos aún puede participar en reacciones específicas. Por ello, es posible que los complejos formados con el metal posean reactividad *in vivo* (Speisky y col., 2009).

El GSH fue capaz de prevenir completamente la lipoperoxidación que resulta de la incubación de las mitocondrias respirando con Cu^{2+} (Fig. 38). No obstante, la suplementación con NAC no protegió significativamente a los fosfolípidos. Por ello, es posible que el GSH forme un complejo con el Cu^{1+} más estable e inocuo que la NAC. Vale mencionar que la capacidad del GSH de prevenir la lipoperoxidación parece ocurrir previo a la reacción de Fenton y en consecuencia se previenen todos los eventos corriente debajo de la formación del HO^\bullet , incluyendo la lipoperoxidación, probablemente debido a un efecto quelante del GSH, tal como se ilustra en la Figura 39.

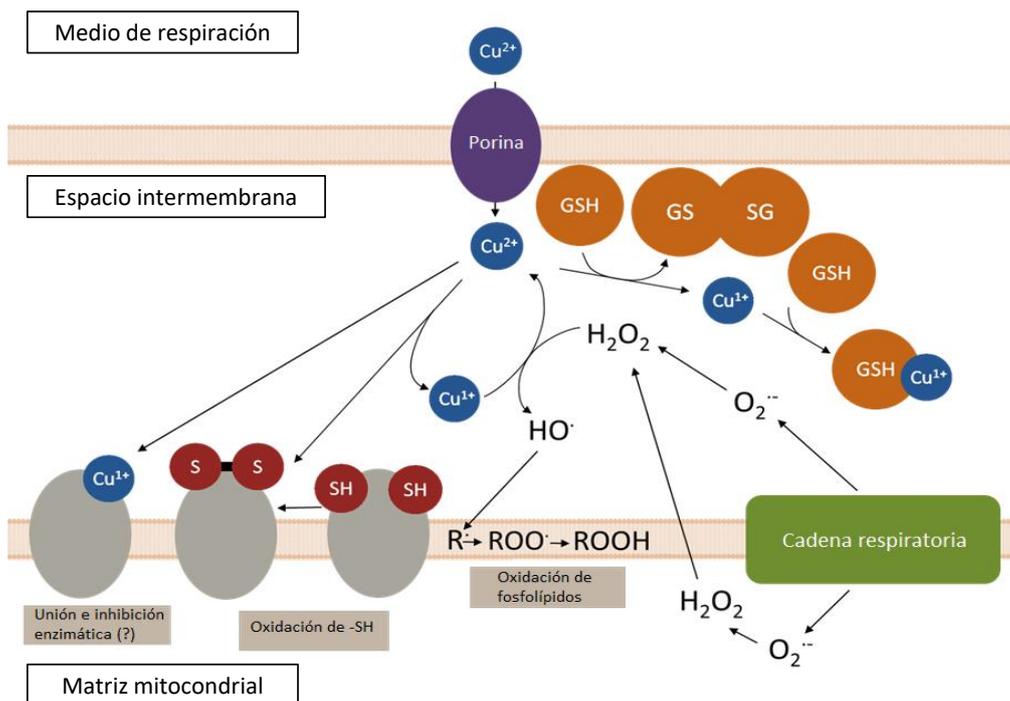


Figura 39. Esquema de las reacciones del Cu con biomoléculas en un modelo de mitocondrias *ex vivo*. El Cu^{2+} permea la membrana externa a través de las porinas, conocidas como VDACS. Luego el Cu^{2+} es reducido a Cu^{1+} por los grupos $-\text{SH}$ presentes en la organela, mientras que el GSH mantiene al metal en una forma inactiva. El exceso de Cu^{1+} reacciona con el H_2O_2 producido por la CTE y promueve la lipoperoxidación y alteración de proteínas de la membrana interna. Adicionalmente, los iones Cu pueden posiblemente interactuar con otros ligandos presentes en las proteínas, alterando su función.

Por último, no puede descartarse que el Cu^{1+} reducido también sea capaz de interactuar con otros componentes de la membrana como las proteínas por medio de equilibrios de complejación, lo cual también tendría consecuencias funcionales.

En resumen, según lo observado en la primera parte de este Capítulo (Sección 1.1), la muerte celular podría estar relacionada con la acumulación intracelular de ROOH ya que se observó daño y estrés oxidativo hepático evidenciado por el incremento de QL *in vivo* y de TBARS en hígado. Es importante destacar que los síntomas observados en los animales expuestos a Cu^{2+} como taquipnea, taquicardia y el oscurecimiento de la piel, parecen obedecer a una hipoxia. Por lo cual es posible que exista un trastorno circulatorio en paralelo a la acumulación de Cu en los órganos, producto del modelo animal empleado. Por otro lado, la elevada concentración a la cual se encuentran expuestas las células

endoteliales, previo al ingreso del metal al hígado, podría influenciar los resultados obtenidos e interpretados como el incremento del contenido de Cu hepático.

En vista de que el objetivo de este trabajo es comprender los potenciales blancos en la citotoxicidad del Cu es necesario considerar que variables adicionales, como la hipoxia asociada a un trastorno circulatorio, podrían influenciar los resultados obtenidos, dificultando la interpretación de los mismos. Por ello, en los capítulos siguientes se continuó trabajando con sistemas celulares.

Los resultados observados en 1.2 señalan que la reacción del Cu^{1+} con el H_2O_2 producido por la mitocondria es capaz de incrementar la lipoperoxidación. Durante el ciclado redox, el Cu alcanza su estado de oxidación inferior probablemente por la reacción con grupos $-\text{SH}$ intracelulares. El daño directo a las estructuras biológicas producido por el Cu^{2+} es completamente prevenido por la reducción previa del metal por los grupos $-\text{SH}$ del GSH o de la NAC. Adicionalmente, el GSH es capaz de prevenir completamente el daño producido por la reacción de Fenton en ausencia de enzimas antioxidantes, posiblemente por una reacción de complejación del metal.

Capítulo 2: Sobrecarga de cobre en células: estrés oxidativo y efecto protector del glutatión

En vista de que uno de los objetivos de esta tesis es comprender la naturaleza del daño producido por el Cu una vez que este se encuentra libre dentro de la célula, los siguientes experimentos fueron realizados utilizando sistemas celulares.

2.1. Efecto del estrés oxidativo generado por la sobrecarga de cobre sobre la respiración mitocondrial en células en cultivo

Para estudiar el efecto de la sobrecarga de iones Cu sobre la función mitocondrial frente al incremento de la producción de especies oxidantes, se comenzó por analizar el efecto de concentraciones tóxicas del metal sobre la viabilidad de diferentes células en cultivo: J774A.1, Vero (líneas celulares) y BAEC (cultivo primario).

2.1.1. Viabilidad celular en células Vero, J774A.1 y BAEC expuestas a altas concentraciones de cobre

Estas células no mostraron diferencias considerables en la sensibilidad frente al Cu^{2+} , observándose una dosis letal 50 (DL_{50}) de 400 μM para BAEC y aproximadamente 700 μM para J774A.1 y Vero (Fig. 40). En vista de esto y considerando la fácil manipulación de las células J774A.1, se continuó trabajando con estas células.

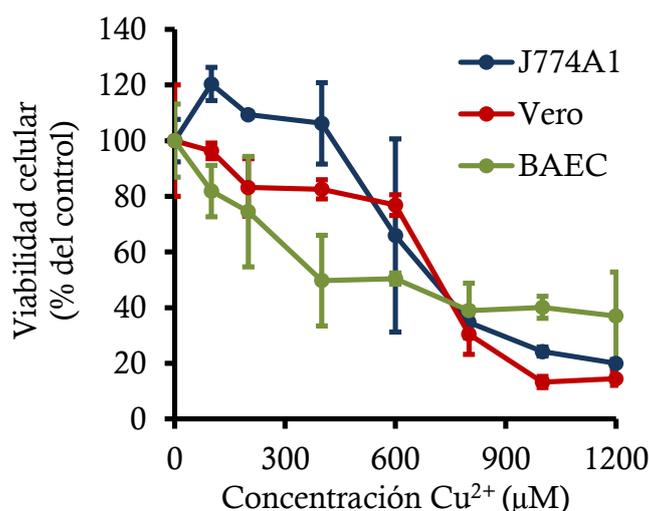


Figura 40. Viabilidad celular en células J774A.1, Vero y BAEC luego de una exposición de 24 horas a Cu^{2+} .

2.1.2. Producción de H₂O₂ en células J774A.1 expuestas al cobre

Se observó que las células J774A.1 expuestas a Cu²⁺, producen H₂O₂ a mayor velocidad que las células controles (Fig. 41). También es notable, que el incremento en la producción de esta especie ocurre rápidamente luego del inicio de la exposición al metal. Esta producción de H₂O₂ fue determinada en el medio extracelular por la oxidación de la sonda *Amplex Red* mediada por la HRP. Dado que el H₂O₂ se determina una vez que éste difunde fuera de la célula, la localización intracelular, así como las enzimas o las especies químicas que dan origen al H₂O₂ producido en las células expuestas a Cu²⁺ son inciertas. Sin embargo, esta determinación permite ver que estas células están expuestas a una situación de estrés oxidativo.

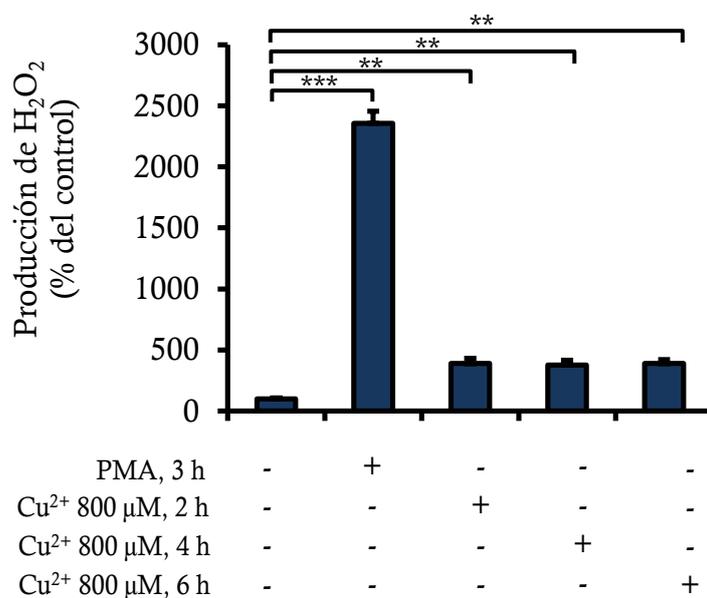


Figura 41. Cinética del efecto de Cu²⁺ 800 μM sobre la producción de H₂O₂ en células J774A.1. PMA fue utilizado como control positivo. (**, p<0,01; ***, p<0,001)

Al tratarse de macrófagos, es posible que el incremento en la producción de H₂O₂ tuviese su origen en la activación de las células y el consecuente incremento en la actividad de NADPH oxidasa (NOX) (Mangnum y col., 2015). Sin embargo, en las células J774A.1 incubadas con Cu²⁺ 600 μM durante 6 horas, no se observaron cambios en la producción de H₂O₂ luego de la inhibición de la NADPH oxidasa por el agregado de DPI (Fig. 42).

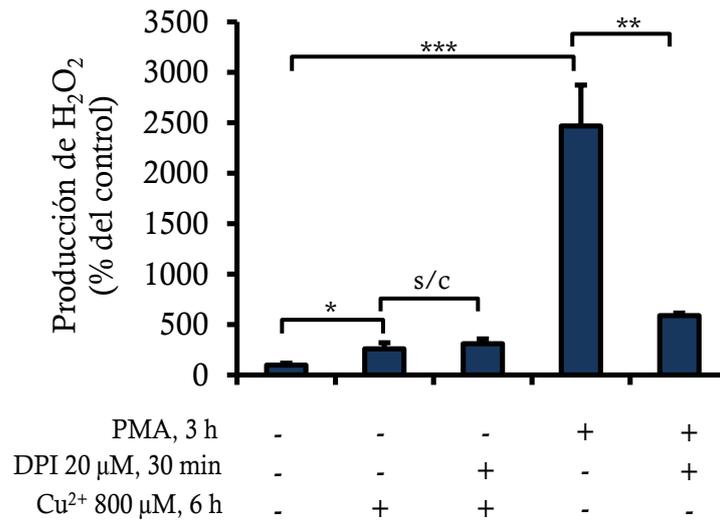


Figura 42. Efecto del DPI en células J774A.1 tratadas con Cu²⁺ 800 μM sobre la producción de H₂O₂. (*, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; s/c, sin cambios)

2.1.3. Análisis morfológico de células J774A.1 expuestas al cobre

La microscopía de células J774A.1 expuestas a una concentración letal de Cu²⁺ muestra un aparente incremento en el volumen celular. En células aisladas se observaron protrusiones en la membrana que forman burbujas con un contenido oscuro o en ocasiones translúcido (Fig. 43).

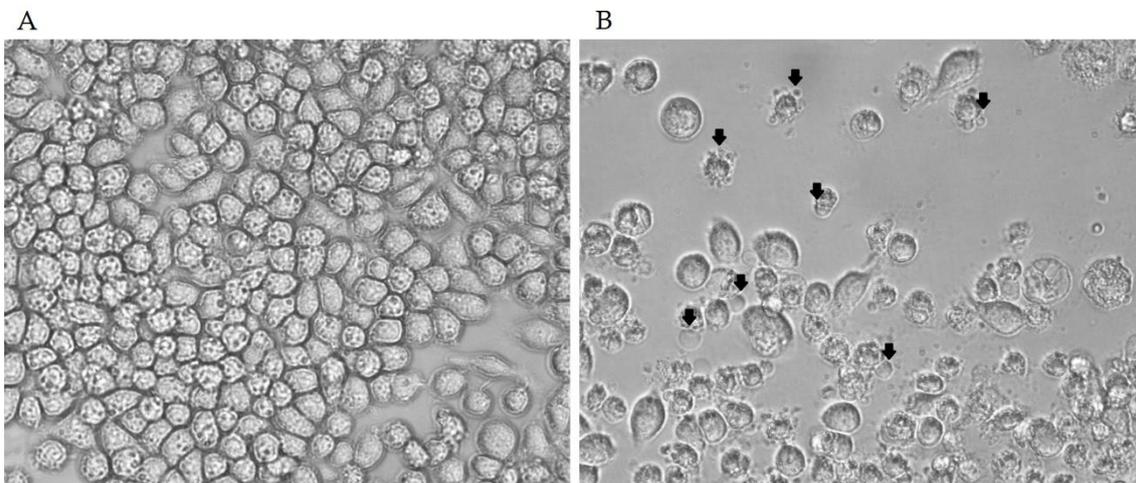


Figura 43. (A) Microscopía (100X) de células J774A.1 controles. (B) Microscopía (100X) de células J774A.1 tratadas con Cu²⁺ 800 μM por 24 h. Las flechas indican protrusiones de membrana.

2.1.4. Función mitocondrial en células J774A.1 expuestas al cobre

Para estudiar la función mitocondrial en las células se empleó un oxímetro *Seahorse*. En esta determinación, las células fueron cultivadas en placas especiales de fondo cónico. La ventaja del equipo *Seahorse* sobre la metodología utilizada en el Capítulo 1, es que permite estudiar la función mitocondrial utilizando las células adheridas. Esto evita no sólo el estrés generado por la re-suspensión de las células, sino también el daño producido por el aislamiento mitocondrial.

La exposición al Cu^{2+} en células J774A.1 no produce una disminución en el consumo de O_2 mitocondrial durante las primeras 6 horas de exposición (Fig. 44A). Tampoco se observa una disminución en el control respiratorio en células J774A.1 luego de la exposición a Cu^{2+} (Fig. 44B).

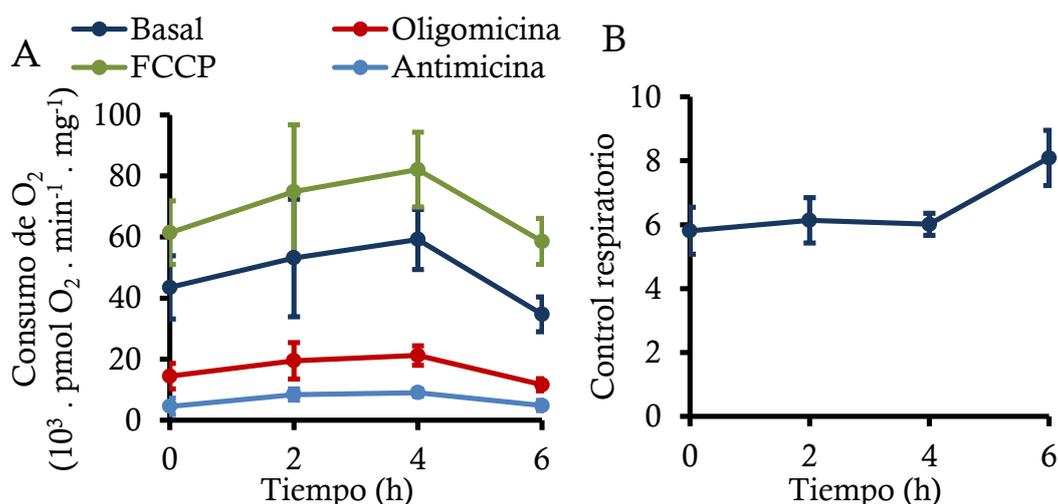


Figura 44. (A) Cinética de consumo de oxígeno en células J774A.1 incubadas con Cu^{2+} 800 μM . (B) Control respiratorio en células J774A.1 incubadas con Cu^{2+} 800 μM .

2.2. Estrés oxidativo y efecto protector del glutati6n en células expuestas a concentraciones t6xicas de cobre

Respecto a las reacciones t6xicas en las cuales puede participar el Cu, el modelo de mitocondrias aisladas empleado en la segunda parte del Capítulo 1 (Secci6n 1.2) demostr6 que el Cu^{1+} es capaz de generar da1o oxidativo mediante la reacci6n con el H_2O_2 producido por la mitocondria y oxidar directamente los grupos $-\text{SH}$ presentes en biomol6culas, mientras que el GSH result6 ser una

molécula esencial en la protección frente a los iones Cu. Si bien las mitocondrias no fueron directamente afectadas por la sobrecarga del metal *in vivo* como se observó en la primera parte del Capítulo 1 (Sección 1.1.4), estas reacciones podrían tener lugar sobre otras estructuras celulares.

Para comprender la relevancia en la citotoxicidad del Cu de las reacciones involucradas en el daño generado por el metal sobre las estructuras biológicas, se procedió a continuación a analizar el detalle de la sobrecarga de iones Cu en distintos sistemas celulares.

2.2.1. Viabilidad celular en distintas células incubadas con cobre

Con el objetivo de establecer una correlación entre la sensibilidad al Cu y la producción de especies oxidantes, se determinó la viabilidad celular en distintas células expuestas a Cu^{2+} , para lo cual es deseable que las células estudiadas presenten un espectro de sensibilidad amplio. Por ello, las células fueron seleccionadas respondiendo al objetivo del experimento planteado y en base a la disponibilidad de recursos de los laboratorios donde fueron llevados a cabo las determinaciones.

Se determinó la viabilidad de las líneas celulares SV40MEFs, HeLa, BEAS-2B, Hepa1-6 y HCT116 expuestas al Cu^{2+} disuelto en el medio de cultivo DMEM (Fig. 45A). La determinación de la viabilidad celular se realizó utilizando células plaqueadas con una confluencia del 60-80%.

Calculando la DL_{50} , se observó un espectro de sensibilidad en estas células más amplio que para BAEC, J774A.1 y Vero, siendo las células HeLa las más sensibles con una DL_{50} de 400 μM Cu^{2+} ; seguidas por los SV40MEFs, DL_{50} 600 μM ; BEAS-2B, DL_{50} 900 μM ; Hepa1-6, DL_{50} 1200 μM y finalmente HCT116, DL_{50} 1600 μM .

El estudio de la cinética de muerte celular al exponer las células a una concentración de Cu^{2+} cercana a la DL_{50} determinada para cada tipo celular, muestra una curva similar para todas las líneas celulares (Fig. 45). Se observa una fase de latencia que se extiende hasta alrededor de las 8 horas, luego de la cual la muerte celular se incrementa linealmente con el tiempo.

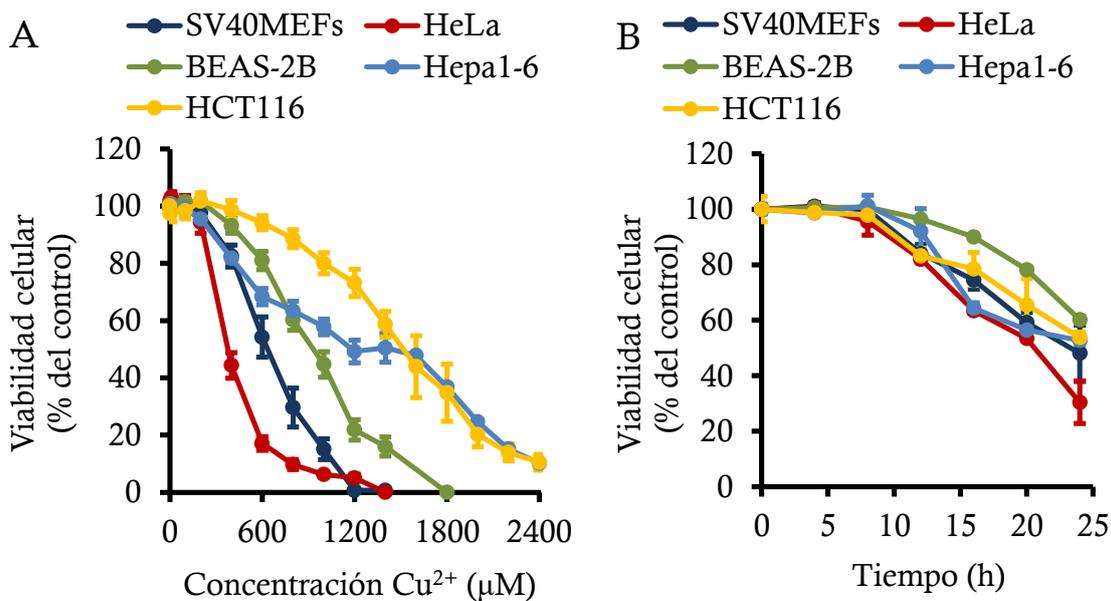


Figura 45. (A) Viabilidad celular, luego de una exposición a distintas concentraciones de Cu²⁺ durante 24 horas. (B) Cinética de muerte celular luego de una incubación con Cu²⁺. SV40MEFs, Cu²⁺ 600 µM; HeLa, Cu²⁺ 600 µM; BEAS-2B, Cu²⁺ 800 µM; Hepa1-6, Cu²⁺ 1000 µM; HCT116, Cu²⁺ 1400 µM.

2.2.2. Acumulación de cobre en distintas células incubadas con cobre

El contenido intracelular de metal luego de la exposición a Cu²⁺ comienza a incrementarse durante la primera hora. El metal continúa acumulándose en función del tiempo, hasta el comienzo de la muerte celular (Fig. 46).

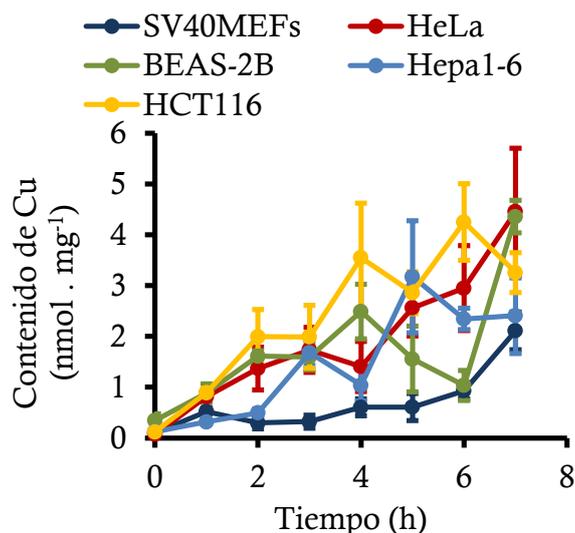


Figura 46. Cinética de la acumulación de Cu en distintas células, luego de una exposición a distintas concentraciones de Cu²⁺. SV40MEFs, Cu²⁺ 600 µM; HeLa, Cu²⁺ 600 µM; BEAS-2B, Cu²⁺ 800 µM; Hepa1-6, Cu²⁺ 1000 µM; HCT116, Cu²⁺ 1400 µM.

2.2.3. Producción de oxidantes en distintas células incubadas con cobre

Todas las líneas celulares expuestas a Cu^{2+} muestran un incremento en la velocidad de oxidación de la DCFH (Fig. 47). La magnitud de oxidación de la DCFH no guarda correlación con la sensibilidad del tipo celular al Cu^{2+} , ya que las células HCT116 resultan ser las células más resistentes al metal (Fig. 45) pero no presentan el incremento más pequeño en la oxidación de la sonda respecto a las demás células (Fig. 47). Las células HeLa, en cambio, son las células más sensibles al Cu^{2+} (Fig. 45) pero tampoco muestran un incremento en la velocidad de oxidación de la DCFH considerablemente más marcado que en el caso de las células HCT116 (Fig. 47). Es notable que el incremento en la oxidación de la DCFH por parte de las células SV40MEFs expuestas a Cu^{2+} resulte considerablemente mayor que en el resto de las líneas celulares.

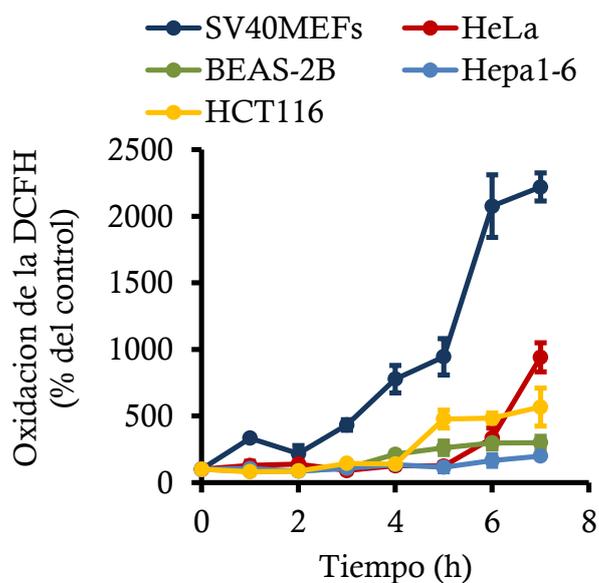


Figura 47. Cinética de la oxidación de la DCFH en distintas células luego de ser expuestas a Cu^{2+} . SV40MEFs, Cu^{2+} 600 μM ; HeLa, Cu^{2+} 600 μM ; BEAS-2B, Cu^{2+} 800 μM ; Hepa1-6, Cu^{2+} 1000 μM ; HCT116, Cu^{2+} 1400 μM .

2.2.4. Producción de anión superóxido en distintas células incubadas con cobre

La oxidación de la DCFH no parece ser consecuencia de un incremento en la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$, ya que las células SV40MEFs, HeLa y Hepa1-6 expuestas al Cu^{2+} no mostraron un incremento en la producción de esta especie cuando fue determinada mediante la oxidación de la sonda dihidroetidina (DHE) (Fig. 48B).

La rotenona (Rot) fue empleada como control positivo de la producción de $O_2^{\bullet-}$ (Fig. 48A).

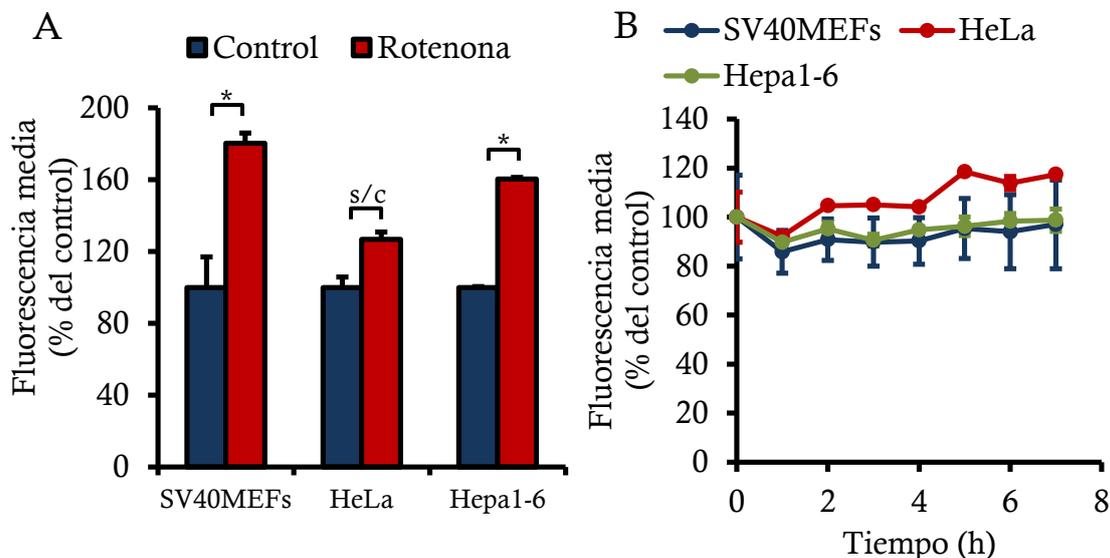


Figura 48. (A) Control positivo para la oxidación de la DHE en células SV40MEFs, HeLa y Hepa1-6. La Rot fue agregada previamente a la incubación de 45 min con DHE. (B) Oxidación de la DHE en células SV40MEFs, HeLa, y Hepa1-6, expuestas a Cu^{2+} 600 μM .

2.2.5. Prevención del estrés oxidativo por inhibidores de la síntesis proteica en células SV40MEFs incubadas con cobre

Notablemente, el incremento en la oxidación de la DCFH en SV40MEFs es completamente prevenido con inhibidores de la síntesis de proteínas como la cicloheximida (CHX) (Fig. 49A). La CHX actúa previniendo el movimiento de los tARN y mARN en relación al ribosoma, bloqueando de esta forma la traducción.

Adicionalmente, el agregado de CHX durante la incubación con el Cu^{2+} previene la retracción de las células SV40MEFs y permite que estas mantengan su morfología durante las primeras 7 horas (Fig. 49B-D). El agregado de CHX en las concentraciones empleadas es suficiente para detener la síntesis de proteínas, sin tener ningún efecto sobre la viabilidad celular hasta por al menos 24 horas.

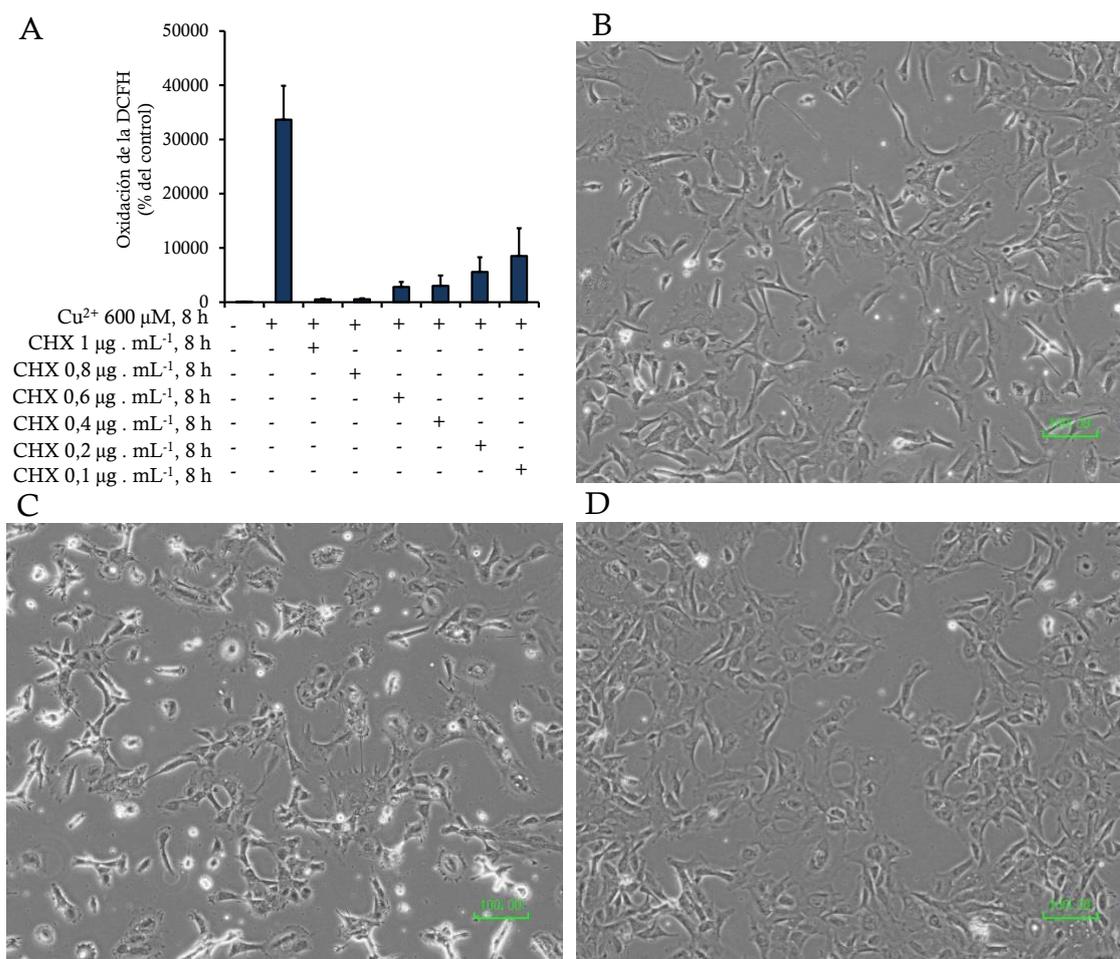


Figura 49. (A) Inhibición de la oxidación de la DCFH por CHX en células SV40MEFs luego de ser expuestas a Cu²⁺ por 7 h. Las células expuestas al metal presentan un aumento de la oxidación de DCFH con p<0,001 y los grupos CHX presentan un cambio con respecto al grupo tratado únicamente con el metal de p<0,001. (B) Microscopía óptica de células SV40MEFs control, (C) incubadas con Cu²⁺ 600 μM por 7 horas y (D) incubadas con Cu²⁺ 600 μM por 7 horas en presencia de CHX 1 μg . mL⁻¹.

La anisomicina (Ani) es otro inhibidor de la síntesis proteica que también resultó efectivo en prevenir la oxidación de la DCFH en MEFs. La Ani en altas concentraciones también fue capaz de incrementar levemente la velocidad de oxidación de la DCFH por sí misma (Fig. 50A).

Al igual que con CHX, el agregado de Ani previene la retracción células durante las primeras 7 horas de incubación con Cu²⁺ (Fig. 50B-D).

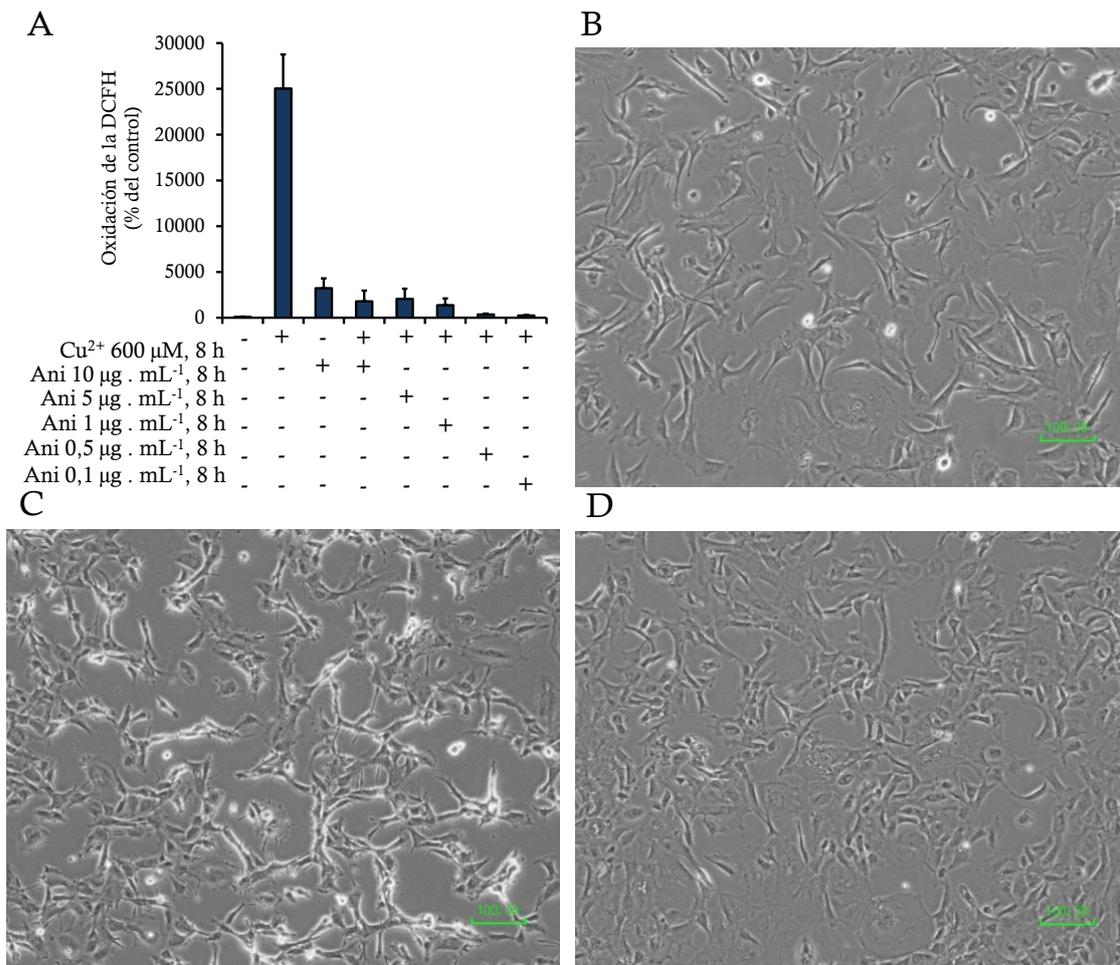


Figura 50. (A) Inhibición de la oxidación de la DCFH por Ani en células SV40MEFs luego de ser expuestas a Cu²⁺ por 7 horas. Las células expuestas al metal presentan un aumento de la oxidación de DCFH con $p < 0,001$ y los grupos Ani presentan un cambio con respecto al grupo tratado únicamente con el metal de $p < 0,001$. (B) Microscopía óptica de células SV40MEFs control, (C) incubadas con Cu²⁺ 600 μM por 7 horas y (D) incubadas con Cu²⁺ 600 μM por 7 horas en presencia de Ani 1 μg . mL⁻¹.

Esta inhibición en la oxidación de la DCFH por inhibidores de la síntesis proteica se observó específicamente en SV40MEFs, mientras que no tuvo lugar en los demás tipos celulares estudiados (resultados no mostrados).

La inhibición de la síntesis proteica no afecta de manera artefactual la oxidación de la DCFH, ya que al incubar células SV40MEFs con CHX y luego agregar rot, no se observó una disminución en la velocidad de oxidación de la sonda respecto de las células sin CHX (Fig. 51).

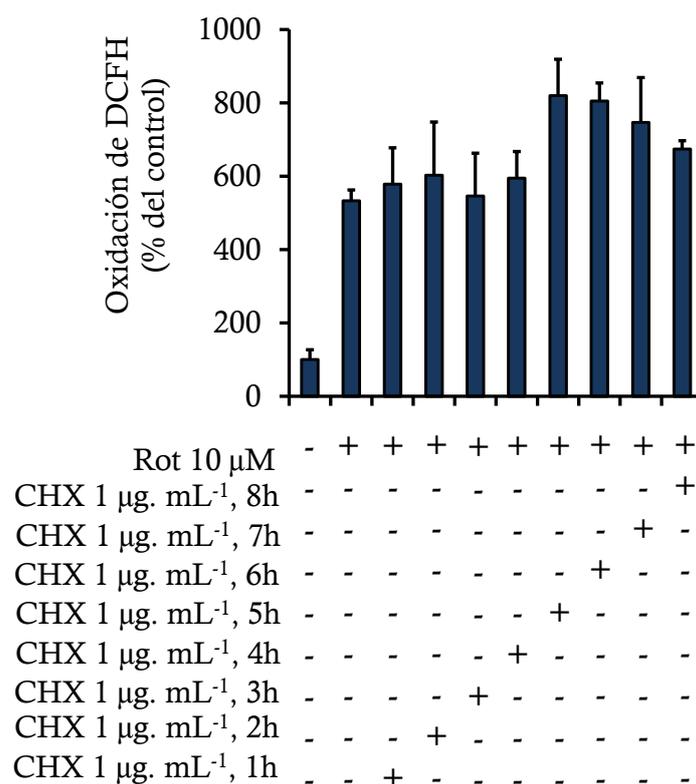


Figura 51. Efecto de la inhibición de la síntesis proteica sobre la oxidación de la DCFH en células SV40MEF. La Rot, empleada como control positivo de la oxidación de la DCFH, fue agregada conjuntamente con la DCFH-DA. El grupo tratado únicamente con Rot presenta un cambio con $p < 0,001$ respecto al control. Los grupos Rot con CHX no muestran cambios significativos respecto al grupo con únicamente Rot.

2.2.6. Efecto de inhibidores de la síntesis proteica en la viabilidad celular en células SV40MEFs incubadas con cobre

Al prevenir el estrés oxidativo en SV40MEFs, era esperable que los inhibidores de la síntesis proteica tuvieran algún efecto positivo en la supervivencia de las células. Sin embargo, la CHX no incrementó la supervivencia de las células SV40MEFs (Fig. 52). De hecho, el agregado de CHX potenció la muerte en éstas. El momento del inicio de la muerte celular no se vio afectado por el agregado de CHX.

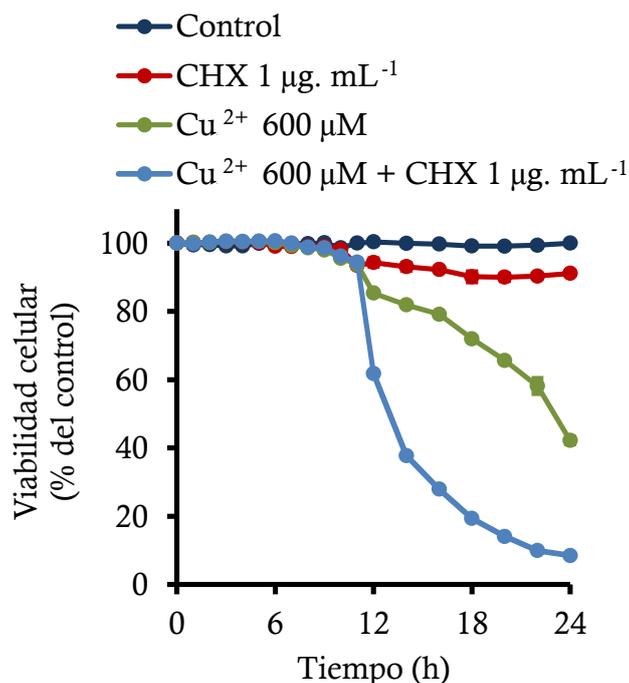


Figura 52. Efecto de la CHX sobre la viabilidad celular en células SV40MEFs luego de ser expuestas a Cu²⁺.

2.2.7. Efecto de inhibidores de la síntesis proteica sobre el estrés oxidativo en células 3T9MEFs incubadas con cobre

La línea celular SV40MEFs se obtiene mediante la transformación con el virus SV40, siendo ésta la principal diferencia con las otras líneas obtenidas por transformación espontánea. Para comprobar si la transformación con el virus SV40 era responsable de las diferencias observadas respecto a la oxidación de la DCFH en las células SV40MEFs y las células transformadas espontáneamente, se estudió el efecto del Cu²⁺ en células 3T9MEFs, transformadas espontáneamente.

La incubación de las células 3T9MEFs con Cu²⁺ también produce un incremento en la oxidación de la DCFH (Fig. 53A). Sin embargo, la magnitud de este incremento no es tan grande como en el caso de los SV40MEFs.

El incremento observado en la oxidación de la DCFH en 3T9MEFs no pudo ser prevenido con los inhibidores de la síntesis de proteínas como CHX o Ani (Fig. 53B).

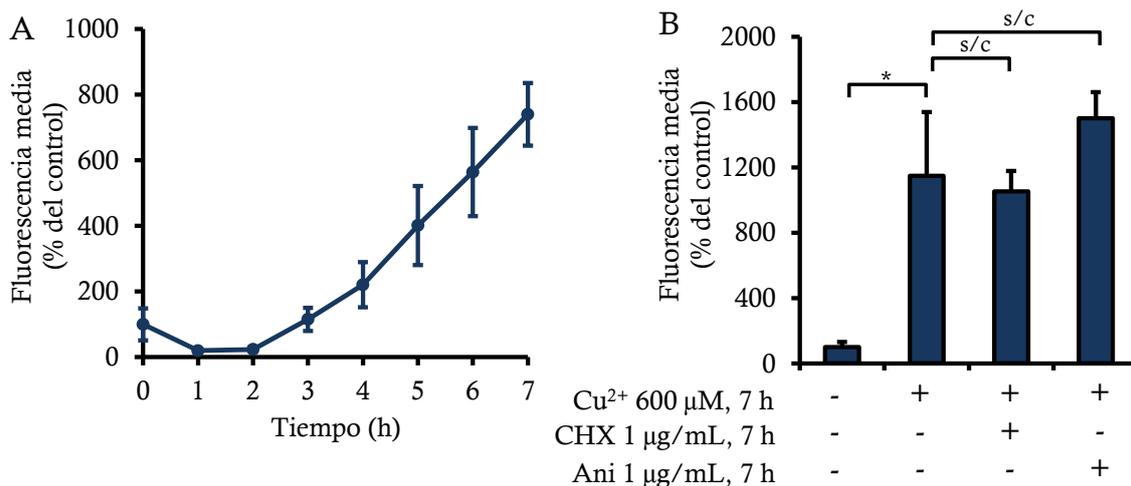


Figura 53. (A) Cinética de la oxidación de la DCFH en células 3T9MEFs luego de ser expuestas a Cu^{2+} , 600 μM . (B) Oxidación de la DCFH en células 3T9MEFs luego de ser expuestas a Cu^{2+} , 600 μM en presencia de CHX y Ani.

2.2.8. Contenido de grupos tioles totales y glutatión en distintas células incubadas con cobre

La oxidación de la DCFH permite observar un incremento en la velocidad de producción de especies oxidantes en las células. En caso de que el incremento en la concentración de estos oxidantes alterase la homeostasis celular, las células pueden hacer uso del GSH para detoxificar las especies dañinas y contrarrestar las modificaciones oxidativas.

En vista de que las células están expuestas a concentraciones letales de Cu^{2+} , es esperable que el GSH empleado por los sistemas antioxidantes se agote y permita que avancen las reacciones oxidativas sobre blancos tóxicos para la célula. Sin embargo, la producción de oxidantes no se vio reflejada en el contenido de GSH, ya que las células incubadas con Cu^{2+} no mostraron cambios significativos en el contenido de grupos -SH reducidos de bajo peso molecular (fundamentalmente GSH) (Fig. 54B). Tampoco se observó una disminución del contenido de grupos -SH totales, que incluyen los -SH proteicos y no proteicos (Fig. 54A).

Es importante remarcar que el contenido de GSH se determinó solamente durante las primeras 7 horas de exposición al Cu^{2+} , ya que luego las células comenzaban a morir. Debido a que el contenido de GSH está íntimamente ligado

al estado metabólico de la célula, resulta necesario realizar la determinación en células vivas.

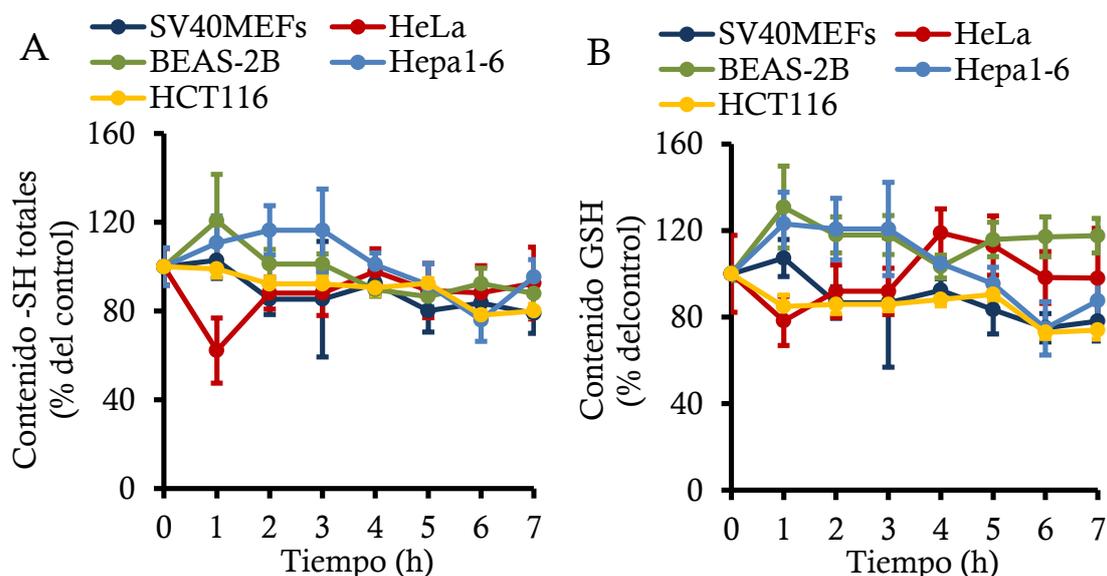


Figura 54. (A) Contenido de grupos -SH totales y (B) contenido de GSH, durante las primeras 7 horas de exposición a Cu^{2+} en células: SV40MEFs, Cu^{2+} 600 μM ; HeLa, Cu^{2+} 600 μM ; BEAS-2B, Cu^{2+} 800 μM ; Hepa1-6, Cu^{2+} 1000 μM ; HCT116, Cu^{2+} 1400 μM .

2.2.9. Efecto del agregado de N-acetilcisteína, glutatión o glutatión oxidado sobre la viabilidad celular en distintas células incubadas con cobre

Para corroborar que el consumo de GSH no estuviese involucrado en la muerte celular inducida por la exposición al Cu^{2+} , las células SV40MEFs, HeLa y Hepa1-6 fueron suplementadas con N-acetilcisteína (NAC). El agregado de NAC no mostró ningún incremento en la viabilidad celular. Sin embargo, el agregado de GSH al medio extracelular fue capaz de prevenir la muerte celular dependiendo de la concentración de GSH empleada. Curiosamente, el GSSG resultó ser aún más eficiente que el GSH, requiriéndose aproximadamente la mitad de concentración de GSSG que de GSH para alcanzar la misma protección que con la forma reducida del tripéptido (Fig. 55).

Tanto el GSH como el GSSG exógenos son incapaces de ingresar a la célula debido a su naturaleza peptídica. Es por ello que su efecto protector es ejercido desde el espacio extracelular. Sin embargo, el GSH se encuentra en altas concentraciones en los compartimentos intracelulares (4-10 mM).

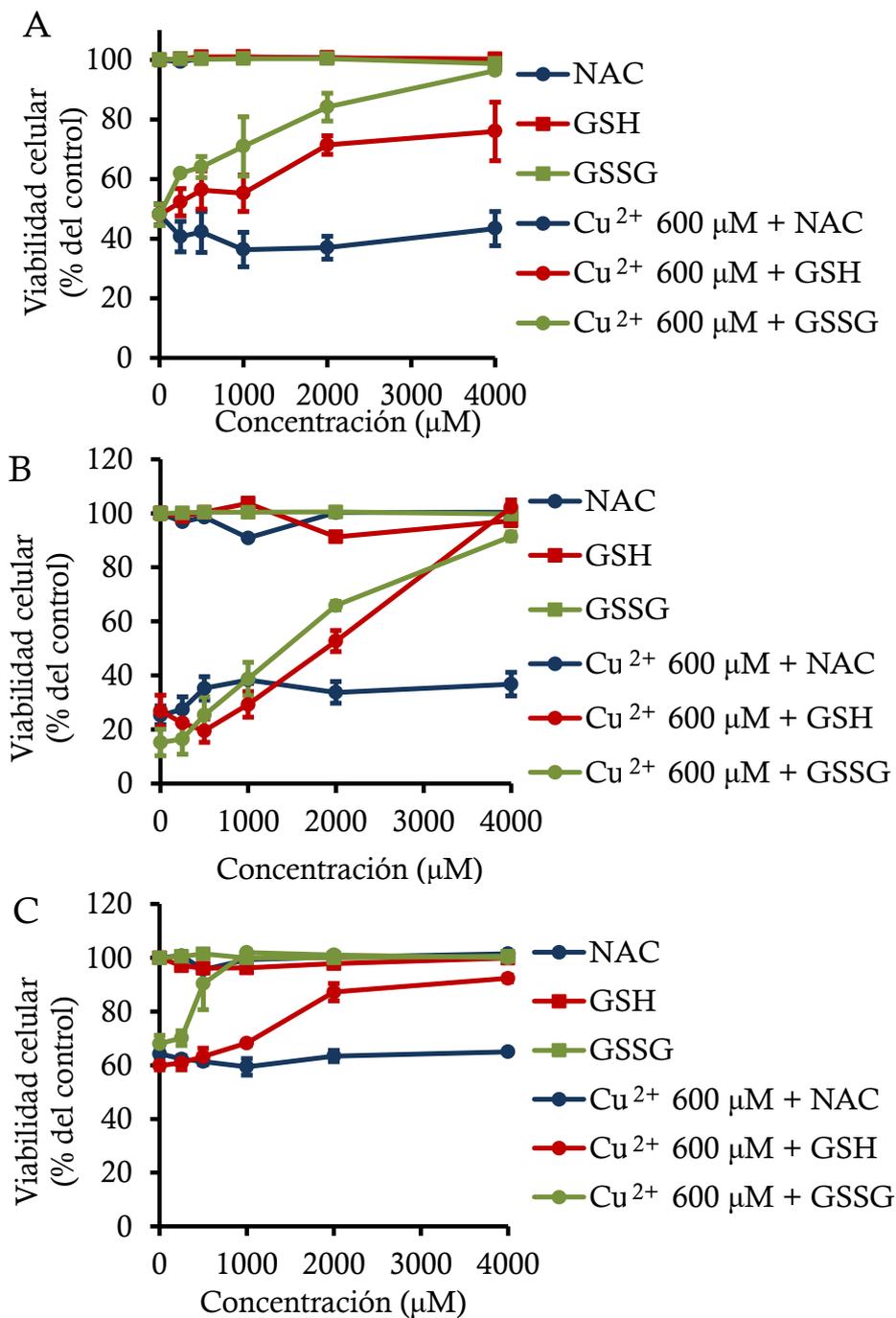


Figura 55. Efecto del agregado de NAC 4 mM, GSH 4 mM y GSSG 4 mM sobre la viabilidad celular en células (A) SV40MEFs, (B) HeLa y (C) Hepa1-6, expuestas a Cu²⁺ durante 24 horas. El Cu²⁺ fue mezclado previo al agregado al medio de cultivo, tanto con NAC, como con GSH o GSSG.

2.2.10. Depleción del glutatión intracelular por el agregado del inhibidor de la síntesis de glutatión BSO

La incubación de las células SV40MEFs, HeLa, BEAS-2B, Hepa1-6 o HCT116 con BSO 1 mM por 24 horas produce una disminución de

aproximadamente el 50% de los grupos –SH totales. Estos incluyen tanto los grupos –SH proteicos como no proteicos (Fig. 56A).

Al precipitar las proteínas mediante el agregado de ácido perclórico (HClO₄), se puede determinar el contenido de grupos –SH no proteicos en el sobrenadante. La incubación con BSO produce en este caso la casi completa depleción de los grupos –SH no proteicos. Por lo tanto, se confirma que estos grupos corresponden fundamentalmente a GSH (Fig. 56B).

De estos resultados se determinó que los grupos –SH correspondientes al GSH constituyen en estas células aproximadamente entre el 40% y el 60% de los grupos –SH totales.

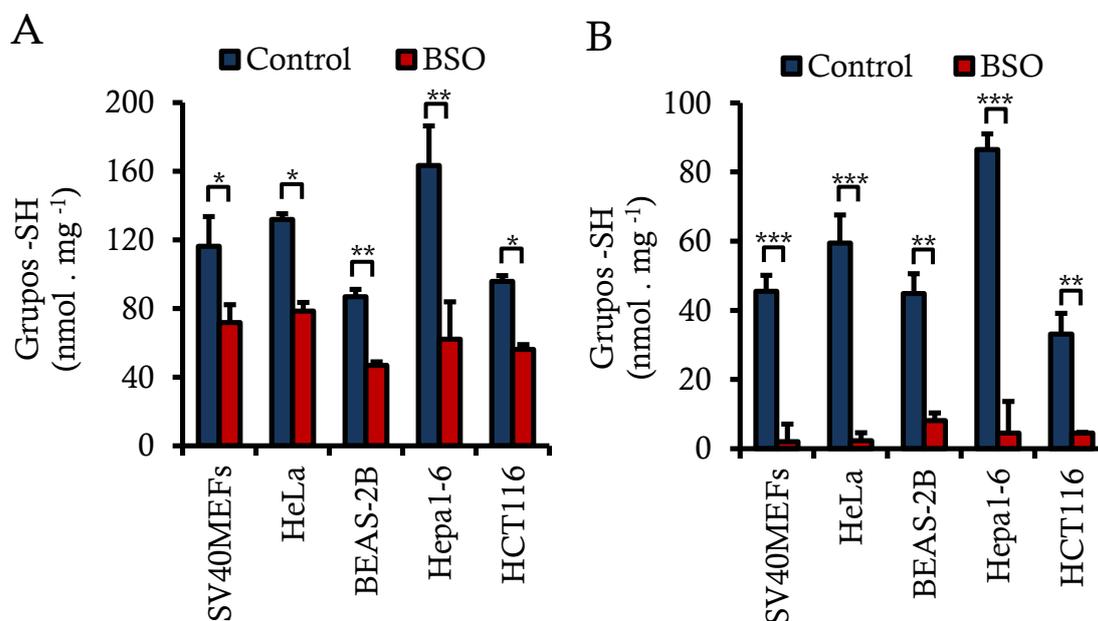


Figura 56. (A) Efecto del BSO 1 mM por 24 horas sobre el contenido de –SH totales en células SV40MEFs, HeLa, Hepa1-6, HCT116 y BEAS-2B. (B) Efecto del BSO 1 mM por 24 horas sobre el contenido de GSH en células SV40MEFs, HeLa, Hepa1-6, HCT116 y BEAS-2B.

2.2.11. Efecto del contenido de grupos tioles intracelulares sobre la viabilidad celular en distintas células incubadas con cobre

Luego de depletar las células de GSH con BSO, éstas fueron incubadas con Cu²⁺ y se evaluó la viabilidad celular. Las células expuestas a Cu²⁺, previo tratamiento con BSO, mostraron una mayor sensibilidad al metal (Fig. 57). Es notable que en ciertas células, como SV40MEFs y BEAS-2B, el incremento en la

sensibilidad debido a la depleción del GSH resulte considerablemente mayor que en células HeLa o Hepa1-6. La concentración de BSO 1 mM se mantuvo durante toda la incubación con Cu^{2+} .

El agregado de NAC 4 mM, como se observó previamente, no previene la muerte celular. Es importante remarcar que el Cu^{2+} fue añadido simultáneamente con la NAC. Por este motivo, la totalidad del Cu en el medio extracelular se encontraba como Cu^{1+} .

Debido a que el contenido de GSH en estas células representa aproximadamente el 50% de los -SH totales, es posible que el incremento en la sensibilidad al Cu se deba a la disminución en el contenido neto de grupos -SH, luego del agregado de BSO. Para descartar este efecto, las células depletadas de GSH fueron repletadas de grupos -SH mediante el agregado de NAC, que posee un grupo -SH capaz de ingresar a la célula. Si bien el -SH de la NAC es, en términos generales, similar al grupo -SH del GSH, la molécula carece de la estructura química particular del tripéptido. Por otro lado, la NAC es un precursor del GSH, pero las condiciones del experimento no permiten que la NAC sea utilizada para la síntesis de GSH ya que la enzima γ -glutamylcysteinyl ligase (GCL) se encuentra inhibida por la elevada concentración de BSO. Sin embargo, la repleción de los grupos -SH en células tratadas con BSO mediante el agregado de NAC no incrementó la viabilidad celular luego de la incubación con Cu^{2+} en comparación con las células depletadas de GSH (Fig. 57).

Si bien las células estudiadas difieren en su sensibilidad al Cu^{2+} , la concentración a la cual el metal se vuelve tóxico luego de 24 h oscila alrededor de 200 μM en todas las células estudiadas. Al depletar el contenido de GSH intracelular, la concentración de Cu^{2+} a la cual las células comienzan a morir parece disminuir uniformemente a 100 μM (Fig. 57).

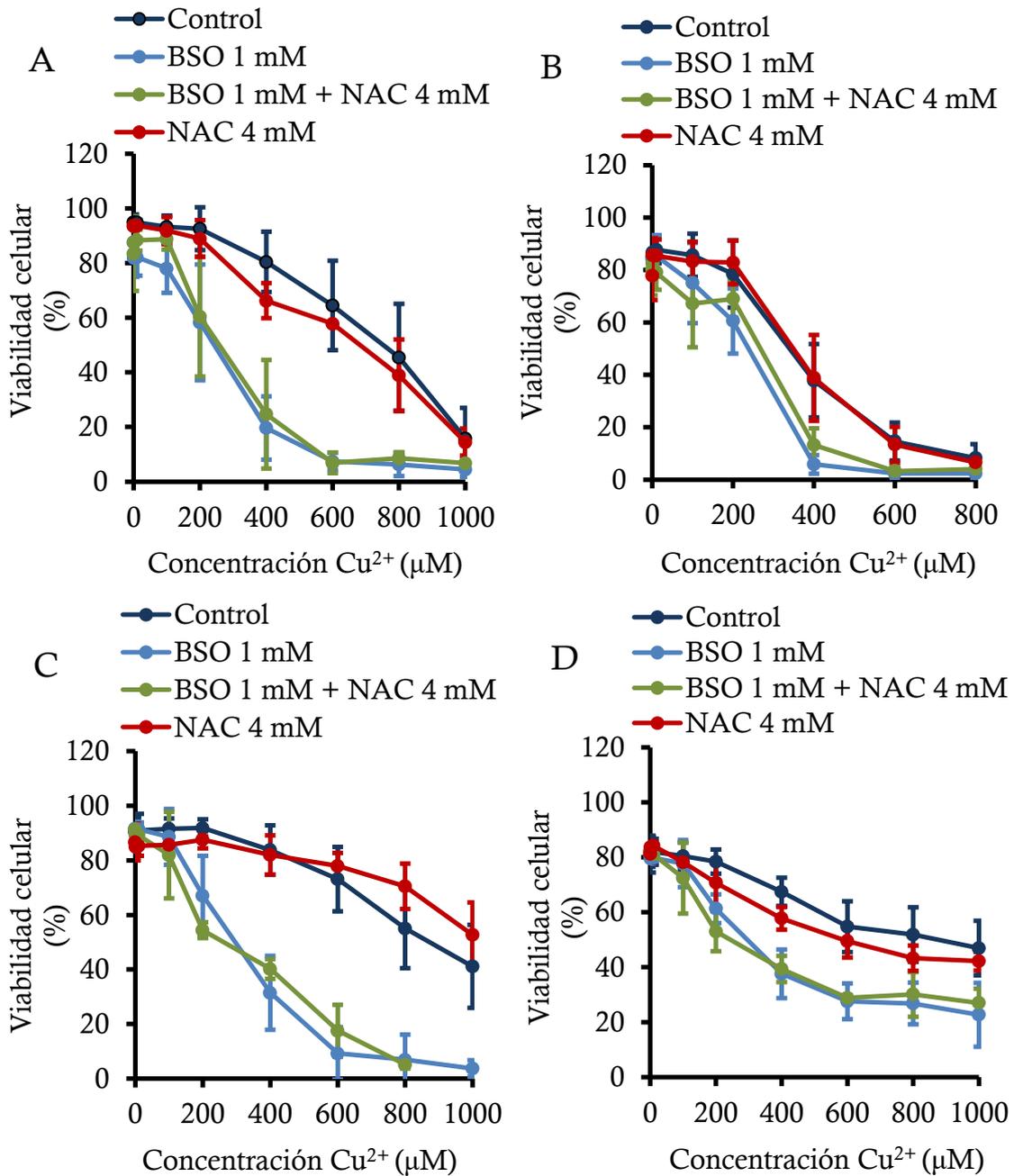


Figura 57. Efecto de la NAC sobre la viabilidad celular en células (A) SV40MEFs, (B) HeLa, (C) BEAS-2B y (D) Hepa1-6 expuestas a Cu²⁺ durante 24 horas. Las células tratadas con BSO fueron incubadas con este inhibidor durante 24 horas previamente al agregado del Cu²⁺ y éste se mantuvo durante toda la incubación con el metal.

2.3. Discusión

Para corroborar el efecto del metal sobre la función mitocondrial, se emplearon las células J774A.1, Vero (líneas celulares) y BAEC (cultivo primario). Al exponer las células a Cu²⁺ en el medio de cultivo se observó una disminución de la viabilidad dependiente de la concentración (Fig. 40). Si bien Ctr1, el principal

transportador de Cu es saturable (Lee y col., 2002), no parece observarse una saturación en la captación del metal a concentraciones menores a 900 μM , ya que al incrementar la concentración de Cu^{2+} se acentúa la disminución en la viabilidad celular (Fig. 40). Por otro lado, es notable la elevada concentración de metal necesaria para producir la muerte de la célula.

Es posible que las vías de señalización afectadas en la inmortalización de las líneas celulares influyeran la sensibilidad de estas frente al metal. Sin embargo, al no observarse diferencias considerables entre la sensibilidad al Cu^{2+} de las células J774A.1 o Vero y las células BAEC (Fig. 40), el estudio de la función mitocondrial se llevó a cabo empleando células J774A.1, debido a su fácil manipulación.

Mediante la oxidación de la sonda *Amplex Red*, en una reacción catalizada por HRP, se pudo evidenciar un incremento en la producción de H_2O_2 por parte de las células J774A.1 expuestas a Cu^{2+} (Fig. 41). La determinación del H_2O_2 se realizó en el espacio extracelular, por lo cual los resultados corresponden al H_2O_2 capaz de difundir fuera de la célula. Esto no permite inferir el origen a nivel químico, ni la localización de la formación esta especie, pero indica que las células estudiadas están expuestas a un incremento en la producción de especies potencialmente oxidantes.

Un incremento en la producción de $\text{O}_2\cdot^-$ podría ser evidenciado como un incremento en la oxidación del *Amplex Red*, ya que esta especie dismuta rápidamente produciendo H_2O_2 (Zhou y col., 1997). Las células J774A.1, al pertenecer a un linaje macrofágico pueden activarse por distintos estímulos, activando así la enzima NOX la cual es capaz de producir una gran cantidad de $\text{O}_2\cdot^-$ (Mangnum y col., 2015). Para descartar la participación de esta enzima en el incremento en la producción de H_2O_2 , se inhibió su actividad mediante el agregado de DPI (Cross y Jones, 1986) y se determinó la velocidad de oxidación del *Amplex Red*. Sin embargo, no se observó una disminución en la oxidación de la sonda por el agregado de DPI (Fig. 42). El inhibidor de la NOX funcionó correctamente ya que sí se observó una marcada disminución en la oxidación del *Amplex Red* luego de activar la NOX con PMA (Martin y Dorf, 1990). Por esto, se puede decir que la NOX no participa en la producción incrementada de H_2O_2 por la exposición a Cu^{2+} , al menos en las células J774A.1.

La microscopía de las células J774A.1 incubadas con Cu^{2+} revela la formación de protrusiones de membrana (Fig. 43). Esto podría explicarse por una alteración del metabolismo energético donde las células no sean capaces de mantener el balance hídrico. Es importante remarcar que estas protrusiones no se asemejan a los característicos *blebs* observados en los procesos apoptóticos, sino más bien son similares a los menos caracterizados *blebs* necróticos (Barros y col., 2003).

Para estudiar la función mitocondrial en estas células se empleó un equipo *SeaHorse*. Este equipo provee la ventaja de estudiar la respiración utilizando células intactas adheridas a la placa de cultivo, por lo cual se evitan las interferencias producto del aislamiento mitocondrial y la recolección de las células.

Se decidió trabajar durante las primeras seis horas de exposición al metal ya que pasado este tiempo las células comenzaban a morir. La muerte celular implica cambios a nivel metabólico que pueden repercutir sobre la función mitocondrial y ser erróneamente interpretadas como una consecuencia directa de la exposición al Cu. Asimismo, es esperable que si la mitocondria estuviera involucrada en el mecanismo de toxicidad del metal, ésta se viera afectada previo a la muerte celular.

Los estados metabólicos 3 y 4 estudiados en las mitocondrias aisladas de tejidos animales permiten obtener información valiosa acerca de la función mitocondrial. Sin embargo, estos estados son artificiales ya que se alcanzan en condiciones de exceso de sustratos y un medio de reacción, donde se encuentran suspendidas las mitocondrias, que intenta emular las condiciones citosólicas. En el entorno celular, la disponibilidad de sustratos para la respiración es mucho más limitada y la población de mitocondrias se encuentra probablemente desdoblada con algunas organelas respirando en estado 3 y otras respirando en estado 4. Por este motivo, resulta de interés estudiar también la respiración basal de la mitocondria en la célula. Este parámetro refleja de manera integral la función mitocondrial, incluyendo la disponibilidad fisiológica de los sustratos.

Para determinar la respiración mitocondrial en células, se debió evaluar el consumo de O_2 en presencia de antimicina, que corresponde a la respiración extramitocondrial. Este valor debe ser sustraído a todas las determinaciones

realizadas para obtener la respiración correspondiente a la organela. La respiración mitocondrial basal en las células expuestas al Cu no mostró cambios significativos respecto al control durante el lapso de tiempo estudiado (Fig. 44). Por su parte, el agregado de oligomicina inhibe la actividad del complejo V y la membrana se hiperpolariza ya que se detiene el flujo retrógrado del H^+ hacia la matriz mitocondrial. Esta condición es muy similar al estado 4 estudiado en las mitocondrias aisladas. El agregado posterior del desacoplante de membrana carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) disipa el potencial de membrana y en consecuencia la velocidad del flujo de electrones por la cadena respiratoria y de consumo de O_2 se incrementa. Este estado es similar al estado 3, sin embargo la velocidad de consumo de O_2 puede ser ligeramente superior ya que el desacople en esta situación es total. Consistentemente con lo observado en las mitocondrias aisladas de hígado de rata, en ninguna de estas dos últimas condiciones se observaron cambios (Fig. 44).

Si bien las mitocondrias no se ven afectadas por la sobrecarga de iones Cu (Secciones 1.1.4 y 2.1.4, de los Capítulos 1 y 2, respectivamente), el estudio de la interacción del Cu con las mitocondrias aisladas del capítulo anterior (Sección 1.2) permitió analizar, desde un punto de vista químico, el efecto del metal sobre estructuras biológicas, en particular sobre los grupos $-SH$ y las membranas. Este modelo *in vitro* ofrece la ventaja de trabajar con un sistema relativamente definido, en el cual se pueden controlar las concentraciones de las sustancias en el medio, e incluso modular el estado de oxidación del metal. Sin embargo, las condiciones de trabajo en este modelo pueden alejarse de la situación fisiológica en una célula y algunas de estas reacciones podrían no tener lugar en una situación real. Por ello, para comprobar la relevancia de las posibles reacciones químicas del Cu con biomoléculas sobre la viabilidad celular se trabajó con células vivas como sistema de estudio (Sección 2.2).

En principio, se decidió emplear distintos tipos celulares, para poder analizar la sensibilidad de los mismos frente a la sobrecarga de iones Cu y establecer si existe una correlación con la producción de especies oxidantes. De esta manera, se obtuvo un conjunto de células (SV40MEFs, HeLa, BEAS-2B, Hepa1-6 y HCT116), cuyo espectro de sensibilidad al Cu^{2+} varía ampliamente (Fig. 45).

La incubación de las células con una concentración fija de Cu^{2+} cercana a la DL_{50} permitió establecer la fase de latencia previa al inicio de la muerte celular. Los eventos metabólicos que culminan en la muerte de la célula deben ocurrir durante este período de aproximadamente ocho horas y estos deben ser distinguidos temporalmente de aquellos que tengan lugar posteriormente al inicio de la muerte celular. Es por eso que las determinaciones que siguieron se realizaron en este lapso de tiempo.

El Cu intracelular en condiciones fisiológicas se encuentra unido a chaperonas y formando complejos con distintos ligandos de manera de controlar su reactividad. La acumulación intracelular de Cu que conlleva a un incremento en las fracciones libres del metal puede ocurrir por un eflujo disminuido, como es el caso de la enfermedad de Wilson, o bien por un incremento en el influjo de metal debido a la concentración elevada de iones Cu en el medio extracelular, como en los modelos aquí estudiados. Las células estudiadas fueron capaces de captar el Cu del medio extracelular y la acumulación intracelular del metal se produce rápidamente luego del comienzo de la exposición del metal (Fig. 46).

La sonda DCFH fue empleada como un indicador general de estrés oxidativo, ya que esta es capaz de reaccionar con un amplio espectro de especies oxidantes. Las determinaciones estrechamente relacionadas a la actividad metabólica de la célula deben realizarse en condiciones donde no se vea comprometida la viabilidad celular, a fin de evitar resultados influenciados por un mayor porcentaje de células muertas. Respecto a la oxidación de la DCFH, esto significa, que una disminución repentina en la oxidación de la sonda, acompañada de una disminución de la viabilidad celular, no debe entenderse como una disminución orquestada en la producción de especies oxidantes; sino al hecho de que las células muertas, naturalmente, no metabolizan el oxígeno a especies más reactivas. Es por ello, que la oxidación de esta sonda se evaluó únicamente en los tiempos previos a las ocho horas.

En todas las líneas celulares se observó un incremento en la velocidad de oxidación de la DCFH, sin embargo la magnitud de esta oxidación varía drásticamente entre ellas (Fig. 47). Por otro lado, la falta de correlación entre la oxidación de la DCFH y la sensibilidad de las células al Cu^{2+} sugiere que el estrés

oxidativo no sería la causa directa de la muerte celular. En el caso particular de las células SV40MEFs, la naturaleza de la oxidación incrementada de la DCFH pareciera ser distinta a las demás células, ya que es posible prevenirla mediante la inhibición de la síntesis de proteínas (Figs. 49 y 50). Sin embargo, incluso previniendo casi completamente la oxidación de la DCFH en estas células, no se observa ningún incremento en la viabilidad celular (Fig. 52). Lo cual sugiere que la producción incrementada de especies oxidantes en estas células es un evento colateral a la muerte celular.

Resulta interesante que la exposición de SV40MEFs a Cu^{2+} induce la retracción de las células, la cual también es posible prevenir mediante inhibidores de la síntesis de proteínas. Sin embargo, la CHX no fue capaz de prevenir la muerte celular. En conjunto, esto indica que la exposición al Cu^{2+} en las células SV40MEFs involucra la activación de una vía de señalización específica, dependiente de la síntesis de proteínas, a diferencia del resto de las células estudiadas.

Las células SV40MEFs son distinguibles del resto de las células ya que la obtención de la línea celular se realiza mediante la transformación de fibroblastos embrionarios murinos con el virus del SV40, mientras que las demás células estudiadas son obtenidas por transformación espontánea. Al exponer las células 3T9MEFs, las cuales son también obtenidas por transformación espontánea, a altas concentraciones de Cu^{2+} , éstas muestran un moderado incremento en la oxidación de la DCFH (Fig. 53A). Sin embargo, éste no es sensible a los inhibidores de la síntesis de proteínas (Fig. 53B). Por ello, la intensa producción de oxidantes, inhibible por CHX y Ani, se debe a la transformación con el virus SV40.

Para comprender la importancia de los grupos $-\text{SH}$ en la protección frente a la sobrecarga de iones Cu , se evaluó el contenido de estos grupos químicos luego de la exposición a Cu^{2+} . Como se describió en el Capítulo 1, debido a la capacidad del Cu^{2+} de oxidar directamente a los grupos $-\text{SH}$ y a su vez de participar en la reacción de Fenton, sería esperable una alteración en el estado redox de estos grupos. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en el contenido de grupos $-\text{SH}$ totales, ni tampoco en los correspondientes al GSH, en ninguna de las líneas celulares estudiadas (Fig. 54). Esto indica que, a pesar de estar las células

expuestas a elevadas concentraciones Cu^{2+} , éstas mantienen el control de la homeostasis de los grupos $-\text{SH}$ intracelulares.

Es importante remarcar que, a diferencia de lo aquí observado en células, la sobrecarga de iones Cu en el hígado de ratas produjo una disminución del GSH (Capítulo 1). Considerando que la acumulación de Cu tiene lugar tanto en el órgano de las ratas como en las células en cultivo, esta diferencia sustancial debe responder a una variable externa producto del modelo utilizado, la cual posiblemente module la gravedad del daño producido por el Cu intracelular. Es probable que esta variable se encuentre relacionada al eminente incremento de Cu en sangre, producto de la dosis de Cu^{2+} requerida para generar un daño en las ratas. De acuerdo con esto, el trabajo se continuó específicamente en sistemas celulares, para poder analizar de manera aislada el efecto tóxico del metal intracelular.

La NAC es una molécula permeable que es desacetilada en el citosol, incrementando de esta forma los niveles citosólicos de cisteína, el aminoácido limitante en la síntesis de GSH. La NAC ha demostrado ser efectiva en prevenir la muerte celular producida por moléculas que consumen el GSH en su mecanismo de acción tóxica, como en la intoxicación aguda con acetaminofén (Smilkstein y col, 1988). En este aspecto, la suplementación de las células con NAC durante la incubación con Cu^{2+} , no mostró ningún efecto protector (Fig. 55). Esto es razonable ya que al continuar disponiendo las células de GSH luego de la incubación con Cu^{2+} , la suplementación con NAC carece de efecto sobre la viabilidad celular.

Asimismo, el agregado de NAC en altas concentraciones reduce completamente el Cu^{2+} a Cu^{1+} en el medio extracelular. Al no observarse diferencias en la viabilidad celular luego de reducir el Cu^{2+} con NAC, esto demuestra que el metal resulta igualmente tóxico, indistintamente de su estado de oxidación extracelular. Por otro lado, también se demuestra que la reacción directa entre el Cu^{2+} y los grupos $-\text{SH}$ intracelulares no es relevante en el mecanismo de acción tóxica del metal.

El agregado de GSH, por su parte, sí fue efectivo en prevenir la toxicidad del Cu^{2+} (Fig. 55). Dado que el GSH es un péptido, éste no puede atravesar la membrana plasmática, por lo que la acción protectora de la molécula tiene lugar

desde el medio extracelular. Curiosamente, el GSSG, que es la forma oxidada del GSH, resultó ser incluso más eficiente que el GSH en prevenir la muerte celular. De hecho, el GSSG muestra aproximadamente el doble de eficiencia que el GSH en proteger a la célula (Fig 55). Esto último está relacionado muy posiblemente con que ambas moléculas están actuando sobre el metal independientemente del grupo $-SH$ y, al ser el GSSG equivalente a dos GSH unidos por un puente disulfuro, éste resulta más eficiente, en términos molares. De acuerdo con esto, el efecto protector en este caso parece deberse a un efecto quelante por parte del GSH. Esto es particularmente interesante, ya que la capacidad, tanto del GSH como del GSSG exógenos de prevenir el ingreso del metal a la célula implica un efecto protector adicional a la acción antioxidante de esta molécula dentro de la célula, ya que frente a un desbalance en la homeostasis de los grupos $-SH$ que involucre la oxidación del GSH, el GSSG continuaría manteniendo su capacidad de coordinar al metal.

Como se demostró en el Capítulo 1, la presencia de GSH previene completamente la lipoperoxidación cuando el Cu se encuentra en presencia H_2O_2 y $O_2^{\bullet-}$ producidos por la mitocondria. Sin embargo, al actuar mediante la inactivación del metal, el GSH sería capaz de prevenir un espectro de reacciones con blancos biológicos más amplio que las relacionadas al daño oxidativo.

Para estudiar la relevancia del GSH intracelular en la toxicidad del metal, las células fueron depletadas de esta molécula empleando BSO. El BSO es un inhibidor competitivo de la enzima GCL, que es la enzima que cataliza el paso limitante en la síntesis de GSH. La incubación de las células por 24 horas con este inhibidor permitió eliminar completamente el contenido intracelular de GSH, sin alterar el contenido de grupos $-SH$ proteicos (Fig. 56).

Naturalmente, la depleción de GSH incrementó la sensibilidad de las células al Cu^{2+} (Fig. 57). Teniendo en cuenta las características estudiadas del GSH, el incremento de la sensibilidad podría deberse a la pérdida de una molécula capaz de formar un complejo con el metal en el citosol e inactivarlo, pero también a la pérdida de una fuente importante de grupos $-SH$ en la célula, ya que el GSH constituye aproximadamente el 50% del total de los grupos $-SH$ en las células estudiadas (Fig. 56). Para discernir cuál de las dos posibles consecuencias de la

depleción de GSH era la responsable del incremento en la sensibilidad de las células, se reincorporaron los grupos –SH en las células depletadas previamente con BSO, mediante el agregado de NAC. Al ser la NAC una molécula capaz de permear la membrana, ésta puede alcanzar el citosol, pero al mantenerse inhibida la enzima GCL por la alta concentración de BSO, la cisteína no puede emplearse en la síntesis de GSH. En estas condiciones, las células disponen de una elevada concentración de grupos –SH, pero la naturaleza química de estos es diferente a la del GSH. Sin embargo, la repleción de los grupos –SH mediante NAC en células depletadas de GSH no mostró ningún efecto protector frente a la toxicidad del metal (Fig. 57). Por lo tanto, el principal rol del GSH frente a la sobrecarga de iones Cu parece ser el de ligando soluble capaz de limitar los potenciales blancos con los cuales podría reaccionar el metal. Por otro lado, es posible que al disminuir el contenido de GSH, las enzimas dependientes de GSH no puedan actuar ya que la NAC es químicamente distinguible del tripéptido. No obstante, debido a que el contenido de GSH no se mostró alterado durante las primeras 7 horas de incubación con el metal, las reacciones catalizadas por estas enzimas parecieran no ser cruciales en la toxicidad del metal.

En resumen, la sobrecarga de iones Cu en células en cultivo genera un incremento en la producción de especies oxidantes. Sin embargo, el contenido de grupos –SH intracelulares permanece inalterado previo al inicio de la muerte celular. En consecuencia, el Cu intracelular se encuentra íntegramente en la forma reducida y la oxidación directa de grupos –SH por parte del Cu^{2+} carece de relevancia en la citotoxicidad del metal. Finalmente, el GSH resultó ser una molécula endógena crucial en la protección frente a los iones Cu^{1+} , que ejerce su rol protector independientemente de sus propiedades antioxidantes.

Capítulo 3: Perfil transcripcional en células BEAS-2B y HCT116 expuestas a concentraciones tóxicas de cobre

Como se observó en los capítulos 1 y 2, el GSH es una molécula esencial en la protección frente a los iones Cu. Sin embargo, es interesante que su acción protectora puede ser ejercida independientemente de su grupo –SH. De esta forma el GSH o incluso el GSSG son capaces de proteger a la célula mediante su acción quelante, frente un espectro más amplio de reacciones tóxicas que únicamente las relacionadas a modificaciones oxidativas de biomoléculas.

Considerando que luego de la exposición a Cu^{2+} , los grupos –SH pertenecientes al GSH no son consumidos durante las horas previas a la muerte celular en los sistemas celulares estudiados, se mantiene abierto el interrogante respecto de la fuerza impulsora de la muerte celular.

Para abordar integralmente la respuesta celular y estudiar qué otros procesos pueden verse afectados por la sobrecarga de iones Cu, se analizaron los cambios en el perfil de transcripción, mediante micromatrices de ADN, de las líneas celulares HCT116 y BEAS-2B incubadas con Cu^{2+} 1400 μM y 800 μM , respectivamente. Estas concentraciones corresponden a la DL_{50} , permitiendo de esta manera correlacionar los niveles de genes transcriptos con la cinética de muerte celular. Estos experimentos fueron realizados en dos líneas celulares diferentes para disminuir las respuestas artefactuales provocadas por las características propias de cada célula.

3.1. Alteración del perfil de transcripción en células expuestas a cobre

La respuesta celular frente a la sobrecarga de iones Cu involucra cambios en el perfil de transcripción en las células BEAS-2B y HCT116. Se consideró como significativa una alteración en la transcripción con un p valor ajustado $< 0,001$.

Los genes cuya transcripción se encuentra alterada comienzan a observarse luego de las dos primeras horas de exposición al metal y este número se incrementa drásticamente durante las primeras 12 horas para luego aproximarse a un *plateau* (Fig. 58). Esto coincide con el tiempo de inicio de la muerte celular observado en el Capítulo 2.

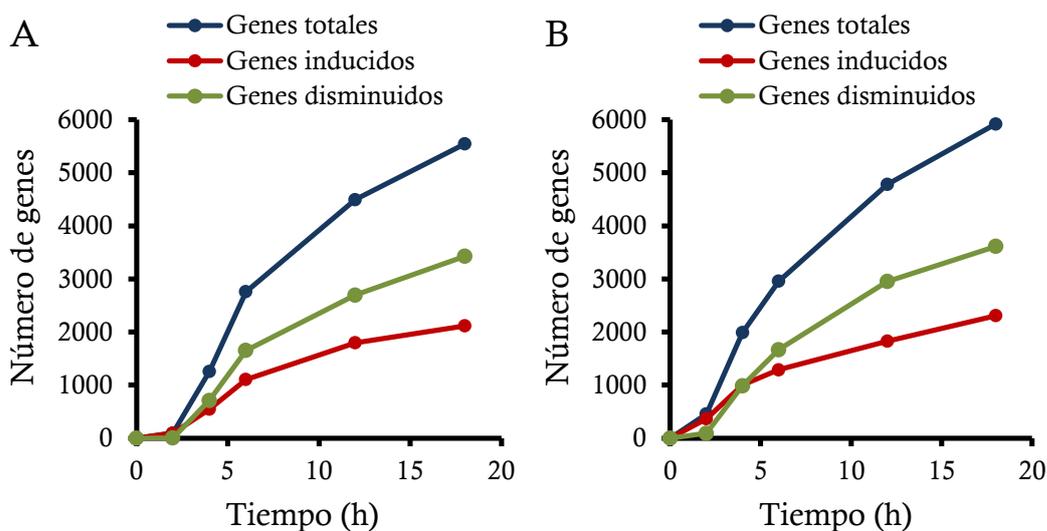


Figura 58. Número de genes cuya transcripción se encuentra alterada en (A) células HCT116 expuestas a Cu²⁺ 1400 μM y (B) en células BEAS-2B expuestas a Cu²⁺ 800 μM.

3.2. Análisis individual de genes cuya transcripción se encuentra alterada por la sobrecarga de cobre

Para facilitar la visualización, los resultados fueron expresados como el logaritmo en base dos (\log_2) de la magnitud del cambio, FC (del inglés *fold change*). Los colores en cada celda de las tablas indican la magnitud y sentido del \log_2 (FC), correspondiendo la intensidad del color rojo a la magnitud del incremento en el \log_2 (FC) y la intensidad del color azul, a la magnitud en la disminución en el \log_2 (FC). Los valores estadísticamente no significativos fueron expresados en color blanco, independientemente de la magnitud del cambio.

En principio se analizaron los genes que se encontraron más fuertemente inducidos, junto con aquellos pertenecientes a sus correspondientes familias. Éstos involucraban fundamentalmente proteínas involucradas en el mantenimiento de la proteostasis. También se estudió la inducción de genes que codifican metalotioneínas, interleuquinas, enzimas que controlan la concentración de H₂O₂ y de aquellos genes que se encuentran bajo el control transcripcional de Nrf2.

3.2.1. Transcripción de genes involucrados en el mantenimiento de la proteostasis

Las HSP, necesarias para el mantenimiento de la homeostasis proteica, se encuentran entre los genes más consistentemente inducidos en las células HCT116 y BEAS-2B expuestas a Cu^{2+} .

3.2.1.1. Transcripción de HSP90s

Entre las distintas familias de HSP, se observa un moderado incremento de HSP90 (Tabla 7). Estas chaperonas moleculares constituyen el 1-2% de las proteínas totales celulares. Sin embargo, frente a un estrés térmico, la proporción de HSP90 puede incrementarse hasta el 4-6% de las proteínas celulares (Crevel y col., 2001).

Tabla 7. (A) Perfil de transcripción de HSP90 en células HCT116 expuestas a Cu^{2+} 1400 μM y (B) en células BEAS-2B expuestas a Cu^{2+} 800 μM .

A	Gen	$\text{Log}_2(\text{FC})$				
		2 h	4 h	6 h	12 h	18 h
	HSP90AA1	0,18	0,5	0,47	0,57	0,65
	HSP90AB1	0,12	0,21	0,19	0,46	0,38
	HSP90B1	0,25	0,21	0,12	-0	-0,04
	TRAP1	-0,06	-0,03	-0,01	0,07	-0,07

B	Gen	$\text{Log}_2(\text{FC})$				
		2 h	4 h	6 h	12 h	18 h
	HSP90AA1	0,43	0,61	0,87	1,07	0,95
	HSP90AB1	0,39	0,65	0,91	0,81	0,73
	HSP90B1	0,24	0,1	0,01	-0,42	-0,45
	TRAP1	-0,1	-0,15	0,08	-0,22	-0,6

3.2.1.2. Transcripción de HSP70s

El mayor incremento en la transcripción de HSP se observa en genes de la familia HSP70 (Tabla 8), donde se alcanzan incrementos mayores a 100 veces en la transcripción de HSPA1A y HSPA6 en las células HCT116 y HSPA6 y HSPA7 en las células BEAS-2B.

Es remarcable que muchos de estos genes alcancen un *plateau* en su nivel de transcripción poco tiempo antes del inicio de la muerte celular.

Tabla 8. (A) Perfil de transcripción de HSP70 en células HCT116 expuestas a Cu^{2+} 1400 μM y (B) en células BEAS-2B expuestas a Cu^{2+} 800 μM .

A	Gen	Log ₂ (FC)				
		2 h	4 h	6 h	12 h	18 h
	HSPA1A	0,49	3,5	4,91	6,83	6,56
	HSPA1B	0,87	0,87	0,91	0,7	0,57
	HSPA1L	0,09	0,31	0,55	1,22	1,38
	HSPA2	-0,13	-0,24	-0,14	0,1	0,38
	HSPA4	-0,08	-0,08	-0,2	0,49	0,49
	HSPA4L	0,02	0,72	1,1	1,73	1,5
	HSPA5	0,29	0,28	0,25	0,23	0,44
	HSPA6	0,17	3,32	4,76	6,1	6,03
	HSPA7	0,06	1,46	2,73	4,16	4,42
	HSPA8	0,17	0,33	0,38	0,37	0,28
	HSPA9	0,14	0,16	0,34	0,23	0,08
	HSPA12A	0,08	-0,14	-0,32	-1,1	-1,47
	HSPA12B	0,11	0,13	-0,03	0,08	0,09
	HSPA13	-0,05	0,49	0,75	0,6	0,18
	HSPA14	-0,06	0,31	0,6	0,99	1,3
	HSPH1	0,77	1,47	1,69	1,81	1,72
	HYOU1	0,39	0,68	0,89	0,65	0,78

B	Gen	Log ₂ (FC)				
		2 h	4 h	6 h	12 h	18 h
	HSPA1A	2,48	3,04	2,86	2,89	2,75
	HSPA1B	2,6	3,29	3,34	3,22	3,21
	HSPA1L	0,3	1,08	1,32	1,91	1,98
	HSPA2	-0,1	-0,17	0,1	1,95	2,46
	HSPA4	0,1	0,39	0,67	0,78	0,62
	HSPA4L	-0,06	0,64	0,76	1,18	1,01
	HSPA5	0,52	0,4	0,44	0,07	0,33
	HSPA6	3,46	7,14	7,56	7,49	7,35
	HSPA7	1,34	5,38	6,46	6,92	6,63
	HSPA8	0,2	0,23	0,34	0,48	0,35
	HSPA9	0,4	0,98	1,05	0,89	0,65
	HSPA12A	0,38	0,25	0,19	-0,38	-0,61
	HSPA12B	0,01	-0,03	0,13	-0,13	0,03
	HSPA13	0,1	0,01	0,16	-0,12	0,06
	HSPA14	0,04	0,39	0,58	1,21	1,42
	HSPH1	1,21	1,83	2,09	2,14	2,01
	HYOU1	0,28	0,39	0,33	0,03	0,24

3.2.1.3. Transcripción de HSP60s

Ante la sobrecarga de iones Cu, se observa una moderada tendencia al aumento en la transcripción de genes pertenecientes a la subfamilia de HSP60 (Tabla 9). Estas chaperonas se localizan principalmente en la mitocondria y, en una menor proporción, en el citosol. Sin embargo, los incrementos en la transcripción corresponden únicamente a genes cuyos productos se localizan en el citosol, como TCP1. La función de TCP1 consiste en el plegamiento de diversas proteínas, incluyendo la actina y la tubulina (Sternlicht y col., 1993). CCT5 y CCT4 también son proteínas citosólicas y participan en la organización de los microtúbulos (Sergeeva y col., 2014).

Tabla 9. (A) Perfil de transcripción de HSP60 en células HCT116 expuestas a Cu^{2+} 1400 μM y (B) en células BEAS-2B expuestas a Cu^{2+} 800 μM .

A	Gen	Log ₂ (FC)					B	Gen	Log ₂ (FC)				
		2 h	4 h	6 h	12 h	18 h			2 h	4 h	6 h	12 h	18 h
	HSPD1	0,04	0,21	0,08	0,12	0,26		HSPD1	-0,31	0,08	0,11	0,31	0,4
	TCP1	-0,08	0,39	0,76	1,05	1,21		TCP1	0,11	0,29	0,8	1,4	1,63
	CCT2	0,15	0,14	-0,03	0,24	-0,02		CCT2	0,03	-0,08	0,01	0,2	0,2
	CCT3	-0,04	-0,02	-0,09	-0	-0,01		CCT3	0,22	-0,16	-0,08	0,23	0,1
	CCT4	0,22	0,36	0,39	0,89	0,9		CCT4	-0,03	0,33	0,55	0,45	0,49
	CCT5	0,22	0,37	0,62	1,14	1,24		CCT5	0,14	0,68	0,66	0,99	1,05
	CCT6A	-0,12	-0,19	-0,22	-0,6	-0,33		CCT6A	-0,12	-0,01	-0,17	-0,58	-0,55
	CCT6B	-0,16	-0,05	-0,1	0,46	0,1		CCT6B	0,13	0,1	-0,03	0,26	-0,12
	CCT7	0	0,08	0,1	-0,4	-0,09		CCT7	-0,18	0,05	0,06	-0,02	-0,09
	CCT8	0	-0,11	-0,1	0,05	-0,05		CCT8	-0,1	-0,04	-0,01	-0,13	-0,06

3.2.1.4. Transcripción de HSP40s

La subfamilia de chaperonas HSP40 funcionan estimulando la hidrólisis de ATP por parte de las HSP70 (Fan y col., 2003). Adicionalmente, algunas HSP40 pueden interactuar directamente con las proteínas incorrectamente plegadas para prevenir su agregación (Christen y Han, 2004). Esta subfamilia se divide en los subgrupos DNAJA, DNAJB y DNAJC, las cuales difieren en los elementos estructurales y funcionales en las chaperonas.

DNAJA es el único subgrupo capaz de unir y actuar como chaperona de péptidos en conformaciones no nativas, independientemente del ATP (Qiu y col., 2016). Dentro de este subgrupo, se observa tanto en las células HCT116 como en BEAS-2B un moderado incremento DNAJA1 y un marcado incremento de DNAJA4 (Tabla 10).

Tabla 10. (A) Perfil de transcripción de HSP40 tipo A en células HCT116 expuestas a Cu^{2+} 1400 μM y (B) en células BEAS-2B expuestas a Cu^{2+} 800 μM .

A	Gen	Log ₂ (FC)					B	Gen	Log ₂ (FC)				
		2 h	4 h	6 h	12 h	18 h			2 h	4 h	6 h	12 h	18 h
	DNAJA1	0,35	0,8	0,86	1,04	1,06		DNAJA1	0,5	0,57	0,72	0,9	0,96
	DNAJA2	0,1	0,24	0,37	0,1	0,04		DNAJA2	0,05	0,26	0,31	0,02	-0,13
	DNAJA3	-0,02	-0,35	-0,6	-0,5	-0,72		DNAJA3	-0,26	-0,48	-0,46	-0,58	-0,53
	DNAJA4	0,96	1,41	1,71	2,74	2,89		DNAJA4	1,07	2,67	3,6	5,51	5,56

También se observa la inducción, tanto en las células HCT116 como en BEAS-2B, del subgrupo DNAJB de HSP40, DNAJB1, DNAJB2, DNAJB4, DNAJB6 y DNAJB9 (Tabla 11). Estas chaperonas, si bien son capaces de unir péptidos no nativos independientemente de ATP, requieren de la participación de HSP70 para completar su función (Qiu y col., 2016).

Tabla 11. (A) Perfil de transcripción de HSP40 tipo B en células HCT116 expuestas a Cu^{2+} 1400 μM y (B) en células BEAS-2B expuestas a Cu^{2+} 800 μM .

A	Gen	Log ₂ (FC)					B	Gen	Log ₂ (FC)				
		2 h	4 h	6 h	12 h	18 h			2 h	4 h	6 h	12 h	18 h
	DNAJB1	1,63	2,79	3,06	3,09	2,93		DNAJB1	2,45	3,89	4,01	3,96	3,98
	DNAJB11	0,21	0,43	0,56	0,83	0,87		DNAJB11	0,27	0,24	0,28	0,09	0
	DNAJB12	0,12	0,37	0,39	0,36	0,05		DNAJB12	0,36	0,4	0,42	0,12	-0,13
	DNAJB13	0,07	0,1	0,09	0,15	0,32		DNAJB13	-0,08	0,1	0,07	0	-0,07
	DNAJB14	0,18	0,26	0,44	-0,1	0,27		DNAJB14	0,07	0,1	0,07	0,09	0,26
	DNAJB2	0,15	0,5	0,48	0,66	0,77		DNAJB2	0,3	0,31	0,4	0,83	0,67
	DNAJB3	0,03	0,2	0,04	0,17	0,22		DNAJB3	0,1	-0,18	0,05	0,3	0,15
	DNAJB4	0,64	1,54	1,67	1,28	0,92		DNAJB4	0,12	0,46	0,95	0,43	0,29
	DNAJB5	0,05	-0,14	0,42	0,26	0,27		DNAJB5	-0,16	-0,02	0,02	0,71	0,81
	DNAJB6	0,23	0,75	1,12	2,52	2,86		DNAJB6	0,31	1,12	1,41	1,91	1,92
	DNAJB7	0,11	0,06	0,23	0,13	0,14		DNAJB7	0,04	0,17	0,15	0,12	0,12
	DNAJB8	-0,11	0,18	0	0,06	0,04		DNAJB8	-0,07	0,05	0,24	-0,04	0,12
	DNAJB9	0,55	1,16	1,23	0,85	1,18		DNAJB9	0,36	0,63	1,11	1,52	1,5

El subgrupo DNAJC posee una mayor variedad de proteínas. Se postula que las DNAJC son capaces de asociarse con HSPA y controlar su compartimentalización y función (Kampinga y col., 2009). Si bien no se observa una homogénea activación de este subgrupo de chaperonas, existe una inducción tanto en células HCT116 como en BEAS-2B de DNAJC7, acompañada de una disminución de DNAJ14 y DNAJC9 (Tabla 12).

Tabla 12. (A) Perfil de transcripción de HSP40 tipo C en células HCT116 expuestas a Cu²⁺ 1400 μM y (B) en células BEAS-2B expuestas a Cu²⁺ 800 μM.

A	Gen	Log ₂ (FC)					B	Gen	Log ₂ (FC)				
		2 h	4 h	6 h	12 h	18 h			2 h	4 h	6 h	12 h	18 h
	DNAJC1	-0,09	0,00	0,19	0,40	0,82		DNAJC1	-0,06	-0,17	0,01	0,43	0,30
	DNAJC10	0,04	-0,13	-0,17	0,18	-0,23		DNAJC10	0,09	-0,02	0,09	-0,43	-0,75
	DNAJC11	0,03	-0,02	-0,02	0,23	0,24		DNAJC11	-0,04	0,15	-0,05	-0,01	-0,13
	DNAJC12	0,01	-0,25	-0,18	-0,28	-0,42		DNAJC12	-0,10	-0,01	0,04	-0,02	-0,04
	DNAJC13	-0,02	-0,04	0,07	-0,10	-0,25		DNAJC13	-0,01	0,18	0,00	-0,34	-0,65
	DNAJC14	-0,13	-0,67	-0,75	-1,05	-1,26		DNAJC14	-0,48	-0,65	-0,72	-1,21	-1,46
	DNAJC15	-0,21	-0,06	-0,01	0,09	0,02		DNAJC15	-0,43	-0,25	-0,43	-0,22	-0,38
	DNAJC16	0,03	-0,07	-0,11	-0,02	-0,19		DNAJC16	0,10	0,05	-0,08	-0,09	-0,04
	DNAJC17	-0,30	-0,32	-0,53	-0,05	0,04		DNAJC17	0,07	0,04	0,10	0,10	0,12
	DNAJC18	0,01	0,03	0,10	0,39	0,05		DNAJC18	0,04	0,11	0,18	-0,15	-0,15
	DNAJC19	-0,01	-0,14	0,01	-0,17	-0,34		DNAJC19	-0,06	-0,19	-0,28	-0,47	-0,41
	DNAJC19P9	0,02	-0,05	-0,18	-0,01	-0,03		DNAJC19P9	-0,11	-0,21	-0,06	-0,13	-0,18
	DNAJC2	-0,05	0,02	-0,07	0,50	0,55		DNAJC2	-0,12	0,02	0,06	-0,04	-0,04
	DNAJC21	0,16	0,04	0,04	0,18	0,07		DNAJC21	-0,06	0,07	-0,05	-0,39	-0,57
	DNAJC22	-0,05	-0,06	0,02	-0,99	-1,16		DNAJC22	0,14	0,14	0,24	-0,05	0,08
	DNAJC24	0,03	0,03	0,08	1,00	1,23		DNAJC24	-0,12	-0,16	-0,19	0,08	0,33
	DNAJC25	0,19	-0,07	-0,20	0,15	0,22		DNAJC25	0,02	0,17	0,27	0,61	1,03
	DNAJC25-GNG10	-0,19	-0,14	-0,36	-0,37	-0,25		DNAJC25-GNG10	-0,33	-0,20	-0,30	-0,38	0,05
	DNAJC27	0,11	-0,40	-0,36	-0,14	-0,16		DNAJC27	-0,22	-0,46	-0,55	-0,37	-0,62
	DNAJC28	0,47	0,05	0,39	0,09	0,49		DNAJC28	0,32	0,31	0,20	-0,04	0,15
	DNAJC3	0,01	0,20	0,16	0,13	0,31		DNAJC3	0,12	0,38	0,49	1,11	1,09
	DNAJC30	-0,25	-0,20	-0,48	-0,49	-0,31		DNAJC30	-0,41	-0,47	-0,34	-0,51	-0,27
	DNAJC4	0,03	0,18	0,34	0,20	0,26		DNAJC4	-0,20	-0,30	0,03	0,29	0,35
	DNAJC5	0,05	0,10	-0,15	-0,25	-0,19		DNAJC5	0,20	0,50	0,74	0,28	0,13
	DNAJC5B	0,04	-0,10	0,23	0,27	-0,02		DNAJC5B	-0,23	0,08	0,10	0,02	0,14
	DNAJC5G	-0,09	-0,21	0,12	-0,17	0,04		DNAJC5G	-0,08	-0,27	-0,15	-0,15	-0,08
	DNAJC6	-0,12	0,05	0,05	0,17	0,25		DNAJC6	0,11	0,21	0,23	0,10	0,20
	DNAJC7	0,06	0,38	0,66	0,94	1,14		DNAJC7	0,07	0,33	0,74	1,13	1,33
	DNAJC8	0,09	0,12	0,16	0,43	0,50		DNAJC8	-0,07	-0,04	0,10	0,34	0,22
	DNAJC9	-0,14	-0,33	-0,61	-0,92	-1,37		DNAJC9	-0,30	-0,67	-1,15	-1,75	-1,76

3.2.1.5. Transcripción de HSP pequeñas

Las HSP pequeñas también pueden unir péptidos mal plegados y promover su correcto plegamiento para alcanzar la conformación nativa por si mismas o en colaboración con otras chaperonas dependientes de ATP. Resulta interesante que

estas chaperonas han sido reconocidas por unir ávidamente Cu^{2+} (Bakthisaran y col., 2015). Dentro de esta subfamilia se observa un marcado incremento en la transcripción de CRYAB y un ligero incremento de la transcripción de HSPB1 y HSPB8 (Tabla 13).

Tabla 13. (A) Perfil de transcripción de HSP pequeñas en células HCT116 expuestas a Cu^{2+} 1400 μM y (B) en células BEAS-2B expuestas a Cu^{2+} 800 μM .

A	Gen	Log ₂ (FC)				
		2 h	4 h	6 h	12 h	18 h
	CRYAA	0,01	-0,08	-0,19	-0,1	-0,15
	CRYAB	0,04	0,14	0,43	2,97	3,44
	HSPB1	0,25	0,86	1,02	1,12	1,1
	HSPB11	-0,05	-0,18	-0,1	0,37	0,46
	HSPB2	-0,03	0,1	0,11	0,11	0,23
	HSPB3	0,08	-0,07	0,13	0,13	-0,09
	HSPB6	0,15	-0,02	0,11	0,12	0,24
	HSPB7	0,14	0,03	0,12	0,09	0,18
	HSPB8	-0,13	0,73	1,5	0,77	1,04
	HSPB9	0	0,05	0,21	0,11	0,16
	ODF1	-0,19	0,01	-0,04	-0,1	-0,14

B	Gen	Log ₂ (FC)				
		2 h	4 h	6 h	12 h	18 h
	CRYAA	0,06	0,29	0,07	0,05	0,46
	CRYAB	-0,12	0,91	1,81	4,03	4,08
	HSPB1	0,09	0,43	0,46	0,77	0,62
	HSPB11	-0,15	-0,3	-0,45	-0,38	-0,67
	HSPB2	0,07	0,06	0,04	0,14	0,21
	HSPB3	-0,13	0	-0,13	-0,1	-0,09
	HSPB6	0,06	0,06	0,11	0,19	0,12
	HSPB7	-0,01	0,13	0,1	0,01	-0,03
	HSPB8	0,22	0,98	1,27	2,17	2,46
	HSPB9	-0,07	-0,11	0,01	0,06	0,11
	ODF1	-0,08	-0,07	-0,02	0,04	-0,18

3.2.1.6. Transcripción de BAG

Las co-chaperonas BAG constituyen una familia de proteínas anti-apoptóticas que comparten un dominio llamado BAG del cual surge su nombre. Por medio de este dominio, actúan sobre la actividad ATPasa de las HSP70 promoviendo la liberación del sustrato (Behl, 2016).

Dentro de esta familia de co-chaperonas se observa un marcado incremento en la transcripción de BAG3 acompañado de una disminución de BAG5 (Tabla 14).

Tabla 14. Perfil de transcripción de BAG1-6 (A) en células HCT116 expuestas a Cu²⁺ 1400 μM y (B) en células BEAS-2B expuestas a Cu²⁺ 800 μM.

A	Gen	Log ₂ (FC)					B	Gen	Log ₂ (FC)				
		2 h	4 h	6 h	12 h	18 h			2 h	4 h	6 h	12 h	18 h
	BAG6	-0,06	0,01	0,35	0,32	0,01		BAG6	-0,11	-0,01	0,08	0	-0,27
	BAG5	-0,07	0,11	-0,08	-1,2	-1,27		BAG5	-0,01	-0,46	-0,6	-1,08	-1,3
	BAG4	-0,16	-0,08	-0,29	0,04	0,55		BAG4	-0,11	-0,15	0,12	0,33	0,07
	BAG3	0,93	2,1	2,34	2,14	2,08		BAG3	1,68	2,71	3,14	3,11	3,08
	BAG2	0	-0,13	-0,69	-0,3	-0,73		BAG2	-0,06	-0,14	-0,13	-0,41	-0,54
	BAG1	-0,17	0,06	-0,05	-0,1	0,03		BAG1	0,08	0,12	0,15	0,19	0,17

Notablemente, HSPA6, DNAJB1, HSPB1, HSPA1A, HSPA1B, HSPH1, HSP90AA1, BAG3 y ATF3, los cuales son genes canónicamente bajo el control transcripcional del factor de transcripción del choque térmico 1, HSF1 (del inglés *heat shock factor 1*), muestran un marcado incremento en su transcripción. El factor de transcripción HSF1 es crítico en la respuesta celular frente a la acumulación de proteínas incorrectamente plegadas a nivel citosólico

3.2.1.7. Transcripción de HSF

Respecto a la transcripción de los factores de transcripción de choque térmico (HSF), se observa una disminución de HSF2 tanto en HCT116 como en BEAS2-B (Tabla 15). Es interesante notar que este hecho también ha sido observado en células sometidas a estrés térmico (Anton y col., 2009).

Tabla 15. (A) Perfil de transcripción de HSFs en células HCT116 expuestas a Cu²⁺ 1400 μM y (B) en células BEAS-2B expuestas a Cu²⁺ 800 μM.

A	Gen	Log ₂ (FC)					B	Gen	Log ₂ (FC)				
		2 h	4 h	6 h	12 h	18 h			2 h	4 h	6 h	12 h	18 h
	HSFY1P1	-0,03	-0,04	-0,04	-0,1	-0,01		HSFY1P1	0,15	0,05	0,07	0,15	0,05
	HSFY2	-0,09	-0,32	-0,25	0,08	-0,1		HSFY2	0,04	0,03	0,09	0,14	0,19
	HSFY1	0,16	-0,01	0,03	-0,1	0,17		HSFY1	0,06	0,09	0	0,16	0
	HSFX2	0,13	0,09	0,1	0,11	0,13		HSFX2	-0,06	-0,15	-0,02	-0,13	0,03
	HSF5	0,12	-0,09	0,13	0,28	0,04		HSF5	-0,09	-0,01	0,08	0,09	-0,04
	HSF4	-0,06	0,31	0,12	0,15	0,18		HSF4	0,22	0,12	0,17	0,13	0,11
	HSF2	0,11	-0,19	-0,59	-1,1	-1,26		HSF2	-0,54	-0,72	-0,83	-1,19	-1,15
	HSF1	0,13	-0,07	-0,18	-0,1	-0,14		HSF1	0,1	0,03	0,02	-0,13	-0,14

3.2.1.8. Transcripción de genes involucrados en la UPR

Adicionalmente a la respuesta frente a la alteración de la proteostasis mediada por HSF1, existe una respuesta frente al incremento en la carga de proteínas incorrectamente plegadas que se origina por su acumulación en el retículo endoplásmico. Esta respuesta se divide en tres ramas correspondientes a las vías de señalización iniciadas por PERK, ATF6 y XBP1. La exposición a Cu^{2+} produce en células HCT116 y BEAS-2B una fuerte inducción en los genes corriente debajo de PERK (Tabla 16). Curiosamente, ERO1A es el único gen inducible involucrado en la vía de PERK que no se encuentra activado. Por otro lado, es esperable que EIF2A no se vea incrementado ya que no es un gen inducible (Wei y col., 2002).

También se observa una activación de menor intensidad en los genes corriente debajo de ATF6 y XBP1.

Tabla 16. (A) Perfil de transcripción de proteínas involucradas en la UPR en células HCT116 expuestas a Cu^{2+} 1400 μM y (B) en células BEAS-2B expuestas a Cu^{2+} 800 μM .

A	Gen	Log ₂ (FC)				
		2 h	4 h	6 h	12 h	18 h
PERK	DDIT3	1,44	3,46	3,93	3,91	4,09
	DDIT4	2,72	3,67	3,49	2,57	2,3
	ATF4	0,6	1,01	1,13	0,82	0,68
	TRIB3	0,34	2,6	3,03	2,98	2,86
	PPP1R15A	2,61	4,23	4,36	4,64	4,4
	EIF2AK3	0,23	0,37	0,53	0,56	1,02
	ERO1A	-0,15	0,23	0,2	-0,29	0,29
	EIF2A	0,09	0,24	0,39	0,36	0,12
ATF6	EDEM1	0,04	-0,12	-0,11	-0,17	-0,09
	DNAJB9	0,55	1,16	1,23	0,85	1,18
	DNAJC3	0,01	0,2	0,16	0,13	0,31
Ire1α	XBP1	0,39	0,3	0,24	-0,08	-0,13
	HSPA5	0,29	0,28	0,25	0,23	0,44

B	Gen	Log ₂ (FC)				
		2 h	4 h	6 h	12 h	18 h
PERK	DDIT3	1,62	2,11	2,23	2,82	2,61
	DDIT4	3	3,29	3,09	3,6	3,88
	ATF4	0,69	0,75	0,4	0,27	0,21
	TRIB3	2,67	3,94	4,13	3,94	3,61
	PPP1R15A	2,23	2,87	3,21	3,32	3,35
	EIF2AK3	0,4	0,4	0,53	0,72	0,83
	ERO1A	0,35	0,56	0,54	0,19	0,25
	EIF2A	0,01	0,07	0,06	-0,06	-0,03
ATF6	EDEM1	0,44	0,57	0,65	0,13	-0,03
	DNAJB9	0,36	0,63	1,11	1,52	1,5
	DNAJC3	0,12	0,38	0,49	1,11	1,09
Ire1α	XBP1	1,18	1,34	1,64	0,79	0,35
	HSPA5	0,52	0,4	0,44	0,07	0,33

3.2.1.9. Transcripción de genes involucrados en la mtUPR

A pesar de la clara respuesta a la carga incrementada de proteínas incorrectamente plegadas, no se observa una inducción consistente en los genes que codifican para proteínas específicamente involucradas en la mtUPR (Tabla 17).

Tabla 17. (A) Perfil de transcripción de proteínas involucradas en la mtUPR en células HCT116 expuestas a Cu^{2+} 1400 μM y (B) en células BEAS-2B expuestas a Cu^{2+} 800 μM .

A	Gen	Log ₂ (FC)					B	Gen	Log ₂ (FC)				
		2 h	4 h	6 h	12 h	18 h			2 h	4 h	6 h	12 h	18 h
	HSPD1	0,04	0,21	0,08	0,12	0,26		HSPD1	-0,31	0,08	0,11	0,31	0,4
	HSPE1	-0,09	-0,5	-0,07	0	0,38		HSPE1	0,46	0,39	-0,17	0,71	0,67
	DNAJA3	-0,02	-0,35	-0,6	-0,5	-0,72		DNAJA3	-0,26	-0,48	-0,46	-0,58	-0,53
	CLPP	-0,38	-0,48	-0,49	-0,1	-0,29		CLPP	-0,36	-0,09	-0,19	-0,12	-0,35
	YME1L1	-0,11	0,11	0,46	0,29	0,62		YME1L1	-0,07	0,21	0,27	0,39	0,59
	PMPCB	-0,11	-0,02	-0,09	-0,4	-0,85		PMPCB	-0,15	-0,12	-0,23	-0,4	-0,49
	TIMM17A	-0,15	-0,02	-0,05	0,13	0,24		TIMM17A	-0,08	-0,06	-0,05	0	0,11
	NDUFB2	-0,04	-0,31	-0,46	-0,4	-0,59		NDUFB2	-0,11	-0,46	-0,57	-0,69	-0,73
	TXN2	0,01	-0,09	0,04	-0,1	0,34		TXN2	0,11	-0,02	0	0,2	0,21
	ENDOG	-0,05	-0,39	-0,49	-0,7	-0,7		ENDOG	0,03	0,16	0,01	-0,32	-0,7

3.2.1.10. Transcripción de ubiquitina

La ubiquitina lleva a cabo diversas funciones en la célula, pero su principal rol es la marcación de proteínas para su degradación proteasómica. Esta proteína es codificada por cuatro genes en células humanas. El gen UBC muestra un marcado incremento en su transcripción tanto en HCT116 como en BEAS-2B, mientras que la transcripción de UBA52 se encuentra ligeramente incrementada (Tabla 18).

Tabla 18. (A) Transcripción de ubiquitina en (A) células HCT116 expuestas a Cu^{2+} 1400 μM y (B) en células BEAS-2B expuestas a Cu^{2+} 800 μM .

A	Gen	Log ₂ (FC)					B	Gen	Log ₂ (FC)				
		2 h	4 h	6 h	12 h	18 h			2 h	4 h	6 h	12 h	18 h
	UBC	0,71	3,14	4,02	4,05	4,25		UBC	0,86	2,46	3,19	4,1	4,17
	UBA52	0,13	0,17	0,33	0,61	0,8		UBA52	0,06	0,27	0,35	1,07	1,07
	RPS27A	0	0,11	0,09	0,04	-0,11		RPS27A	-0,04	-0,33	-0,26	-0,27	0,15
	UBB	0,05	0,21	0,28	-0	0,22		UBB	-0,27	-0,08	-0,02	0,76	0,67

3.2.2. Transcripción de genes involucrados en procesos autofágicos

Las proteínas codificadas por los genes LC3A, LC3B y LC3C, GABARAP, GABARAPL1 y GABARAPL2 son proteínas clave en el proceso autofágico ya que estas deben ser unidas covalentemente a la fosfatidiletanolamina en la membrana del fagoróforo para que este se extienda y engulla el contenido citosólico (Kabeya y

col, 2004). Al finalizar el proceso autofágico, estas proteínas son degradadas por el autolisosoma, por lo cual deben ser sintetizadas nuevamente (Tanida y col., 2008).

Distintos autores han reportado que estas proteínas son inducibles frente a distintos tipos de estrés y, si bien todas participan en la extensión del fagoróforo, podrían diferir en funciones más finas que modulen el proceso autofágico. Por ejemplo, los autofagosomas compuestos por LC3A son morfológicamente distinguibles de aquellos formados por LC3B y la localización intracelular de estas proteínas no se superpone (Koukourakis y col., 2015).

Notablemente, luego de la exposición a Cu^{2+} se observó una intensa inducción específica de los genes LC3B y GABARAPL1 (Tabla 19).

Tabla 19. (A) Transcripción de LC3 y GABARAP en células HCT116 expuestas a Cu^{2+} 1400 μM y (B) en células BEAS-2B expuestas a Cu^{2+} 800 μM .

A	Gen	Log ₂ (FC)					B	Gen	Log ₂ (FC)				
		2 h	4 h	6 h	12 h	18 h			2 h	4 h	6 h	12 h	18 h
	MAP1LC3C	0,21	0,22	0,24	0,25	0,09		MAP1LC3C	0,01	0,03	0,02	0,11	0,14
	MAP1LC3B2	-0,16	-0,06	-0,05	0,23	-0,19		MAP1LC3B2	-0,06	-0,15	-0,11	-0,11	-0,21
	MAP1LC3B	0,44	1,94	2,71	3,06	3,04		MAP1LC3B	1,11	2,07	2,52	3,12	3,34
	MAP1LC3A	0,09	0,07	0,08	-0,1	0,19		MAP1LC3A	-0,23	-0,28	-0,24	0,27	0,06
	GABARAPL2	-0,19	-0,2	-0,27	0,02	0,44		GABARAPL2	-0,14	-0,32	-0,18	0,28	0,57
	GABARAPL1	0,64	1,51	2,28	2,42	2,34		GABARAPL1	0,46	1,25	1,59	2,4	2,49
	GABARAP	0,1	-0,31	-0,06	0,13	0,34		GABARAP	0,01	-0,06	-0,23	0,32	0,65

3.2.3. Transcripción de metalotioneínas

Las metalotioneínas (MT) son una familia de proteínas de bajo peso molecular, con un alto contenido de cisteína que puede alcanzar el 30% del total de los aminoácidos constituyentes (Sigel y Sigel, 2009). Éstas son reconocidas por unir ávidamente distintos metales de transición como Zn y Cu, entre otros mediante los grupos -SH aportados por las cisteínas.

Tanto en células HCT116 como en células BEAS-2B se observa un aumento de la transcripción de los genes que codifican MTs (Tabla 20). Si bien se halló una clara inducción de estos genes, los perfiles de transcripción en los distintos tipos celulares analizados difieren ya que, por ejemplo, en células HCT116 existe una

marcada inducción de MT1B, mientras que en BEAS-2B se observa en cambio una inducción de MT1A, MT1M y MT2A.

Tabla 20. (A) Perfil de transcripción de MTs en células HCT116 expuestas a Cu^{2+} 1400 μM y (B) en células BEAS-2B expuestas a Cu^{2+} 800 μM .

A	Gen	Log ₂ (FC)				
		2 h	4 h	6 h	12 h	18 h
MT1A	0,06	0,07	0	0,16	0,02	
MT1B	0,66	2,46	1,91	3,89	2,7	
MT1CP	0,12	-0,11	0,12	0,04	0,31	
MT1DP	0,1	0,18	0,21	0,81	0,39	
MT1E	2,44	1,84	1,23	1,62	1,42	
MT1F	0,67	0,98	0,52	1,77	1,34	
MT1G	1,16	1,76	1,45	2,57	2,44	
MT1H	0,51	1,15	0,6	2,28	1,86	
MT1IP	0,81	1,06	0,8	1,24	1,21	
MT1JP	-0,07	0,36	-0,04	0,12	0,22	
MT1L	0,78	0,4	0,4	0,52	0,17	
MT1M	-0,04	-0,02	0,06	0,29	0,08	
MT1X	1,12	1,46	1,35	1,59	1,59	
MT2A	0,4	0,44	0,41	0,41	0,34	
MT3	-0,15	-0,14	-0,05	0,04	-0,07	
MT4	0,07	0,03	-0,03	0,1	0,31	

B	Gen	Log ₂ (FC)				
		2 h	4 h	6 h	12 h	18 h
MT1A	1,95	2,2	2,15	2,05	1,87	
MT1B	-0,05	-0,02	-0,02	0,13	-0,05	
MT1CP	-0,05	0,04	0,01	-0,04	0,16	
MT1DP	0,13	0,07	0,15	0,27	0,16	
MT1E	1,16	0,56	0,47	0,07	0,03	
MT1F	1,67	2,12	2,4	2,46	2,38	
MT1G	1,59	2,36	2,76	2,94	2,96	
MT1H	0,66	0,95	1,08	1,08	0,93	
MT1IP	2,53	3,41	3,4	3,44	3,35	
MT1JP	-0,09	-0,1	-0,05	0,03	0,02	
MT1L	0,33	0,17	0,16	0,05	0,06	
MT1M	1,1	1,76	1,89	1,79	1,72	
MT1X	3,75	4,52	4,59	4,34	3,97	
MT2A	1,64	1,91	1,99	1,95	1,8	
MT3	-0,01	0	0,14	0,16	0,21	
MT4	0,07	0,06	0,18	0,07	0,26	

3.2.4. Transcripción de interleuquinas

Las interleuquinas son sintetizadas por diversos tipos celulares como linfocitos T ayudantes CD4+, monocitos, macrófagos, células endoteliales e incluso células epiteliales.

La incubación con Cu^{2+} produce una muy marcada inducción de CXCL8 tanto en células HCT116 como en BEAS-2B (Tabla 21). También se observa una intensa inducción de IL11 en ambas células.

CXCL8 es una citoquina pro-inflamatoria que estimula la quimiotaxis principalmente de neutrófilos y promueve la angiogénesis, mientras que IL11 es una citoquina anti-inflamatoria.

Tabla 21. (A) Perfil de transcripción de interleuquinas en células HCT116 expuestas a Cu^{2+} 1400 μM y (B) en células BEAS-2B expuestas a Cu^{2+} 800 μM .

A	Gen	Log ₂ (FC)				
		2 h	4 h	6 h	12 h	18 h
IL1A	0,00	0,20	0,38	0,10	0,24	
IL1B	-0,09	-0,15	-0,11	-0,09	-0,10	
IL1F10	0,01	0,04	0,18	0,14	0,08	
IL1RN	-0,03	-0,14	0,04	0,12	0,14	
IL2	-0,15	-0,03	-0,14	0,01	-0,03	
IL3	-0,04	0,07	0,09	0,25	0,37	
IL4	0,20	-0,10	0,00	0,31	0,31	
IL5	0,18	-0,11	-0,04	0,11	0,07	
IL6	-0,03	0,05	-0,03	0,05	0,08	
IL7	-0,09	0,20	0,09	-0,03	0,03	
CXCL8	0,39	2,40	3,90	4,08	4,36	
IL9	-0,09	-0,02	-0,04	0,09	-0,01	
IL10	0,37	0,38	0,48	0,25	0,87	
IL11	-0,01	0,51	1,27	1,63	2,31	
IL12A	0,20	0,13	-0,19	0,18	-0,02	
IL12B	-0,07	0,20	0,11	-0,05	0,11	
IL13	0,11	0,16	0,13	0,09	0,02	
IL15	0,01	-0,05	0,07	0,05	-0,19	
IL16	0,12	0,31	0,39	0,26	0,25	
IL17A	0,08	-0,13	0,09	-0,14	0,22	
IL17B	-0,05	0,02	0,06	-0,19	-0,14	
IL17C	0,18	0,49	0,31	0,09	0,27	
IL17D	-0,03	-0,15	-0,24	-0,13	-0,19	
IL17F	0,01	-0,09	0,08	0,22	0,01	
IL18	0,16	0,07	0,01	-0,11	0,13	
IL19	0,02	-0,03	0,07	0,04	0,20	
IL20	-0,06	0,12	0,12	0,25	0,03	
IL21	0,11	-0,11	-0,09	0,14	-0,06	
IL22	0,17	0,30	0,10	0,13	0,02	
IL23A	0,00	-0,08	0,05	0,12	0,15	
IL24	-0,12	-0,06	0,02	0,09	-0,09	
IL25	-0,02	-0,06	0,12	0,41	0,45	
IL26	0,13	-0,02	0,12	0,10	0,18	
IL27	0,00	0,21	0,01	0,04	0,02	
IL31	-0,10	0,03	-0,22	-0,03	0,14	
IL32	-0,02	0,09	0,22	0,32	0,04	
IL33	0,13	-0,09	-0,07	0,00	-0,05	
IL34	0,08	0,11	0,01	0,01	0,13	
IL36A	-0,22	-0,01	0,46	-0,13	-0,03	
IL36B	0,03	-0,03	0,00	-0,08	0,16	
IL36G	-0,13	-0,03	-0,03	0,02	0,06	
IL36RN	0,04	0,11	0,11	0,24	0,16	
IL37	-0,11	-0,08	0,02	-0,06	0,10	

B	Gen	Log ₂ (FC)				
		2 h	4 h	6 h	12 h	18 h
IL1A	0,12	0,28	0,37	0,23	0,40	
IL1B	-0,01	0,17	0,08	-0,18	0,02	
IL1F10	-0,03	0,01	0,10	0,03	0,08	
IL1RN	0,11	0,03	-0,01	-0,04	-0,01	
IL2	-0,13	-0,06	-0,28	-0,02	-0,05	
IL3	-0,04	-0,04	-0,12	-0,09	0,08	
IL4	0,04	0,11	0,01	0,04	0,16	
IL5	0,07	0,05	0,17	0,11	0,23	
IL6	-0,01	0,43	0,96	0,95	1,09	
IL7	-0,01	0,04	0,07	0,22	0,19	
CXCL8	2,33	4,07	4,79	5,01	5,03	
IL9	-0,10	0,04	0,05	0,09	0,03	
IL10	0,58	0,66	0,31	0,49	0,93	
IL11	1,80	3,03	3,43	3,68	3,55	
IL12A	0,72	0,90	1,06	1,32	1,61	
IL12B	0,05	-0,05	0,05	-0,08	0,01	
IL13	-0,02	-0,07	0,10	-0,12	0,13	
IL15	-0,22	-0,43	-0,44	-0,48	-0,41	
IL16	0,15	-0,11	0,06	0,10	0,21	
IL17A	-0,20	-0,29	-0,21	-0,08	-0,06	
IL17B	0,03	0,03	0,03	-0,02	0,19	
IL17C	-0,02	0,01	-0,01	0,50	0,07	
IL17D	-0,02	0,22	0,20	0,07	-0,15	
IL17F	0,21	0,13	0,00	0,08	0,27	
IL18	0,36	0,30	0,27	0,16	0,37	
IL19	0,16	0,23	0,24	0,28	0,52	
IL20	-0,04	0,01	-0,03	0,22	0,40	
IL21	0,10	-0,10	-0,01	0,15	0,08	
IL22	0,01	0,02	0,13	0,23	0,17	
IL23A	-0,15	-0,05	-0,14	-0,01	0,11	
IL24	0,12	0,38	0,50	0,67	0,51	
IL25	-0,11	-0,02	-0,14	0,62	0,50	
IL26	0,20	0,09	0,20	0,12	0,11	
IL27	0,02	-0,04	-0,01	0,00	0,04	
IL31	0,08	0,00	0,09	-0,08	0,16	
IL32	0,10	0,43	0,42	0,66	0,87	
IL33	-0,01	0,20	0,27	0,10	0,17	
IL34	-0,02	-0,04	-0,13	-0,02	0,01	
IL36A	-0,12	0,00	-0,08	0,17	-0,03	
IL36B	-0,02	0,03	0,03	0,10	0,19	
IL36G	-0,13	0,09	0,10	0,19	0,12	
IL36RN	0,05	0,16	0,17	0,09	0,25	
IL37	0,19	0,15	0,00	0,21	0,20	

3.2.5. Transcripción de genes bajo control transcripcional de Nrf2

Nrf2 es un factor de transcripción que responde a diversos estímulos. Entre ellos se encuentra el incremento en la producción de especies oxidantes, pero su actividad también puede ser regulada mediante fosforilación en respuesta a otros tipos de estrés.

Entre los genes cuya expresión se encuentra bajo el control transcripcional de Nrf2 y fueron inducidos por la exposición a Cu^{2+} (Tabla 22), se encuentran diversas proteínas relacionadas al metabolismo del GSH y del Fe. Se observó una moderada inducción de los genes G6PD y ME1, involucrados en la producción de NADPH. Resulta lógico que las células expuestas al Cu^{2+} , requieran de fuentes reductoras para controlar el estado de oxidación intracelular del metal. Es remarcable que la transcripción de genes involucrados en el uso del GSH no se encuentra incrementada mientras que los genes involucrados en el metabolismo de las tiorredoxinas muestran una moderada inducción.

Respecto a los genes involucrados en la síntesis de GSH, no se observa un incremento en la transcripción de la subunidad catalítica (GCLC) de la GCL. Sin embargo, existe una consistente inducción en la subunidad moduladora (GCLM) de la GCL y el importador de cistina, también conocido como Xc- (SLC7A11). Si bien la GCLC posee la completa actividad catalítica de la enzima GCL, GCLM interactúa con GCLC e incrementa su actividad catalítica (Chen y col., 2005).

Se observó un incremento en los genes que regulan el metabolismo del Fe, especialmente HMOX1. Es importante remarcar que si bien HMOX1 es una proteína bajo control transcripcional de Nrf2, esta proteína también se ve incrementada por el estrés térmico (Furusawa y col., 2011).

Tabla 22. (A) Perfil de transcripción de genes bajo control transcripcional de Nrf2 en células HCT116 expuestas a Cu²⁺ 1400 μM y (B) en células BEAS-2B expuestas a Cu²⁺ 800 μM.

A	Gen	Log ₂ (FC)				
		2 h	4 h	6 h	12 h	18 h
Sínt. NADPH	G6PD	-0,10	-0,10	0,32	0,97	1,01
	PGD	-0,01	-0,02	-0,06	0,22	-0,10
	ME1	-0,23	0,68	1,11	2,06	1,97
	IDH1	-0,19	0,21	0,32	0,53	0,35
Empleo de GSH	GPX2	0,02	0,04	-0,03	-0,06	0,04
	GSTA1	0,05	0,03	0,10	-0,02	0,13
	GSTA2	-0,01	0,16	0,03	-0,05	-0,01
	GSTA3	-0,03	0,07	0,09	0,07	0,14
	GSTA5	0,08	0,11	0,11	0,05	0,19
	GSTM1	-0,13	-0,12	-0,11	0,11	0,06
	GSTM3	-0,09	-0,04	-0,13	-0,06	0,05
	GSTP1	0,08	-0,04	-0,19	0,11	0,00
	Empleo de Trx	TXNRD1	0,21	0,62	0,92	0,43
TXN		0,14	0,24	0,27	0,28	0,28
PRDX1		0,05	0,03	-0,07	0,04	0,00
SRXN1		0,91	1,83	2,03	1,85	1,42
Sínt. GSH	GCLC	0,19	0,71	0,41	-0,81	-1,38
	GCLM	0,47	0,89	1,18	1,33	1,18
	SLC7A11	0,19	0,97	1,45	2,05	1,86
	GSR	-0,11	0,16	0,51	0,85	0,95
Met. Fe	HMOX1	3,07	4,49	4,59	4,58	4,10
	FTH1	-0,06	0,35	0,44	0,76	0,74
	FTL	0,27	0,47	0,42	0,58	0,41
Ox.	NQO1	0,10	-0,01	0,06	0,11	-0,26
Fase 2	UGT1A1	-0,02	0,14	-0,17	0,11	0,07
	UGT1A6	0,08	0,12	0,16	0,25	0,10

B	Gen	Log ₂ (FC)				
		2 h	4 h	6 h	12 h	18 h
Sínt. NADPH	G6PD	0,08	0,32	0,46	0,72	0,46
	PGD	-0,05	0,04	-0,15	0,10	-0,06
	ME1	-0,01	0,44	0,76	1,46	1,61
	IDH1	-0,24	-0,31	-0,40	0,15	0,03
Empleo de GSH	GPX2	-0,11	-0,02	-0,09	0,04	-0,06
	GSTA1	0,13	0,06	0,16	0,06	0,06
	GSTA2	-0,02	0,01	0,14	0,19	0,20
	GSTA3	0,13	0,14	0,17	0,08	0,01
	GSTA5	-0,11	0,07	0,10	-0,15	-0,09
	GSTM1	-0,27	-0,26	-0,21	0,31	0,19
	GSTM3	0,14	0,05	0,04	0,64	0,58
	GSTP1	0,03	-0,17	-0,36	-0,19	-0,28
	Empleo de Trx	TXNRD1	1,05	2,09	2,18	2,12
TXN		-0,13	-0,07	-0,15	-0,24	-0,22
PRDX1		-0,04	-0,10	-0,07	-0,14	-0,35
SRXN1		1,18	2,25	2,79	2,62	2,60
Sínt. GSH	GCLC	-0,27	-0,21	-0,08	-0,66	-0,63
	GCLM	1,04	1,91	2,36	2,10	2,02
	SLC7A11	0,70	1,74	2,38	2,21	2,04
	GSR	-0,06	0,36	0,56	0,73	0,68
Met. Fe	HMOX1	5,23	6,10	6,23	6,25	6,34
	FTH1	0,39	0,64	0,86	1,66	1,67
	FTL	0,09	0,26	0,39	0,87	0,93
Ox.	NQO1	0,14	0,28	0,35	0,29	0,14
Fase 2	UGT1A1	0,17	0,00	0,07	0,01	0,14
	UGT1A6	0,10	-0,05	-0,07	0,11	-0,01

3.2.6. Transcripción de genes que regulan la concentración de H₂O₂

Contrario a lo esperado, no se observa un incremento en la transcripción de los genes que codifican para proteínas involucradas en la detoxificación del H₂O₂ (Tabla 23). De hecho, la transcripción de estos genes se encuentra ligeramente disminuida. Tanto en las células HCT116 como en las células BEAS-2B se observa una disminución en la transcripción de GPX8, GPX1 y CAT. Además, en células BEAS-2B se observa una disminución de PRDX6 y PRDX3. Únicamente la SOD2 parece sufrir un ligero incremento en su transcripción en los tiempos más prolongados, tanto en las células HCT116 como en las células BEAS-2B.

Tabla 23. (A) Perfil de transcripción de genes involucrados en el metabolismo del H₂O₂ en células HCT116 expuestas a Cu²⁺ 1400 μM y (B) en células BEAS-2B expuestas a Cu²⁺ 800 μM.

A	Gen	Log ₂ (FC)				
		2 h	4 h	6 h	12 h	18 h
Sumideros de O ₂ ⁻	SOD3	-0,02	-0,06	0,01	0,02	0,12
	SOD2	-0,12	-0,25	-0,04	0,27	0,39
	SOD1	0,03	-0,03	0,11	0,16	0,13
Sumideros de H ₂ O ₂	CAT	-0,02	-0,03	0,07	-0,12	-0,51
	GPX8	0,11	0,13	-0,05	-0,39	-1,21
	GPX7	-0,03	0,29	-0,01	0,15	-0,03
	GPX6	0,13	0,09	0,14	0,09	0,19
	GPX5	-0,17	-0,16	-0,28	-0,11	-0,16
	GPX4	-0,22	-0,29	-0,23	-0,10	-0,26
	GPX3	0,05	0,19	0,23	0,01	0,16
	GPX2	0,02	0,04	-0,03	-0,06	0,04
	GPX1P1	-0,54	-0,74	-0,44	-0,12	-0,26
	GPX1	-0,31	-0,60	-0,50	-0,11	-0,31
	PRDX6	0,03	0,04	-0,02	0,12	-0,31
	PRDX5	-0,21	-0,18	0,11	-0,12	0,03
	PRDX4	0,16	0,00	-0,07	0,06	-0,21
	PRDX3	-0,16	-0,21	-0,14	-0,36	-0,39
	PRDX2	-0,10	-0,14	-0,06	-0,20	0,02
	PRDX1	0,05	0,03	-0,07	0,04	0,00

B	Gen	Log ₂ (FC)				
		2 h	4 h	6 h	12 h	18 h
Sumideros de O ₂ ⁻	SOD3	0,06	0,06	0,07	0,03	0,06
	SOD2	-0,24	-0,15	-0,01	1,10	1,28
	SOD1	-0,26	-0,25	-0,25	-0,03	-0,07
Sumideros de H ₂ O ₂	CAT	-0,41	-0,21	-0,53	-0,61	-0,86
	GPX8	-0,33	-0,63	-0,81	-1,58	-1,76
	GPX7	-0,25	0,05	0,00	-0,02	0,02
	GPX6	-0,14	-0,13	-0,26	-0,15	-0,32
	GPX5	-0,39	-0,18	-0,12	-0,23	-0,09
	GPX4	-0,37	-0,20	-0,33	-0,05	-0,22
	GPX3	0,03	0,04	0,22	0,44	0,28
	GPX2	-0,11	-0,02	-0,09	0,04	-0,06
	GPX1P1	-0,30	-0,53	-0,53	-0,05	-0,11
	GPX1	-0,36	-0,49	-0,46	-0,59	-0,72
	PRDX6	-0,14	-0,03	-0,50	-0,96	-1,41
	PRDX5	-0,25	-0,19	-0,01	0,55	0,28
	PRDX4	-0,13	-0,16	-0,19	-0,29	-0,43
	PRDX3	-0,32	-0,41	-0,49	-0,41	-0,35
	PRDX2	-0,21	-0,11	-0,22	0,28	0,21
	PRDX1	-0,04	-0,10	-0,07	-0,14	-0,35

3.3. Estudio de los procesos celulares alterados por la sobrecarga de cobre mediante GSEA

En principio, el estudio individual o de familias de genes en base al incremento o disminución en su transcripción permite delinear los procesos que están siendo fundamentalmente afectados por la sobrecarga de iones Cu. Sin embargo, debido al extenso número de genes cuya transcripción se encuentra alterada, este enfoque está limitado a aquellos genes que posean las mayores magnitudes de cambio. En este aspecto, es posible que numerosos genes levemente inducidos, contribuyan a un proceso celular específico de la misma manera que un grupo reducido, cuya inducción sea mayor.

El estudio integral de los procesos celulares alterados por la sobrecarga de iones Cu se realizó mediante GSEA (del inglés *gene set enrichment analysis*). Este método consiste en identificar clases de genes que se encuentran sobre-

representadas en un gran conjunto de genes obtenidos experimentalmente, por ejemplo mediante micromatrices de ADN (Subramanian y col., 2005). Para obtener un perfil funcional del conjunto de genes, este análisis puede ser comparado con cada uno de los procesos descritos en la ontología de genes (GO, del inglés *gene ontology*). En la práctica, las ontologías son representaciones de componentes, funciones o procesos, que son detectables u observables, y de las relaciones entre ellos. GO es un gran proyecto bioinformático que tiene por objetivo unificar la representación de los atributos de los genes y los productos de éstos en todas las especies (The Gene Ontology Consortium, 2008). Se puede acceder libremente a la base de datos GO a través del sitio *web* <http://amigo.geneontology.org/amigo>.

GO provee una ontología de términos definidos representando las propiedades de los productos génicos que cubren tres campos: componentes celulares, función molecular y procesos biológicos. El análisis en este trabajo se concentró en los procesos biológicos GO. Estos procesos son básicamente operaciones o conjuntos de eventos moleculares con un principio y un fin definido, pertinentes al funcionamiento de una unidad viva integrada como una célula, un tejido, un órgano o un organismo.

El GSEA consiste en analizar si la exposición a Cu^{2+} produce la inducción o la disminución del conjunto de genes correspondientes a un proceso GO. En caso de que los genes correspondientes a un proceso GO se encuentren significativamente inducidos se dice que el proceso se encuentra enriquecido, mientras que si la transcripción de estos genes se encuentra disminuida se dice que el proceso se encuentra depletado. Para determinar si un proceso GO se encuentra enriquecido o depletado se empleó el test de Kolmogorov-Smirnov y los procesos alterados con un p valor ajustado (Benjamini Yekutieli) menor a 0,001 fueron considerados significativos. El GSEA fue realizado mediante el *software* provisto por el sitio *web* <https://genetrail2.bioinf.uni-sb.de/> para el análisis de transcriptomas.

A continuación se presentan en formato de tablas los procesos GO enriquecidos y depletados en las células HCT116 y BEAS-2B expuestas a Cu^{2+} 1400 μM y 800 μM por distintos tiempos. Los valores corresponden al logaritmo negativo del p valor ajustado. Los procesos GO fueron añadidos a la tabla cuando

estos mostraron una alteración significativa tanto en las células HCT116 como en las células BEAS-2B. Para facilitar la visualización, los procesos fueron ordenados en orden decreciente en base logaritmo negativo del p valor ajustado obtenido a las 6 horas en las células HCT116, ya que en este momento comienza a observarse el *plateau* en la expresión de la mayoría de los genes. La intensidad del color rojo o del color azul es proporcional a la magnitud del logaritmo negativo del p valor ajustado para los procesos enriquecidos y para los procesos depletados respectivamente.

Entre los procesos enriquecidos consistentemente en ambas células por la sobrecarga de iones Cu (Tabla 24), se observa un marcado incremento en la respuesta frente a proteínas incorrectamente plegadas y al estrés del retículo endoplásmico, coincidente con lo observado mediante el estudio de los genes individuales. Adicionalmente, se observó una muy ligera inducción de los genes involucrados en la vía intrínseca de la apoptosis en respuesta a la UPR.

Es importante destacar que si bien es notable la activación de procesos relacionados a la olfacción, al analizar individualmente los genes involucrados en este proceso se observa que su inducción no es significativa y por ello el proceso en sí carece de significado biológico.

Tabla 24. Análisis de los procesos biológicos GO mediante GSEA que se encuentran enriquecidos en células HCT116 y BEAS-2B expuestas a Cu²⁺ 1400 μM y 800 μM respectivamente.

Proceso biológico GO	HCT116					BEAS-2B				
	Tiempo (h)					Tiempo (h)				
	2	4	6	12	18	2	4	6	12	18
Respuesta al estrés del retículo endoplásmico	3,50	6,10	9,50	4,81	NS	4,56	7,89	8,21	NS	NS
Detección de estímulos químicos involucrados en la percepción sensorial	NS	4,00	6,80	12,00	18,90	4,70	8,96	10,11	17,13	21,21
Respuesta a las proteínas topológicamente incorrectas	4,70	7,20	6,80	3,88	NS	3,47	5,25	6,6	NS	NS
Respuesta a las proteínas mal plegadas	4,40	7,20	6,60	3,32	NS	5,4	8,45	9,63	NS	NS
Percepción sensorial del olor	NS	3,80	5,50	10,10	15,20	NS	7,20	8,73	14,28	17,78
Detección de estímulos químicos involucrados en	NS	3,90	5,40	10,80	16,60	3,23	7,54	9,49	14,78	19,05

Proceso biológico GO	HCT116					BEAS-2B				
	Tiempo (h)					Tiempo (h)				
	2	4	6	12	18	2	4	6	12	18
la percepción sensorial del olor										
Respuesta celular a proteínas topológicamente incorrectas	NS	3,40	3,60	NS	NS	5,22	9,60	9,47	NS	NS
Vía de señalización intrínseca de la apoptosis en respuesta al estrés del RE	NS	NS	3,50	NS	NS	3,43	NS	4,16	NS	NS
Vía de señalización nuclear del RE	NS	NS	3,40	NS	NS	3,39	NS	NS	NS	NS
Respuesta celular al calor	NS	NS	NS	3,66	NS	NS	NS	4,74	NS	NS
Respuesta del retículo endoplásmico (RE) a las proteínas mal plegadas	NS	3,50	NS	NS	NS	4,38	5,12	6,81	NS	NS

El grupo de procesos que se encuentran depletados (Tabla 25) es considerablemente mayor que el de los enriquecidos. Sin embargo, los procesos depletados poseen una clara consistencia ya que se concentran fundamentalmente en aquellos relacionados a la progresión en el ciclo celular, la transcripción, la traducción citosólica, la traducción mitocondrial y la respiración mitocondrial.

Tabla 25. Análisis de los procesos biológicos GO mediante GSEA que se encuentran depletados en células HCT116 y BEAS-2B expuestas a Cu^{2+} 1400 μM y 800 μM respectivamente.

Proceso biológico GO	HCT116					BEAS-2B				
	Tiempo (h)					Tiempo (h)				
	2	4	6	12	18	2	4	6	12	18
Traducción mitocondrial	17	27	28	9,57	15,6	31	26,9	29,5	19,1	20,4
Iniciación de la traducción mitocondrial	17	23	25	7,95	12,6	30	26,5	28,2	16,9	15,6
Elongación de la traducción mitocondrial	16	22	24	7,29	11,8	27	25,3	27	16	15,6
Terminación de la traducción mitocondrial	15	19	21	6,13	10,3	30	25,3	27	14,2	12,9
Biogénesis del ribosoma	NS	8,3	19	5,86	8,91	6,7	9,07	12,5	6,97	7,04
Proceso metabólico de ARNt	NS	11	15	5,98	11,7	7,4	13,5	14,5	26,5	20,4
Procesamiento del ARNr	NS	8	15	NS	5,45	4,6	5,92	7,35	4,07	4,46

Proceso biológico GO	HCT116					BEAS-2B				
	Tiempo (h)					Tiempo (h)				
	2	4	6	12	18	2	4	6	12	18
Proceso metabólico del ARNr	NS	7,5	14	NS	5,71	4,5	5,26	6,77	4,12	4,48
Modificación del ARN	NS	10	13	6,15	11,2	5,4	7,55	12,3	21,7	17,7
Terminación translacional	9,3	9	13	NS	NS	29	35	35,2	NS	NS
Fase biológica	NS	10	13	5,82	13,9	16	22,1	26,6	31,7	35,6
Fase del ciclo celular y fase mitótica del ciclo celular	NS	10	12	5,97	14,4	17	22,8	27,9	33	35,6
Procesamiento de ARNt	NS	10	12	5,78	7,4	6,2	10	12,3	23	17
Elongación translacional	9	7,5	11	NS	3,04	28	34,1	32,6	3,21	NS
Cadena de transporte de electrones	6,6	7,5	9,4	3,12	5,77	22	12,3	16,6	8,81	11,3
Cadena de transporte de electrones respiratoria	6,6	7,1	9,3	3,03	5,75	22	12,8	17,2	8,72	11,2
Modificación de ARNt	NS	6,7	7,6	NS	5,86	3,7	4,78	5,6	14,2	10,3
Reparación por escisión de nucleótido	NS	6,2	7,5	NS	NS	6,6	7,28	7,22	11,4	9,42
Elongación de la hebra de ADN involucrada en la replicación del ADN	NS	5,3	7,4	NS	4,04	5	NS	4,59	6,72	8,1
Elongación de la hebra de ADN	NS	5,1	6,9	NS	4,44	5,3	NS	5,25	7,1	8,64
Hidrólisis del enlace fosfodiéster del ARN	NS	5	6,9	3,12	5,17	3,6	7,59	9,08	4,99	6,61
Acilación de proteínas	NS	3,3	6,3	5,86	7,35	NS	4,57	4,84	7,57	6,57
Iniciación de la replicación del ADN	NS	4,5	6,2	NS	4,96	NS	NS	NS	4,62	5,16
Acetilación de aminoácidos proteicos internos	NS	NS	6	5,05	6,91	NS	5,23	4,6	7,78	6,71
Segregación mitótica de cromátides hermanas	NS	5,9	6	3,43	9,16	4,6	8,08	9,21	12,7	13,1
Acetilación de la peptidil lisina	NS	NS	5,9	4,96	6,45	NS	4,49	4,15	7,19	6,65
Acetilación de histonas	NS	NS	5,9	5,49	7,43	NS	5,03	4,62	8,74	7,42
Segregación de cromátides hermanas	NS	6,3	5,8	3,66	9,3	4,4	7,12	8,83	12,3	13,2
Acetilación de proteínas	NS	NS	5,8	5,29	7,4	NS	4,47	4,37	6,91	5,71
Acetilación de peptidil lisina interna	NS	NS	5,4	4,79	6,43	NS	4,67	4,26	7,84	6,97
Síntesis de pseudouridina	NS	NS	4,9	NS	3,25	NS	NS	NS	4,29	3,69
Regulación de la segregación de	NS	4,1	4,6	4,08	7,86	NS	5,27	6,47	7,42	6,64

Proceso biológico GO	HCT116					BEAS-2B				
	Tiempo (h)					Tiempo (h)				
	2	4	6	12	18	2	4	6	12	18
los cromosomas										
Organización de la cromatina conteniendo CENP A y ensamblaje del nucleosoma conteniendo CENP A	NS	NS	4,1	NS	NS	3,2	4,63	4,91	4,54	3,6
Prometafase mitótica	NS	3,8	4,1	4,38	9,22	6,2	10,5	13,5	23,6	23,7
Regulación de la organización de los cromosomas	NS	3,4	4,1	3,66	5,7	NS	NS	4,75	9,07	8,41
Replicación del ADN nuclear	NS	NS	4	NS	4,78	4,3	4,57	4,64	4,81	7,14
Fase M y fase M mitótica	NS	4	3,9	NS	5,84	9,5	15,2	17,9	21,7	24,7
Replicación del ADN independiente del ensamblaje del nucleosoma y replicación del ADN independiente de la organización del nucleosoma	NS	3	3,9	NS	NS	4,3	5,93	6,33	5,37	3,96
Procesamiento del ARN 3' terminal	NS	NS	3,9	NS	NS	NS	4,04	4,39	NS	NS
Remodelado de la cromatina en el centrómero	NS	NS	3,8	NS	NS	NS	4,56	5,56	5,35	4,23
Anafase y anafase mitótica	NS	3,6	3,6	NS	4,65	9,7	15	14,4	16,3	18,1
Regulación de la segregación de cromátides hermanas	NS	5,1	3,4	3,22	6,82	NS	4,56	5,05	4,73	5,06
Fase S y fase S mitótica	NS	NS	3,3	NS	NS	5,7	7,31	8,15	8,27	10,3
Interfase	NS	NS	3,1	NS	NS	5,8	6,87	7,78	7,84	9,8
Checkpoint del huso	NS	3,8	NS	NS	3,52	3,3	5	5,47	5,32	5,44
Citoquinesis	NS	NS	NS	4,4	6,17	NS	NS	NS	7,02	6,79
Desarrollo embrionario en el útero	NS	NS	NS	4,16	5,84	NS	NS	NS	3,62	3,79
Establecimiento de la localización del huso mitótico	NS	NS	NS	NS	3,44	NS	NS	NS	4,24	6,18
Hidrólisis exonucleolítica del enlace fosfodiéster del ARN	NS	NS	NS	NS	3,85	NS	NS	4,94	NS	3,07
Importe de proteínas transmembrana intracelulares	NS	3	NS	NS	NS	NS	NS	NS	3,49	3,49
Mantenimiento del telómero	NS	NS	NS	NS	4,63	NS	NS	4,46	7,19	7,8
Organización del huso	NS	NS	NS	3,32	5,82	3	NS	5,87	10,4	12,2
Organización del huso mitótico	NS	NS	NS	NS	3,42	NS	NS	NS	3,93	4,75
Organización del telómero	NS	NS	NS	NS	4,69	NS	NS	4,15	6,77	7,32

Proceso biológico GO	HCT116					BEAS-2B				
	Tiempo (h)					Tiempo (h)				
	2	4	6	12	18	2	4	6	12	18
Poliubiquitinación de proteínas	NS	NS	NS	NS	3,13	NS	NS	NS	5,91	6,07
Recombinación mitótica	NS	NS	NS	NS	3,01	NS	NS	NS	6,45	7,21
Regulación de la actividad ligasa	NS	3,1	NS	NS	NS	4,3	6,34	5,49	3,31	4,86
Regulación de la actividad ligasa de la proteína ubiquitina	NS	3,6	NS	NS	3,75	NS	4,77	5,19	5,29	5,93
Regulación de la transición del ciclo celular metafase anafase	NS	3,4	NS	NS	3,99	NS	4,24	4,68	4,3	5,11
Regulación de los procesos basados en microtúbulos	NS	NS	NS	NS	4,22	NS	NS	NS	3,46	4,69
Regulación del proceso catabólico de proteínas proteasomal	NS	NS	NS	NS	6,43	NS	NS	NS	5,16	7,32
Regulación negativa de la organización de organelas	NS	NS	NS	NS	6,94	NS	NS	NS	6,28	7,14
Regulación negativa de la transición del ciclo celular metafase anafase	NS	3,1	NS	NS	NS	NS	4,34	4,73	4,08	4,69
Regulación positiva de la modificación de proteínas por la conjugación o remoción de proteínas pequeñas	NS	3,7	NS	NS	NS	NS	5,42	4,73	3,36	5,06
Transición del ciclo celular mitótico metafase anafase	NS	3,6	NS	NS	4,32	NS	4,63	5,09	4,68	5,53

3.4. Discusión

Los perfiles de transcripción en las células BEAS-2B y HCT116 expuestas a Cu^{2+} resultan muy similares, indicando que la respuesta celular frente a la sobrecarga del metal no difiere considerablemente, al menos entre estas células.

En principio, se observa una alteración en el perfil transcripcional que comienza dos horas luego de la exposición al Cu^{2+} y se incrementa consistentemente hasta alcanzar un *plateau* entre las 6 y las 12 horas. Esto es esperable ya que en aquel momento se inicia la muerte celular. Por otro lado, la cantidad de genes inducidos es mayor que aquellos cuya transcripción se inhibe (Fig. 58), sugiriendo que las células están remodelando su transcriptoma para enfrentar específicamente el estímulo estresante.

Es notable la marcada inducción de HSPs tanto en células HCT116 como en BEAS-2B. Es importante mencionar que no todos los genes pertenecientes a esta

familia son inducibles. Por ejemplo, HSPA8 es una chaperona no inducible constitutivamente expresada cuyo contenido puede ser superior al 1% de la proteína total de la célula (Stricher y col., 2013). Sin embargo, la fuerte inducción en numerosos genes que codifican HSP sugiere la existencia de alguna reacción que impacta sobre la homeostasis proteica.

Existe una clara inducción de la totalidad de los genes que se encuentran canónicamente bajo control transcripcional de HSF1. Este factor se encuentra constitutivamente inhibido por chaperonas HSP90 y HSP70 (Anckar y Sistonen, 2011). Frente a un incremento en la carga de proteínas incorrectamente plegadas en el citosol, como ocurre en el caso del estrés térmico, HSF1 es liberado de su inhibición y tiene lugar la transcripción de sus genes diana. Asimismo, la disminución observada en la expresión de HSF2 ha sido reportada durante el estrés térmico (Anton y col., 2009).

Es posible que las modificaciones oxidativas de las proteínas, como consecuencia del estrés oxidativo generado por la sobrecarga de iones Cu, promoviesen una respuesta de choque térmico y la inducción de HSPs. Sin embargo, estas células disponen de GSH para contrarrestar las modificaciones oxidativas, ya que la concentración de esta molécula no disminuye luego de la incubación con Cu^{2+} , y la NAC no fue efectiva en prevenir la muerte celular por la exposición al metal (Capítulo 2). Por lo tanto, la intensidad del estrés oxidativo generado por la sobrecarga de iones Cu podría no ser suficiente para repercutir directamente sobre la homeostasis proteica. Es posible entonces que la interacción del metal con proteínas ocurra independientemente del poder oxidante del $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{1+}$.

La respuesta frente a la carga incrementada de proteínas incorrectamente plegadas no se limita a la HSR ya que existe una robusta activación de la rama PERK de la UPR y la activación más moderada de ATF6 e IRE1 α . En principio, esta respuesta puede deberse a un estrés en el plegamiento proteico a nivel del retículo endoplásmico pero que no alcanza como para activar las tres ramas de la UPR. Respecto a los genes involucrados en la rama PERK de la UPR, es esperable que la transcripción del factor eIF2 α no se encuentre alterada. Sin embargo, la inducción de los genes DDIT3, DDIT4, ATF4, TRIB3, PPP1R15A y ERO1A ha

sido reportada extensamente luego de una sobrecarga de proteínas incorrectamente plegadas en el retículo endoplásmico.

Resulta interesante que dentro de los genes involucrados en la rama PERK de la UPR, únicamente la transcripción de ERO1A no se encuentre incrementada. La proteína ERO1A es necesaria para producir la hiperoxidación del retículo endoplásmico en situaciones de estrés (Seervi y col., 2013). Es posible que en el caso de los SV40MEFs, la marcada oxidación de la DCFH, dependiente de la síntesis de proteínas observada luego de la exposición al Cu^{2+} (Capítulo 2), se deba a la inducción de este gen.

Los SV40MEFs presentan un estrés basal del retículo endoplásmico, debido a la sobrecarga en la maquinaria involucrada en el plegamiento proteico en este compartimento, producto de la transformación con el virus SV40. Este virus, hace un pasaje por el retículo endoplásmico de la célula huésped durante su ciclo replicativo y da lugar una situación de estrés basal (Cho y col, 2013; Smith, 2014), que, sumada al estrés generado por el metal, conduciría a una UPR más intensa que en las células transformadas espontáneamente como HeLa, 3T9MEFs, BEAS-2B, Hepa1-6 y HCT116. De hecho, en las células 3T9MEFs, las cuales no están transformadas con el virus SV40, se observa un incremento en la velocidad de oxidación de la DCFH pero éste no es sensible a los inhibidores de la síntesis de proteínas (Capítulo 2).

En concordancia con el incremento en la carga de proteínas que requieren asistencia en el plegamiento, se observa un claro incremento en la síntesis de ubiquitina. Es razonable que exista un incremento en la síntesis de ubiquitina acompañando un aumento en la velocidad de degradación de las proteínas por medio del proteasoma. En paralelo, el incremento de LC3 y GABARAPL1 sugieren que parte de las proteínas dañadas son recicladas mediante el proceso de autofagia.

Los genes involucrados en la mtUPR no mostraron una inducción consistente. Esto era esperable de acuerdo con los resultados observados en el consumo de O_2 mitocondrial en ratas y en células J774A.1 expuestas a Cu^{2+}

(Capítulo 2). Por ello, resulta notable la selectividad del Cu en su mecanismo de acción tóxica ya que el efecto del mismo sobre la célula no es homogéneo.

En conjunto, las señales que dirigen los principales cambios en el transcriptoma parecen tener su origen fundamentalmente en el citosol y en menor medida en el retículo endoplásmico. Esto resulta coherente, ya que estos compartimentos marcan la ruta empleada por las células para eliminar el exceso de metal. El Cu ingresa al citosol como Cu^{1+} a través de Ctr1, donde es captado por ATOX1 para luego ser incorporado a la red *trans*-Golgi por medio de la ATP7A/B, donde finalmente es excretado de la célula. Naturalmente, el Cu es transportado por diversas chaperonas a distintos sitios donde se localizan proteínas específicas dependientes de Cu. Sin embargo, frente a la sobrecarga del metal, el esfuerzo de la célula debe concentrarse en mantener funcionando la ruta que permite la excreción del metal y, en consecuencia, se incrementan las fracciones libres de Cu en el compartimento citosólico, el retículo endoplásmico y la red *trans* Golgi. Entonces, es probable que en estos compartimentos tengan lugar las reacciones químicas que eventualmente producen la muerte de la célula.

Considerando la hipótesis generalizada según la cual las reacciones oxidativas impulsan la muerte celular por la sobrecarga de iones Cu, resulta llamativo que la transcripción de los genes involucrados en la degradación del H_2O_2 no se encuentra incrementada. De hecho, se observa una disminución moderada en la transcripción de genes aislados como GPX8 y GPX1 en células HCT116 y BEAS-2B y de PRDX6 y PRDX3 en BEAS-2B. Por lo tanto, no se observa un esfuerzo en estas células por redireccionar los flujos metabólicos con el objetivo de controlar la producción de especies oxidantes como el H_2O_2 .

Finalmente, el estudio de los procesos GO mediante la técnica de GSEA señaló numerosos procesos celulares afectados por la sobrecarga de iones Cu y remarcó que los procesos más consistentemente incrementados en células HCT116 y BEAS-2B son aquellos relacionados a la HSR y a la UPR. Si bien es posible evidenciar procesos activados adicionales, éstos no se encuentran consistentemente incrementados en ambas células por lo cual pueden constituir procesos de fondo que ocurren de manera colateral a la muerte celular.

Respecto a los procesos depletados, es notable la evidente disminución de los procesos relacionados a la progresión en el ciclo celular, la traducción y la función mitocondrial, tanto en células HCT116 como en BEAS-2B. Estos eventos se deben fundamentalmente al redireccionamiento de los flujos metabólicos hacia los procesos fundamentales para enfrentar el estímulo estresante. Es posible entonces que luego de que ocurran las reacciones químicas con las dianas moleculares tóxicas para la célula, producto del incremento de las fracciones libres de Cu, exista algún grado de programación que involucre un freno a los procesos que favorezcan la supervivencia de la célula.

En resumen, el transcriptoma de las células HCT116 y BEAS-2B indica la ausencia de una respuesta que intente disminuir la concentración intracelular de H_2O_2 . Adicionalmente, el empleo del GSH no parece crucial en la restauración de la homeostasis redox, como se observa en la falta de inducción de proteínas dependientes de GSH dedicadas a controlar el balance de especies oxidantes. En vista de que el GSH es una molécula endógena protectora, es posible que éste ejerza su rol protector independientemente de sus propiedades antioxidantes.

Es notable que el origen de la intensa respuesta celular para restaurar la homeostasis proteica coincida con los compartimentos involucrados en la vía de eflujo del metal. Considerando que la toxicidad de los iones Cu en células no se encuentra dirigida por las propiedades oxidantes del metal, sería posible que las altas concentraciones de Cu^{1+} libre en el citosol y el retículo endoplásmico den lugar a la interacción directa del metal con las proteínas, mientras que el GSH intervenga previniendo esta interacción independientemente de su grupo -SH.

Capítulo 4: Efecto protector del glutatión frente a la interacción entre el cobre y las proteínas

La exposición a Cu^{2+} incrementa la producción de especies oxidantes en el entorno intracelular (Capítulo 1 y 2). Sin embargo, el estrés oxidativo no parece ser la fuerza impulsora de la muerte celular (Capítulo 2). La intensa HSR y la menos intensa UPR, en ausencia de una respuesta antioxidante (Capítulo 3), sugieren una interacción directa entre los iones Cu y las proteínas. Adicionalmente, esta interacción debe ser independiente de la formación de puentes disulfuro en las proteínas (Capítulo 2).

De ocurrir la interacción directa entre las proteínas y los iones Cu, es posible que el GSH bloquee esta interacción, manteniendo la estructura y función enzimática, independientemente de sus funciones antioxidantes.

4.1. Formación de agregados de ovoalbúmina en presencia de Cu^{2+}

Para investigar la interacción directa del Cu con proteínas, se incubó ovoalbúmina $1,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ con diferentes concentraciones de Cu^{2+} (100, 200, 600 y $1000 \mu\text{M}$). La interacción fue evidenciada siguiendo la densidad óptica (D. O.) a 405 nm , longitud de onda correspondiente al máximo de absorción del producto de la formación de los agregados proteicos. Los agregados proteicos pueden formarse por la alteración de la estructura terciaria de las proteínas, con la exposición de regiones hidrófobas que interactúan entre sí. La incubación con Cu^{2+} produce la agregación de la ovoalbúmina a concentraciones de metal mayores a $600 \mu\text{M}$ (Fig. 59).

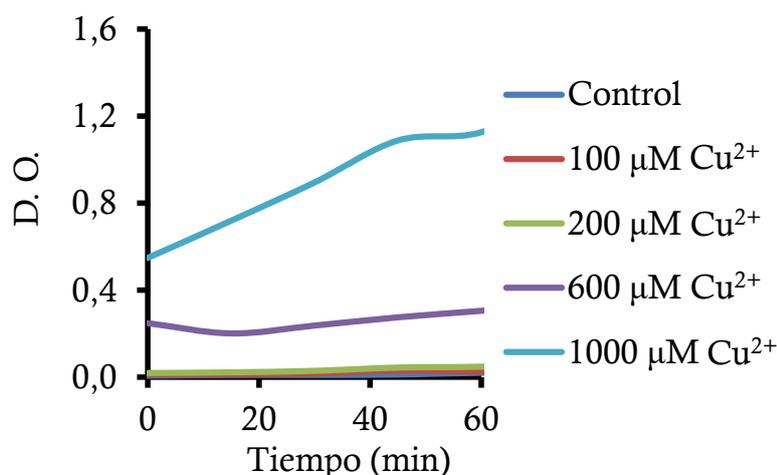


Figura 59. Cinética de la agregación de ovoalbúmina inducida por la incubación con diferentes concentraciones de Cu^{2+} , determinado mediante la D. O. medida a 405 nm .

Es importante destacar que la ovoalbúmina posee cuatro grupos –SH reducidos (Fothergill y Fothergill, 1970). Por lo cual, es posible que la capacidad del Cu^{2+} de oxidarse directamente a los grupos –SH pudiese llevar a la formación de multímeros, unidos covalentemente por puentes disulfuro.

4.2. Formación de agregados de seroalbúmina bovina en presencia de Cu^{2+}

El agregado de Cu^{2+} también induce la agregación de la BSA (Fig. 60), del mismo modo que la ovoalbúmina. Sin embargo, la BSA se distingue de la ovoalbúmina en que sólo posee un grupo –SH expuesto al solvente (Rombouts y col., 2015). Por lo cual, en caso de oxidarse el grupo –SH, esta proteína solo sería capaz de formar dímeros unidos covalentemente.

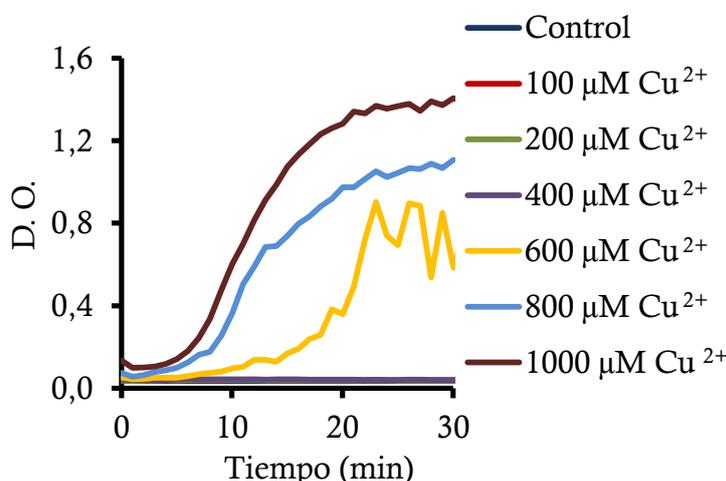


Figura 60. Cinética de la agregación de BSA inducida por la incubación con diferentes concentraciones de Cu^{2+} , determinado mediante la D. O. medida a 405 nm.

4.3. Efecto del Cu^{2+} sobre la formación de puentes disulfuro en proteínas

Para discernir si la agregación de la ovoalbúmina o la BSA se encuentra influenciada por la oxidación de grupos –SH presentes en las proteínas, se determinó la formación de multímeros unidos covalentemente, de mayor peso molecular que las proteínas monoméricas, producto de la incubación de ovoalbúmina o BSA con Cu^{2+} . Las determinaciones se realizaron en condiciones desnaturizantes no reductoras. La ovoalbúmina es una proteína de 45 kDa (Nisbet y col., 1981), mientras que la BSA tiene un peso de 66 kDa.

El agregado de Cu^{2+} no induce la formación de puentes disulfuro en la ovoalbúmina ni tampoco en la BSA (Fig. 61). Se observa que si bien la

ovoalbúmina muestra unas bandas de mayor peso molecular en el control, la intensidad de éstas no se vio incrementada por el agregado de Cu^{2+} .

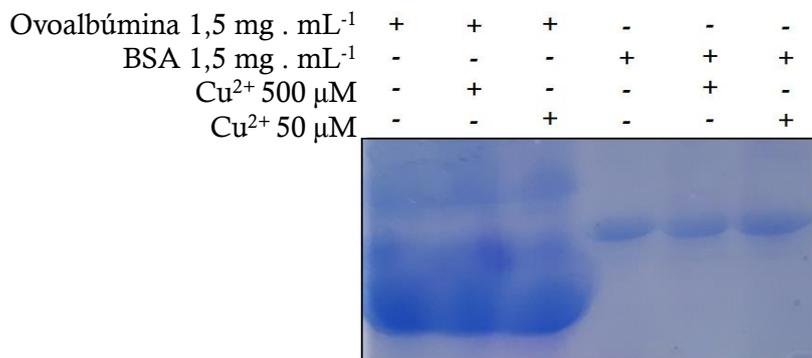


Figura 61. Formación de grupos $-\text{SH}$ por el agregado de Cu^{2+} en ovoalbúmina y BSA. La corrida electroforética fue revelada por tinción con *Coomassie Blue*.

4.4. Formación de agregados de seroalbúmina bovina por el agregado de metales con distinta configuración electrónica externa

Al emplear distintos metales en una concentración 800 μM , sólo el Cu^{2+} y el Zn^{2+} fueron capaces de promover la agregación de la BSA (Fig. 62). Notablemente, el Fe^{3+} no fue capaz de promover la formación de agregados.

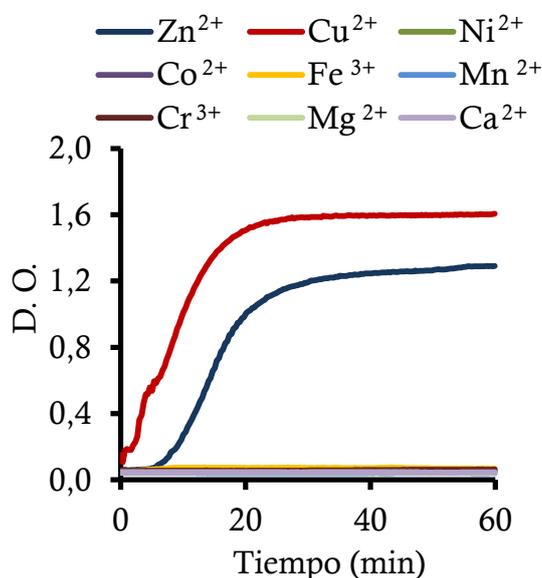


Figura 62. Cinética de la agregación de BSA inducida por la incubación con diferentes metales, determinada mediante la D. O. medida a 405 nm. Los metales se emplearon en una concentración 800 μM .

4.5. Efecto de la co-incubación de Cu^{2+} con Fe^{2+} o Zn^{2+} sobre la viabilidad celular

Para estudiar la relevancia de la interacción directa de los iones Cu con las proteínas en la muerte celular inducida por el metal, se analizó el efecto del agregado de Zn^{2+} o Fe^{2+} a células SV40MEFs expuestas a Cu^{2+} . En estos experimentos, no se observó un incremento en la muerte celular luego de la co-incubación con Fe^{2+} (Fig. 63A), siendo este ión metálico el que cataliza la reacción de Fenton. Sin embargo, la co-incubación con Zn^{2+} potenció drásticamente la muerte celular (Fig. 63B).

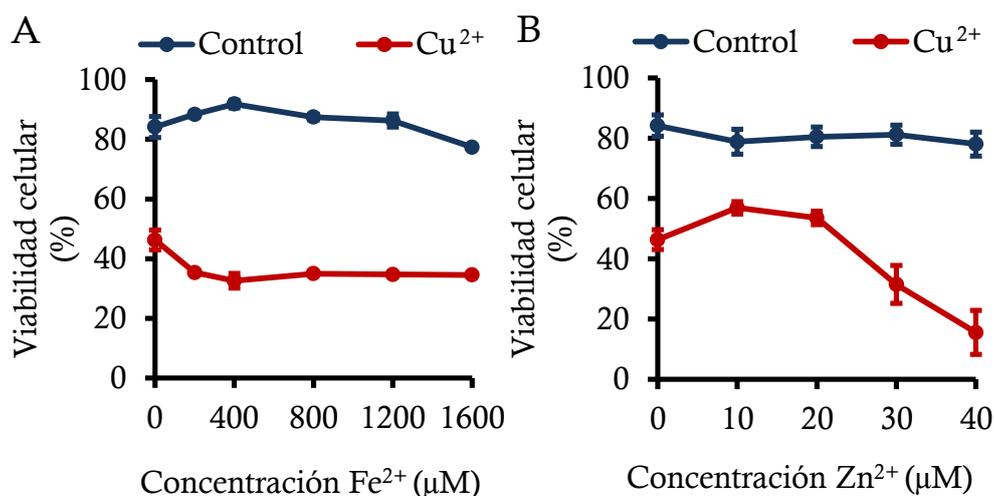


Figura 63. Efecto del agregado de los metales divalentes Fe^{2+} (A) y Zn^{2+} (B) sobre la viabilidad celular en células SV40MEFs expuestas a concentraciones tóxicas de Cu^{2+} . Las células fueron incubadas con Cu^{2+} es 800 μM .

4.6. Efecto protector del GSH frente a la interacción directa entre las proteínas y el cobre

En los estudios realizados *in vitro* se observó que el agregado de NAC o GSH a la BSA en ausencia de Cu^{2+} , no induce la agregación de la proteína. Cuando la BSA es incubada con GSH, previo al agregado de Cu^{2+} se previene completamente la agregación de la proteína inducida por el metal (Fig. 64). Resulta interesante que si bien la incubación de BSA con NAC no previene la agregación inducida por Cu^{2+} , ésta retrasa el inicio de la agregación de la proteína. Por otro lado, el GSH es capaz de prevenir también la agregación de la BSA inducida por Cu^{1+} , ya que el GSH sigue siendo protector cuando el Cu^{2+} es reducido previamente con NAC.

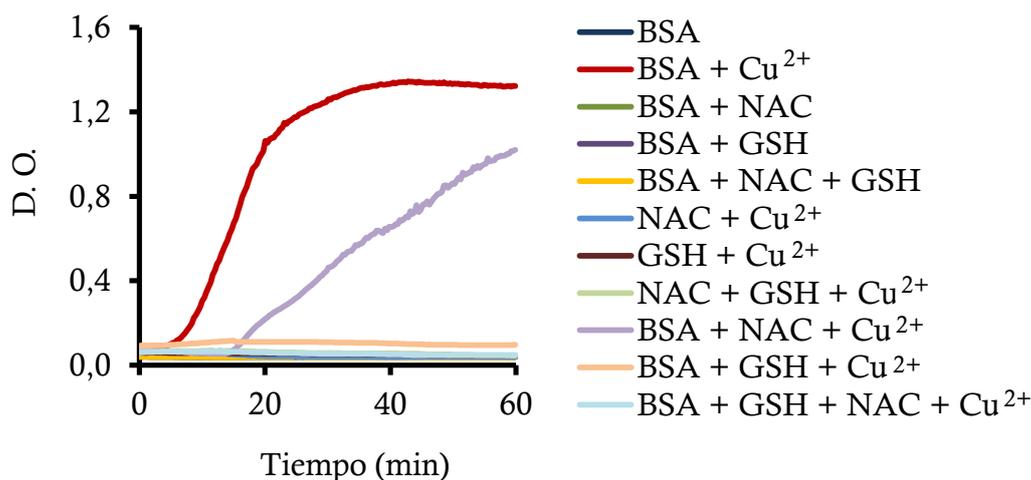


Figura 64. Efecto inhibitorio del GSH sobre la agregación proteica inducida por Cu^{2+} y Cu^{1+} , determinado mediante la D. O. medida a 405 nm. El Cu^{1+} fue obtenido mediante la reducción de Cu^{2+} con NAC. Las concentraciones de los reactivos empleados fueron las siguientes: BSA, $1,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; NAC, 2 mM; GSH, 2 mM y Cu^{2+} , $800 \mu\text{M}$. La BSA fue el último reactivo agregado en todos los casos.

4.7. Efecto protector del GSSG frente a la interacción directa entre las proteínas y el cobre

Resulta llamativo que la incubación de BSA con GSSG también previene completamente la agregación de la proteína inducida por Cu^{2+} (Fig. 65), del mismo modo que el GSH. Por otro lado, el GSSG sigue siendo capaz de prevenir la agregación de la BSA cuando el Cu^{2+} es previamente reducido a Cu^{1+} con NAC.

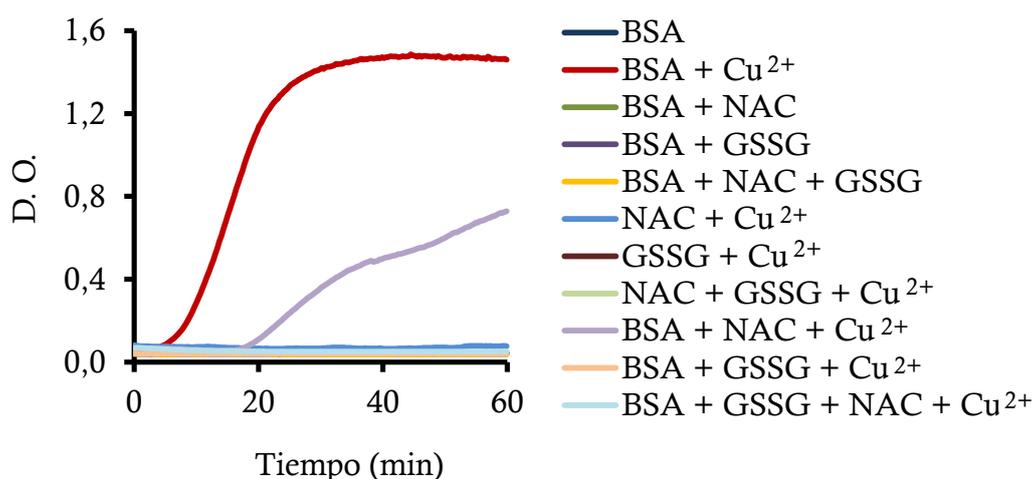


Figura 65. Efecto inhibitorio del GSSG sobre la agregación proteica inducida por Cu^{2+} y Cu^{1+} , determinado mediante la D. O. medida a 405 nm. El Cu^{1+} fue obtenido mediante la reducción de Cu^{2+} con NAC. Las concentraciones de los reactivos empleados fueron las siguientes: BSA, $1,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; NAC, 2 mM; GSSG, 2 mM y Cu^{2+} , $800 \mu\text{M}$. La BSA fue el último reactivo agregado en todos los casos.

4.8. Discusión

De acuerdo a la intensa respuesta de choque térmico observada en las células HCT116 y BEAS-2B (Capítulo 3), en ausencia de una respuesta antioxidante, era esperable observar una alteración de la proteostasis debido a la interacción directa entre los iones Cu y las proteínas.

La incubación de Cu^{2+} con ovoalbúmina produjo la agregación de la proteína de modo dependiente con la concentración de metal. Es importante destacar que la concentración de Cu necesaria para producir la agregación de esta proteína es considerablemente alta, ya que a concentraciones menores a $600\ \mu\text{M}$ no se observa un incremento en la D. O. medida (Fig. 59). Por otro lado, el agregado de Cu^{2+} a BSA también promovió la formación de agregados a concentraciones de Cu^{2+} mayores a $600\ \mu\text{M}$ (Fig. 60). Se cree que la agregación proteica se debe a la interacción entre residuos hidrófobos presentes en las proteínas, que normalmente se encuentran no expuestos al solvente o en el caso de células en medios hidrofílicos. Por ello, la interacción de la ovoalbúmina o la BSA con el Cu^{2+} debe inducir un cambio conformacional que permita la exposición de estos residuos y favorezca las interacciones entre proteínas.

Debido a que la ovoalbúmina posee cuatro grupos $-\text{SH}$ expuestos, podría darse la formación de multímeros de ovoalbúmina, unidos covalentemente por enlaces disulfuros. Sin embargo, se observó que la oxidación directa de los grupos $-\text{SH}$ por el Cu^{2+} no es relevante en el mecanismo de acción tóxica del metal (Capítulo 2). En este aspecto, la BSA resulta más adecuada para estudiar la interacción directa entre el metal y las proteínas ya que sólo posee un grupo $-\text{SH}$ expuesto y no comprometido en enlaces intramoleculares. Por lo cual, esta proteína solamente podría formar dímeros. No obstante, si bien los multímeros de ovoalbúmina son observables en el control, la incubación de Cu^{2+} , tanto con ovoalbúmina como con BSA, no incrementó la formación de multímeros unidos covalentemente (Fig. 61). Si bien la oxidación de grupos $-\text{SH}$ por el agregado de iones Cu^{2+} en solución fue observada previamente en NAC, Cys y GSH, los potenciales de reducción muy negativos de los grupos $-\text{SH}$ en estas moléculas pequeñas pueden diferir del potencial de reducción del grupo $-\text{SH}$ proteico. En

consecuencia, se continuó trabajando empleando BSA como modelo de agregación por la interacción directa entre el metal y la proteína.

Notablemente, al incubar la BSA con distintos metales con diferente configuración electrónica externa, sólo se observa la formación de agregados por la incubación con Cu^{2+} y con Zn^{2+} (Fig. 62). Un comportamiento similar ha sido observado en el caso de la γ D-Cristalina (Quintanar y col., 2016). Curiosamente, contrario a lo esperado, el Fe^{3+} no fue capaz de promover la agregación de la BSA.

Los iones Fe^{2+} catalizan la reacción de Fenton. Por ello, en el caso de que el estrés oxidativo mediado por la reacción entre el Cu^{1+} y el H_2O_2 estuviera dirigiendo la muerte celular por la sobrecarga de Cu, la co-incubación con Cu y Fe llevaría a la depleción de sistemas metabólicos comunes al mecanismo de acción tóxica de ambos metales, generando un efecto potenciador en la muerte celular. Sin embargo, el agregado de Fe^{3+} no mostró un incremento en la muerte celular en comparación con las células tratadas solamente con Cu^{2+} . Por otro lado, el Zn es un metal cuya toxicidad no está relacionada a la alteración de la homeostasis redox intracelular. Sin embargo, la co-incubación de Cu^{2+} con Zn^{2+} potenció drásticamente la muerte celular (Fig. 63). En base a esto, la muerte celular por sobrecarga de Cu parece deberse a la alteración de la proteostasis, lo cual explicaría la intensa respuesta de choque térmico observada en el Capítulo 3.

El Cu^{2+} es capaz de promover la agregación de la BSA. Sin embargo, como se describió en el Capítulo 2, debido a que las células mantenían el control de la homeostasis de los grupos $-\text{SH}$, la totalidad del Cu se encuentra en la forma reducida. En cualquier instancia, al ser reducido el Cu^{2+} con NAC, éste sigue siendo capaz de inducir la agregación de la proteína. Sin embargo, es evidente que la NAC retrasa el inicio de la agregación. Si bien es posible que la NAC coordine los iones Cu, esta unión debe ser débil ya que en las células, la NAC no incrementó la viabilidad luego de la exposición al Cu^{2+} (Fig. 55). Por lo tanto, el tiempo *lag* o de retraso en la agregación de la BSA parece deberse a la reducción del Cu^{2+} a Cu^{1+} , ya que la forma reducida del metal presenta características menos polarizantes que la forma oxidada y por ende una menor tendencia a ser coordinada por ligandos en la estructura de las proteínas.

Es remarcable que el GSH fue capaz de prevenir completamente la agregación de la BSA inducida por el Cu^{2+} . Como el Cu^{2+} es reducido por el grupo $-\text{SH}$ del GSH, el Cu^{1+} formado podría en principio ser complejado e inactivado por el exceso de GSH o por el GSSG. Por otro lado, el GSH es capaz de coordinar el Cu^{1+} y prevenir la agregación de la BSA, como se observa por la previa reducción del metal por el agregado de NAC (Fig. 66).

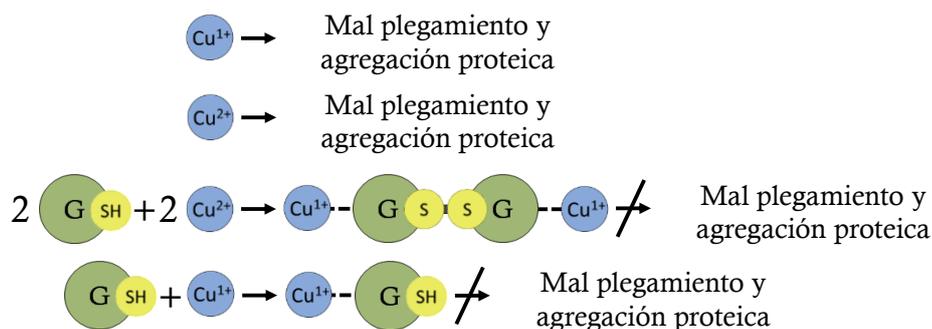


Figura 66. Efecto protector del GSH frente a la agregación de proteínas por el Cu^{2+} o el Cu^{1+} .

El GSSG, por su parte, también fue capaz de prevenir completamente la agregación de la BSA por el Cu^{2+} . Esto resulta notorio, ya que al estar comprometido el grupo $-\text{SH}$ en el puente disulfuro del GSSG, los ligandos involucrados en la coordinación del Cu^{2+} deben ser distintos a este grupo funcional (Fig. 67). Finalmente, el GSSG también fue capaz de prevenir la agregación de BSA por Cu^{1+} , como puede observarse cuando el metal es reducido previamente con NAC. En conjunto, estas observaciones indican que el GSH es capaz de inactivar el metal y prevenir la interacción con proteínas, independientemente del grupo $-\text{SH}$ (Fig. 67).

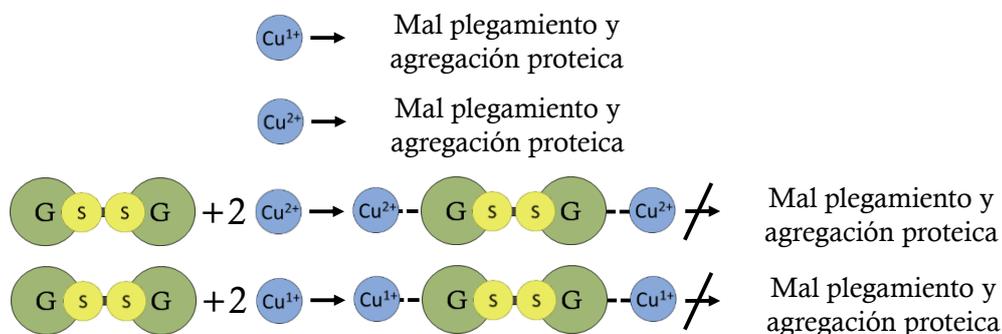


Figura 67. Efecto protector del GSSG frente a la agregación de proteínas por el Cu^{2+} o el Cu^{1+} .

En resumen, la alteración de la proteostasis parece ser la fuerza impulsora de la muerte celular en la sobrecarga de Cu. Por otro lado, el GSH es una molécula endógena clave en la protección frente a los iones Cu que es capaz de inactivar al Cu^{1+} , independientemente de sus propiedades antioxidantes.

Capítulo 5: Rol de la apoptosis en la muerte celular inducida por sobrecarga de cobre

Tanto el estrés oxidativo como el estrés térmico pueden producir la muerte celular apoptótica o necrótica, dependiendo la intensidad del estímulo. Ambos estímulos convergen en la activación de JNK (del inglés *c-jun N-terminal kinase*) y ésta ha sido reportada como inductora de la apoptosis en ciertos modelos experimentales (Chen y Tan, 2000; Tabas y Ron, 2011).

Para estudiar el rol de la apoptosis y la participación de la quinasa JNK en la muerte celular inducida por Cu^{2+} se emplearon distintas líneas celulares incubadas con Cu^{2+} en una concentración cercana a la DL_{50} durante distintos tiempos.

5.1. Fosforilación de JNK en células incubadas con concentraciones tóxicas de cobre

JNK es una quinasa que se activa por fosforilación frente a numerosos estímulos estresantes. Luego de la incubación con Cu^{2+} , se observó un incremento en la fosforilación de JNK que ocurre antes de las 4 horas, de manera ubicua en todas las células estudiadas (Fig. 68). La máxima fosforilación parece alcanzarse entre las 8 y las 12 horas, lo cual es coherente con el inicio de la muerte celular.

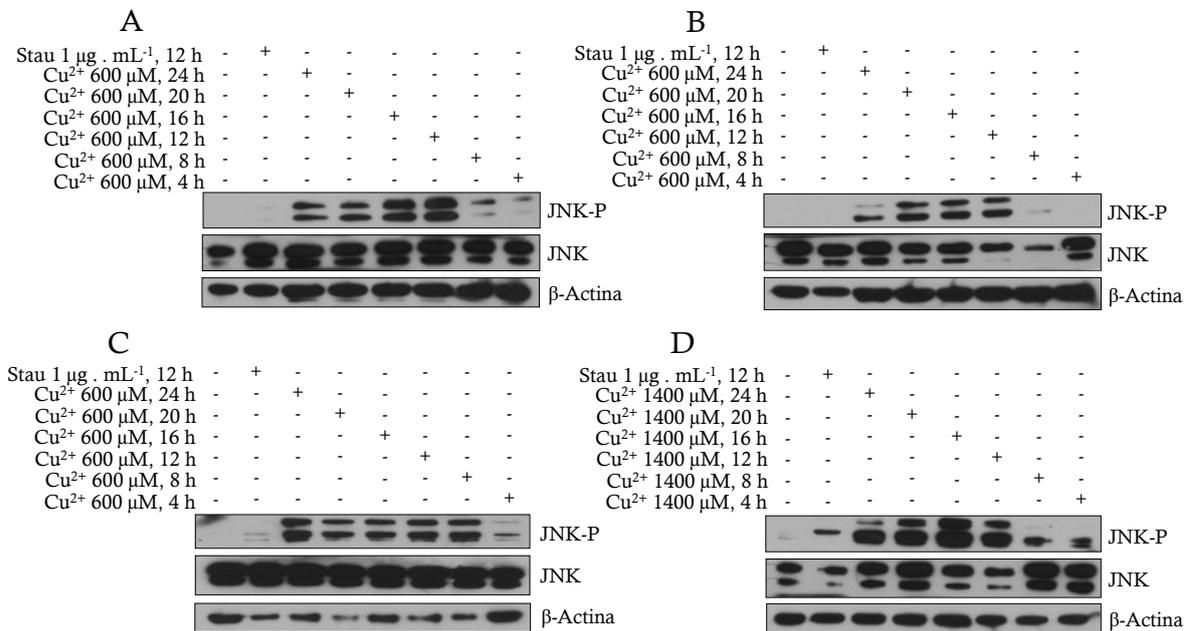


Figura 68. Immunoblots para la fosforilación de JNK en células (A) SV40MEFs, (B) HeLa, (C) Hepa1-6 y (D) HCT116 luego de la exposición a Cu^{2+} .

5.2. Fosforilación de MKK7 y MKK4 en células incubadas con concentraciones tóxicas de cobre

La proteína JNK puede ser fosforilada y activada por numerosas quinasas. La activación de JNK mediada por MKK7 y MKK4 puede responder a una activación de la quinasa ASK1. Ésta última es una quinasa responsable de iniciar la cascada apoptótica frente a una sobrecarga de especies oxidantes. Por esto, se estudió la activación de MKK7 y MKK4 en células SV40MEFs y en células HeLa.

Luego de la incubación de las células con Cu^{2+} , se observó claramente un incremento en la fosforilación de MKK7 y MKK4 conjuntamente con la fosforilación de JNK (Fig. 69).

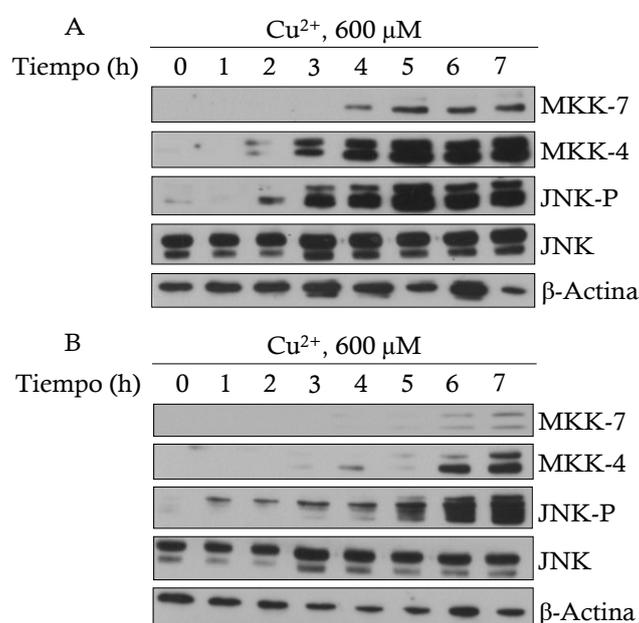


Figura 69. *Immunoblots* para la fosforilación de JNK, MKK7 y MKK4 en células (A) SV40MEFs y (B) HeLa, luego de la exposición a Cu^{2+} .

5.3. Efecto de la quinasa JNK sobre la viabilidad celular en células 3T9MEFs expuestas a concentraciones tóxicas de cobre

La quinasa JNK posee múltiples funciones, incluyendo tanto apoptóticas como anti-apoptóticas. Para estudiar el papel de esta enzima en la toxicidad del Cu se compararon las curvas de muerte de células 3T9MEFs doble *knockout* para JNK1 y JNK2 (DKO JNK1/2) y 3T9MEFs *wild type*, expuestas a Cu^{2+} . Sin embargo, no se observaron diferencias en la sensibilidad al Cu^{2+} entre las células 3T9MEFs^{DKO JNK1/2} y las células 3T9MEFs^{wt} (Fig. 70).

Vale remarcar que la concentración de Cu^{2+} necesaria para producir la muerte de las células 3T9MEFs^{wt} no difiere considerablemente de las células SV40MEFs.

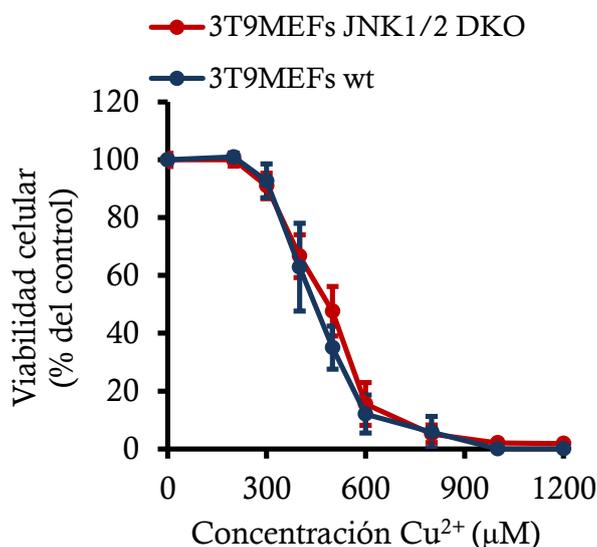


Figura 70. Viabilidad celular en células 3T9MEFs^{wt} y 3T9MEFs^{DKO JNK1/2} expuestas a Cu^{2+} por 24 horas.

5.4. Parámetros apoptóticos en células SV40MEFs expuestas a concentraciones tóxicas de cobre

A pesar de ser la muerte celular independiente de JNK, la exposición al Cu^{2+} en SV40MEFs produce el clivaje de la caspasa 3 (Fig. 71A). También es evidente el clivaje de PARP (Fig. 71A), uno de los blancos de la actividad enzimática de la caspasa 3. De acuerdo con esto, también se observa una actividad aumentada de caspasa 3 determinada como actividad DEVDasa (Fig. 71B).

El ensayo de anexina-V/7-AAD muestra una población de células doble positivas para anexina-V y 7-AAD y una población de células positivas únicamente para anexina-V (Fig. 71C- D).

Al microscopio, las células SV40MEF controles se observan extendidas sobre la placa de cultivo y poseen un núcleo claro con pequeñas partes oscuras (Fig. 71E). Sin embargo, la morfología de las células SV40MEFs, incubadas con Cu^{2+} por 24 horas, no se asemeja a la clásica morfología apoptótica, ya que no se observa la formación de *blebs* (Fig. 71F). De hecho, es evidente la retracción del citosol y perturbaciones en la membrana. También puede observarse en algunas células la

hinchazón en ciertas zonas de la membrana formando burbujas que protruyen al medio extracelular y en algunos casos quedan sueltas sobre la placa de cultivo.

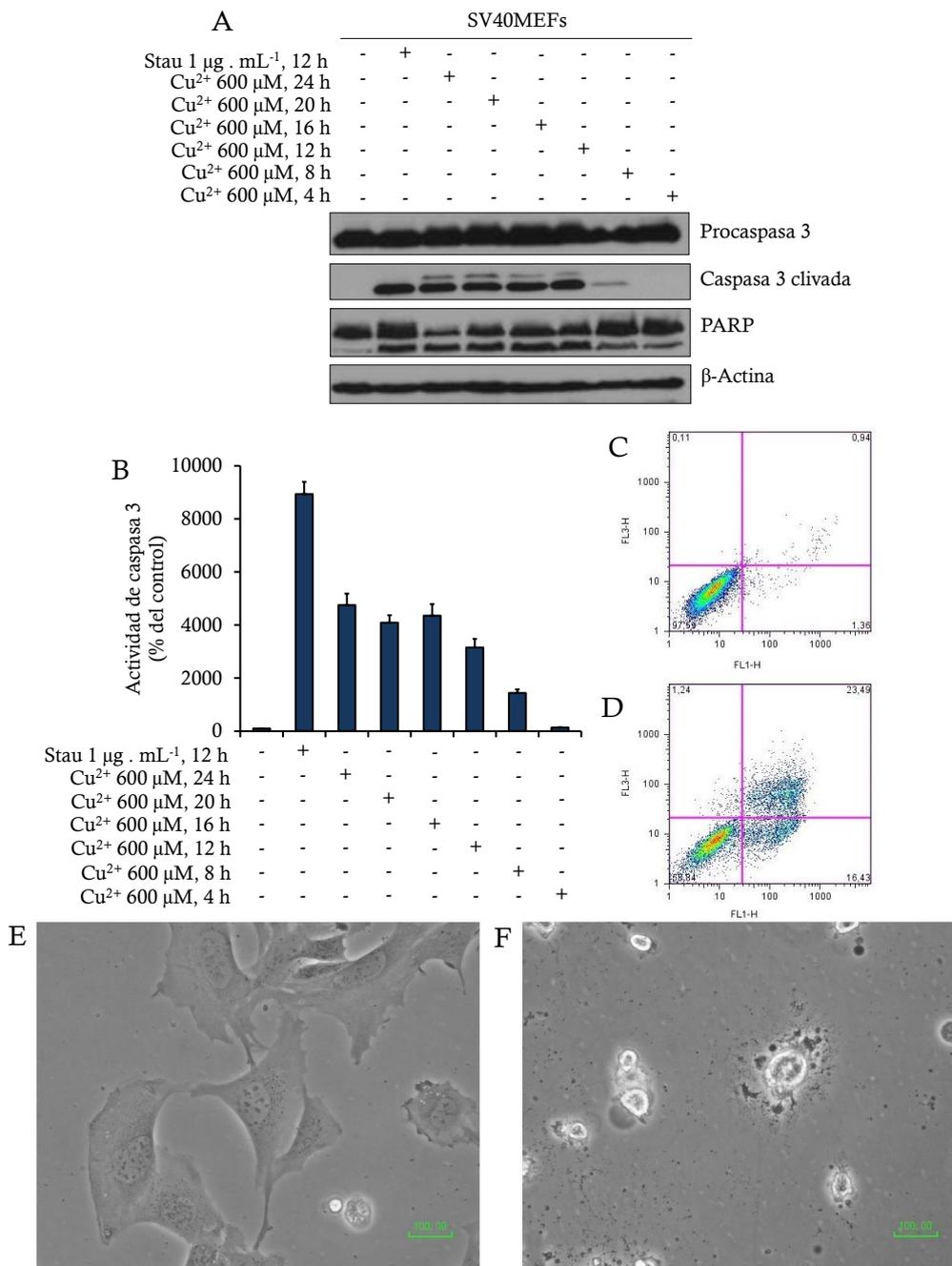


Figura 71. (A) *Inmunoblot* para caspasa 3 clivada, procaspasa 3, PARP y β -Actina en células SV40MEFs incubadas con Cu^{2+} . (B) Actividad DEVDasa en células SV40MEFs incubadas con Cu^{2+} . Stau fue empleada como control positivo de apoptosis. Los grupos correspondientes a la exposición a Stau y al Cu^{2+} a partir de las 8 h presentaron un aumento de la actividad de caspasa 3 con $p < 0,001$. (C) Ensayo de Anexina-V/7-AAD en células SV40MEFs controles y (D) incubadas con Cu^{2+} 600 μM por 24 horas. Microscopía óptica (400x) de (E) células SV40MEFs controles y (F) incubadas con Cu^{2+} 600 μM por 24 horas.

5.5. Efecto de las proteínas Bax y Bak sobre la viabilidad celular en células SV40MEFs expuestas a concentraciones tóxicas de cobre

Bax y Bak son dos proteínas pro-apoptóticas, involucradas en numerosas formas de muerte celular apoptótica. Sin embargo, éstas no parecen ser un factor determinante en la muerte celular ya que al comparar las curvas de viabilidad de una cepa de células SV40MEFs^{wt} y células SV40MEFs^{Bax/Bak DKO} incubadas con Cu²⁺ por 24 horas, no se observaron cambios. Vale destacar que si bien no se observa un incremento significativo en la viabilidad de las células SV40MEFs^{Bax/Bak DKO}, en todos los experimentos individuales éstas demostraron ser ligeramente más resistentes que las células SV40MEFs^{wt} (Fig. 72).

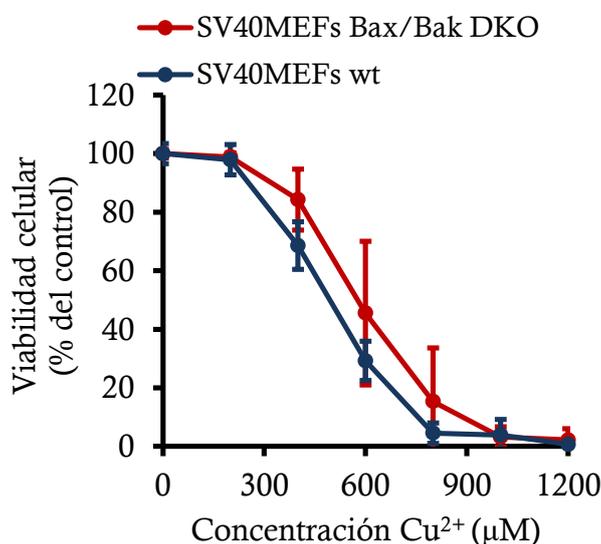


Figura 72. Viabilidad celular en células SV40MEFs^{wt} y SV40MEFs^{Bax/Bak DKO}, expuestas a Cu²⁺ por 24 horas.

5.6. Efecto de las caspasas sobre la viabilidad celular en células SV40MEFs expuestas a concentraciones tóxicas de cobre

Para determinar si la activación de caspasas en SV40MEFs es la fuerza impulsora de la muerte celular, estas células fueron incubadas con Cu²⁺ en presencia de zVAD.fmk, un inhibidor de la actividad de caspasas. Al finalizar la incubación se determinó la actividad de caspasa 3 en el lisado celular. El agregado de zVAD.fmk, previo a la exposición al metal, inhibe la actividad de caspasa 3 en células SV40MEFs (Fig. 73A). La incubación con zVAD.fmk también fue capaz de prevenir el clivaje de la caspasa 3 inducido por el Cu²⁺ en estas células (Fig 73B).

Al determinar la viabilidad en células SV40MEFs mediante anexina-V/7-AAD, luego del agregado de zVAD.fmk, se observa que la población de células apoptóticas disminuye considerablemente (Fig. 73C). Sin embargo, sólo se observa un pequeño incremento en la viabilidad en estas células.

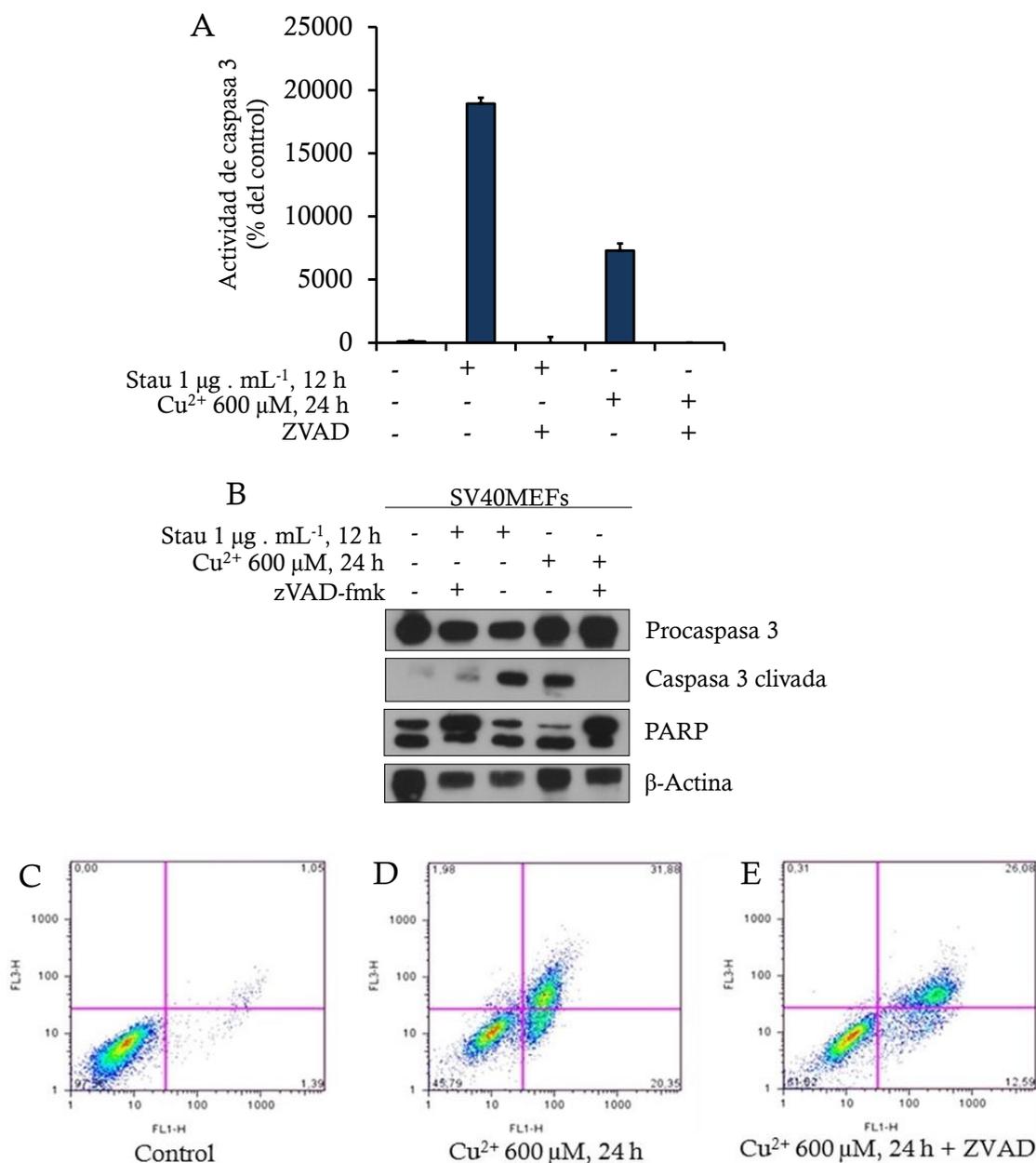


Figura 73. (A) Efecto del agregado de zVAD.fmk sobre la actividad de caspasa 3 en células SV40MEFs incubadas con Cu²⁺. Los grupos correspondientes a la exposición a Stau y al Cu²⁺ presentaron un aumento de la actividad de caspasa 3 con $p < 0,001$ mientras que las células tratadas con zVAD.fmk no presentaron diferencias respecto al control. (B) Efecto del agregado de zVAD.fmk sobre el clivaje de caspasa 3 en células SV40MEFs incubadas con Cu²⁺. (C) Población de células apoptóticas estudiado por citometría de flujo empleando las sondas anexina-V/7-AAD como marcadores de apoptosis y necrosis respectivamente.

5.7. Parámetros apoptóticos en células HeLa expuestas a concentraciones tóxicas de cobre

El *immunoblot* en células HeLa tratadas con Stau muestra el clivaje de caspasa 3, el clivaje de PARP s (Fig. 74A) y un incremento en la actividad de caspasas (Fig. 74B). Curiosamente, en el *immunoblot* de estas células incubadas con Cu^{2+} , se observa una banda correspondiente a la porción clivada de la caspasa 3. Sin embargo, el peso molecular de esta banda es superior al peso molecular de la caspasa 3 clivada como puede observarse en el tratamiento con Stau. Por lo cual, éste corresponde a un clivaje atípico. Respecto a PARP, se observan unas bandas de baja intensidad de peso molecular inferior a PARP que podría corresponder a PARP clivado. No obstante, es posible que esto se deba a una señal artefactual, ya que en las células controles también se observa una banda de baja intensidad. Tampoco se observa actividad de caspasa 3 por parte de las células HeLa luego de la incubación con Cu^{2+} .

Resulta llamativo que en células HeLa incubadas con Cu^{2+} , el ensayo de anexina-V/7-AAD muestra una población de células doble positivas para anexina-V y 7-AAD y una población de células positivas únicamente para anexina-V, a pesar de no haberse observado actividad de caspasa 3 (Fig. 74C-D).

Las células HeLa controles muestran un citoplasma oscuro y un núcleo claro con pequeñas partes oscuras (Fig. 74E), mientras que la exposición a Cu^{2+} en células HeLa produce un encogimiento y oscurecimiento del núcleo (Fig. 74F). Resulta muy evidente la formación de protrusiones en la membrana de color oscuro. También se observa que estas burbujas pueden separarse de la membrana y quedar sueltas sobre la placa de cultivo mientras que el cuerpo de la célula sigue manteniéndose firmemente adherido. No se observan células con evidente morfología apoptótica.

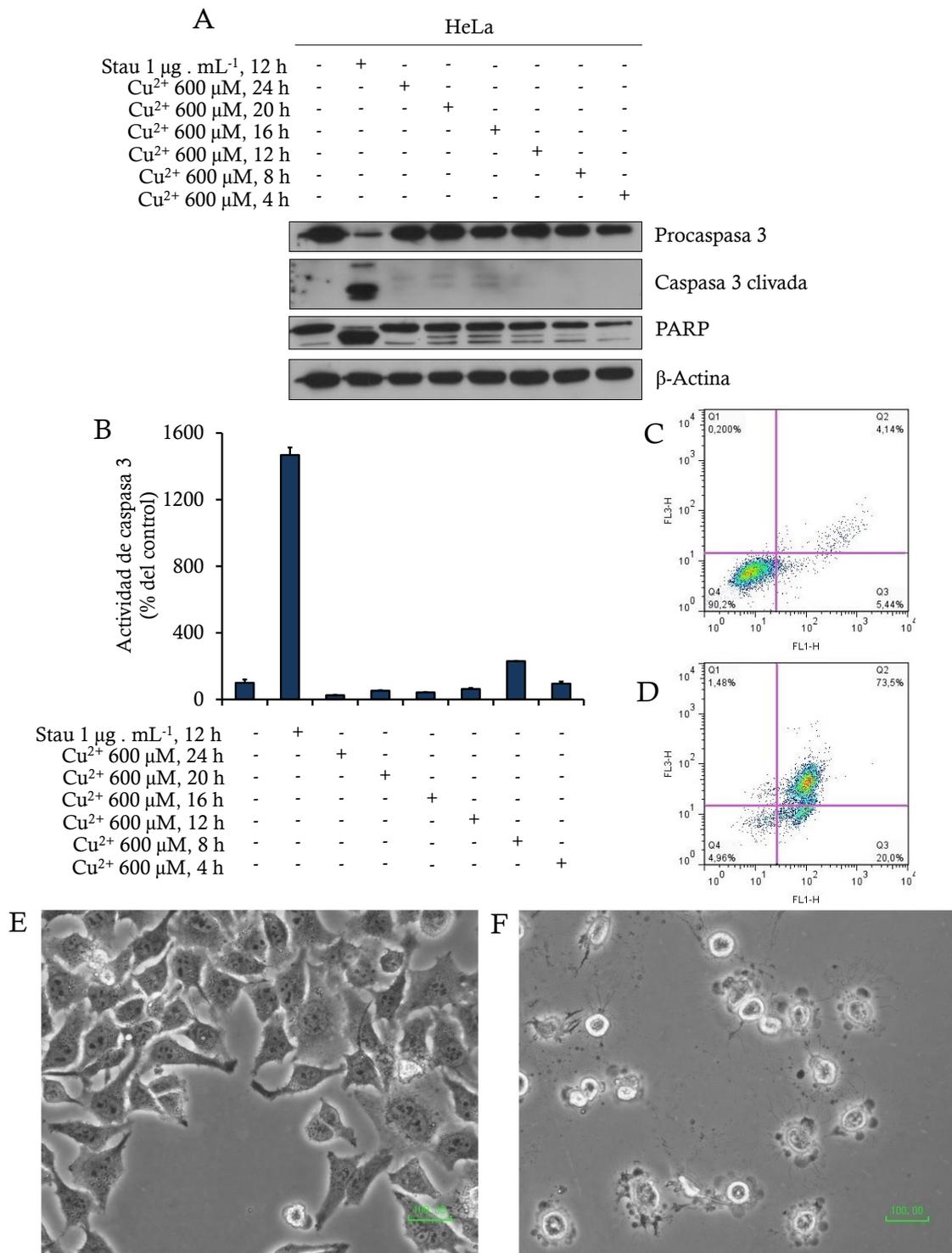


Figura 74. (A) *Inmunoblot* para caspasa 3 clivada, procaspasa 3, PARP y β -Actina en células HeLa incubadas con Cu^{2+} . (B) Actividad DEVDasa, en células HeLa incubadas con Cu^{2+} . La Stau fue empleada como control positivo de apoptosis. El grupo correspondiente a la exposición a Stau presentó un aumento de la actividad de caspasa 3 con $p < 0,001$. Ensayo de Anexina-V/7-AAD en (C) células HeLa controles y (D) incubadas con Cu^{2+} 600 μM por 24 horas. Microscopía óptica (400x) de (E) células HeLa controles y (F) incubadas con Cu^{2+} 600 μM por 24 horas.

5.8. Parámetros apoptóticos en células BEAS-2B expuestas a concentraciones tóxicas de cobre

El *immunoblot* en células BEAS-2B tratadas con Stau muestra el clivaje de caspasa 3, el clivaje de PARP (Fig. 75A) y un incremento en la actividad de caspasas (Fig 75B). Sin embargo, las células expuestas a Cu^{2+} no muestran clivaje de caspasa 3 (Fig. 75A) ni tampoco actividad de caspasa 3 (Fig 75C).

Curiosamente, si bien no se observa clivaje de PARP, la concentración de esta proteína parece disminuir por la exposición de las células BEAS-2B a la concentración tóxica de Cu^{2+} . También se observó una disminución en la transcripción tanto de PARP-1 como de PARP-2 en los experimentos con micromatrices de ADN realizados en el Capítulo 3 con éstas células.

El ensayo de anexina-V/7-AAD en células BEAS-2B incubadas con Cu^{2+} muestra una población de células doble positivas para anexina-V y 7-AAD, sin embargo no se observa una población de células positivas únicamente para anexina-V (Fig 75D-E)

Las células BEAS-2B control se observan extendidas sobre la placa de cultivo ocupando una gran superficie (Fig 75F). Los núcleos de estas células son de color claro con pequeñas partes de color oscuro. En la microscopía de células BEAS-2B expuestas a Cu^{2+} se observa la formación de núcleos picnóticos, compactos y de color oscuro (Fig. 75G). Resulta evidente la retracción del citosol y las perturbaciones en la membrana. También se observa la formación de evaginaciones en la membrana que forman burbujas con un contenido oscuro. En algunos casos las burbujas se separan de la membrana y quedan sueltas sobre la placa de cultivo. También se observan perturbaciones en la membrana y retracción del citosol. Las células BEAS-2B muertas no se mantienen adheridas a la membrana.

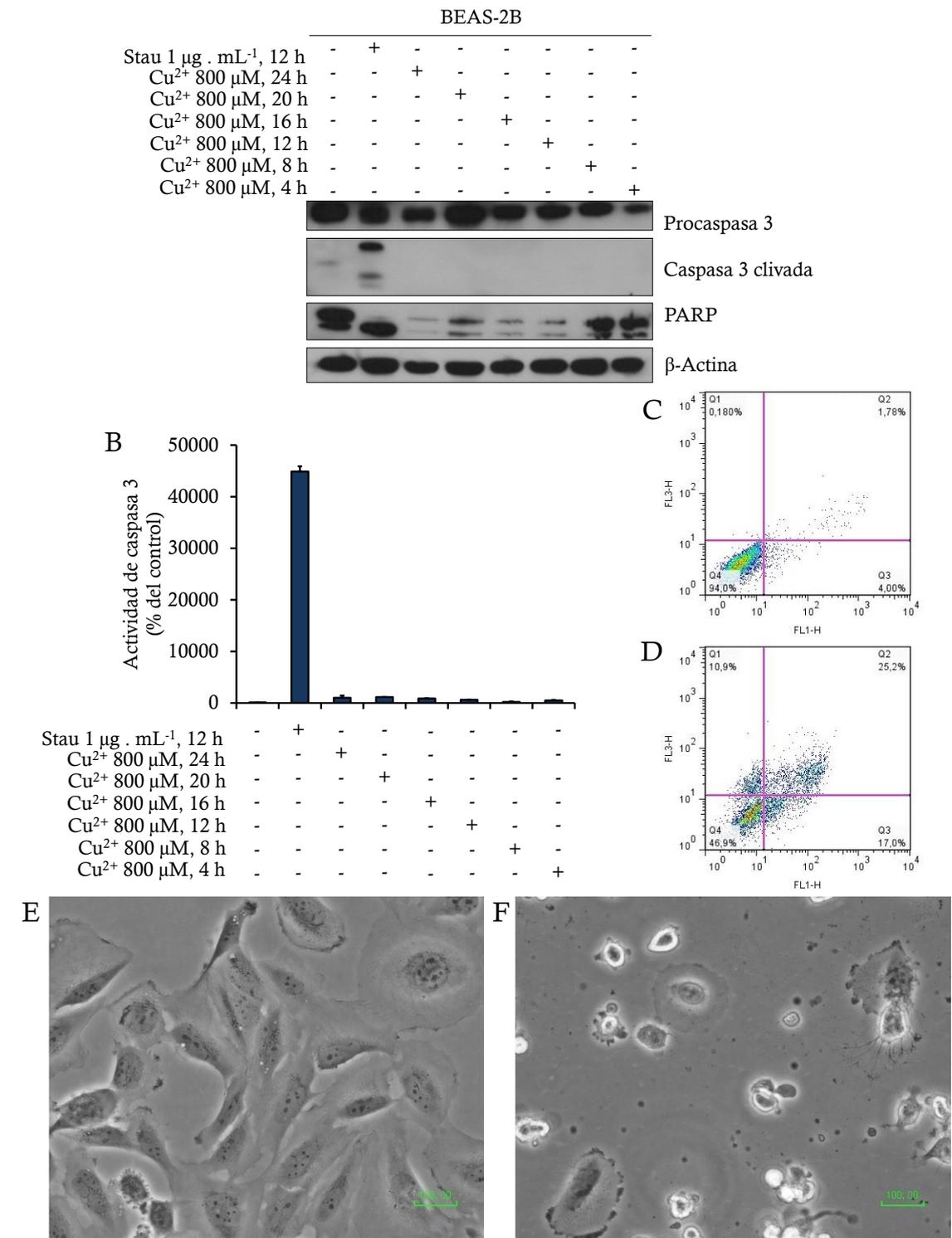


Figura 75. (A) *Inmunoblot* para caspasa 3 clivada, procaspasa 3, PARP y β -Actina en células BEAS-2B incubadas con Cu^{2+} . (B) Actividad DEVDasa, en células BEAS-2B incubadas con Cu^{2+} . La Stau fue empleada como control positivo de apoptosis. El grupo correspondiente a la exposición a Stau presentó un aumento de la actividad de caspasa 3 con $p < 0,001$. Ensayo de Anexina-V/7-AAD en células BEAS-2B controles (C) e incubadas con Cu^{2+} 800 μM por 24 horas (D). Microscopía óptica (400x) de (E) células BEAS-2B controles y (F) incubadas con Cu^{2+} 800 μM por 24 horas.

5.9. Parámetros apoptóticos en células Hepa1-6 expuestas a concentraciones tóxicas de cobre

El *immunoblot* en células Hepa1-6 incubadas con Cu^{2+} muestra ausencia de clivaje de caspasa 3 y PARP (Fig 76A). En el ensayo de Anexina-V/7-AAD para las células tratadas parece observarse una población de células apoptóticas tempranas y una población de células apoptóticas tardías/necróticas (Fig 76B-C). Morfológicamente, las células Hepa1-6 controles se observan aplanadas, mono o multinucleadas, con núcleos de color claro con pequeñas zonas oscuras (Fig 76D). Luego de la incubación con Cu^{2+} , estas células se vuelven redondeadas y el núcleo deja de ser visible (Fig 76E). Se observan pequeñas burbujas con contenido oscuro sueltas sobre la placa en las células Hepa1-6 incubadas con Cu^{2+} . Sin embargo, esto también ocurre en las células control.

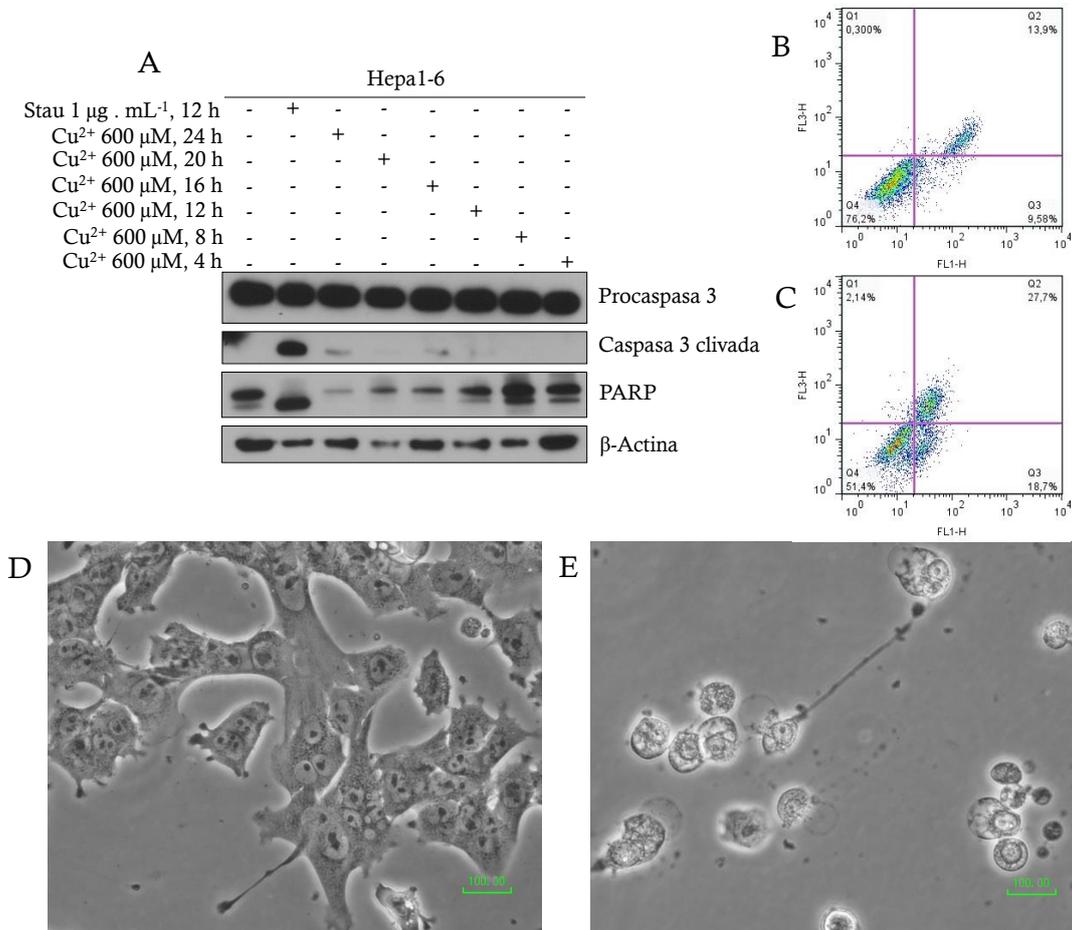


Figura 76. (A) *Immunoblot* para caspasa 3 clivada, procaspasa 3, PARP y β -Actina en células Hepa1-6 incubadas con Cu^{2+} . La Stau fue empleada como control positivo de apoptosis. Ensayo de Anexina-V/7-AAD en (B) células Hepa1-6 controles y (C) incubadas con Cu^{2+} 600 μM por 24 horas. Microscopía óptica (400x) de (D) células Hepa1-6 controles y (E) incubadas con Cu^{2+} 600 μM por 24 horas.

5.10. Parámetros apoptóticos en células HCT116 expuestas a concentraciones tóxicas de cobre

El *immunoblot* en células HCT116 tratadas con Stau muestra el clivaje de caspasa 3, el clivaje de PARP (Fig. 77A) y un incremento en la actividad de caspasas (Fig. 77B). En las células HCT116 tampoco se observó el clivaje de caspasa 3, ni tampoco el clivaje de PARP (Fig. 77A). La incubación de estas células con Cu^{2+} no produjo la activación de caspasas, lo cual coincide con la ausencia de clivaje de caspasa 3 (Fig. 77B).

El ensayo de anexina-V/7-AAD en células HCT116 incubadas con Cu^{2+} muestra una población de células doble positivas para anexina-V y 7-AAD, sin embargo no se observa una población de células positivas únicamente para anexina-V (Fig 77C-D).

Según la microscopía de las células HCT116 control, éstas ocupan una superficie menor sobre la placa de cultivo que las células SV40MEFs, HeLa y BEAS-2B, pero poseen a su vez una mayor altura. En las células HCT116 puede observarse claramente la presencia de un solo núcleo de color claro con pequeñas partes de color oscuro (Fig. 77E). Al ser incubadas con Cu^{2+} las células HCT116 muestran una morfología redondeada y éstas pierden su adherencia a la placa de cultivo (Fig. 77F). A diferencia de las células BEAS-2B y HeLa, no resulta evidente la presencia de evaginaciones de la membrana de color oscuro. No se observaron tampoco células con morfología apoptótica.

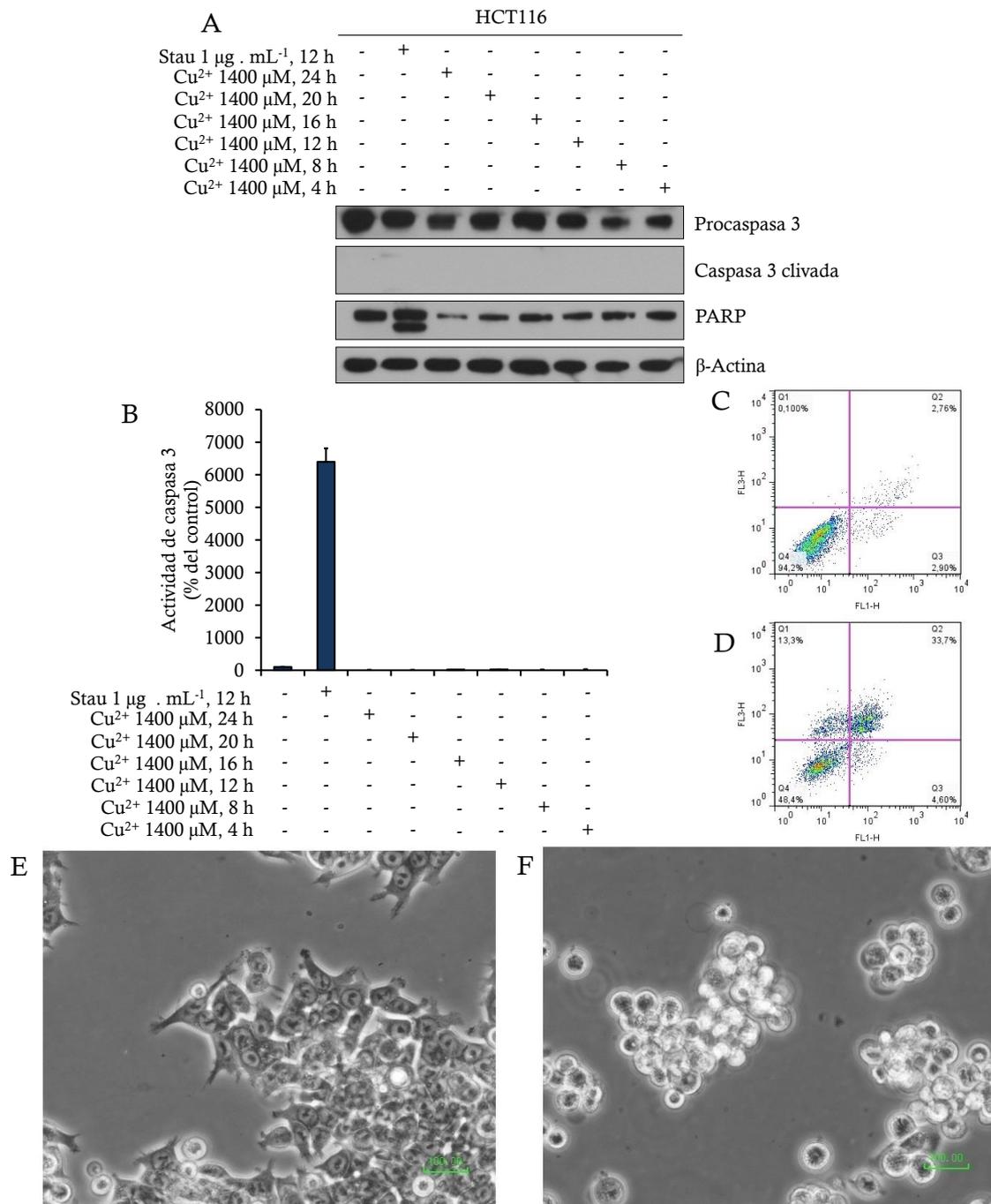


Figura 77. (A) *Inmunoblot* para caspasa 3 clivada, procaspasa 3, PARP y β -Actina en células HCT116 incubadas con Cu^{2+} . (B) Actividad DEVDasa, en células HCT116 incubadas con Cu^{2+} . La Stau fue empleada como control positivo de apoptosis. El grupo correspondiente a la exposición a Stau presentó un aumento de la actividad de caspasa 3 con $p < 0,001$. Ensayo de Anexina-V/7-AAD en (C) células HCT116 controles y (D) incubadas con Cu^{2+} 1400 μM por 24 horas. Microscopía óptica (400x) de (E) células HCT116 controles y (F) incubadas con Cu^{2+} 1400 μM por 24 horas.

5.11. Efecto de la exposición a distintas concentraciones de cobre sobre la morfología de hepatocitos murinos primarios

Las células empleadas para el estudio de la activación de caspasas corresponden a líneas celulares estables y es posible que como consecuencia de la transformación, alguna vía de señalización relacionada con la muerte inducida por la exposición al Cu^{2+} se viera afectada. Para descartar un resultado artefactual a causa de trabajar con líneas celulares, se estudió la inducción de la apoptosis en un cultivo primario de hepatocitos murinos.

Los hepatocitos controles existen como células mononucleadas, binucleadas o tetranucleadas. Los núcleos se observan de un color claro, conteniendo pequeñas zonas oscuras (Fig. 78A). El citoplasma de estas células posee un color gris claro y se observa la presencia de gránulos más oscuros. Luego de exponer los hepatocitos por 24 horas a distintas concentraciones de Cu^{2+} se observan alteraciones morfológicas en las células dependientes de la concentración de metal (Fig 78B-F). Al incubar las células con una concentración de Cu^{2+} de 300 μM comienza a observarse picnosis, detectable por la condensación de los núcleos en una masa oscura y compacta rodeada de un halo blanco. A concentraciones de Cu^{2+} mayores a 400 μM los núcleos picnóticos son evidentes en la gran mayoría de las células y también se observa una intensa granulación del citoplasma, la acentuación del color negro en los gránulos citoplasmáticos y la aparición de gránulos blancos, probablemente debido a la acumulación del lípidos. Si bien, en algunas células comienza a observarse degradación de la cromatina, la mayoría de las células mantiene los núcleos picnóticos incluso frente a las concentraciones más elevadas de Cu^{2+} .

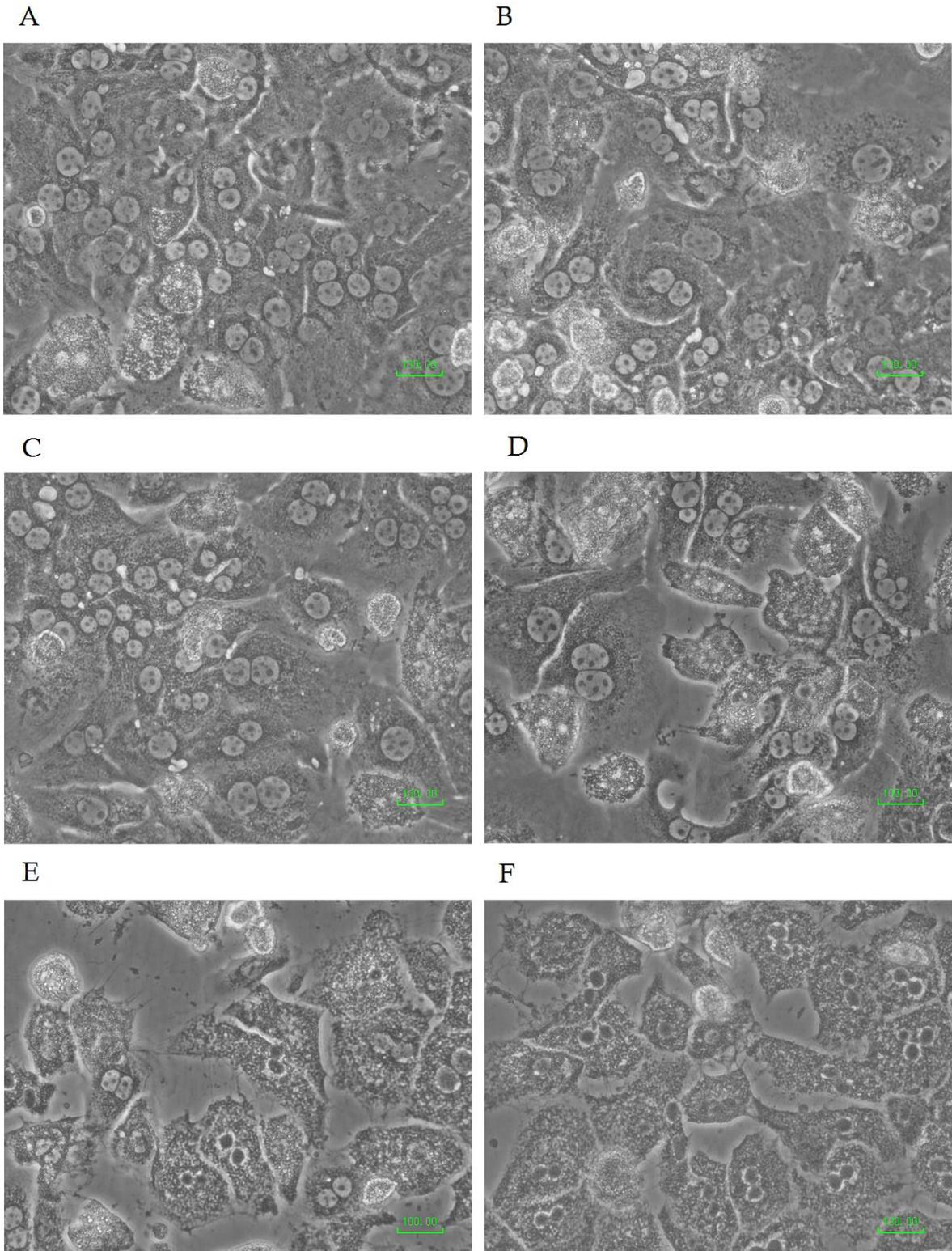


Figura 78. Morfología en hepatocitos murinos primarios (A) controles y expuestos por 24 horas a Cu^{2+} (B) 100 μM , (C) 200 μM , (D) 300 μM , (E) 400 μM , (F) 500 μM , determinada por microscopía óptica (400x).

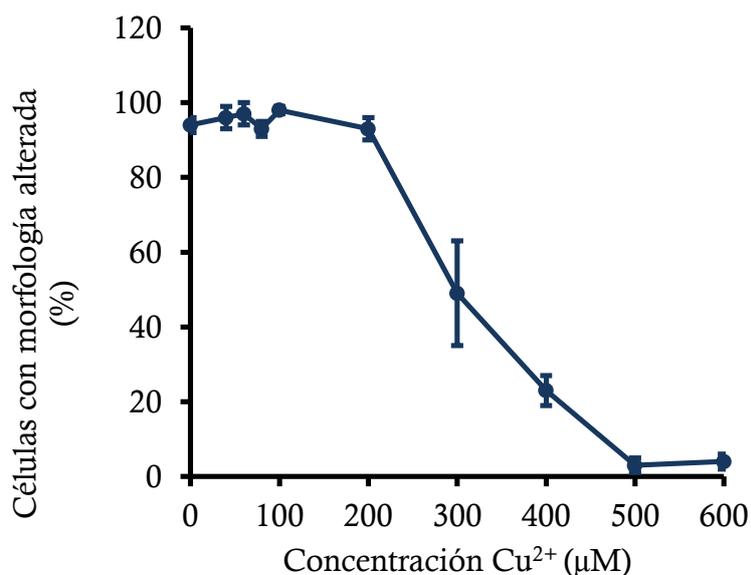


Figura 79. Hepatocitos con morfología alterada determinada por microscopía óptica.

5.12. Efecto de la sobrecarga de cobre sobre la viabilidad celular de hepatocitos murinos primarios

La viabilidad celular en el cultivo primario de hepatocitos se determinó por microscopía de fluorescencia, empleando IP como sonda. El IP es una sonda fluorescente que no puede atravesar la membrana plasmática en células vivas. Luego de la muerte celular, la membrana se permeabiliza y el IP puede ingresar e intercalarse en la doble hélice de ADN. Por lo cual, las células que presenten fluorescencia nuclear luego del agregado de IP corresponden a células muertas. Se empleó esta técnica para determinar la viabilidad celular en los hepatocitos primarios ya que estas células crecen embebidas en una matriz de colágeno. Por ese motivo se encuentran firmemente adheridas a la matriz y resulta difícil despegarlas sin dañarlas para obtener una suspensión y realizar la determinación por citometría de flujo.

En paralelo a los cambios morfológicos se observa una disminución en la viabilidad celular (Fig. 80). La concentración de Cu²⁺ necesaria para producir la muerte de los hepatocitos murinos primarios es moderadamente inferior a la concentración necesaria para producir la muerte en la mayoría líneas celulares estudiadas previamente. Sin embargo, estas células no son considerablemente más sensibles al Cu²⁺ que las células HeLa.

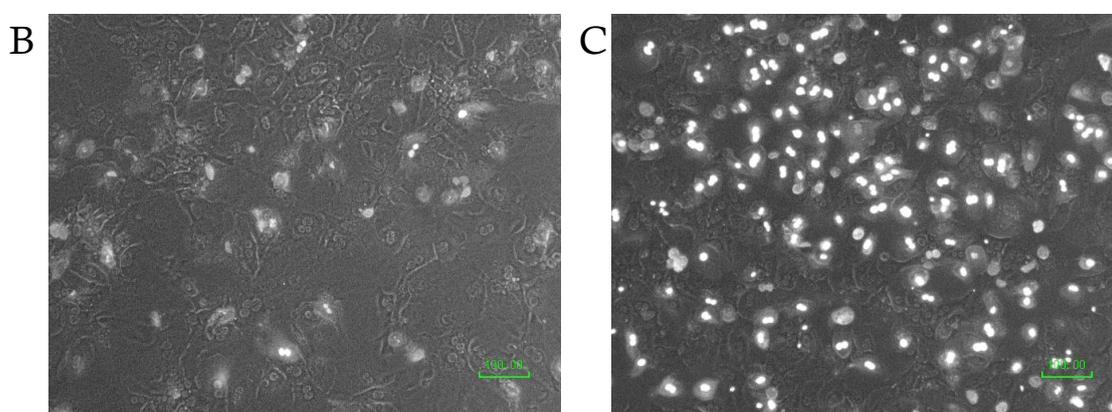
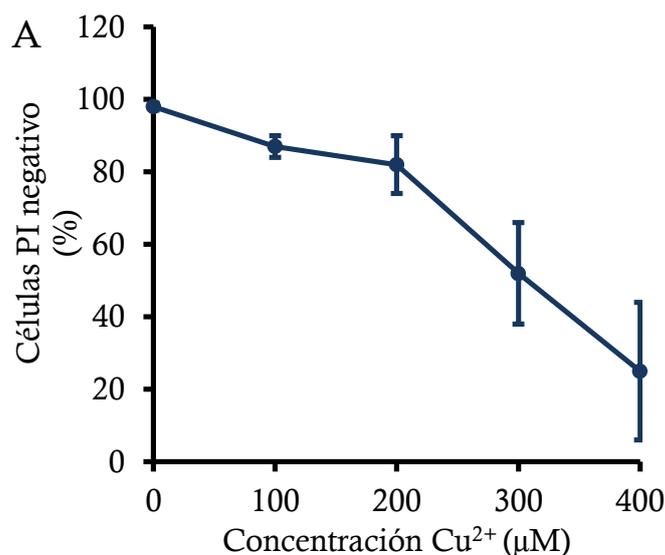


Figura 80. (A) Viabilidad celular en hepatocitos luego de una exposición de 24 horas a Cu^{2+} determinada por exclusión de IP. En el panel inferior se muestra a modo de ejemplo la microscopía (100X) de los hepatocitos incubados con IP (B) control y (C) tratados con Cu^{2+} 300 μM durante 24 horas.

5.13. Parámetros apoptóticos en hepatocitos murinos primarios expuestos a concentraciones tóxicas de cobre

Al igual que en la mayoría de las líneas celulares estudiadas, la exposición al Cu^{2+} no produce en hepatocitos el clivaje de caspasa 3 (Fig. 81A). Tampoco se observa un incremento en la actividad de caspasa 3 en hepatocitos (Fig. 81B).

La fosforilación de la histona H2AX (del inglés *H2A histone family member X*) ocurre luego de una ruptura de la doble cadena de ADN (Kuo y Yang, 2008). Este proceso ocurre también durante la apoptosis debido a la degradación del ADN en fragmentos de longitud regular. Sin embargo, al no haber actividad de caspasa 3, no se observa fosforilación de H2AX en hepatocitos expuestos a Cu^{2+} (Fig. 81C).

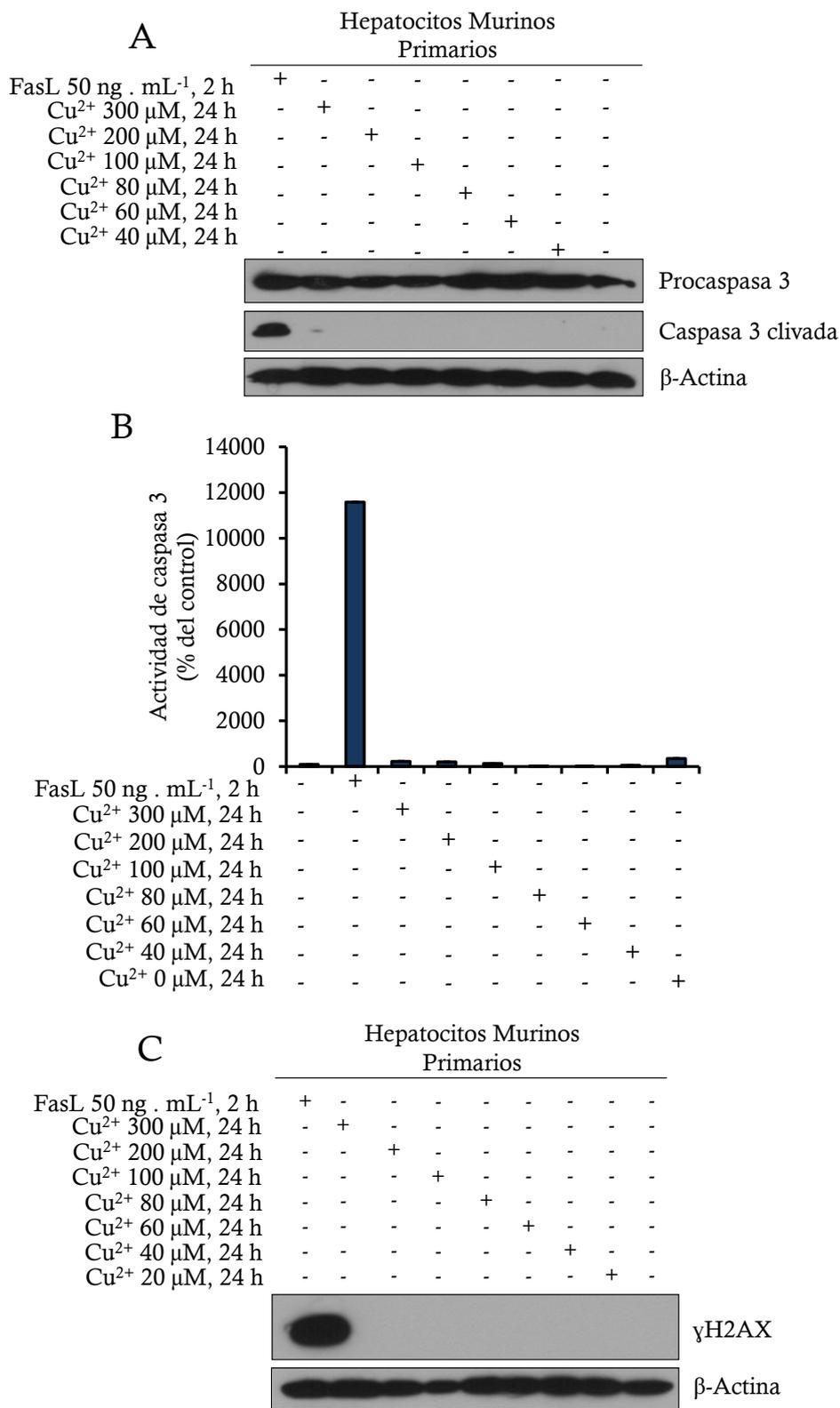


Figura 81. (A) *Immunoblot* para procaspasa 3, caspasa 3 clivada y β-Actina en hepatocitos murinos primarios incubados con Cu²⁺. (B) Actividad de caspasa 3 en hepatocitos luego de ser incubados con Cu²⁺ por 24 horas. El grupo correspondiente a la exposición a Stau presentó un aumento de la actividad de caspasa 3 con p<0,001. (C) Fosforilación de H2AX en hepatocitos incubados con Cu²⁺ por 24 horas. FasL fue empleado como control positivo para apoptosis.

5.14. Comparación entre la morfología apoptótica clásica y la morfología en hepatocitos murinos primarios expuestos a concentraciones tóxicas de cobre

La morfología de los hepatocitos incubados por 24 horas con Cu^{2+} 300 μM difiere claramente de la clásica morfología apoptótica observada luego de una incubación con FasL (del inglés *Fas ligand*), donde resulta evidente la formación de *blebs* apoptóticos (Fig. 82).

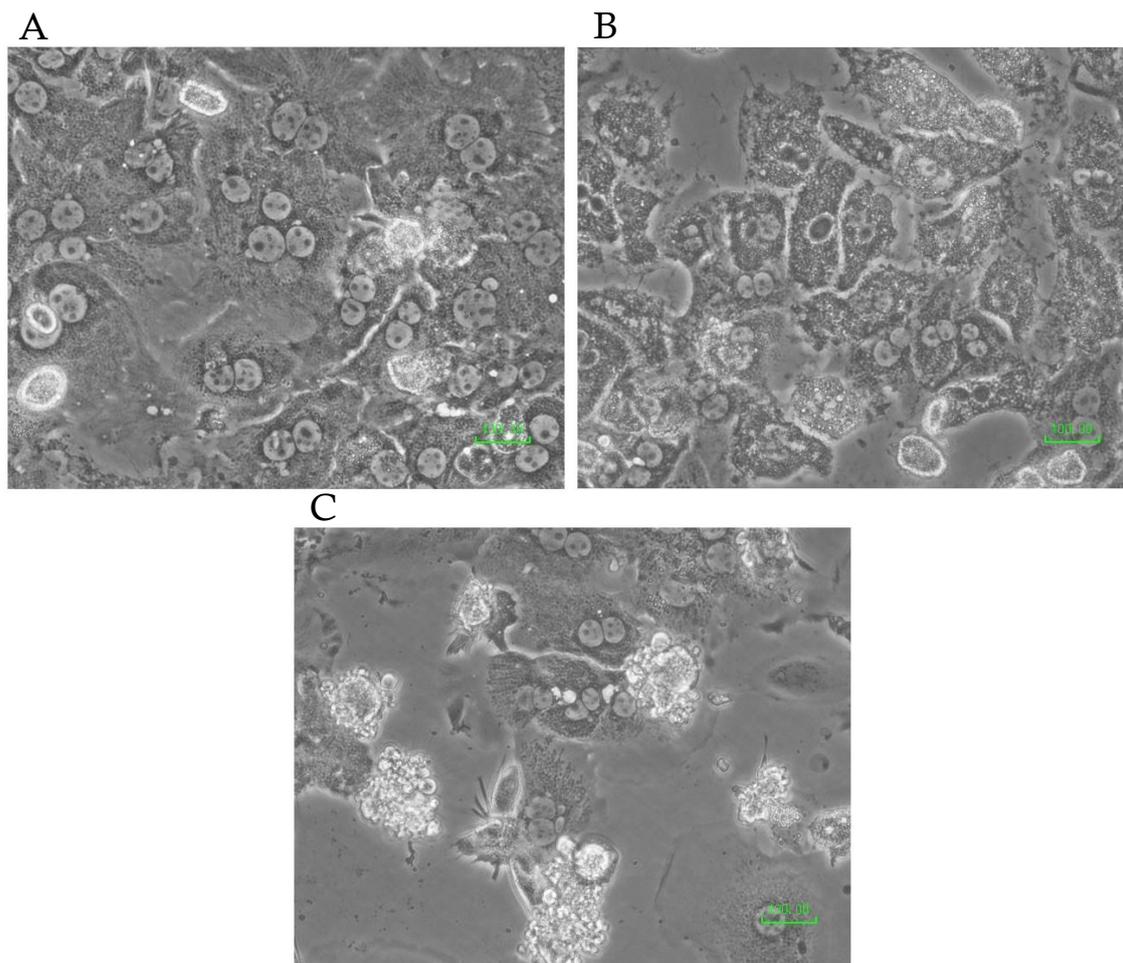


Figura 82. Microscopía óptica (400x) de hepatocitos murinos primarios. Se observan (A) células control, (B) células expuestas a Cu^{2+} 300 μM , 24 h y (C) células expuestas a FasL 50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 2 h. FasL fue empleado como control positivo para apoptosis.

5.15. Discusión

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que puede ser inducida por distintos estímulos tanto extrínsecos como intrínsecos. Este tipo característico de muerte celular ha sido observado en distintos modelos de enfermedad de Wilson y de sobrecarga de Cu^{2+} . Sin embargo, no existe un

consenso respecto al mecanismo por el cual puede iniciarse la muerte celular apoptótica en estas células ni tampoco está claro cuan determinante es la presencia de parámetros apoptóticos en la muerte inducida por el metal.

La proteína JNK es una quinasa que se activa frente a un amplio repertorio de estresores citotóxicos como el choque térmico, los rayos X, la radiación UV, el choque osmótico, citoquinas proinflamatorias (Xia y col., 1995; Kyriakis y Avruch, 1996; Ichijo, 1999; Hatai y col., 2000) y el H_2O_2 (Saitoh y col., 1998). Adicionalmente, la quinasa JNK ha sido señalada como una proteína capaz de inducir la muerte celular apoptótica dependiente de caspasa 9 y caspasa 3 e independiente de caspasa 8 (Hatai y col., 2000).

Efectivamente, la fosforilación de JNK se observó en todas las células estudiadas luego de la incubación con Cu^{2+} (Fig. 68). Adicionalmente, se observó la fosforilación de MKK7 y MKK4 (Fig. 69), las cuales son capaces de fosforilar JNK.

Debido a la capacidad del H_2O_2 de activar JNK se ha establecido en la literatura una conexión entre el estrés oxidativo y la muerte celular apoptótica corriente regulada por esta quinasa. Vale mencionar que esta conjetura, ampliamente difundida en la literatura, requiere extender las características fisicoquímicas del H_2O_2 a otras especies oxidantes que puedan encontrarse incrementadas en los numerosos modelos de citotoxicidad, lo que regularmente se hace desde un punto de vista termodinámico sin tomar en cuenta las limitaciones cinéticas, compartimentalización y concentraciones en estado estacionario de las especies oxidantes debido a la formación de gradientes intracelulares. En este aspecto, la presencia de enzimas capaces de disminuir drásticamente la energía de activación de reacciones específicas puede dar lugar a reacciones adicionales que normalmente ocurrirían muy lentamente.

La Trx es una proteína pequeña de 12 kDa capaz de sensar el estado redox intracelular mediante la oxidación/reducción de los dos grupos $-SH$ correspondientes a la secuencia Cys-Gly-Pro-Cys ubicada en el sitio activo de la enzima (Nishinaka y col., 2016). La proteína Trx es el inhibidor natural de ASK1. Esta proteína es capaz de unirse directamente al extremo N-terminal de ASK1 e inhibir su actividad quinasa y en consecuencia la apoptosis dependiente de esta

enzima. La interacción entre Trx y ASK1 requiere que los grupos –SH ubicados en el sitio activo de Trx se encuentren en el estado reducido. De hecho, los inhibidores de la enzima TrxR y las mutaciones inactivantes del ciclo redox en Trx producen un incremento en la actividad de ASK1 (Saitoh y col., 1998). Es por ello que la Trx ha sido aceptada como una proteína capaz de conectar la producción aumentada de especies oxidantes con la muerte celular apoptótica.

Si bien la fosforilación de JNK es consistente en todas las células estudiadas, los eventos corriente abajo de la actividad de esta quinasa no parecen ser determinantes en la muerte celular ya que no se observa ninguna diferencia entre las curvas de supervivencia de las células 3T9MEFs^{DKO JNK1/JNK2} y 3T9MEFs^{wt}. Por lo tanto, la activación de JNK es colateral a la muerte celular.

Por otro lado, el estrés térmico puede conducir a la muerte celular apoptótica dependiente de Bax (Gu y col., 2015). Sin embargo, las células SV40MEFs^{Bax/Bak DKO} no resultaron significativamente más resistentes a la sobrecarga de Cu que las SV40MEFs^{wt}.

Notablemente, en las células SV40MEFs incubadas con Cu²⁺ se observó un marcado incremento en la actividad de caspasas (Fig. 71B), determinado como actividad DEVDasa, junto con el clivaje de caspasa 3 y PARP (Fig. 71A). Adicionalmente, el ensayo de Anexina-V/7-AAD en células SV40MEFs muestra una población de células apoptóticas tempranas y una población de células apoptóticas tardías/necróticas (Fig. 71C-D). Esto sugiere un mecanismo alternativo a la activación de ASK1 por las especies oxidantes intracelulares, que culmina en el clivaje de caspasa 3.

Sin embargo, resulta curioso que la morfología de las células muertas no posee características apoptóticas en su gran mayoría, ya que no se observa la formación de los característicos *blebs* apoptóticos (Fig. 71F). El agregado de zVAD.fmk es capaz de bloquear completamente la actividad de caspasas y a su vez de prevenir el clivaje de caspasa 3 en las células incubadas con Cu²⁺. En consecuencia, este inhibidor de caspasas disminuye drásticamente la población de células apoptóticas tempranas pero la supervivencia celular sólo se ve ligeramente incrementada. Es por ello, que la activación de caspasas en SV40MEFs es un

evento colateral a una muerte celular, la cual presenta características morfológicas fundamentalmente necróticas.

En las células HeLa incubadas con Cu^{2+} se observó un clivaje atípico de caspasa 3, ya que la banda correspondiente al fragmento clivado de caspasa 3 poseía un peso molecular mayor al de la banda observada por la incubación con Stau (Fig. 74A). De todos modos, la intensidad de esta banda es considerablemente baja y esto coincide con la baja actividad DEVDasa observada. Es llamativo que en el ensayo de Anexina-V/7-AAD, estas células mostraran, al igual que las SV40MEFs, una población de células apoptóticas tempranas y una población de células apoptóticas tardías/necróticas (Fig. 74C-D). Es posible que la exposición de la fosfatidil serina en estas células ocurra por un mecanismo independiente de caspasa 3. Sin embargo, la microscopía muestra una clara morfología necrótica, donde resulta evidente la formación protrusiones de membrana cuasi esféricas con un contenido oscuro, conocidos en la literatura como *blebs* necróticos, para diferenciarlos de los típicos *blebs* apoptóticos (Fig. 74F).

Los *blebs* necróticos ocurren en la muerte necrótica poco tiempo antes de la permeabilización de la membrana y si bien su origen a nivel bioquímico no ha sido comprendido, este es marcadamente diferente de los *blebs* apoptóticos. En la muerte celular apoptótica, la presión intracelular se incrementa por la contracción, mediada por quinasas, del citoesqueleto, mientras que en la necrosis, la presión intracelular aumenta por el influjo descontrolado de iones y agua. El incremento de la presión hidrostática en regiones localizadas de la membrana produce la compresión del contenido citosólico y en caso de que este no pueda ser contenido por la malla de citoesqueleto subyacente a la membrana plasmática, se produce la protrusión y el crecimiento del *bleb* necrótico (Barros y col., 2003). No está claro si existe algún nivel de señalización intracelular mediando la formación de estas estructuras, ni tampoco la identidad de las proteínas ubicadas en la base del *bleb* necrótico.

Las células Hepa1-6 no mostraron clivaje de caspasa 3 ni tampoco de PARP (Fig. 76A). Es curioso que en el ensayo de Anexina-V/7-AAD en estas células también pareciera observarse una población apoptótica temprana y una apoptótica tardía/necrótica (Fig. 76B-C). Sin embargo, la morfología de las células Hepa1-6

incubadas con Cu^{2+} no posee características apoptóticas (Fig. 76E), por lo cual, cualquier evento apoptótico está ocurriendo en paralelo a un evento necrótico mucho más crítico.

En el caso de las células HCT116 y BEAS-2B incubadas con Cu^{2+} , no se observó un incremento de la actividad DEVDasa, ni tampoco clivaje de caspasa 3, ni de PARP. De acuerdo a esto, el ensayo de Anexina-V/7-AAD solo mostró una población de células necróticas. Adicionalmente, la microscopía en ambas células mostró una morfología claramente necrótica. En el caso de las células BEAS-2B, se observan algunos *blebs* necróticos sobre la placa de cultivo, mientras que en las células HCT116 no.

Es notable que la abundancia de *blebs* necróticos pareciera guardar relación con la sensibilidad de las células estudiadas al Cu^{2+} , ya que en las células HCT116 que presentan la mínima sensibilidad al metal, no se observaron estas estructuras, mientras que las células HeLa resultaron ser las células más sensibles al Cu^{2+} y presentaron la mayor densidad de *blebs*.

Naturalmente, al desconocer si existe algún grado de programación en la muerte morfológicamente necrótica inducida por Cu^{2+} , es posible que las líneas celulares establecidas muestren una menor sensibilidad al metal debido a alteraciones en las vías de señalización involucradas.

Para descartar un resultado artefactual respecto a la muerte celular se trabajó con hepatocitos murinos primarios. En estas células se observan cambios morfológicos a concentraciones de Cu^{2+} superiores a 300 μM (Fig. 78-79) que se acompañan de la permeabilización de las células, determinado por el ingreso de la sonda IP (Fig. 80). No se observó en los hepatocitos clivaje de caspasa 3 ni tampoco un incremento en la actividad DEVDasa. La proteína H2AX muestra una intensa fosforilación como consecuencia del clivaje de la doble hebra de ADN, como puede observarse al estimular los hepatocitos con FasL. Sin embargo, los hepatocitos incubados con Cu^{2+} no muestran una fosforilación incrementada de esta histona. De acuerdo con estas observaciones, la muerte celular en hepatocitos es independiente de la actividad de caspasas.

Finalmente, la microscopía en hepatocitos incubados con Cu^{2+} muestra una morfología necrótica donde resultan evidentes los núcleos fuertemente picnóticos y la aparición de gránulos blancos en el citosol, probablemente debido a la acumulación de lípidos (Fig. 82). En los hepatocitos incubados con FasL se observa claramente la formación de *blebs* apoptóticos. Sin embargo, en los hepatocitos incubados con Cu^{2+} no se observa la formación de *blebs* necróticos pero esto es probablemente consecuencia de las características del cultivo ya que las células se encuentran embebidas en una matriz de colágeno y no directamente sobre la placa de cultivo.

En resumen, la activación de JNK tiene lugar de manera ubicua en las células expuestas a concentraciones tóxicas de iones Cu. Sin embargo, la fosforilación de esta quinasa no afecta a la muerte celular. Por otro lado, la muerte celular por la sobrecarga de Cu es fundamentalmente necrótica y si bien puede tener lugar la activación de caspasas en células específicas, ésta ocurre de manera secundaria a otro evento más crítico.

Discusión general

En el conjunto de patologías relacionadas con un desbalance en el metabolismo del Cu, la enfermedad de Wilson es sin duda aquella donde resulta más evidente el papel central del Cu en el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, si bien es claro que la acumulación intracelular de Cu da origen a esta enfermedad, no se conocen cuáles son los procesos y reacciones bioquímicas que impulsan la muerte de las células. Debido a la gran incertidumbre respecto a los blancos moleculares intracelulares de los iones Cu, que resultan en la citotoxicidad del metal, tampoco ha sido posible comprender con exactitud el rol del Cu en patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.

La conexión entre la acumulación de Cu en hígado y cerebro y los síntomas observados en la enfermedad de Wilson fue descrita a mediados del siglo XX (Cumings, 1948) y poco tiempo después comenzaron a surgir los tratamientos basados en quelantes de metales (Denny-Brown y Porter, 1951). Considerando que el concepto de estrés oxidativo surgió en 1985 (Sies, 1985) y rápidamente se describió la participación en este proceso de los metales de transición Fe y Cu, es notorio que los tratamientos farmacológicos disponibles actualmente estén basados íntegramente en la coordinación y eliminación del Cu sistémico. Por ello, es posible que el estrés oxidativo generado por la sobrecarga de iones Cu sea un evento colateral que acompaña a la toxicidad del metal, y que la muerte celular se encuentre dirigida por un evento más crítico.

Es evidente que el GSH posee un papel central en la protección frente a la toxicidad de los iones Cu. El GSH es el principal antioxidante endógeno y éste puede, haciendo uso de su grupo $-SH$ oxidable, ser empleado por un amplio espectro de enzimas para controlar la homeostasis redox intracelular. Sin embargo, el GSH es capaz de coordinar tanto el Cu^{2+} como el Cu^{1+} , empleando la parte de la molécula independiente del grupo $-SH$, y de esta forma prevenir un espectro más amplio de reacciones tóxicas producidas por la interacción del metal con dianas biológicas. Por ello, resulta notable la precisión con la que el GSH interviene en el metabolismo del Cu, empleando diferentes partes de la molécula en distintos niveles de toxicidad. En este aspecto surgen preguntas adicionales, como cuál es el destino del complejo Cu-GSH luego de la sobrecarga de metal, ya que éste es

distinguible del GSH libre. Es posible que las enzimas que empleen el GSH no sean capaces de reconocer al complejo Cu-GSH, y la capacidad de las células de mantener el balance redox se encuentre disminuida, a pesar de poseer una concentración adecuada de grupos –SH pertenecientes al GSH.

Como se observó en los Capítulos 1, 2 y 4, los iones Cu deben estar libres para resultar tóxicos, ya que al ser coordinados por moléculas como el GSH, éstos no dañan las estructuras biológicas. Por este motivo, es importante analizar el mecanismo mediante el cual se incrementa la concentración de Cu libre como consecuencia de la sobrecarga del metal, para poder comprender las dianas biológicas del metal. En este aspecto, debe destacarse que el contenido intracelular total de Cu es mantenido en estado estacionario por el constante influjo y eflujo del metal. Sin embargo, dentro de la célula, solamente una fracción del Cu total se encuentra libre ya que la mayor parte del metal está formando complejos con distintos ligandos como el GSH, ATOX1, MTs, etc.

La concentración de iones Cu libres y la fracción que se encuentra formando complejos con distintos ligandos podría estimarse haciendo la suposición que la velocidad de influjo de los iones Cu es suficientemente lenta como para permitir que el metal sea coordinado a medida que ingresa a la célula por los ligandos intracelulares disponibles (Fig. 83). De esta forma, cuando un ion Cu atraviesa la membrana y es coordinado por un ligando, la baja velocidad de influjo permite que otro ligando difunda hasta la interfase membrana-citosol para coordinar al próximo ion Cu. Según este mecanismo, la concentración de Cu libre y la concentración de iones Cu coordinados por distintos quelantes estarán determinadas por el conjunto de constantes de formación de los complejos correspondientes y la concentración en estado estacionario de Cu total.

La exposición a concentraciones elevadas de Cu^{2+} produce un incremento en la velocidad de influjo del metal por sobre la velocidad de eflujo que conduce a la acumulación intracelular del metal. De esta forma se produce un incremento de la fracción de iones Cu coordinados y de la concentración de iones Cu libre, como consecuencia del incremento del Cu total. Considerando el mecanismo aquí propuesto, el Cu libre se incrementaría uniformemente dentro de los compartimentos donde se esté acumulando el metal. En el caso del citosol, las

distintas organelas comprendidas dentro del compartimento entrarían en contacto con la fracción libre de Cu.

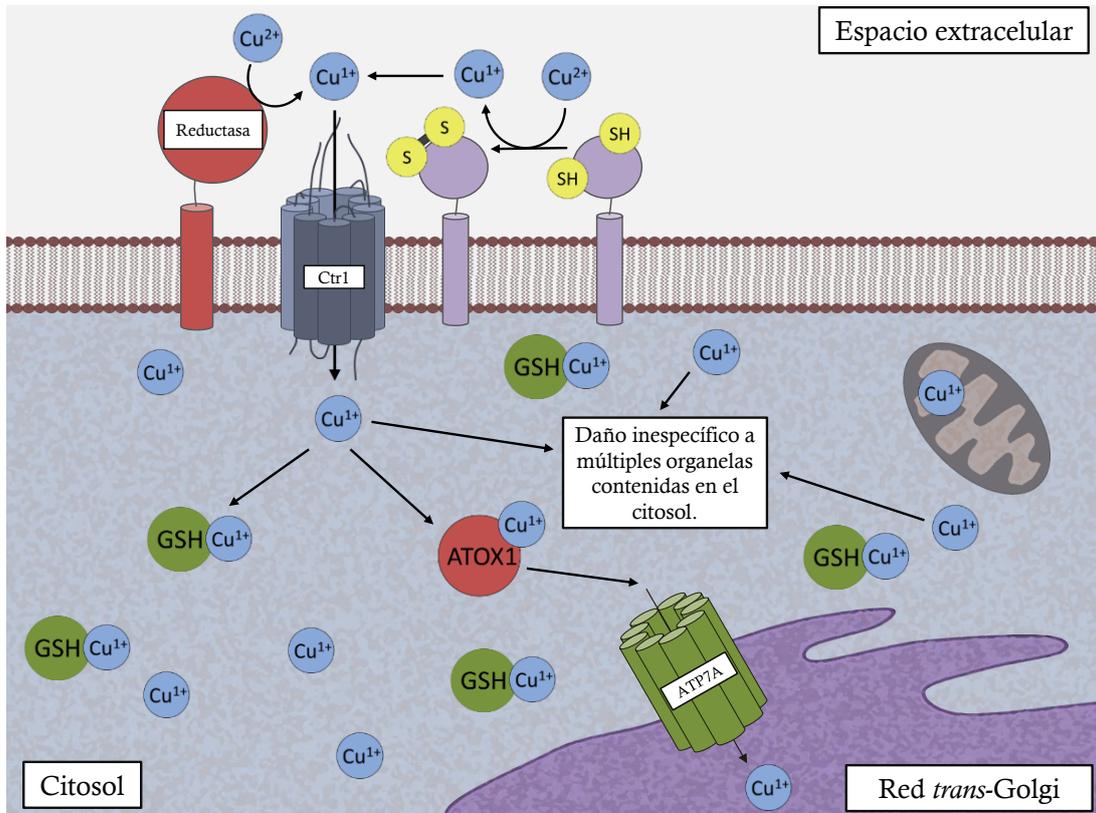


Figura 83. Mecanismo propuesto para explicar el incremento en la concentración de Cu^{1+} libre en células expuestas a concentraciones elevadas de Cu^{2+} , considerando que la velocidad de influjo del metal es inferior a la velocidad de difusión de las moléculas quelantes hasta la interfase membrana-citosol.

Un mecanismo alternativo podría explicar el incremento en la concentración libre de iones Cu considerando que la velocidad de influjo del metal es suficientemente elevada como para superar la velocidad con la que las moléculas quelantes tales como chaperonas, MTs y GSH, son capaces de difundir hasta la interfase membrana-citosol (Fig. 84). De esta manera, al ingresar los iones Cu a la célula se produce un incremento localizado de la fracción de Cu libre en las cercanías del sitio de ingreso del metal y la consecuente titulación local de las moléculas quelantes.

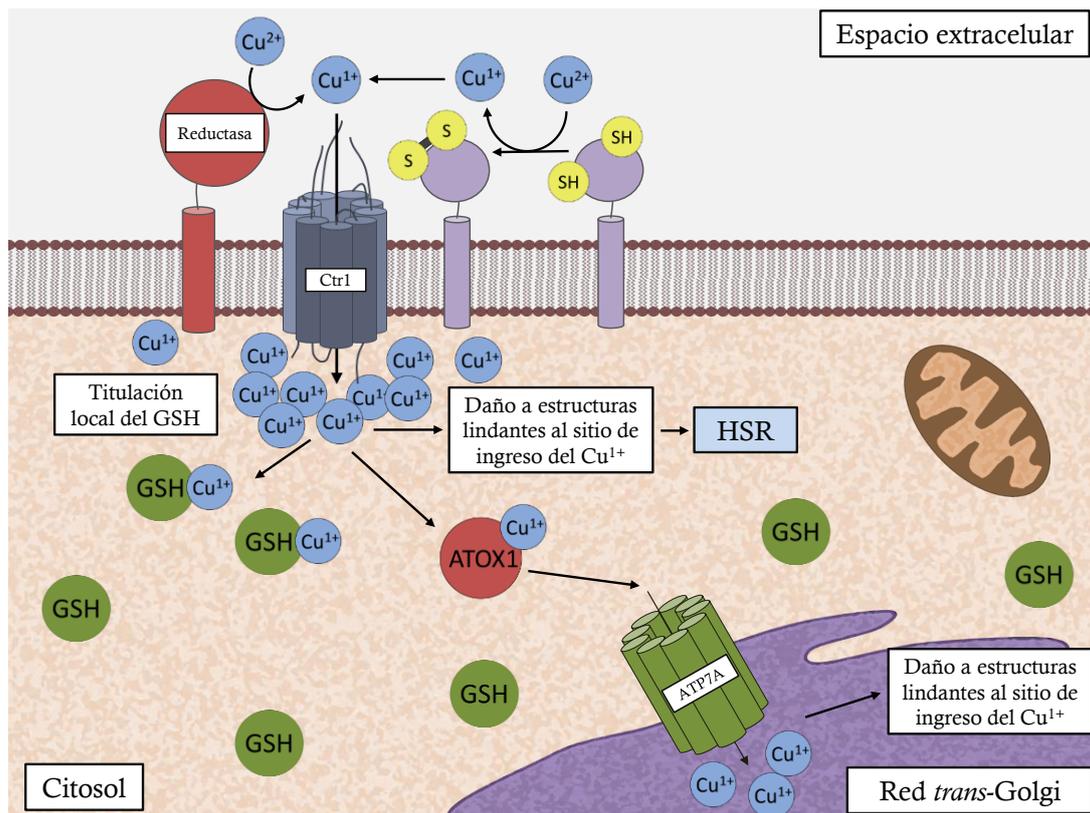


Figura 84. Mecanismo propuesto para explicar el incremento en la concentración de Cu^{1+} libre en células expuestas a concentraciones elevadas de Cu^{2+} , considerando que la velocidad de influjo del metal es superior a la velocidad de difusión de las moléculas quelantes hasta la interfase membrana-citosol.

A partir de estos dos mecanismos mediante los cuales pueden incrementarse las concentraciones intracelulares de Cu se derivan consecuencias claramente distinguibles.

En el caso de que el incremento en el contenido de Cu se deba a la nueva posición de equilibrio dinámico (Fig. 83), los potenciales blancos de reacción para el metal se extienden a todas las estructuras contenidas dentro del compartimento donde se incrementa la concentración libre de Cu. Sin embargo, esto contrasta notoriamente con los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis ya que no se observó una disminución en la función mitocondrial en el hígado de ratas administradas con Cu^{2+} $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Capítulo 1, Sección 1.1), así como tampoco se observó una consistente mtUPR (Capítulo 3). Estas organelas se encuentran suspendidas en el citosol y en el contexto de este modelo deberían verse afectadas por la acumulación del metal, como se observó en las mitocondrias estudiadas *in*

vitro (Capítulo 1, Sección 1.2). Por otro lado, es clara la capacidad del GSH de interactuar con el Cu^{2+} mediante el grupo $-\text{SH}$ y también independientemente del grupo $-\text{SH}$ utilizando el resto del tripéptido. Debido a que la constante de estabilidad del complejo formado entre el GSH y el Cu^{1+} es mayor a 10^{35} (Aliaga y col., 2016), éste debería ser completamente titulado por el Cu^{1+} para comenzar a observarse un claro incremento en la concentración del metal libre. No obstante, el máximo contenido de Cu observado en las células oscila entre 2,11 y 4,45 $\text{nmol} \cdot \text{mg prot}^{-1}$, dependiendo del tipo celular, mientras que el GSH nunca alcanzó valores inferiores a 30 $\text{nmol} \cdot \text{mg prot}^{-1}$. También se debe considerar en este aspecto, que el GSH fue determinado en el lisado celular y no específicamente en el citosol. Sin embargo, el citosol comprende la mayor parte del volumen celular y en términos de masa, constituye el principal reservorio de GSH celular. Adicionalmente, a los sitios disponibles en las moléculas de GSH capaces de unir al metal se deben considerar los sitios en otros agentes capaces de unir e inactivar al metal como las MTs, las cuales se encontraron marcadamente inducidas frente a la sobrecarga de iones Cu. En consecuencia, es poco probable que el influjo de Cu sea capaz de titular las moléculas de GSH para luego incrementar las fracciones libres de metal. El modelo alternativo (Fig. 84), implica una mayor selectividad en las potenciales dianas del metal ya que al ingresar a la célula, tendría lugar una competencia entre las distintas moléculas capaces de unir o reaccionar con el Cu^{1+} .

En los modelos celulares y animales aquí empleados, se utilizaron concentraciones elevadas del Cu^{2+} para generar un incremento en el contenido intracelular de Cu, similar al alcanzado tanto en modelos experimentales como en situaciones clínicas. Sin embargo, la distribución de Cu dentro de la célula debido a una exposición a altas concentraciones de Cu^{2+} puede diferir respecto a la distribución en células donde el eflujo se encuentre disminuido, como ocurre en la enfermedad de Wilson.

En una situación donde la causa de la toxicidad de los iones Cu radique en un eflujo disminuido, no se podría aplicar directamente el modelo donde la velocidad de influjo de Cu^{1+} supera a la velocidad de difusión de las moléculas quelantes hasta la interfase membrana-citosol, ya que las células no se encuentran expuestas a una concentración elevada de Cu. En este caso, sería esperable una

saturación gradual de los sistemas intracelulares capaces de unir e inactivar el Cu, para luego dar lugar al incremento de la fracción de Cu libre. Sin embargo, cuando todos los sistemas protectores endógenos se encuentren saturados, el incremento inicial de la fracción de Cu libre tendrá lugar inmediatamente debajo de la membrana, al igual que en lo propuesto para los modelos experimentales celulares empleados en esta tesis.

Finalmente, la muerte celular inducida por la sobrecarga de iones Cu es puramente necrótica. Si bien las caspasas pueden verse activadas en ciertas condiciones, éstas son un evento colateral a un evento necrótico ya que al inhibirlas, no se previene la muerte celular. Surge la pregunta en este punto si la muerte celular puede involucrar algún tipo de programación o es consecuencia de una serie de procesos o reacciones químicas espontáneos que la célula es incapaz de controlar.

La respuesta de choque térmico puede ser capaz de llevar a la muerte necrótica o apoptótica, dependiendo de la intensidad del estímulo estresante. En el caso de las células incubadas con Cu^{2+} , las características del estrés son probablemente distinguibles de un estrés producto de un incremento en la temperatura. En el estrés térmico, el plegamiento alterado de las proteínas ocurre homogéneamente en todos los compartimentos celulares. Por otro lado, el estrés producto de la exposición al Cu^{2+} parece ocurrir principalmente en el citosol y según el modelo competitivo planteado de acumulación de Cu, las reacciones químicas y bioquímicas ocurren principalmente en los alrededores del sitio de influjo del metal a la célula. De acuerdo con esto, el ingreso de Cu al citosol podría afectar la estructura y función de proteínas de membrana, o en estrecho contacto con ésta, produciendo la muerte celular por necrosis.

Conclusión

La acumulación intracelular de Cu resulta tóxica para la célula. Sin embargo, frente a una sobrecarga de Cu, los mecanismos de control de la homeostasis de los grupos –SH se activan, y como consecuencia de los procesos redox intervinientes es posible mantener al Cu en su forma reducida (Cu^{1+}).

Los efectos del Cu^{1+} y la toxicidad en células y tejidos pueden explicarse a través de dos mecanismos semi-independientes, ya que los procesos químicos involucrados son diferentes, pero que tienen en común al GSH:

a. *Mecanismo no-oxidativo: Proteostasis y posterior necrosis:* Por un lado, el Cu^{1+} puede participar en diversas reacciones bioquímicas a nivel intra y extracelular, donde la más relevante es su interacción directa con proteínas, la cual produce una alteración de la homeostasis proteica que dirige la muerte celular (Fig. 84). De acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis, este mecanismo de acción tóxica es independiente de las reacciones oxidativas, por lo cual es entendible la baja efectividad que los tratamientos con α -tocoferol proveen en la enfermedad de Wilson reportados en bibliografía.

b. *Mecanismo oxidativo: Estrés oxidativo.* Por otro lado, el Cu^{1+} puede promover el estrés oxidativo mediante la reacción con H_2O_2 y la formación del radical HO^\bullet , constituyendo un mecanismo de citotoxicidad dependiente de las reacciones oxidativas. Este mecanismo oxidativo podría modular la intensidad de la muerte celular, pero montado sobre un mecanismo de citotoxicidad no-oxidativo (Fig. 84). De hecho, en condiciones oxidantes donde pueda acumularse el Cu^{2+} , éste resulta aún más efectivo que el Cu^{1+} en alterar la proteostasis mediante su interacción directa con las proteínas.

Notablemente, el GSH es una molécula endógena protectora capaz de intervenir en ambos mecanismos de acción tóxica. Al emplear la parte del tripéptido independiente del grupo –SH, éste es capaz de coordinar al Cu^{1+} , impidiendo así su interacción con las proteínas. Por otro lado, cuando el mecanismo oxidativo cobra relevancia, el GSH puede hacer uso del grupo –SH para contrarrestar modificaciones oxidativas en biomoléculas.

Finalmente, en caso de que los sistemas de defensa endógenos como el GSH no sean capaces de controlar la sobrecarga de Cu, se produce la muerte celular. Si

bien en ciertos tipos celulares puede tener lugar la activación de caspasas, ésta ocurre de manera secundaria a la muerte necrótica (Fig. 85).

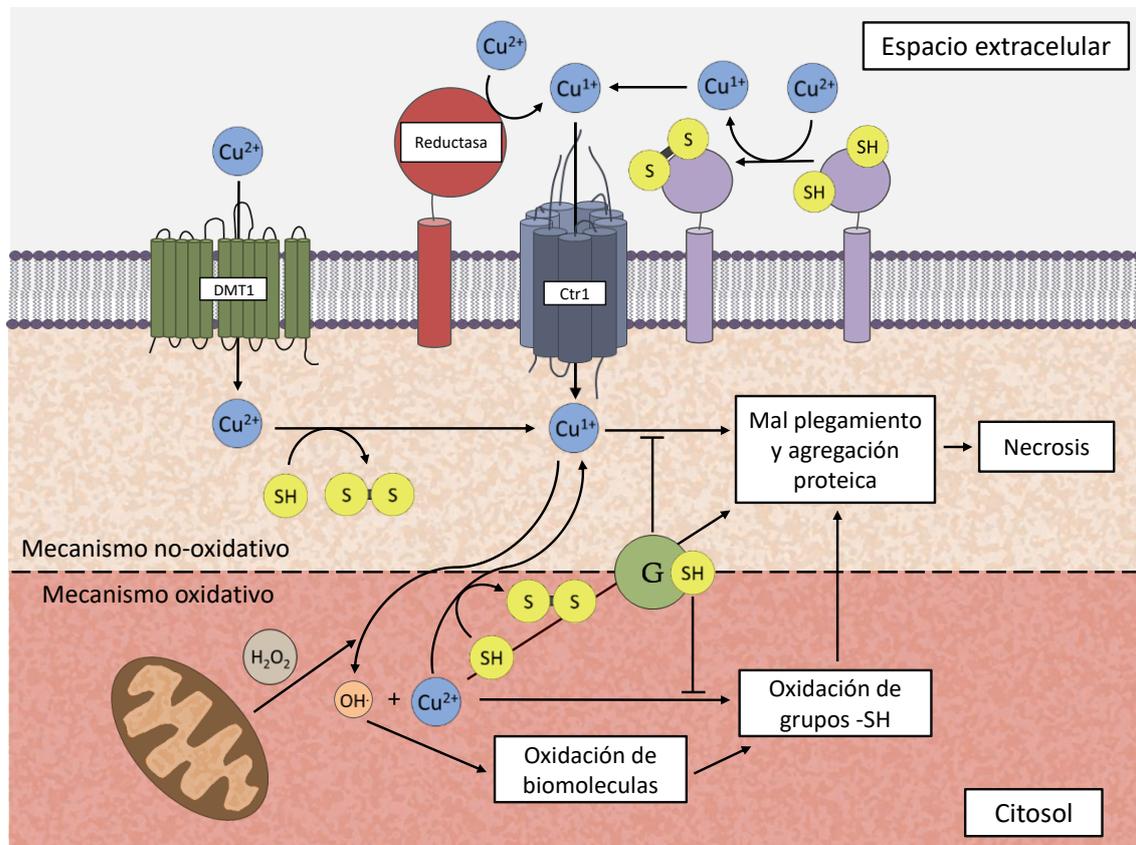


Figura 85. Las células expuestas a concentraciones tóxicas de Cu^{2+} mantienen el control de los grupos $-\text{SH}$ intracelulares y en consecuencia el metal se acumula como Cu^{1+} . El metal resulta letal debido a la alteración de la proteostasis por la interacción entre el Cu^{1+} y proteínas. Por ello, el Cu posee un mecanismo de acción tóxica independiente de sus propiedades oxidantes. Por otro lado, el Cu^{1+} puede generar estrés oxidativo al reaccionar con H_2O_2 , dando origen al radical HO^\bullet , pero este mecanismo dependiente de las reacciones oxidativas es secundario al mecanismo independiente de estas. De hecho, la oxidación de Cu^{1+} a Cu^{2+} resulta en una mayor alteración de la proteostasis. El GSH es una molécula endógena capaz de coordinar el Cu^{1+} y bloquear su interacción con proteínas, empleando la parte del tripéptido independiente del $-\text{SH}$, y a su vez es capaz de intervenir en el mecanismo dependiente de las reacciones oxidativas haciendo uso del $-\text{SH}$.

Resumen

El Cu es un metal esencial para diversas funciones enzimáticas que debido a su reactividad puede participar en reacciones tóxicas para la célula. La enfermedad autosómica recesiva, conocida como la enfermedad de Wilson, es la principal causa donde la sobrecarga de iones Cu resulta tóxica y produce la muerte de la célula. Sin embargo, los desórdenes relacionados al metabolismo del Cu han sido relacionados con la alta prevalencia de la enfermedad de Alzheimer y también con la enfermedad de Parkinson, aunque los mecanismos por los cuales el Cu pueda participar en estas enfermedades no han sido esclarecidos.

Debido a la capacidad del Cu de promover la lipoperoxidación mediante la reacción con el H_2O_2 , el estrés oxidativo ha sido aceptado como la fuerza impulsora de la muerte celular inducida por la sobrecarga del metal. Sin embargo, los tratamientos frente a la sobrecarga de iones Cu con el objetivo de controlar la lipoperoxidación no han aportado resultados convincentes. De hecho, algunos reportes muestran una completa ausencia de correlación entre el contenido de α -tocoferol y el deterioro cognitivo en pacientes con enfermedad de Wilson. En consecuencia, los tratamientos disponibles actualmente para esta enfermedad se basan únicamente en las propiedades quelantes de moléculas como la D-penicilamina.

El objetivo de este trabajo es estudiar las posibles reacciones del Cu, junto con los procesos celulares en respuesta a éstas y comprender su relevancia en el mecanismo de muerte celular inducido por la sobrecarga del metal.

La sobrecarga de iones Cu en ratas produce la muerte de los animales dependiente de la dosis del metal. Luego de una inyección intraperitoneal de Cu se observa la acumulación del metal en hígado y mitocondrias del órgano, acompañado del incremento en la lipoperoxidación y una disminución del glutatión (GSH) endógeno. Como las mitocondrias son organelas particularmente sensibles al daño oxidativo, es esperable una disminución de su función. Sin embargo, no se observa una alteración en el consumo de O_2 mitocondrial.

Interesantemente, empleando un modelo experimental de mitocondrias aisladas se observó que si bien el Cu es capaz de promover la lipoperoxidación dependiente del H_2O_2 producido por la organela, el Cu^{2+} oxida directamente los

grupos tioles tanto proteicos como los correspondientes al GSH. Por otro lado, el GSH fue capaz de prevenir el daño del metal a estructuras biológicas, independientemente de su grupo –SH, sugiriendo una acción quelante sobre el Cu.

La falta de efecto de la sobrecarga hepática *in vivo* del metal sobre la función mitocondrial se corroboró en un modelo celular, empleando un cultivo primario de células BAEC y las líneas celulares J774A.1 y Vero, donde tampoco se observó una disminución en la función mitocondrial.

Para estudiar el efecto del Cu sobre las estructuras celulares se empleó un conjunto de células expuestas a concentraciones tóxicas de Cu. El incremento en la producción de especies oxidantes no muestra correlación con la sensibilidad de las células al metal pero, a diferencia del modelo en ratas, la sobrecarga de iones Cu no produjo una disminución del GSH previo a la muerte de las células. Esta particularidad parece deberse al efecto de la alta concentración de Cu en la circulación previo a la llegada al hígado. Por ello, se continuó estudiando el efecto del Cu específicamente en sistemas celulares. Por otro lado, el GSH resultó ser una molécula clave en la protección celular frente a los iones Cu que ejerce su acción protectora independientemente de sus propiedades antioxidantes.

Empleando micromatrices de ADN, se observó una intensa respuesta de choque térmico, junto a una más limitada respuesta frente a las proteínas incorrectamente plegadas en el retículo endoplásmico. Coherentemente con la falta de efecto sobre las mitocondrias, no se observó una respuesta frente a las proteínas incorrectamente plegadas en estas organelas. Adicionalmente, existe una completa ausencia de respuesta en los genes dedicados a controlar la producción de H₂O₂ y genes cuyos productos hagan uso del GSH para mantener el estado redox. Sin embargo, se observa una inducción de los genes relacionados a la síntesis del GSH. Por esto, es posible que el Cu sea capaz de interactuar directamente con proteínas, alterando su función.

La incubación de Cu²⁺ o Cu¹⁺ con seralbúmina bovina induce la agregación de la proteína. Notablemente, tanto el GSH como el GSSG son capaces de prevenir la agregación inducida por Cu²⁺ como por Cu¹⁺, y esto ocurre independientemente del grupo –SH. En este aspecto, la co-incubación de células con Cu y agentes pro-

agregantes como el Zn^{2+} potencian la muerte celular, mientras que en la co-incubación de Cu con agentes pro-oxidantes como el Fe^{2+} no se observa potenciación. Estas observaciones sugieren que una interacción directa del Cu con las proteínas es más relevante que el estrés oxidativo en la muerte celular inducida por la sobrecarga del metal.

Finalmente, la muerte celular inducida por Cu puede llevar a la activación de caspasas. Sin embargo, este evento es secundario a una muerte celular necrótica.

En conclusión, la toxicidad del Cu intracelular se acompaña de un incremento en la producción de especies oxidantes. Sin embargo, este efecto ocurre de manera colateral a la muerte celular, la cual es necrótica y es dirigida fundamentalmente por la interacción directa entre el Cu y las proteínas. Por otro lado, el GSH es una molécula endógena capaz de coordinar los iones Cu sin hacer uso del grupo $-SH$. Por lo cual, en células donde prevalezca el estrés oxidativo, el GSH puede proveer una línea de defensa adicional, haciendo uso de sus propiedades antioxidantes.

Referencias bibliográficas

Akerboom T, Sies H. (1981) Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Meth Enzymol* 77:373-382.

Aliaga ME, López-Alarcón C, Bridi R, Speisky H. (2016) Redox-implications associated with the formation of complexes between copper ions and reduced or oxidized glutathione. *J Inorg Bioch* 154: 78-88.

Aller SG, Unger VM. (2006) Projection structure of the human copper transporter CTR1 at 6-Å resolution reveals a compact trimer with a novel channel-like architecture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(10): 3627-3632.

Anckar J, Sistonen L. (2011) Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease. *Annu Rev Biochem* 80: 1089-1115.

Arnesano F, Banci L, Bertini I, Huffman DL, O'Halloran TV. (2001) Solution structure of the Cu(I) and apo forms of the yeast metallochaperone, Atx1. *Biochemistry* 40: 1528-1539.

Bakthisaran R, Tangirala R, Rao ChM. (2015) Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology. *Biochim Biophys Acta* 1854(4): 291-319.

Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. (2011) Alzheimer's disease. *Lancet*. 377(9770): 1019-1031.

Barber A, Bernheim F. (1967) Lipid peroxidation: its measurement, occurrence and significance in animal tissue. *Adv Hematol Res* 2: 355-403.

Barros LF, Kanaseki T, Sabirov R, Morishima S, Castro J, Bittner CX, Maeno E, Ando-Akatsuka Y, Okada Y. (2003) Apoptotic and necrotic blebs in epithelial cells display similar neck diameters but different kinase dependency. *Cell Death Differ* 10(6): 687-697.

Barros LF, Kanaseki T, Sabirov R, Morishima S, Castro J, Bittner CX, Maeno E, Ando-Akatsuka Y, Okada Y. (2003) Apoptotic and necrotic blebs in epithelial cells display similar neck diameters but different kinase dependency. *Cell Death Differ* 10(6): 687-697.

Barrow L, Tanner MS. (1989) The effect of carbon tetrachloride on the copper-laden rat liver L. *Br J Exp Pathol* 70(1): 9-19.

Behl C. (2016) Breaking BAG: The Co-Chaperone BAG3 in Health and Disease. *Trends Pharmacol Sci* 37(8): 672-688.

Boveris A, Cadenas E, Reiter R, Filipowsky M, Nakase Y, Chance B. (1980) Organ chemiluminescence: noninvasive assay for oxidative radical reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 347-351.

Boveris A, Oshino N, Chance B. (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128: 617-627.

Boveris A, Repetto M, Bustamante J, Boveris AD, Valdez L. (2008) The concept of oxidative stress in pathology. En: *Free Radical Pathophysiology*. (Alvarez S, Evelson P y Boveris A, eds), Research Signpost, Kerala, India, pp. 1-17.

Boveris A, Turrens JF. (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 191(2): 421-427.

Boveris A, Valdez LB, Zaobornyj T, Bustamante J. (2006) Mitochondrial metabolic states regulate nitric oxide and hydrogen peroxide diffusion to the cytosol. *Biochim Biophys Acta* 1757: 535-542.

Boveris A, Alvarez S, Bustamante J, Valdez L. (2002) Measurement of superoxide radical and hydrogen peroxide production in isolated cells and subcellular organelles. *Methods Enzymol* 349: 280-287.

Bradford MM. (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Brewer GJ. (2014) Alzheimer's disease causation by copper toxicity and treatment with zinc. *Front Aging Neurosci* 6: 92.

Brewer GJ. (2009) Zinc and tetrathiomolybdate for the treatment of Wilson's disease and the potential efficacy of anticopper therapy in a wide variety of diseases. *Metallomics* 1: 199-206.

Brigelius-Flohé R, Maiorino M. (2013) Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* 1830: 3289-3303.

Burow S, Valet G. (1987) Flow-cytometric characterization of stimulation, free radical formation, peroxidase activity and phagocytosis of human granulocytes with 2,7-dichlorofluorescein (DCF) *Eur J Cell Biol* 43(1): 128-133.

Burton GW, Traber MG. (1990) Vitamin E: Antioxidant Activity, Biokinetics and Bioavailability. *Annu Rev Nutr* 10: 357-382.

Cadenas E, Giulivi C, Ursini, F, Boveris A. (1994) Electronically-excited state formation during lipid peroxidation. *Methods Toxicol* 1B: 384-399.

Cadenas E. (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 58: 79-110.

Callaghan J, Gutman S. (2006) Counterpoint Food and Drug Administration. En: *Guidance for C-Reactive Protein Assays: Matching Claims with Performance Data*. *Clin Chem* 52.

Canning P, Sorrell F, Bullock A. (2015) Structural basis of KEAP1 interactions with Nrf2. *Free Radic Biol Med* 88: 101-107.

Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N. (2009) Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138: 628-644.

Chang R. Química. Sexta edición (1999) Mc Graw-Hill Interamericana Editores S.A. México. ISBN: 0-07-01644-X.

Chen Y, Shertzer HG, Schneider SN, Nebert DW, Dalton TP. (2005) Glutamate cysteine ligase catalysis: dependence on ATP and modifier subunit for regulation of tissue glutathione levels. *J Biol Chem* 280(40): 33766-33774.

Chen YR, Tan TH. (2000) The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling. *Int J Oncol* 16: 651-662.

Cho JA, Lee AH, Platzer B, Cross BC, Gardner BM, De Luca H, Luong P, Harding HP, Glimcher LH, Walter P, Fiebigler E, Ron D, Kagan JC, Lencer WI. (2013) The Unfolded Protein Response Element IRE1 Senses Bacterial Proteins Invading the ER to Activate RIG-I and Innate Immune Signaling. *Cell Host Microbe* 13(5): 558-569.

Christen P, Han W. (2004) cis-Effect of DnaJ on DnaK in ternary complexes with chimeric DnaK/DnaJ-binding peptides. *FEBS Lett* 563(1): 146-150.

Cicchini M, Chakrabarti R, Kongara S, Price S, Nahar R, Lozy F, Zhong H, Vazquez S, Kang Y, Karantza V. (2014) Autophagy regulator BECN1 suppresses mammary tumorigenesis driven by WNT1 activation and following parity. *Autophagy* 10(11): 2036-2052.

Cicchini M, Karantza V, Xia B. (2015) Molecular Pathways: Autophagy in Cancer. A Matter of Timing and Context. *ClinCancer Res* 21(3): 498-504.

Clarke P, Tyler KL. (2009) Apoptosis in animal models of virus-induced disease. *Nat Rev Microbiol* 7(2): 144-55.

Cochrane CG. (1991) Mechanisms of oxidant injury of cells. *Mol Aspects Med* 12: 137-147.

Crevel G, Bates H, Huikeshoven H, Cotterill S. (2001) The Drosophila Dpit47 protein is a nuclear Hsp90 co-chaperone that interacts with DNA polymerase alpha. *J Cell Sci* 114(11): 2015-2025.

Cross AR, Jones OT. (1986) The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils. Specific labelling of a component polypeptide of the oxidase. *Biochem J* 237: 111-116.

Cullinan SB, Zhang D, Hannink M, Arvisais E, Kaufman RJ, Dieh JA. (2003) Nrf2 Is a Direct PERK Substrate and Effector of PERK-Dependent Cell Survival. *Mol Cell Biol* 23(20): 7198-7209.

Cumings JN. (1948) The copper and iron content of brain and liver in the normal and in hepato-lenticular degeneration. *Brain* 71: 410-415.

Dancis A, Yuan DS, Klausner RD. (1994) Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport. *Cell* 76: 393-402.

Davie CA (2008) A review of Parkinson's disease. *Br Med Bull* 86(1): 109-127.

De Feo CJ, Aller SG, Siluvai GS, Blackburn NJ, Unger VM. (2009) Three-dimensional structure of the human copper transporter hCTR1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(11): 4237-4242.

Denny-Brown D, Porter H. (1951) The effect of BAL (2,3-dimercaptopropanol) on hepatolenticular degeneration (Wilson's disease) *N Engl J Med* 245 (24): 917-925.

Ellman GL. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch BiochemBiophys* 82(1): 70-77.

Elmore S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35(4): 495-516.

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391 (6662): 43-50.

Estabrook RW. (1967) Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. *Meth Enzymol* 10: 41-47.

Faa G, Lisci M, Caria MP, Ambu R, Sciot R, Nurchi VM, Silvagni R, Diaz A, Crisponi G. (2001) Brain copper, iron, magnesium, zinc, calcium, sulfur and phosphorus storage in Wilson's disease. *J Trace Elem Med Biol* 15(2-3):155-160.

Fan CY, Lee S, Cyr DM. (2003) Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell stress & chaperones*. 8(4): 309-316.

Fenton H. (1894) Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J Chem Soc Trans* 65(65): 899-911.

Ferguson SJ, Nicholls D, Ferguson S (2002) *Bioenergetics* (3rd ed.) San Diego: Academic. pp 114-117.

Fong KL, McCay PB, Poyer JL. (1976) Evidence for superoxide-dependent reduction of Fe³⁺ and its role in enzyme-generated hydroxyl radical formation. *Chem Biol Interact* 15(1): 77-89.

Fothergill LA, Fothergill JE. (1970) Thiol and disulphide contents of hen ovalbumin. C-Terminal sequence and location of disulphide bond. *Biochem J* 116(4): 555-561.

Fraga C, Leibovitz B, Tappel AL. (1988) Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free Radical Biol Med* 4(3): 155-161.

Fridovich I. (1978) Superoxide radicals, superoxide dismutases and the aerobic lifestyle. *Superoxide Photochem Photobiol* 28: 733-741.

Furusawa Y, Tabuchi Y, Wada S, Takasaki I, Ohtsuka K, Kondo T. (2011) Identification of biological functions and gene networks regulated by heat stress in U937 human lymphoma cells. *Int J Mol Med* 28(2): 143-151.

Gerschman R. (1954) Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* 119(3097): 623-626.

González M, Reyes-Jara A, Suazo M, Jo WJ, Vulpe C. (2008) Expression of copper-related genes in response to copper load. *Am J Clin Nutr* 88(suppl): 830S-4S.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86, 494-501.

Gu M, Cooper JM, Butler P, Walker AP, Mistry PK, Dooley JS, Schapira AH. (2000) Oxidative-phosphorylation defects in liver of patients with Wilson's disease. *Lancet* 356(9228): 469-474.

Gu ZT, Li L, WU F, Zhao P, Yang H, Liu YS, Geng Y, Zhao L, Sub L. (2015) Heat stress induced apoptosis is triggered by transcription-independent p53, Ca²⁺ dyshomeostasis and the subsequent Bax mitochondrial translocation. *Sci Rep* 5: 11497.

Haber F, Weiss J. (1934) The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc Roy Soc S* 147: 332-351.

Halliwell B, Chirico S. (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 57(5): 715S-724S.

Halliwell B, Gutteridge J. (1989) Lipid peroxidation: a radical chain reaction, in: *Free Radic Biol Med*, 2nd ed. Clarendon Press, Oxford, pp. 188-276.

Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, Inagaki F, Ohsumi Y. (2007) The Atg12-Atg5 Conjugate Has a Novel E3-Like Activity for Protein Lipidation in Autophagy. *J Biol Chem* 282: 37298-33702.

Hatai T, Matsuzawa A, Inoshita S, Mochida Y, Kuroda T, Sakamaki K, Kuida K, Yonehara S, Ichijo H, Takeda K. (2000) Execution of Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 (ASK1)-induced Apoptosis by the Mitochondria-dependent Caspase Activation. *J Biol Chem* 275(34): 26576-265781.

Hattori Y, Lutsenko S. (2013) An Expanding Range of Functions for the Copper Chaperone/Antioxidant Protein Atox. *Antiox Redox Signal* 19(9): 945-957.

Hébert CD, Elwell MR, Travlos GS, Fitz CJ, Bucher JR. (1993) Subchronic toxicity of cupric sulfate administered in drinking water and feed to rats and mice. *Fundam Appl Toxicol* 21(4): 461-475.

Hellman NE, Gitlin JD. (2002) Ceruloplasmin metabolism and function. *Annu Rev Nutr* 22: 439-58.

Hill GM, Brewer GJ, Juni JE, Prasad AS, Dick RD. (1986) Treatment of Wilson's disease with zinc. II. Validation of oral 64copper with copper balance. *Am J Med Sci* 292: 344-349.

Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin X-M, Milliman CL, Korsmeyer SJ. (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75: 241-251.

Hoogenraad TU, Koevoet R, de Ruyter Korver EG. (1979) Oral zinc sulphate as long-term treatment in Wilson's disease (hepatolenticular degeneration) *Eur Neurol* 18: 205-211.

Ichijo H. (1999) From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene* 18: 6087-6093.

Institute of Medicine. (2001) Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. A report of the 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. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Washington, DC, National Academy Press.

Jiménez-Jiménez FJ, Fernández-Calle P, Martínez-Vanaclocha M, Herrero E, Molina JA, Vázquez A, Codoceo R. (1992) Serum levels of zinc and copper in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 112(1-2): 30-33.

- Jocelyn PC. (1967) The standard redox potential of cysteine-cystine from the thiol-disulphide exchange reaction with glutathione and lipoic acid. *Eur J Biochem* 2: 327-331.
- Jones DP (2008) Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 295(4): C849-C868.
- Jones DP, Sies H. (2015) The redox code. *Antioxid Redox Signal* 23(9): 734-746.
- Jung K, Kwak M. (2010) The Nrf2 System as a Potential Target for the Development of Indirect Antioxidants. *Molecules* 15 (10): 7266-7291.
- Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T. (2004) Lc3, Gabarap and Gate16 Localize to Autophagosomal Membrane Depending on Form-Ii Formation. *J Cell Sci* 117: 2805-2812.
- Kalita J, Kumar V, Misra UK, Ranjan A, Khan H, Konwar R. (2014) A study of oxidative stress, cytokines and glutamate in Wilson disease and their asymptomatic siblings. *J Neuroimmunol* 274(1-2): 141-148.
- Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, Cheetham ME, Chen B, Hightower LE. (2009) Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 14(1): 105-111.
- Kane DJ, Sarafian IA, Anton R, Hahn H, Gralla EB, Valentine JS, Ord I, Bredesen DE. (1993) Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 262: 1274-1277.
- Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. (2011) The Beclin 1 Network Regulates Autophagy and Apoptosis. *Cell Death Differ* 18: 571-580.
- Kaplan JH, Maryon EB. (2016) How Mammalian Cells Acquire Copper: An Essential but Potentially Toxic Metal. *Biophysical Perspective* 111(1): 7-13.
- Knutson MD. (2007) Steap proteins: implications for iron and copper metabolism. *Nutr Rev* 65: 335-340.
- Koukourakis MI, Kalamida D, Glatromanolaki A, Zois CE, Siviridis E, Pouliliou Y, Mitrakas A, Gater KC, Harris AL. (2015) Autophagosome Proteins LC3A, LC3B and LC3C Have Distinct Subcellular Distribution Kinetics and Expression in Cancer Cell Lines. *PLoS One* 10(9): e0137675.
- Kuo LJ, Yang LX. (2008) Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo* 22(3): 305-309.
- Kyriakis JM, Avruch J. (1996) Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays* 18(7): 567-577.

La Fontaine S, Ackland ML, Mercer JFB. (2010) Mammalian copper-transporting P-Type ATPases, ATP7A and ATP7B: Emerging roles. *Int J Biochem Cell Biol* 42(2): 206-209.

Lee J, Peña MM, Nose Y, Thiele DJ. (2002) Biochemical Characterization of the Human Copper Transporter Ctr1. *J Biol Chem* 277(6): 4380-4387.

Lee J, Prohaska JR, Thiele DJ. (2000) Isolation of a murine copper transporter gene, tissue specific expression and functional complementation of a yeast copper transport mutant. *Gene* 254: 87-96.

Legler G, Müller-Platz CM, Mentges-Hettkamp M, Pflieger G, Jülich E. (1985) On the chemical basis of the Lowry protein determination. *Anal Biochem* 150: 278-287

Li X, Fang P, Mai J, Choi ET, Wang H Yang X. (2013) Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J Hematol Oncol* 6: 19.

Liang S, Hong-Fang J. (2007) Adjunctive vitamin E treatment in Wilson disease and suggestions for future trials. *Hepatology* 51(5): 1864-1865.

Liu N, Lo LS, Askary SH, Askary SH, Jones L, Kidane TZ, Trang T, Nguyen M, Goforth J, Chu YH, Vivas E, Tsai M, Westbrook T, Linder MC. (2007) Transcuprein is a macroglobulin regulated by copper and iron availability. *J Nutr Biochem* 18: 597-608.

Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohé L. (1974) Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 42: 68-72.

Lowry OH, Rosebrough NG, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J BiolChem*193 : 265-275.

Malhi H, Irani AN, Volenberg I, Schilsky ML, Gupta S. (2002) Early cell transplantation in LEC rats modeling Wilson's disease eliminates hepatic copper with reversal of liver disease. *Gastroenterology* 122(2): 438-447.

Mangum LC, Borazjani A, Stokes JV, Matthews AT, Lee JH, Chambers JE, Ross MK. (2015) Organochlorine insecticides induce NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species in human monocytic cells via phospholipase A2/arachidonic acid. *Chem Res Toxicol* 28(4): 570-584.

Mannella CA, Colombini M, Frank J. (1983) Structural and functional evidence for multiple channel complexes in the outer membrane of *Neurospora crassa* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(8): 2243-2247.

Marks N, Berg MJ, Guidotti A, Saito M. (1998) Activation of caspase-3 and apoptosis in cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* 52(3): 334-341.

Martin CA, Dorf ME. (1990) Interleukin-6 production by murine macrophage cell lines P388D1 and J774A.1: stimulation requirements and kinetics. *Cell Immunol* 128(2): 555-568.

Mayer MP, Bukau B. (2005) HSP70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62: 670-684.

McCullough KD, Martindale JL, Klotz L, Aw T, Holbrook NJ. (2001) Gadd153 Sensitizes Cells to Endoplasmic Reticulum Stress by Down-Regulating Bcl2 and Perturbing the Cellular Redox State. *Mol Cell Biol* 21(4): 1249-1259.

Mitchell P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191: 144-148.

Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.

Mosser DD, Morimoto RI. (2004) Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene* 23: 2907-2918.

Muller FL, Liu Y, Van Remmen H (2004) Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 279(47): 49064-49073.

Myung J, Bo Kim K, Crews CM. (2001) The Ubiquitin-Proteasome Pathway and Proteasome Inhibitors. *Med Res Rev* 21(4): 245-273.

Nassif ND, Cambray SE, Kraut DA. (2014) Slipping up: Partial substrate degradation by ATP-dependent proteases. *IUBMB Life* 66(5): 309-317.

Nelson DL y Cox MM. (2013) *Lehninger Principles of Biochemistry*, 6ta Ed. W.H. Freeman and Company.

Neupert W, Herrmann J M. (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76: 723-749.

Nisbet AD, Saundry RH, Moir AJG, Fothergill LA, Fothergill JE (1981). The complete amino-acid sequence of hen ovalbumin. *European Journal of Biochemistry* 115(2): 335-345.

Nishinaka Y, Masutani H, Nakamura H, Yodoi J. (2016) Regulatory roles of thioredoxin in oxidative stress-induced cellular responses. *Redox Rep* 6(5): 289-295.

Nyasae L, Bustos R, Braiterman L, Eipper B, Hubbard A. (2007) Dynamics of endogenous ATP7A (Menkes protein) in intestinal epithelial cells: copper-dependent redistribution between two intracellular sites. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292: G1181-G1194.

- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95(2): 351-358.
- Öhrvik H, Dennis JT. (2014) How Copper Traverses Cellular Membranes Through the Mammalian Copper Transporter 1, Ctr1. *Ann N Y Acad Sci* 1314: 32-41.
- Pagan J, Seto T, Pagano M, Cittadini A. (2013) Role of the Ubiquitin Proteasome System in the Heart Circulation Research 112: 1046-1058.
- Pope S, Land JM, Heales SJR. (2008) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration; cardiolipin a critical target?. *Biochim Biophys Acta* 1777(7-8): 794-799.
- Prohaska JR, Gybina AA. (2004) Intracellular copper transport in mammals. *J Nutr* 134(5): 1003-1006.
- Prohaska JR. (1987) Functions of trace elements in brain metabolism. *Physiol Rev* 67: 858-901.
- Proikas-Cezanne T, Takacs Z, Donnes P, Kohlbacher O. (2015) Wipi Proteins: Essential Ptdins3p Effectors at the Nascent Autophagosome. *J Cell Sci* 128: 207-217.
- Qiu XB, Shao YM, Miao S, Wang L. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell Mol Life Sci* 63: 2560-2570.
- Quintanar L, Domínguez-Calva JA, Serebryany E, Rivillas-Acevedo L, Haase-Pettingell Cameron, Amero C, King JA. (2016) Copper and Zinc Ions Specifically Promote Nonamyloid Aggregation of the Highly Stable Human γ D Crystallin. *ACS Chem Biol* 11: 263-272.
- Rae TD, Schmidt PJ, O'Halloran TV. (1999) Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 284: 805-808.
- Rasia MR, Bertoncini CW, Marsh D, Hoyer W, Cherny D, Zweckstetter D, Griesinger C, Jovin TM, Fernández CO. (2005) Structural characterization of copper(II) binding to α -synuclein: Insights into the bioinorganic chemistry of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(12): 4294-4299.
- Repetto M, Boveris A. (2012) Transition metals: bioinorganic and redox reactions in biological systems. En: *Transition Metals: Characteristics, Properties and uses*, (Mishra A, ed), Nova Science Publishers, Inc. Hauppauge, NY, p. 349-370 ISBN: 978-1-61324-559-0.

Reznick A, Packer L. (1994) Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Meth Enzymol* 233: 357-363.

Rhee SG, Woo HA, Kil IS, Bae SH. (2012) Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. *J Biol Chem* 287: 4403-4410.

Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. (2015) Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research* 43(7): e47.

Ritossa F. (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18: 571-573.

Roberti Mdo R, Borges Filho HM, Gonçalves CH, Lima FL. (2011) Aceruloplasminemia: a rare disease - diagnosis and treatment of two cases. *Rev Bras Hematol Hemoter* 33(5): 389-392.

Roberts EA, Schilsky ML. (2008) Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update. *Hepatology* 47: 2089-2111.

Rombouts I, Lagrain B, Scherf KA, Koehler P, Delcour JA. (2015) Formation and reshuffling of disulfide bonds in bovine serum albumin demonstrated using tandem mass spectrometry with collision-induced and electron-transfer dissociation. *Sci Rep* 5: 12210.

Rothe G, Valet G. (1990) Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J Leukoc Biol* 47(5): 440-448.

Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, Kawabata M, Miyazono K, Ichijo H. (1998) Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK). *EMBO J* 17(9): 2596-2606.

Salvesen GS, Dixit VM. (1999) Caspase activation: the induced proximity model, *Proc Natl Acad Sci SA* 96: 10964-10967.

Sandqvist A, Bjork JK, Åkerfelt M, Chitikova Z, Grichine A, Vourc'h C, Jolly C, Salminen TA, Nymalm Y, Sistonen L. (2009) Heterotrimerization of heat-shock factors 1 and 2 provides a transcriptional switch in response to distinct stimuli. *Mol Biol Cell* 20: 1340-1347.

Sano R, Reed JC. (2013) ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys* 1833(12): 3460-3470.

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270 (5235): 467-470.

Seervi M, Sobhan PK, Joseph J, Ann Mathew K, Santhoshkumar TR. (2013) ERO1 alpha-dependent endoplasmic reticulum mitochondrial calcium flux contributes to ER stress and mitochondrial permeabilization by procaspase-activating compound-1 (PAC-1). *Cell Death Dis* 4: e968.

Shapiro AL, Viñuela E, Maizel JV Jr. (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* 28(5): 815-820.

Shi X, Stoj C, Romeo A, Kosman DJ, Zhu Z. (2003) Fre1p Cu²⁺ reduction and Fet3p Cu¹⁺ oxidation modulate copper toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278(50): 50309-50315.

Sies H. (1974) Biochemistry of the peroxisome in the liver cell. *Angew Chem Int Ed Engl* 13: 706-718.

Sies H. (1985) Oxidative stress: introductory remarks. En: Sies H (ed) *Oxidative Stress*. London: Academic Press. pp. 1-7.

Sies H. (2017) Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol* 11: 613-619.

Sies H. (2015) Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol* 4: 180-183.

Sigel H, Sigel A, eds. (2009) *Metallothioneins and Related Chelators*. En: *Metal Ions in Life Sciences*. Cambridge, England: Royal Society of Chemistry.

Siliprandi N, Siliprandi D, Bindoli A, Toninello A. (1978) Effect of Oxidation of Glutathione and Membrane Thiol Groups on Mitochondrial Functions. En: Sies H, Wendel A. (eds) *Functions of Glutathione in Liver and Kidney*. *Proceedings in Life Sciences*. Springer, Berlin, Heidelberg.

Sinha S, Christopher R, Arunodaya GR, Prashanth LK, Gopinath G, Swamy HS, Taly AB. (2005) Is low serum tocopherol in Wilson's disease a significant symptom? *J Neurol Sci* 228(2):121-123.

Skoog D, West D, Holler F, Crouch S. (2001) *Química Analítica*, McGraw-Hill, México, 7^a ed.

Smilkstein MJ, Knapp GL, Kulig KW, Rumack BH. (1988) Efficacy of oral N-acetylcysteine in the treatment of acetaminophen overdose. Analysis of the national multicenter study (1976 to 1985). *N Engl J Med* 319(24): 1557-1562.

Smith JA. (2014) A new paradigm: innate immune sensing of viruses via the unfolded protein response. *Front Microbiol*: 222.

Smith MA, Harris PL, Sayre LM, Perry G. (1997) Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 94: 9866-9868.

Speisky H, Gómez M, Burgos-Bravo F, López-Alarcón C, Jullian C, Olea-Azar C, Aliaga ME. (2009) Generation of superoxide radicals by copper-glutathione complexes: redox-consequences associated with their interaction with reduced glutathione. *Bioorg Med Chem* 17(5): 1803-1810.

Squitti R, Bressi F, Pasqualetti P, Bonomini C, Ghidoni R, Binetti G, Cassetta E, Moffa F, Ventriglia M, Vernieri F, Rossini PM. (2009) Longitudinal prognostic value of serum “free” copper in patients with Alzheimer disease. *Neurology* 72: 50-55.

Sternlicht H, Farr GW, Sternlicht ML, Driscoll JK, Willison K, Yaffe, MB. (1993) The t-complex polypeptide 1 complex is a chaperonin for tubulin and actin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(20): 9422-9426.

Stricher F, Macri C, Ruff M, Muller S. (2013) HSPA8/HSC70 chaperone protein: structure, function, and chemical targeting. *Autophagy* 9(12): 1937-1954.

Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. (2005) Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(43): 15545-15550.

Svetel M, Kozic D, Stefanova E, Semnic R, Dragasevic N, Kostic VS. (2001) Dystonia in Wilson's disease. *Mov Disord* 16: 719-723.

Svetel M, Potrebic A, Pekmezovic T, Tomić A, Kresojevic N, Jesić R, Dragasević N, Kostić VS. (2009) Neuropsychiatric aspects of treated Wilson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 15: 772-775.

Tabas I, Ron D. (2011) Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature Cell Biology* 13: 184-190.

Tamás MJ, Sharma SK, Ibstedt S, Jacobson T, Christen P. (2014) Heavy metals and metalloids as a cause for protein misfolding and aggregation. *Biomolecules* 25: 4(1):252-267.

Tanida I, Ueno T, Kominami E. (2008) LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol* 445: 77-88.

Terada K, Sugiyama T. (1999) The Long-Evans Cinnamon rat: an animal model for Wilson's disease. *Pediatr Int* 41(4): 414-418.

The Gene Ontology Consortium. (2008) The Gene Ontology project in 2008. *Nucleic Acids Research* 36 (Database issue): D440-D444.

Tiezte F. (1969) Enzymic method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione. *Anal Biochem* 27: 502-522.

Tiraboschi P1, Hansen LA, Thal LJ, Corey-Bloom J. (2004) The Importance of Neuritic Plaques and Tangles to the Development and Evolution of AD. *Neurology* 62(11): 1984-1989.

Tyedmers J, Mogk A, Buku B. (2010) Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(11): 777-788.

Voet DJ, Voet JG, Pratt CW. (2008) Chapter 18, Mitochondrial ATP synthesis. *Principles of Biochemistry*, 3rd Edition. Wiley. pp 608.

Walshe JM. (1956) Wilson's disease. New oral therapy. *Lancet* 267: 25-26.

Walshe JM. (1982) Treatment of Wilson's disease with trientine (triethylenetetramine) dihydrochloride. *Lancet* 1: 643-647.

Wang M, Kaufman RJ. (2014) The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nature Reviews Cancer* 14: 581-597.

Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270(5240): 1326-1331.

Yan W, Frank CL, Korth MJ, Sopher BL, Novoa I, Ron D, Katze MG. (2002) Control of PERK eIF2alpha kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(25): 15920-15925.

Yang X, Tang XP, Zhang YH, Luo KZ, Jiang YF, Luo HY, Lei JH, Wang WL, Li MM, Chen HC, Deng SL, Lai LY, Liang J, Zhang M, Tian Y, Xu Y (1989) Prospective evaluation of the diagnostic accuracy of hepatic copper content, as determined using the entire core of a liver biopsy sample. *Hepatology* 62(6): 1731-1741.

Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho D, Hirsch T, Susin SA, Petit PX, Mignotte B, Kroemer G. (1995) Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* 182: 367-377.

Zheng J, Lou JR, Zhang X, Benbrook DM, Hanigan MH, Lind SE, Dinga W. (2010) N-Acetylcysteine interacts with copper to generate hydrogen peroxide and selectively induce cancer cell death. *Cancer Lett* 298(2): 186-194.

Zhou B, Gitschier J. (1997) hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 7481-7486.

Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N, Haugland RP. (1997) A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal Biochem* 253(2): 162-168.