



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante  
**Dr. Felipe Barros O.**  
Centro de Estudios Científicos

Profesor Co-Patrocinante  
**Dr. Jaime Figueroa V.**  
Instituto de Bioquímica  
Facultad de Ciencias

**IDENTIFICACIÓN DE LOS EVENTOS MOLECULARES QUE  
DETERMINAN LA IRREVERSIBILIDAD EN LA MUERTE CELULAR  
NECRÓTICA INDUCIDA POR ESTRÉS OXIDATIVO**

Tesis de Grado presentada como parte  
de los requisitos para optar al grado de  
*Licenciado en Bioquímica* y Título  
Profesional de *Bioquímico*

**IVAN MARCELO RUMINOT MORAGA**

**VALDIVIA – CHILE**

**2005**

*A mis queridos padres Juanita y Ricardo,  
y a mis hermanos César y Ricardo.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer al Dr. Felipe Barros por haberme brindado la oportunidad de desarrollar éste trabajo de tesis en su laboratorio. Gracias por la confianza y apoyo prestado en esta instrucción de abismante espíritu científico.

A Joel, infinitas gracias por su compañerismo, sapiencia y hermandad. A todos los compañeros “viejos y nuevos”, amigos y profesores del laboratorio Omar, Carolina, Carlitos, Carla, Steffen, Segundo, Teresa, Etienne, Anitsi, Astrid, Isabel, Marcelo, Yasnita, Yamil, Leo, Dr. Francisco Sepúlveda, Dra. Isabel Niemeyer y Dr. Pablo Cid que sin duda hicieron un ambiente fantástico para el trabajo, la discusión y conversación. A mis queridos amigos Rodrigo, Denise, Chani, Jaimito, Jessica, Gaspar, Yogui y René, gracias por tantos momentos maravillosos de alegría y ayuda en los momentos difíciles.

Finalmente y no en menor grado quiero agradecer a mi familia, a mis padres Ricardo y Juanita por haber depositado en mi tanto amor y confianza, a mis queridos hermanos César y Ricardo por su infinito apoyo, cariño y fuerza durante estos últimos años. A Leticia, que con su amor e impaciencia, ayudó a concretar más rápido este trabajo.

Ésta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Biofísica y Fisiología Molecular perteneciente al Centro de Estudios Científicos (CECS) y fue financiada por FONDECYT 1020648, proyecto de responsabilidad del Dr. Felipe Barros O.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

Capítulo		Página
	<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	iv
	<b>ÍNDICE DE FIGURAS ANEXOS</b>	v
	<b>ABREVIATURAS</b>	vi
1	<b>RESUMEN</b>	1
	<b>SUMMARY</b>	2
2	<b>INTRODUCCIÓN</b>	3
3	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	7
3.1	Material.	7
3.2	Métodos.	7
3.2.1	Cultivo celular.	7
3.2.2	Mediciones de fluorescencia celular.	8
3.2.2.1	Determinación del nivel de calcio intracelular.	10
3.2.2.2	Determinación del nivel de sodio intracelular.	12
3.2.2.3	Registro y estimación del potencial transmitocondrial.	12
3.2.3	Viabilidad celular.	16
3.2.3.1	Actividad enzimática de lactato deshidrogenasa (LDH) en sobrenadantes celulares.	16
3.2.3.2	Morfología nuclear.	17
3.2.3.3	Actividad de caspasa 3	17
3.2.3.4	Análisis de fragmentación de DNA.	18

Capítulo		Página
3.2.4	Ensayos para descartar posibles artefactos producidos por el $H_2O_2$ en las propiedades fluorescentes de las sondas y en la actividad enzimática de LDH.	19
3.2.5	Análisis de datos.	21
4	<b>RESULTADOS</b>	22
4.1	Altas dosis de $H_2O_2$ son necesarias para inducir necrosis en células Clone 9.	22
4.2	$H_2O_2$ induce la vía canónica de necrosis celular, dependencia de cationes en la muerte oxidativa.	22
4.3	Identificación del punto de no retorno (PNR) en células Clone 9.	25
4.4	Ausencia de apoptosis en células rescatadas antes del PNR.	28
4.5	$H_2O_2$ induce sobrecargas tardías de $Na^+$ y $Ca^{2+}$ .	30
4.6	Caída del potencial transmitocondrial en células sometidas a estrés oxidativo.	32
4.7	Reversibilidad de los cambios iónicos y potencial transmitocondrial al remover el $H_2O_2$ antes del PNR.	35
4.8	La función mitocondrial determina el PNR.	37
4.9	La inhibición de la función mitocondrial no adelanta la sobrecarga secundaria de $Ca^{2+}$ en células Clone 9 sometidas a estrés oxidativo.	39
5	<b>DISCUSIÓN</b>	43

Capítulo		Página
5.1	<b>ANEXOS</b>	50
	<b>ANEXO A EXPERIMENTOS EN CÉLULAS HELA</b>	51
A.1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> induce sobrecargas tardías de sodio y calcio en células HeLa.	51
A.2	El aumento del Na <sup>+</sup> intracelular es necesario para que ocurra la sobrecarga secundaria del Ca <sup>2+</sup> citosólico. Dependencia del Na <sup>+</sup> extracelular en la muerte necrótica.	52
A.3	La inhibición de la bomba de Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPasa revierte el alza secundaria de calcio inducida por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y protege de la necrosis.	54
A.4	La inhibición metabólica glicolítica y mitocondrial inducen el alza secundaria de calcio en células sometidas a estrés oxidativo.	56
6	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	58

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b>	Patrón de fluorescencia del calcio citosólico evidenciado con la sonda Fluo-3 en células Clone 9.	11
<b>Figura 2</b>	Patrón de fluorescencia del Na <sup>+</sup> citosólico evidenciado con la sonda SBFI en células Clone 9.	14
<b>Figura 3</b>	Patrón de carga mitocondrial de la sonda TMRM en células Clone 9.	15
<b>Figura 4</b>	El H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y la variación de pH extracelular no interfieren significativamente en la actividad de LDH.	20
<b>Figura 5</b>	Altas dosis de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> son necesarias para que ocurra la necrosis en células Clone 9.	23
<b>Figura 6</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> induce la vía canónica de necrosis celular, dependencia de cationes y pH extracelular en la muerte oxidativa.	26
<b>Figura 7</b>	Identificación del punto de no retorno (PNR) en células Clone 9.	27
<b>Figura 8</b>	Ausencia de apoptosis en células rescatadas antes del PNR.	29
<b>Figura 9</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> induce sobrecargas tardías de sodio y calcio.	31
<b>Figura 10</b>	Caída del potencial transmitocondrial en células sometidas a estrés oxidativo.	34
<b>Figura 11</b>	Reversibilidad de los cambios iónicos y potencial transmitocondrial al remover el H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> antes del PNR.	36
<b>Figura 12</b>	La función mitocondrial determina el PNR.	41
<b>Figura 13</b>	La inhibición de la función mitocondrial no adelanta la sobrecarga secundaria de Ca <sup>2+</sup> en células Clone 9 sometidas a estrés oxidativo.	42

## INDICE DE FIGURAS ANEXOS

### ANEXO A

- Figura A.1** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce sobrecargas tardías de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> en células HeLa. 51
- Figura A.2** El aumento del Na<sup>+</sup> intracelular es necesario para que ocurra la sobrecarga secundaria del Ca<sup>2+</sup> citosólico. Dependencia del Na<sup>+</sup> extracelular en la muerte necrótica. 53
- Figura A.3** La inhibición de la bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa revierte el alza secundaria de calcio inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y protege de la necrosis. 55
- Figura A.4** La inhibición metabólica glicolítica y mitocondrial inducen el alza secundaria de calcio en células sometidas a estrés oxidativo. 57

**ABREVIATURAS**

Ac-DEVD-pNA	Acil-aspartato-glutamato-valina-aspartato-p-nitro anilina
AM	Acetoximetil-éster
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosíntrifosfato
CHAPS	s-(s-colamida-propil-dimetilamonio)-1-propano sulfonato
CsA	Ciclosporina A
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
2-DOG	2-desoxiglucosa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis ( $\beta$ -aminoetiléter) aminoetiléter tetraacético.
DTT	Ditiotreitol
FCCP	Carbocyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone
g	gravedad
KRH	Krebs Ringer Hepes
KRH-glc	Krebs Ringer Hepes suplementado con 25 mM glucosa
LDH	Lactato deshidrogenasa

mA	miliamperios
mV	milivoltios
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida dinucleótido forma oxidada
NADH	Nicotinamida dinucleótido forma reducida
PARP	Poli-(ADP-ribosa)-polimerasa
PBS	Tampón fosfato salino
PI	Yoduro de propidio
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
PNR	Punto de no retorno
ROI	Región observada de interés
rpm	Revoluciones por minuto
SFB	Suero fetal bovino
STS	Staurosporina
TAE	Tris acetato EDTA
TE <sub>50</sub>	Tiempo de exposición requerido para lisar el 50 % de la población celular
TMRM	Tetrametil rodamina
U	Unidades internacionales
μl	microlitro
μm	micrómetro
μM	micromolar
°C	grados Celsius

## 1. RESUMEN

La muerte celular necrótica depende de la acumulación intracelular de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$ , sin embargo, aún se desconocen los mecanismos que llevan al desbalance iónico. En este trabajo se investigaron parámetros asociados a la necrosis con el fin de descubrir el (los) determinante (s) de la irreversibilidad en la muerte celular necrótica inducida por estrés oxidativo. Células epiteliales Clone 9 fueron expuestas por tiempos crecientes a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (32 mM), necesitándose  $14 \pm 2$  minutos ( $n=36$ ) para inducir un 50% de necrosis. Este tiempo fue entonces definido operacionalmente como el punto de no retorno (PNR). Usando sondas fluorescentes y microscopía confocal se observó que el PNR coincide con la depolarización mitocondrial y el inicio de la sobrecarga de cationes. La remoción del peróxido antes del PNR, normalizó los parámetros funcionales, sin evidencia de necrosis evaluada a las 20 horas. Contra lo esperado, estas células sub-necróticas tampoco presentaron apoptosis, a juzgar por actividad de caspasas, fragmentación del DNA y morfología nuclear.

Luego se evaluó el posible papel de la mitocondria en la irreversibilidad necrótica. Los inhibidores metabólicos mitocondriales FCCP ( $2 \mu\text{M}$ ) y rotenona ( $2 \mu\text{M}$ ) adelantaron significativamente el punto de no retorno a  $1,8 \pm 0,4$  minutos ( $n=5$ ) y  $5,0 \pm 1,3$  minutos ( $n=3$ ), respectivamente. Por el contrario, el bloqueador del poro de transición mitocondrial ciclosporina A ( $100 \mu\text{M}$ ), retardó el punto de no retorno a  $23,1 \pm 6$  minutos ( $n=3$ ). Experimentos suplementarios en células HeLa mostraron que la sobrecarga necrótica de calcio inducida por estrés oxidativo fue dependiente del consumo de ATP por la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa. La inhibición farmacológica y funcional de la bomba revirtió la sobrecarga tardía de calcio, además de proteger significativamente la necrosis. En su conjunto estos resultados establecen al poro de transición mitocondrial y a la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa como elementos claves en la muerte necrótica inducida por peróxido de hidrogeno en células epiteliales.

## SUMMARY

The necrotic cell death depends on the intracellular accumulation of  $\text{Ca}^{+2}$  and  $\text{Na}^{+}$ , however, the mechanisms that produce the ionic desbalance are unknown. In this work were investigated parameters associated to the necrosis with the purpose of discovering determinants of the irreversibility in the necrotic cell death induced by oxidative stress. Clone 9 epithelial cells were exposed per increasing times to  $\text{H}_2\text{O}_2$  (32 mM), and required  $14 \pm 2$  minutes ( $n=36$ ) to induce a 50% of necrosis. This time was defined operationally as the point of no return (PNR). Using fluorescent dyes and confocal microscopy it was observed that the PNR agrees with the mitochondrial depolarization and the beginning of the cation overload. The removal of peroxide before the PNR, normalized the functional parameters, without evidence of necrosis evaluated at 20 hours. Surprisingly, these sub-necrotic cells did not present apoptosis either, judging by activity of caspases, DNA fragmentation and nuclear morphology. After this, the possible role of the mitochondria in the necrotic irreversibility was evaluated. Mitochondrial poisons FCCP (2 mM) and rotenone (2 mM) significantly advanced the point of no return to  $1,8 \pm 0,4$  minutes ( $n=5$ ) and  $5,0 \pm 1,3$  minutes ( $n=3$ ), respectively. On the other hand, the blockade of the pore of mitochondrial transition with cyclosporin A (100 mM) retarded the point of no return to  $23,1 \pm 6$  minutes ( $n= 3$ ). Additional experiments in HeLa cells showed that the necrotic calcium overload induced by oxidative stress was employed in the consumption of ATP by the  $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$  ATPase. The pharmacological and functional inhibition of the pump reverted the delayed calcium overload and also protected the necrosis significantly. In conclusion, these results establish that the pore of mitochondrial transition and the  $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$  ATPase are key elements in the necrotic death induced by hydrogen peroxide in epithelial cells.

## 2. INTRODUCCIÓN

Una célula de mamífero expuesta a un daño letal puede morir por apoptosis o necrosis. La apoptosis es un proceso altamente regulado en el cual la activación de cascadas bioquímicas predeterminadas, lleva al desensamblaje ordenado de la célula. Los remanentes celulares son inmunosupresores (Voll *et al*, 1997; Fadok *et al*, 1998) y desaparecen fagocitados por células vecinas sin afectar mayormente la homeostasis tisular. La necrosis en cambio ha sido entendida como un fenómeno pasivo en el cual la privación energética severa lleva a la pérdida de gradientes electroquímicos y lisis celular (Barros *et al*, 2002). En este caso los remanentes son pro-inflamatorios (Melcher *et al*, 1998) y producen daño e incluso la muerte de células vecinas.

Datos recientes indican que la muerte celular necrótica pudiera no ser un fenómeno meramente pasivo, sino que el resultado de la activación secuencial de múltiples eventos bioquímicos. Por ejemplo la depleción energética producida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es mediada en parte por la sobreactivación de la enzima nuclear poli-(ADP-ribosa)-polimerasa (PARP), esta enzima poli-ADP-ribosila e inactiva la enzima glicolítica GAPDH (Colussi *et al*, 2000) lo que culmina en la depleción del ATP celular (Ha *et al*, 1999). También se ha reportado la activación de canales catiónicos no selectivos (NSCC) como mediadores de la muerte celular necrótica inducida por radicales libres (Barros *et al*, 2001a).

Desde la exposición a un estímulo letal hasta la pérdida de la integridad estructural (lisis) que ocurre horas más tarde, una célula de mamífero experimenta una serie de cambios estructurales y funcionales. Los más estudiados han sido la sobrecarga de calcio (Mehendale *et al*, 1985; Herson *et al*, 1999; Ermak *et al*, 2002),

edema de organelos y citoplasma (Carini *et al*, 2000; Simon *et al*, 2002; Schlenker *et al*, 2000; Barros *et al*, 2001b), el colapso del potencial mitocondrial (Byrne *et al*, 1999), la depleción energética (Hyslop *et al*, 1988; Ha *et al*, 1999; Colussi *et al*, 2000, Barros *et al*, 2003), la ruptura de lisosomas y la activación de proteasas y otras enzimas líticas (Bronk *et al*, 1993). En general, estos estudios se han concentrado en la medición y manipulación positiva y negativa de uno o dos de estos eventos.

Un inconveniente de este tipo de aproximación simple a un problema complejo es que los eventos son capaces de retroalimentar sus determinantes patogénicos en forma no lineal. Por ejemplo es esperable que una elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico sea a la vez causa y efecto de la disminución de ATP. Ello directamente por la interacción  $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$  en la bomba reticular y también indirectamente debido a la relación de  $\text{Ca}^{2+}$  y ATP con el  $\text{Na}^+$  intracelular a través del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y de la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP asa, respectivamente.

Es decir, existen retroalimentaciones positivas y negativas simultáneas que hacen difícil el establecimiento de causalidades. Dada esta complejidad y la rapidez con que suceden los eventos, no ha sido posible proponer una cadena causal o jerárquica de eventos (y menos aun mecanismos) que expliquen la necrosis, tarea que está mucho más avanzada para la apoptosis y en particular la apoptosis mediada por receptor de superficie (Ashkenazí, A. y Dixit V., 1998)

El presente trabajo de tesis buscó identificar mediadores moleculares de la muerte celular necrótica, para ello se investigaron una serie de parámetros celulares relacionados con la muerte celular necrótica y así poder determinar cual (es) de esto(s) evento(s) son los que gatillan la condena irreversible a la necrosis celular.

Luego de someter las células epiteliales Clone 9 a estímulos necróticos, se midieron una serie de parámetros fisiológicos y bioquímicos previamente asociados a la muerte celular necrótica, tales como niveles citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$ , potencial mitocondrial, morfología nuclear e integridad del DNA genómico.

En particular se exploró el papel de la mitocondria en la irreversibilidad necrótica. Datos de nuestro laboratorio obtenidos en células Clone 9 han demostrado que el punto de no retorno de la necrosis ocurre a los  $14 \pm 2$  minutos luego de la exposición continua a  $\text{H}_2\text{O}_2$  a altas concentraciones. Este evento es posterior al aumento rápido del calcio citosólico, anterior al aumento regenerativo de sodio y calcio, volumen celular y ocurre a tiempos similares a los que se registra la depolarización mitocondrial. En este proyecto se investigó directamente la hipótesis de que el colapso mitocondrial provocado por estrés oxidativo es responsable de la irreversibilidad en la necrosis en células Clone 9 expuestas a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Para poner a prueba esta hipótesis se estudió el impacto de la inhibición metabólica mitocondrial sobre el punto de no retorno y sobre la acumulación intracelular de iones sodio y calcio en células sometidas a  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Experimentos suplementarios realizados en células HeLa indicaron que la sobrecarga tardía de calcio depende del uso de ATP por la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa. Estos resultados pueden ser articulados en un modelo en que la entrada masiva de sodio a la célula activa la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa, produciendo una depleción local de ATP.

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

La función mitocondrial cumple un papel determinante en la irreversibilidad de la muerte celular necrótica inducida por estrés oxidativo.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el rol de la función mitocondrial en la irreversibilidad de la muerte celular necrótica inducida por estrés oxidativo.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Establecimiento de protocolos de estimulación letal en poblaciones de células Clone 9 con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Identificación del punto de no retorno en células Clone 9 expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Establecimiento y medición en tiempo real de parámetros fisiológicos y bioquímicos relacionados con muerte celular necrótica. A saber, concentraciones de Ca<sup>2+</sup> y Na<sup>+</sup> citosólico, potencial transmitocondrial, integridad del DNA genómico.
- Estudio de la inhibición metabólica mitocondrial sobre el punto de no retorno en células Clone 9 sometidas a estrés oxidativo.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Material

Ácido plurónico, yoduro de propidio, Hoechst-33342 y las sondas fluorescentes Fluo-3 AM, SBFI AM, Sodium Green AM y TMRM, fueron adquiridas en Molecular Probes (Eugene, OR). Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en Merck (Darmstadt, Alemania). El kit LDH-P UV para determinación de lactato deshidrogenasa (LDH) fue adquirido de Wiener Lab (Rosario, Argentina). RNAasa A, proteinasa K, en Winkler S.A., Chile. N-metil-d-glucamina ( $NMDG^+$ ), etilen glicol-bis(aminoetil éter)-N,N',N'-ácido tetraacético (FCCP), ácido iodoacético (IAA), ouabaína, digitonina, rotenona, ciclosporina A (CsA) y demás reactivos fueron adquiridos desde Sigma (St. Louis, MO)

#### 3.2 Métodos

##### 3.2.1 Cultivo celular

Las células epiteliales de hígado de rata Clone 9 fueron obtenidas desde *American Type Culture Collection* (ATCC; Rockville, MD) y fueron mantenidas en medio DMEM-glucosa 25 mM, suplementado con SFB 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 0,1 mg/ml y anfotericina B 0,25  $\mu$ g/ml a 37° C en una atmósfera húmeda de  $CO_2$  al 5% y aire al 95%.

La células epiteliales humanas HeLa fueron obtenidas desde *American Type Culture Collection* (ATCC; Rockville, MD) y fueron mantenidas en medio DMEM-glucosa 5,5 mM, suplementado con SFB 7%, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 0,1 mg/ml y

anfotericina B 0,25  $\mu\text{g/ml}$  a 37° C en una atmósfera húmeda de  $\text{CO}_2$  al 5% y aire al 95%.

Las células fueron pasadas cada semana utilizando una solución de tripsina al 0,05% y EDTA 5,53 mM, por 5 minutos a 37°C, para luego neutralizar el proceso agregando 8 ml de medio DMEM suplementado con SFB 10%. Las células Clone 9 fueron utilizadas entre 4 y 6 días de crecidas con pasajes que fluctuaron entre el 8 y 36. Las células HeLa fueron utilizadas entre 2 y 4 días de crecidas con pasajes que fluctuaron entre el 8 y 30. Las células fueron expuestas a condiciones experimentales en el tampón Krebs-Ringer-HEPES (KRH; NaCl 136 mM; Hepes 10 mM; KCl 4,7 mM;  $\text{MgSO}_4$  1,25 mM;  $\text{CaCl}_2$  1,25 mM; pH=7,4) suplementado con glucosa 25 mM (KRH-glc).

En algunos experimentos el  $\text{Na}^+$  fue reemplazado equimolarmente por  $\text{NMDG}^+$  y el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular fue quelado con EGTA 10 mM.

### **3.2.2 Mediciones de fluorescencia celular.**

Las células fueron crecidas en cubre objetos de vidrio circulares de 25 mm, estos se montaron en una cámara abierta construida por Bio JSP (Santiago, Chile), y fueron expuestas a condiciones experimentales en tampón KRH-glc a temperatura ambiente (20-22 °C).

La fluorescencia fue medida en regiones de interés (Regions of Interest; ROIs) posicionadas sobre las células cada 20-30 segundos utilizando un microscopio confocal Carl Zeiss Pascal equipado con un láser de Argón y Helio/Neón con líneas de excitación a 488 y 543 nm, respectivamente.

Las sondas fluorescentes verdes Fluo-3 y Sodium Green fueron excitadas utilizando un láser de Argón (488 nm), la emisión se registró entre los 500 y 550 nm.

La sonda fluorescente roja TMRM se excitó con un láser Helio/Neón (543 nm) y la emisión se registró entre 550 y 615 nm.

En este microscopio confocal, la epifluorescencia es convertida a una imagen digital (256 x 256 ó 512 x 512 píxeles), donde a cada píxel se le ha asignado un valor entre 0 (negro) y 256 (blanco). La fluorescencia emitida se obtuvo a partir de un corte óptico aproximado de 7  $\mu\text{m}$  de grosor.

La señal de fondo fue medida en aquellas regiones del campo desprovistas de células, y este valor fue sustraído a las mediciones celulares.

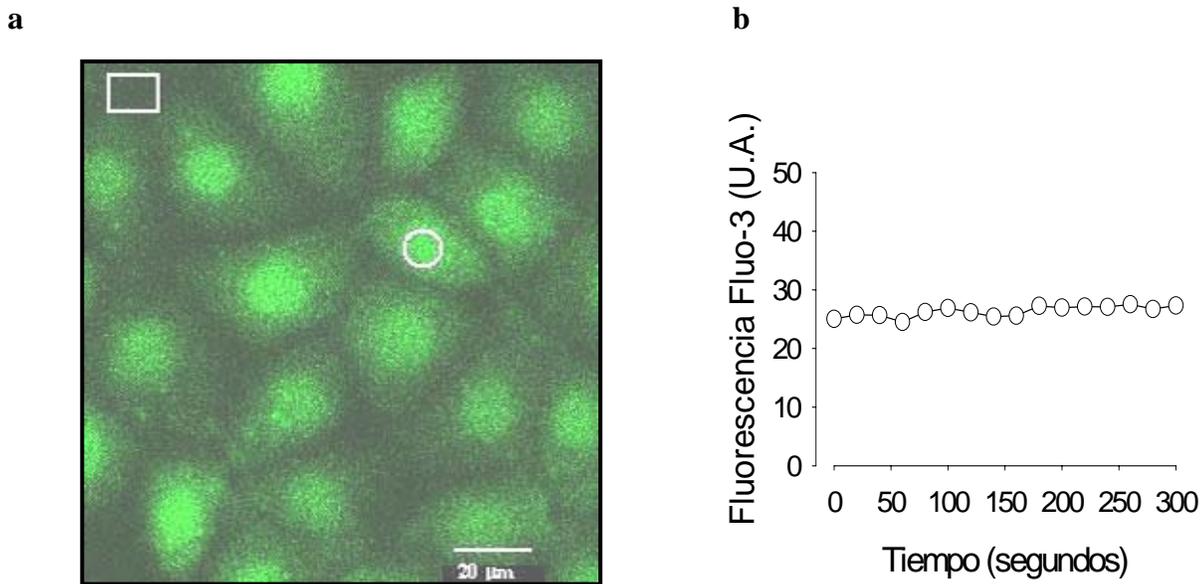
Para comparar valores de distinta células, los datos son estandarizados asignando a la fluorescencia basal ( $F_0$ ) el valor de 1.

La señal de la sonda ratiométrica SBFI fue obtenida con un microscopio Olympus IX70. La sonda fue excitada a dos longitudes de onda 340 y 380 nm utilizando un monocromador Cairn, registrándose la razón de las emisiones a 535 nm captadas con una cámara Hamamatsu bajo el control del software de Kinetic Imaging.

Para estudiar comportamiento de las sondas fluorescentes frente a las intensidades de iluminación utilizadas, se realizaron experimentos controles en donde células HeLa y Clone 9 cargadas con los fluoróforos de interés fueron excitadas reiteradamente con el láser en particular. Estos experimentos controles indicaron que la exposición reiterada de las células frente al láser no causaron el apagamiento de las sondas utilizadas en este trabajo (Figuras 1, 2 y 3).

### 3.2.2.1 Determinación del nivel de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular.

Para estimar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico libre, células Clone 9 fueron cargadas con Fluo-3 5  $\mu\text{M}$  en tampón KRH-glc suplementado con ácido plurónico 0,02%. Posterior a 30 minutos, tiempo necesario para la desesterificación de la sonda, se lavó 3 veces con tampón KRH-glc. El registro de fluorescencia se llevó a cabo cada 20-30 segundos en ROIs posicionados en los núcleos celulares (Figura 1a). La señal de fondo se obtuvo posicionando los ROIs en regiones desprovistas de células. La exposición reiterada frente al láser 488 nm no indujo el apagamiento de la sonda Fluo-3 (Figura 1b).



**Figura 1. Patrón de fluorescencia del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico evidenciado con la sonda Fluo-3 en células Clone 9.** **a**, Imagen obtenida por microscopía confocal de epifluorescencia. El registro de la fluorescencia se realizó en ROIs posicionados en los núcleos celulares (O) y en regiones desprovistas de células ( $\square$ ), para obtener la señal de fondo. La barra representa 20  $\mu\text{m}$ . **b**, Curso temporal de la fluorescencia de Fluo-3 (expresada en unidades arbitrarias) en ROIs posicionados sobre los núcleos celulares de 6 células  $\pm$  error estándar. La señal de fondo fue sustraída del valor de la fluorescencia cosechada de las células. La exposición reiterada frente al láser 488 nm no indujo el apagamiento de la sonda Fluo-3. Las células HeLa mostraron un patrón de fluorescencia homogéneo similar al observado en células Clone 9. Se obtuvieron resultados similares en al menos 3 experimentos independientes.

### **3.2.2.2 Determinación del nivel de Na<sup>+</sup> intracelular.**

Para estimar los niveles de Na<sup>+</sup> intracelular las células fueron cargadas con Sodium Green 5 nM o SBF1 5 μM en tampón KRH-glc suplementado con ácido plurónico 0,02%. Posterior a 30 minutos, tiempo necesario para la desesterificación de la sonda, se lavó 3 veces con el tampón KRH-glc. El registro de fluorescencia se llevó a cabo cada 20-30 segundos en ROIs posicionados en los núcleos celulares (Figura 2a). La señal de fondo se obtuvo posicionando los ROIs en regiones desprovistas de células. La razón de fluorescencia de SBF1 no se afectó frente a la excitación reiterada a 340 nm y 380 nm (Figura 2b).

### **3.2.2.3 Registro y estimación del potencial transmitocondrial**

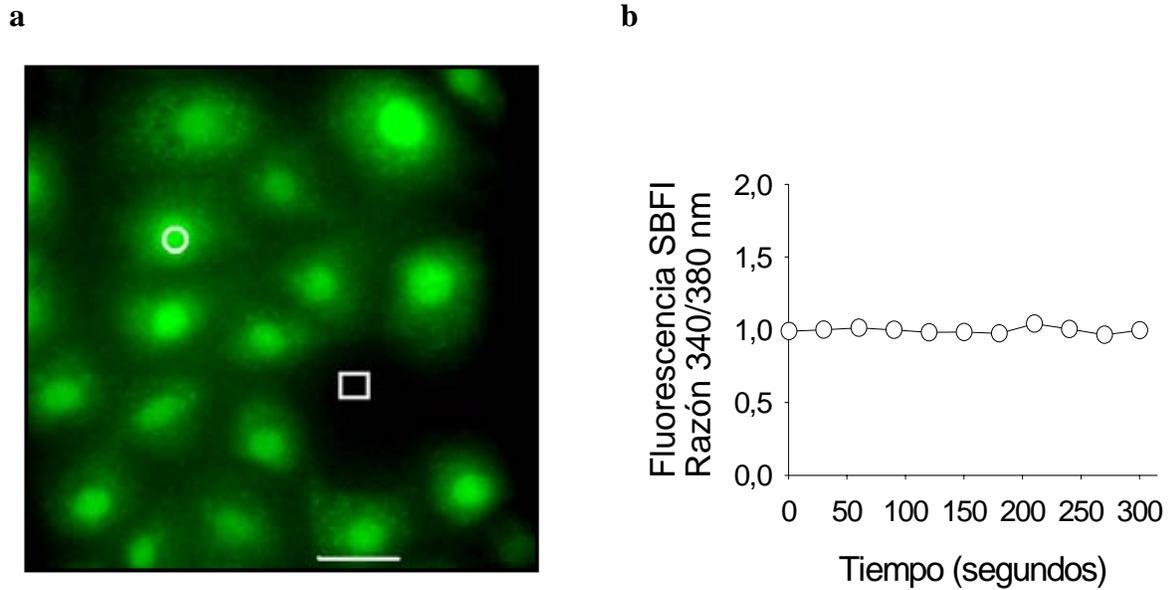
El potencial transmitocondrial fue registrado en células equilibradas con TMRM 100 nM en tampón KRH-glc suplementado con ácido plurónico 0.02%.

Los valores promedio de fluorescencia fueron obtenidos cada 20-30 segundos en ROIs posicionados en agrupaciones de mitocondrias ubicadas en la periferia de los núcleos celulares (Figura 3A). TMRM es una sonda mono-catiónica que atraviesa fácilmente las membranas lipídicas y se concentra en compartimentos intracelulares cargados negativamente. De esta manera las mitocondrias funcionales, que tienen un potencial de membrana aproximado a los -120 mV concentran al fluoróforo. La depolarización mitocondrial ya no permite la retención iónica del fluoróforo en la matriz mitocondrial, lo que se visualiza como una pérdida de la fluorescencia. La fluorescencia de TMRM no se afectó frente a la excitación reiterada a 543 nm (Figura 3b).

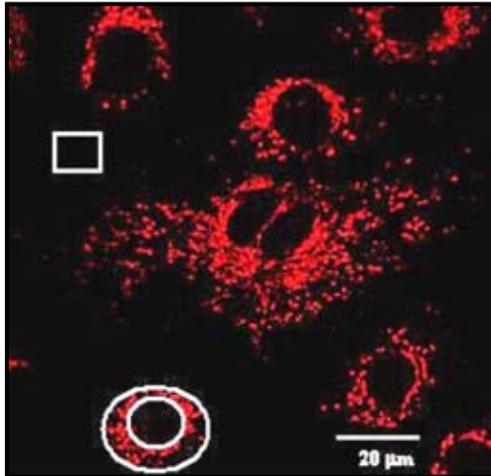
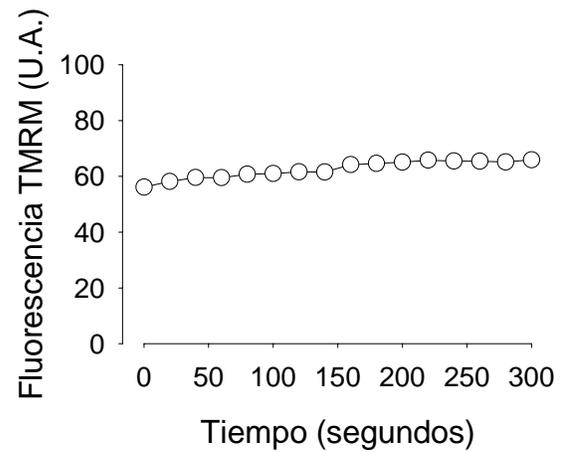
Para expresar los datos de fluorescencia de la sonda TMRM en función del potencial transmitocondrial, se reemplazó en la ecuación de Nernst los valores de fluorescencia de la sonda TMRM cosechados desde agrupaciones de mitocondrias y del espacio extracelular. Las células HeLa en reposo presentan un potencial transmitocondrial del orden de los -150 mV, considerando -30 mV de potencial de membrana y -120 mV de potencial mitocondrial. Con estos datos se estimó el curso temporal del potencial mitocondrial ( $\Psi_{transmit}$ ) en células Clone 9 expuestas a  $H_2O_2$  según la ecuación de Nernst.

$$\Psi_{transmit} = \frac{RT}{FZ} \ln \frac{(TMRM)_{ext}}{(TMRM)_{mit}}$$

En donde R corresponde a la constante de los gases (8.31 J/mol), T corresponde a la temperatura en °K (298 °K), F corresponde a la constante de Faraday (23.062 cal/V ó 96.406 J/V) y Z número de cargas presentes (Z=1).



**Figura 2. Patrón de fluorescencia del Na<sup>+</sup> citosólico evidenciado con la sonda SBFI en células Clone 9.** **a**, El registro de la fluorescencia se realizó en ROIs posicionados en los núcleos celulares (O) y en regiones desprovistas de células (□), para obtener la señal de fondo. La barra representa 20 μm. **b**, Curso temporal de la fluorescencia de SBFI (razón de las emisiones a 535 nm) en ROIs posicionados sobre los núcleos celulares de 8 células ± error estándar. La razón de fluorescencia de SBFI no se afectó frente a la excitación reiterada a 340 nm y 380 nm. La señal de fondo fue sustraída del valor de la fluorescencia cosechada de las células. Se obtuvieron resultados similares en al menos 3 experimentos independientes.

**a****b**

**Figura 3. Patrón de carga mitocondrial de la sonda TMRM en células Clone 9. a,** Imagen obtenida por microscopía confocal de epifluorescencia. El registro de la fluorescencia se realizó en ROIs posicionados en agrupaciones de mitocondrias ubicadas en la periferia de los núcleos celulares (O) y en el espacio extracelular (□), para obtener la señal de fondo. La barra representa 20  $\mu\text{m}$ . **b,** Curso temporal de la fluorescencia de TMRM (unidades arbitrarias) en ROIs posicionados sobre agrupaciones de mitocondrias en 6 células  $\pm$  error estándar. La señal de fondo fue sustraída del valor de la fluorescencia cosechada de mitocondrias. La fluorescencia de TMRM no se afectó frente a la excitación reiterada a 543 nm. Se obtuvieron resultados similares en al menos 3 experimentos independientes.

### **3.2.3 Viabilidad celular.**

#### **3.2.3.1 Actividad enzimática de lactato deshidrogenasa (LDH) en sobrenadantes celulares.**

La estimación de la necrosis fue realizada mediante la cuantificación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al medio extracelular, utilizando el kit LDH-P UV de Winer lab (Rosario, Argentina).

LDH cataliza la conversión de piruvato a L-lactato utilizando como cofactor NADH el cual es oxidado a NAD<sup>+</sup>. El método consiste en la evaluación espectrofotométrica de la velocidad de desaparición de NADH a 340 nm. De esta manera, a medida que exista una mayor cantidad de LDH, más rápida será la velocidad de la reacción.

Las células fueron expuestas a condiciones experimentales en 1 ml de KRH-glc. Los protocolos experimentales fueron realizados a temperatura ambiente (20-22°C) para células Clone 9 y a 37°C con atmósfera humidificada para células HeLa. En experimentos en los cuales se cuantificó la actividad de LDH a las 8 horas, el tampón KRH-glc fue suplementado con SFB 10%. Transcurridos los periodos de incubación se extrajeron 40 µl de sobrenadante al cual se le añadieron 400 µl de la mezcla de sustratos que contiene piruvato 0,6 mM, NADH 0,18 mM y fosfatos 50 mM a pH 7,5. La cinética de desaparición de NADH a 340 nm fue medida por un espectrofotómetro Genesys<sup>TM</sup> 2. Los resultados fueron expresados como porcentaje de la máxima liberación de LDH, medido en presencia del detergente digitonina 100 µM.

### 3.2.3.2 Morfología nuclear

Posterior al tratamiento experimental, los núcleos fueron teñidos con Hoechst-33342 10  $\mu\text{g/ml}$  y yoduro de propidio 2  $\mu\text{g/ml}$ . Las imágenes de los núcleos celulares fueron obtenidas por un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E600. El procesamiento de imágenes para segmentar y parametrizar la morfología de los núcleos fue realizado por el Dr. Steffen Hartel con la ayuda del programa IDL<sup>®</sup> (Research Systems, Co, USA). El primer parámetro morfológico, la entropía, describe el grado de desorden de elementos dentro de un sistema y permite cuantificar la textura de un objeto (Haralick *et al*, 1973). Para un objeto fluorescente, este parámetro distingue entre distribuciones de intensidades homogéneas o heterogéneas. Los núcleos que presenten mayor homogeneidad tendrán valores menores de entropía, comparado a núcleos con intensidades más heterogéneas que presentaran valores de entropía mayores. El segundo parámetro morfológico, el tamaño nuclear, fue calculado a partir del número de píxeles que definen cada núcleo celular (Hartel *et al*, 2003).

### 3.2.3.3 Actividad de Caspasa 3

Posterior al tratamiento con STS 4  $\mu\text{M}$ , las células fueron lisadas con 200  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis (Hepes 10 mM, pH 7,4, KCl 42 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, PMSF 1 mM, EDTA 0,1 mM, EGTA 0.1 mM, DTT 1 mM, pepstatina A, aprotinina 5  $\mu\text{g/ml}$ , y CHAPS al 0,5%. Posteriormente un volumen de 15  $\mu\text{l}$  del lisado fue agregado a 150  $\mu\text{l}$  de tampón de reacción (Hepes 25 mM, EDTA 1 mM, CHAPS 0,1%, sucrosa 10%, DTT 3 mM, pH 7,5 y 10  $\mu\text{M}$  del sustrato de Caspasa 3 Ac-DEVD-pNA. La actividad enzimática de Caspasa-3 fue determinada a través de un ensayo colorimétrico, basado en el clivaje del sustrato coloreado Ac-DEVD-pNA. La cinética de aparición de pNA clivado se obtuvo midiendo

la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro Genesys™ 2. El contenido de proteínas totales fue estimado según el método de Bradford, utilizando una curva de calibración con albúmina de suero bovino (Winkler, Chile).

#### **3.2.3.4 Análisis de fragmentación de DNA**

Se utilizó un protocolo descrito por Laird *et al*, 1991 con algunas modificaciones. Posterior la tratamiento experimental, las células se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) y colectadas con tripsina 0,05%. Luego se incubaron con tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM, EDTA 5 mM, SDS 0,5%, NaCl 0,2 M y proteinasa K 0,1 mg/ml) por 90 minutos a 37 °C con agitación.

Luego se agregó un volumen de isopropanol al lisado y se mezcló por 20 minutos a temperatura ambiente, luego se centrifugó durante 6 minutos a 6000 x g.

El precipitado se lavó 3 veces con 0,5 ml de etanol al 75% y fue resuspendido en tampón Tris HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM (TAE), pH 7,5.

El RNA residual de cada muestra fue removido con RNAasa A 170 µg/ml por 60 minutos a 37°C con agitación.

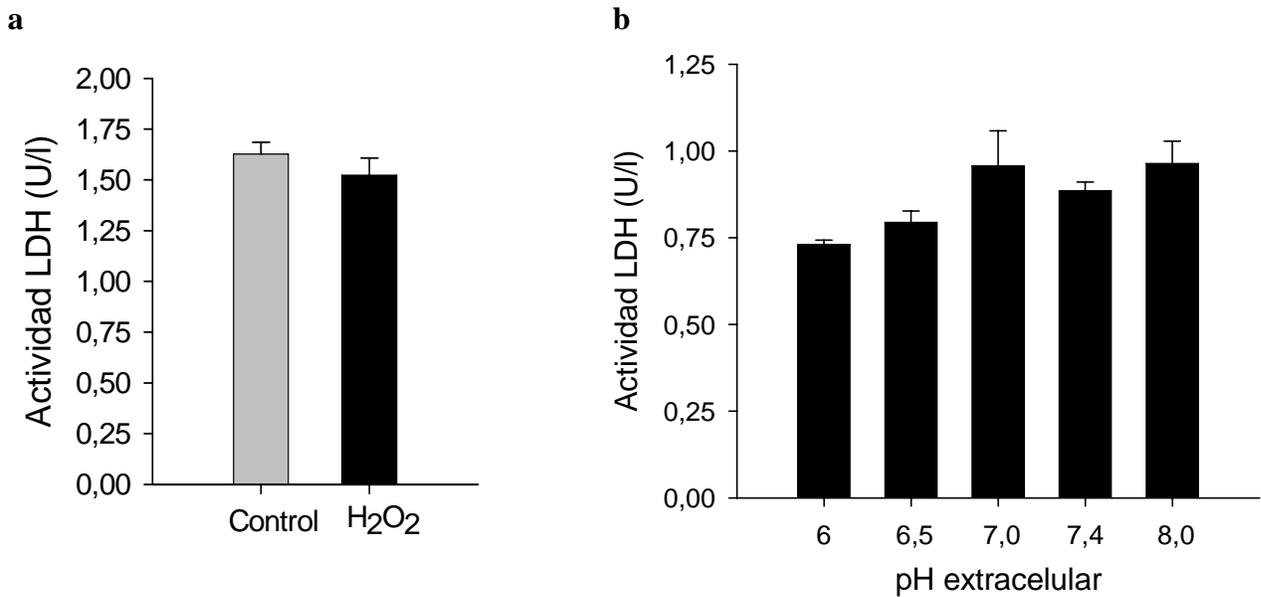
Las muestras de DNA se cargaron en geles de agarosa al 1,5% en tampón TAE, luego fueron sometidas a electroforesis a 60 mV y 150 mA por 60 minutos. Las muestras de DNA fueron visualizadas por tinción con bromuro de etidio sobre un transiluminador ultravioleta.

### **3.2.4 Ensayos para descartar posibles artefactos producidos por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las propiedades fluorescentes de las sondas y en la actividad enzimática de LDH.**

Debido a la posibilidad que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a altas concentraciones afecte las propiedades de las sondas fluorescentes y la actividad de la enzima LDH, se realizaron experimentos controles que se resumen a continuación.

(i) Los espectros de absorción y de emisión de las sondas Fluo-3, Sodium Green (desesterificadas) y TMRM no fueron afectados significativamente por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 32 mM. Datos obtenidos por fluorimetría (LS 55 Perkin-Elmer) (Bittner C.X., 2002; Castro *et al*, 2004).

(ii) La actividad enzimática de LDH no se afectó significativamente en células expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 32 mM y variación de pH extracelular (Figura 4). La insensibilidad de la actividad de LDH a cambios de pH extracelular en el rango 6,0 a 8,0 (Figura 4b) permite la interpretación directa de los resultados presentados en la Figura 6b.



**Figura 4. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la variación de pH extracelular no interfieren significativamente en la actividad de LDH. a,** Células Clone 9 fueron incubadas en tampón KRH-glc en presencia (barras negras) o ausencia (barra gris) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **b,** Células Clone 9 fueron incubadas en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en tampón KHR-glc variando el pH (6,0; 6,5; 7,0; 7,4 y 8,0). Posterior a 3 horas de tratamiento, las células se permeabilizaron con digitonina 100  $\mu$ M y se cuantificó la actividad de LDH, expresada en U/l. No se apreciaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ( $p > 0,05$ ). Los datos representan el promedio de 3 experimentos realizados por duplicado  $\pm$  error estándar.

### 3.2.5 Análisis de datos.

El valor del  $TE_{50}$  se obtuvo a partir del ajuste a una función sigmoídea de tres parámetros;  $M = M_{max} / (1 + (t/TE_{50})^a)$ . Donde  $M$  = mortalidad;  $M_{max}$  = mortalidad máxima;  $t$  = tiempo;  $TE_{50}$  = tiempo en el cual el 50% de las células han perdido viabilidad y  $a$  = coeficiente de inflexión.

La frecuencia de distribución ( $F$ ) de los valores de  $TE_{50}$  fue obtenida al graficar la siguiente función logarítmica  $F = A * e[-0,5 * (\ln(t_{1/2}/Pico)/B)^2]$ .

Los análisis de datos se realizaron con el programa Sigma Plot (Jandel Scientific, CA) y son presentados como promedio  $\pm$  error estándar. La significancia estadística fue evaluada usando la prueba *t student* para comparar dos muestras. Los datos obtenidos de múltiples grupos fueron evaluados por ANOVA multifactorial. Se consideró significancia estadística cuando  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Altas dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son necesarias para inducir necrosis en células Clone 9.

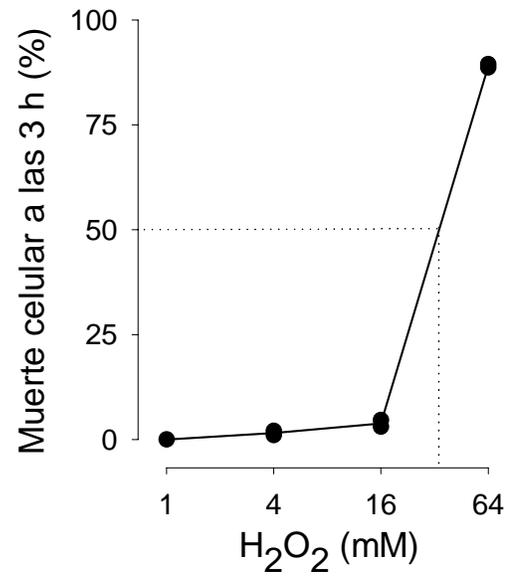
Inicialmente se determinó la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> necesaria para inducir la lisis celular tras 3 horas de tratamiento continuo con el oxidante, tiempo usual para que ocurra la necrosis en condiciones fisiopatológicas como isquemia-reperfusión y exposición a oxidantes fuertes (Majno, G. y Joris, I., 1995).

Las células Clone 9 fueron expuestas a concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1, 4, 16, 64 mM en tampón KRH-glc. Luego de 3 horas de tratamiento continuo con el oxidante se estimó la muerte celular en función de la liberación de LDH al medio extracelular (Figura 5).

A partir de la curva de dosis respuesta de células Clone 9 se observa que a 32 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aproximadamente el 50% de la población celular liberó su LDH luego de 3 horas de tratamiento continuo con el oxidante. Esta concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se escogió para inducir la necrosis en células Clone 9.

### 4.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce la vía canónica de necrosis celular, dependencia de cationes y pH extracelular en la muerte oxidativa.

El paso siguiente consistió en evaluar si este protocolo de estrés oxidativo induce la vía canónica de la necrosis epitelial que requiere de la entrada de iones Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> para su manifestación (Barros *et al*, 2002; Ermak *et al*, 2002; Padanilam *et al*, 2003). Para ello se realizaron experimentos de muerte celular en células Clone 9 incubadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 3 horas continuas en tampón KRH-glc.



**Figura 5. Altas dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son necesarias para que ocurra la necrosis en células Clone 9.** Las células fueron expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por los tiempos indicados. La muerte celular fue estimada a través de la actividad de la enzima LDH. Los datos son representados como promedio  $\pm$  error estándar de 3 experimentos realizados por duplicado.

El tampón KRH se privó de iones  $\text{Na}^+$  reemplazando equimolarmente por  $\text{NMDG}^+$  y el  $\text{Ca}^{2+}$  fue secuestrado utilizando 10 mM EGTA.

Ambos tratamientos inhibieron significativamente la necrosis en células Clone 9 (Figura 6). El experimento control realizado en células expuestas a  $\text{H}_2\text{O}_2$  en tampón KRH-glc, provocó la lisis del  $84,2 \pm 4,3\%$  ( $n=3$ ) de la población celular, el reemplazo equimolar del  $\text{Na}^+$  por  $\text{NMDG}^+$  en el tampón KRH-glc causó la lisis del  $37,5 \pm 10,2\%$  ( $n=3$ ), mientras que el secuestro del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular con EGTA 10 mM lisó sólo el  $5,5 \pm 2,5\%$  ( $n=3$ ) de la población celular.

Otro evento característico observado en células sometidas a estrés oxidativo es la acidificación intracelular, fenómeno atribuido a la liberación de iones  $\text{H}^+$  producto de la masiva hidrólisis de ATP (Wu *et al*, 1996). Además existen reportes que la acidosis extracelular estaría actuando como un agente protector ante la muerte celular oxidativa en células sinusoidales hepáticas (Bronk *et al*, 1991) por un mecanismo asociado a una baja de la tasa de oxidación del cofactor NADPH.

En base a estos antecedentes investigamos el rol del pH y  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular en nuestro modelo de estrés oxidativo. Para ello células Clone 9 fueron expuestas a  $\text{H}_2\text{O}_2$  variando el  $\text{Ca}^{2+}$  (0,125 mM, 1,25 mM y 12,5 mM) y pH (6,0; 7,0; 7,4 y 8,0) extracelular, luego de 3 horas de tratamiento continuo con  $\text{H}_2\text{O}_2$  se cuantificó la necrosis en función de la LDH liberada al medio extracelular.

Se observó una significativa protección de la muerte necrótica en células expuestas a condiciones ácidas (pH 6,0) y bajo calcio extracelular (0.125 mM). Por el contrario, células expuestas a condiciones alcalinas (pH 8,0) y altas concentraciones

de calcio extracelular (12,5 mM) fueron significativamente más susceptibles a la lisis necrótica (Figura 6b).

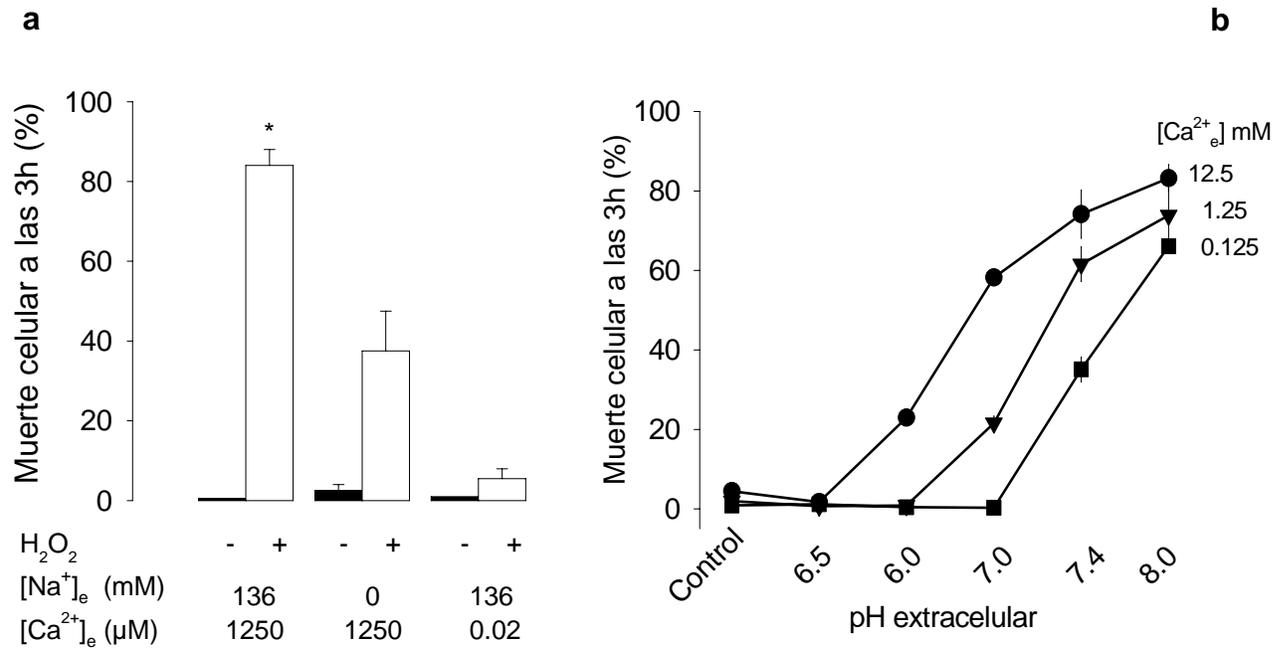
Estos resultados indican que este tratamiento oxidativo dañó a las células por mecanismos dependientes de la sobrecarga de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y protección por acidosis extracelular.

#### **4.3 Identificación del punto de no retorno (PNR) en células Clone 9.**

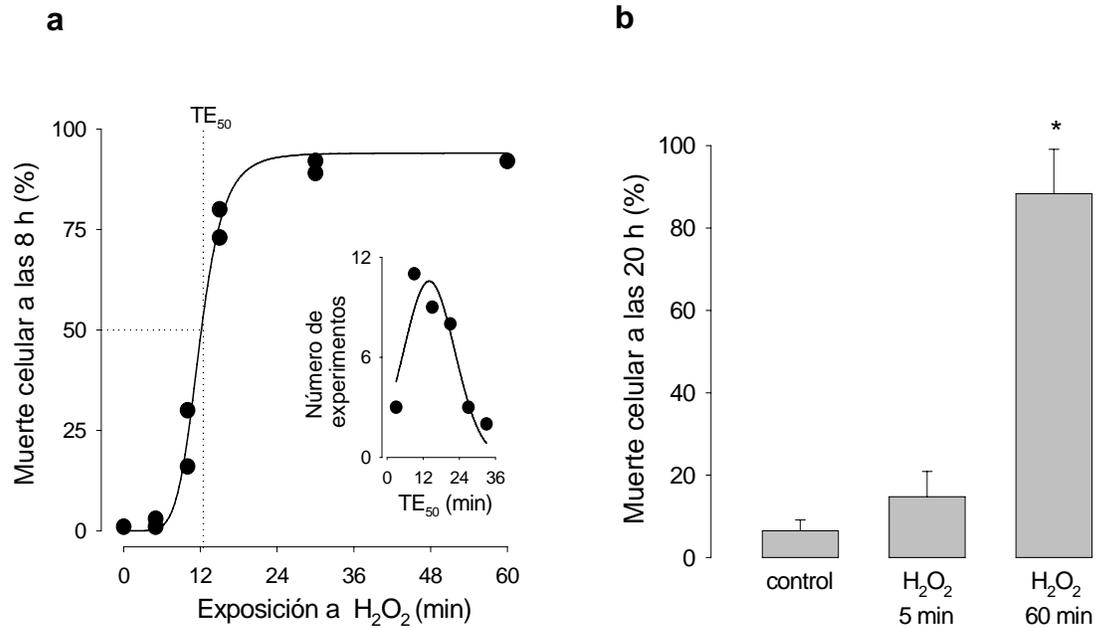
Con el fin de definir temporalmente el momento donde la necrosis se torna irreversible, las células Clone 9 fueron expuestas por tiempos crecientes (0; 5; 10; 15; 30 y 60 minutos) a  $\text{H}_2\text{O}_2$  en tampón KRH-glc. Luego de 8 horas se cuantificó la actividad de LDH.

Para 36 experimentos independientes, se requirieron  $14 \pm 2$  minutos de exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$  para lisar el 50% de la población celular ( $\text{TE}_{50}$ ), dato obtenido al ajustar una curva sigmoidea de 3 parámetros, detallada en Material y Métodos. La Figura 7a muestra que posterior a 10 minutos de exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$  ocurre un agudo incremento de la muerte necrótica. El inserto de la figura 7a detalla la distribución de los valores de  $\text{TE}_{50}$  que fluctuaron entre 10-20 minutos. En experimentos realizados en células sobre pasaje 30 se obtuvieron valores de  $\text{TE}_{50}$  sobre los 20 ó 30 minutos.

Además se evaluó la viabilidad en el tiempo de células sometidas por 5 minutos a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Este tratamiento no afectó la viabilidad de las células registrada a las 20 horas posteriores (Figura 7 b).



**Figura 6.  $H_2O_2$  induce la vía canónica de necrosis celular, dependencia de cationes y pH extracelular en la muerte oxidativa.** **a**, Las células fueron incubadas en presencia (barras grises) o ausencia (barras negras) de  $H_2O_2$  en tampón KRH-glc, el  $Na^+$  fue reemplazado equimolarmente por  $NMDG^+$  y el  $Ca^{2+}$  fue quelado con 10 mM EGTA. El retiro de los iones  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  protegió significativamente la muerte necrotica (\*  $p < 0.05$ ). **b**, Las células fueron incubadas en presencia de  $H_2O_2$  en tampón KRH-glc, variando el  $Ca^{2+}$  (●, 12,5 mM; ▼, 1,25 mM y ■, 0,125 mM) y pH extracelular, como experimento control se muestra el porcentaje de mortalidad en células sin tratamiento oxidativo en KRH-glc pH 7.4. Los datos son representados como promedio  $\pm$  error estándar de 3 experimentos realizados por duplicado.



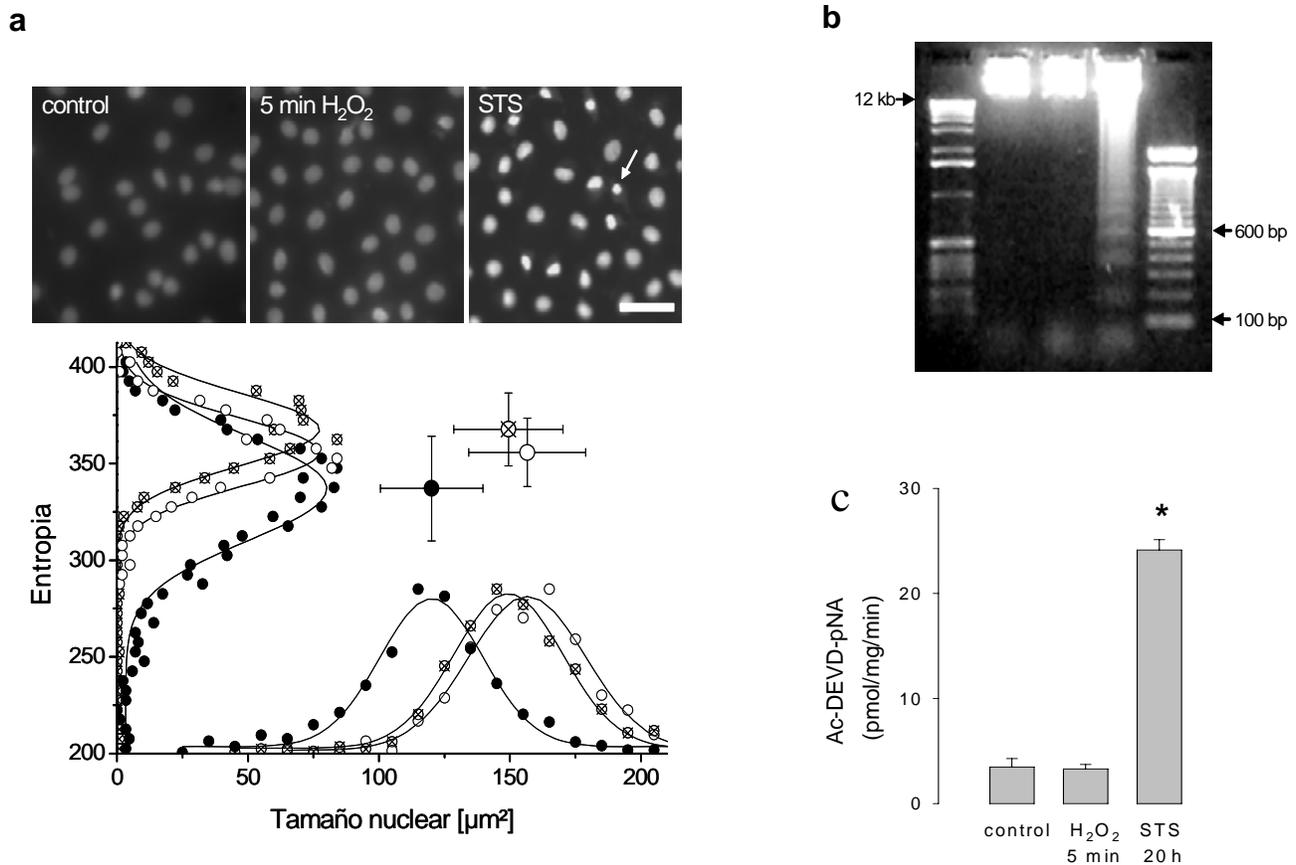
**Figura 7. Identificación del punto de no retorno (PNR) en células Clone 9.** **a**, Células Clone 9 fueron expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por tiempos crecientes, luego se lavó el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se incubaron en tampón KRH-glc. Ocho horas después se cuantificó la necrosis (LDH liberada). En este experimento se necesitaron aproximadamente 12 minutos para lisar el 50% de las células (ET<sub>50</sub>), valor obtenido del ajuste a una función sigmoidea de tres parámetros. El inserto muestra la distribución de los valores de ET<sub>50</sub> para 36 experimentos independientes. **b**, Viabilidad de células Clone 9 posterior a 20 horas determinada por liberación de LDH en células expuestas por 0, 5 y 60 minutos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incubadas en tampón KRH-glc suplementado con SFB 10%. No se apreciaron diferencias estadísticas significativas entre el experimento control y tratamiento breve con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 minutos) ( $p > 0.05$ ). Los datos son representados como promedio  $\pm$  error estándar de 3

experimentos realizados por duplicado.

#### **4.4 Ausencia de apoptosis en células rescatadas antes del PNR.**

Si bien es cierto un tratamiento breve de 5 minutos con  $\text{H}_2\text{O}_2$  no perturbó la viabilidad celular medida a las 20 horas posteriores (Figura 7b), se ha descrito que dosis micromolares de  $\text{H}_2\text{O}_2$  induce apoptosis en células promonocíticas U-937 (Troyano *et al*, 2003). La apoptosis fue evaluada mediante 3 métodos independientes; estructura nuclear, actividad de caspasa 3 e integridad del DNA genómico. Se utilizó como control positivo de inducción de apoptosis staurosporina (STS) 4  $\mu\text{M}$ .

Posterior al protocolo experimental (exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 5 minutos y STS 4 $\mu\text{M}$  durante 8 horas) se capturaron las imágenes de los núcleos de células Clone 9 teñidos con yoduro de propidio 2  $\mu\text{g/ml}$  y Hoechst 10  $\mu\text{g/ml}$ . A partir de la distribución de fluorescencia de la cromatina nuclear se cuantificaron los parámetros morfológicos de tamaño y textura nuclear descritos en Material y Métodos (Haralick *et al*, 1973; Hartel *et al*, 2003). Las células tratadas con STS 4  $\mu\text{M}$  desarrollaron un encogimiento y condensación nuclear típico de células apoptóticas, contrario a la morfología de las células expuestas a  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 5 minutos, que presentaron una morfología similar a los núcleos controles (Figura 8 a). La Figura 8 b muestra la actividad de caspasa 3 (experimento desarrollado por el Sr. Joel Castro) medida 8 horas después del tratamiento breve con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5 minutos), esta no difiere del grupo control. El tratamiento con STS durante 8 horas aumentó significativamente la actividad de caspasa 3 como era esperado. La integridad del DNA genómico de estas células se evaluó posterior a 20 horas del tratamiento breve con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 8 c). El DNA de estas células se encontró intacto al igual que el de las células controles.



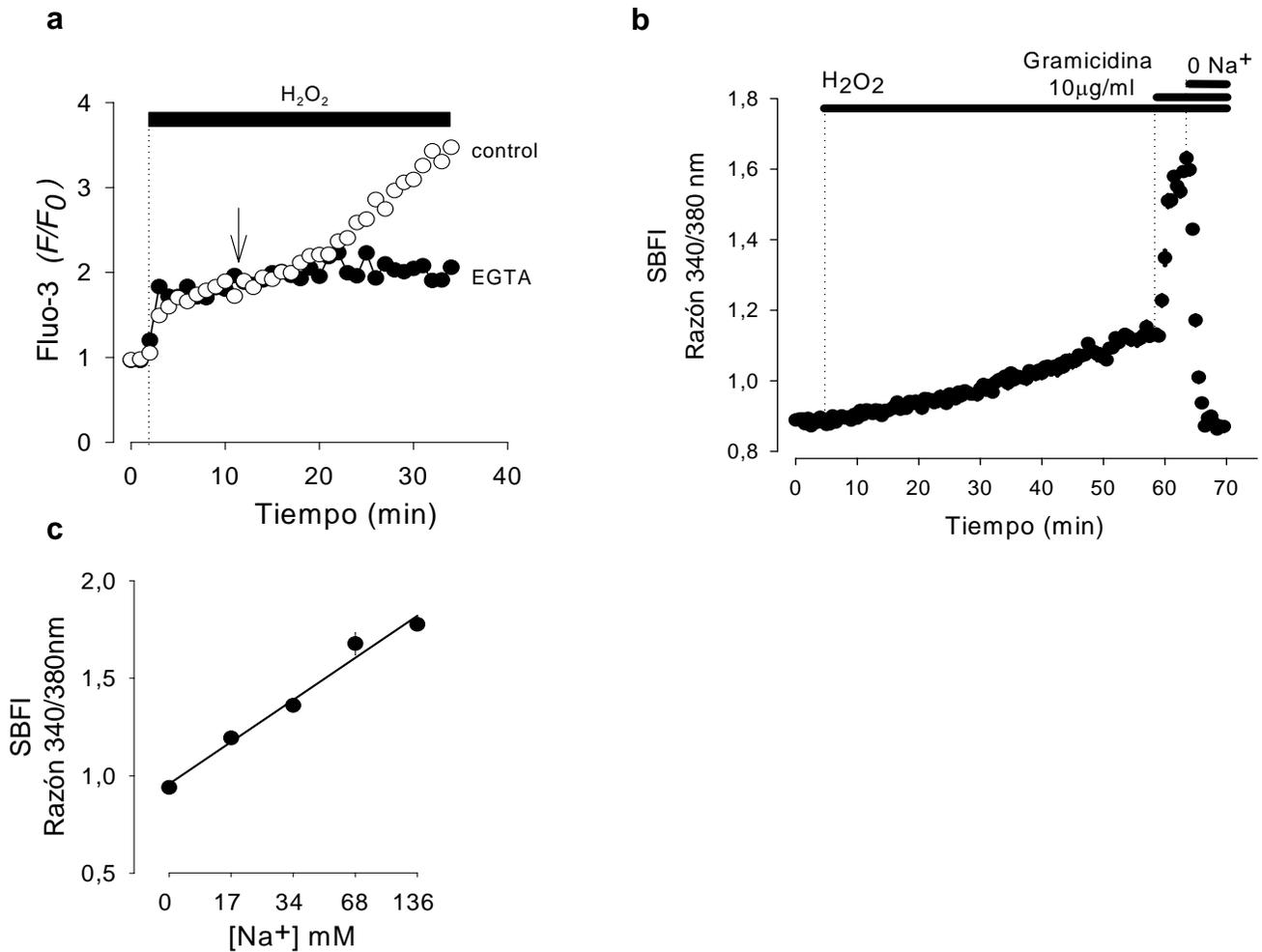
**Figura 8. Ausencia de apoptosis en células rescatadas antes del PNR. La apoptosis fue evaluada mediante 3 métodos independientes.** Como control positivo se utilizó staurosporina (STS) 4  $\mu\text{M}$ . **a**, La estructura nuclear (círculos blancos), cuantificada mediante parámetros de textura y morfología, no se ve afectada posterior a 8 horas de exposición breve a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (círculos cruzados), comparado con la condensación nuclear (ver flecha) observada en células tratadas con STS (círculos negros). Los datos representan el promedio  $\pm$  error estándar (709-973 células). La barra corresponde a 50  $\mu\text{m}$ . **b**, La actividad de caspasa 3 medida 8 horas después del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 minutos) no difiere del grupo control ( $p > 0.05$ ). Datos promedio de 3 experimentos  $\pm$  error estándar respecto al control. **c**, Ausencia de fragmentación apoptótica del DNA genómico en respuesta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 minutos).

El tratamiento con STS causó la fragmentación enzimática del DNA, evento tardío característico de células apoptóticas. Estos experimentos indican que células Clone 9 son resistentes a un daño sub-necrótico (5 minutos  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ya que no se apreciaron rastros de necrosis a mediano plazo.

#### **4.5 $\text{H}_2\text{O}_2$ induce sobrecargas tardías de $\text{Na}^+$ y $\text{Ca}^{2+}$ .**

La vía canónica de la muerte celular necrótica se caracteriza por una ganancia neta de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . El tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  indujo un aumento bifásico del calcio citosólico, registrado con la sonda Fluo-3 (Figura 9 a). El alza inicial del calcio intracelular alcanzó una nueva meseta, con alzas de 2 a 3 veces la señal basal prolongada durante  $20 \pm 5$  minutos ( $n=3$ ). Esta alza fue insensible a EGTA, lo que sugiere un origen intracelular (Castro *et al.*, 2004). El secuestro del calcio extracelular con EGTA 10 mM inhibió el alza secundaria, lo que sugiere que el divalente proviene del medio extracelular (Figura 9 a). En forma paralela se midió el  $\text{Na}^+$  intracelular con la sonda ratiométrica SBFI (Figura 9 b). El tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  provocó una lenta y sostenida alza del  $\text{Na}^+$  intracelular. La exposición a gramicidina (20  $\mu\text{g/ml}$ ) aumentó la señal de fluorescencia, indicando el ingreso de sodio extracelular, que alcanzó el equilibrio con el  $\text{Na}^+$  extracelular.

El reemplazo del ión  $\text{Na}^+$  por  $\text{K}^+$  en presencia de gramicidina causó un abrupto descenso de la señal de fluorescencia, lo que demuestra la especificidad de la sonda a iones  $\text{Na}^+$ .



**Figura 9. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce sobrecargas tardías de sodio y calcio.** **a**, Células cargadas con Fluo-3 en presencia (círculos blancos) o en ausencia (círculos negros) de calcio extracelular. La flecha indica el punto de inflexión de la curva, señalando el inicio de la acumulación secundaria de Ca<sup>2+</sup>. Los datos representan el promedio de 8-10 células, representativo de 3 experimentos por separado. **b**, Células cargadas con SBFI. La exposición a gramicidina (20 μg/ml) aumentó la señal hasta alcanzar el equilibrio con el Na<sup>+</sup> extracelular (136 mM). **c** Representa la calibración de la sonda a 0, 17, 34, 68 y 136 mM de Na<sup>+</sup> en células tratadas con gramicidina. Los datos representan el promedio 3 experimentos ± error estándar.

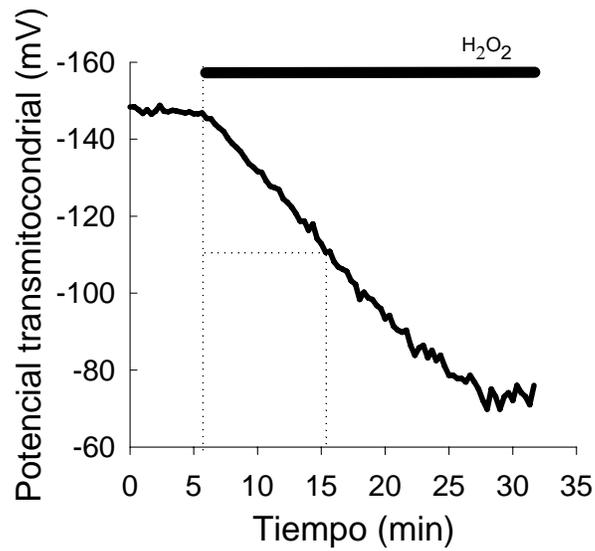
#### 4.6 Caída del potencial transmitocondrial en células sometidas a estrés oxidativo.

El mecanismo descrito por el cual el estrés oxidativo desarticula la función mitocondrial es un fenómeno denominado transición de la permeabilidad mitocondrial (Green *et al*, 2004). El aumento de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, fosfatos inorgánicos (Pi) y oxidantes, promueven la apertura de poros de alta conductancia en la membrana interna de la mitocondria que permiten el paso de moléculas de masa molecular inferior a 1500 Dalton. La formación de estos poros causan la depolarización mitocondrial y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Crompton *et al*, 1999).

Para evaluar la función mitocondrial de células sometidas a estrés oxidativo, se registró en tiempo real el potencial transmitocondrial en células Clone 9, cargadas con la sonda mono-catiónica TMRM. El potencial transmitocondrial corresponde a la suma vectorial del potencial mitocondrial ( $\sim -120$  mV) y el potencial a través de la membrana plasmática ( $\sim -30$  mV). La Figura 10 muestra el curso temporal del potencial transmitocondrial, estimado con la ecuación de Nernst (ver Material y Métodos) en células expuestas a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El  $t_{1/2}$  de la depolarización alcanzó los  $14.6 \pm 2.6$  minutos ( $n=4$ ). Este resultado es concordante con la literatura, donde se ha descrito que los eventos iniciales que ocurren frente a células sometidas a estrés oxidativo corresponden a alzas de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y depolarización mitocondrial (Lemasters *et al*, 1987). En los 4 experimentos realizados la depolarización no fue completa, y el potencial se estabilizó a los  $-81.8 \pm 4.6$  mV. Dado que ésta estimación representa a una población de mitocondrias (ver Figura 3A) no es posible saber si el potencial remanente indica una depolarización parcial o una depolarización total de una sub-población de mitocondrias.

Otros estudios obtenidos en nuestro laboratorio han demostrado que durante la exposición a  $H_2O_2$ , células HeLa pierden el potencial de membrana plasmática con un  $t_{1/2}$  del orden de los 10 minutos (Castro et al, 2005).

Según la cronología de eventos que suceden en células Clone 9 sometidas a estrés oxidativo, el  $t_{1/2}$  de caída del potencial transmitocondrial coincide con el tiempo en que las células transitan por el punto de no retorno ( $14 \pm 2$  minutos, Figura 7). En base a ésta observación se idearon experimentos con el fin de evaluar la contribución de la pérdida de función mitocondrial en la irreversibilidad necrótica.



**Figura 10. Caída del potencial transmitocondrial en células sometidas a estrés oxidativo.** Las células fueron expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por aproximadamente 25 minutos en presencia continua de TMRM. Se muestra un curso temporal promedio (6 células) de la caída del potencial  $\pm$  error estándar. El tiempo medio de caída del potencial transmitocondrial para éste experimento alcanzó el orden de los 9 minutos. El promedio del tiempo medio de caída del potencial para 4 experimentos independientes alcanzó los  $14.6 \pm 2.6$  minutos.

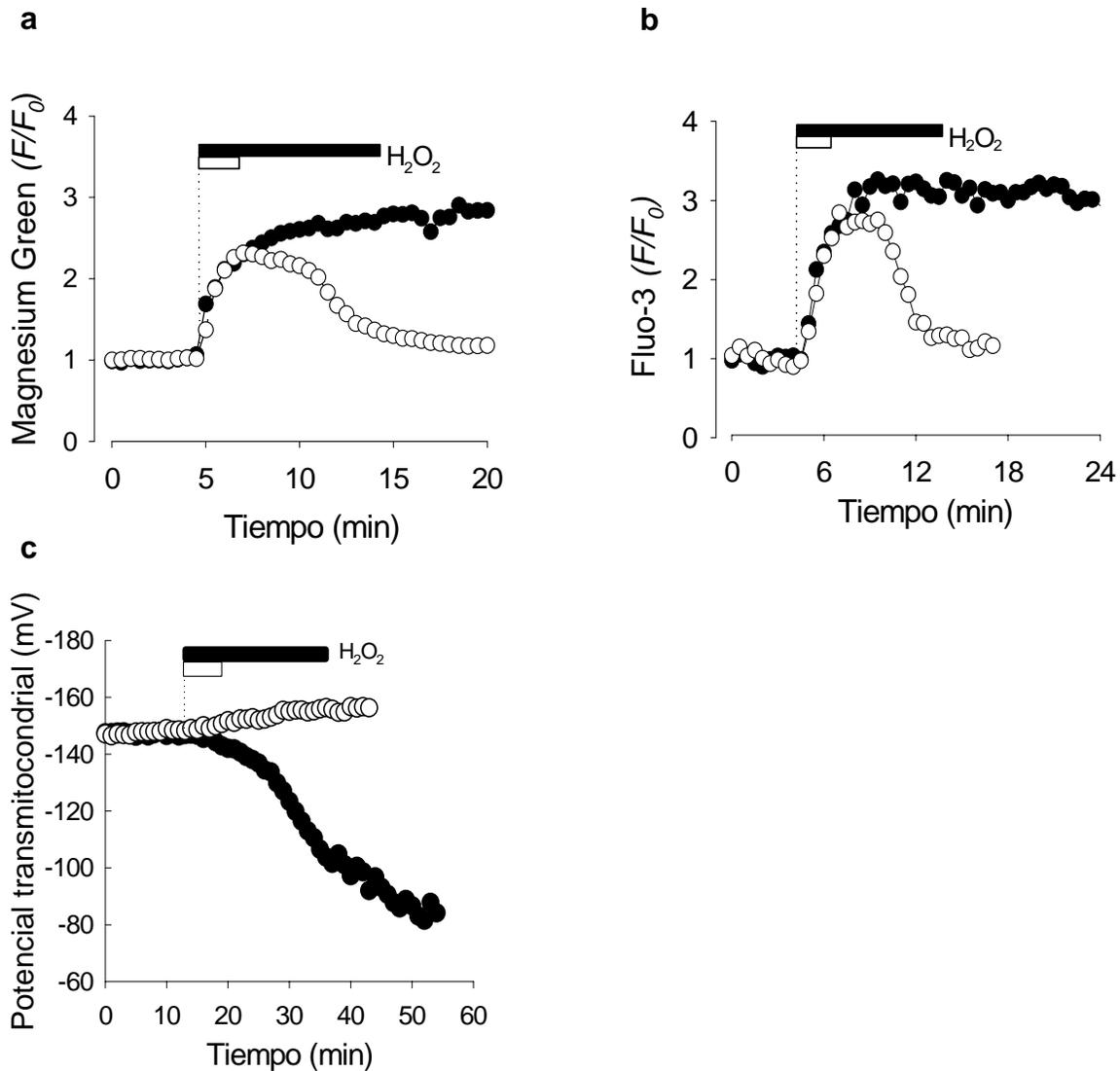
#### **4.7 Reversibilidad de los cambios iónicos y potencial transmitocondrial al remover el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> antes del PNR.**

Si los cambios iónicos y la caída del potencial transmitocondrial fueran relevantes para la irreversibilidad necrótica, sería esperable que la remoción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> antes del PNR normalice estos parámetros a los niveles basales. Para comprobar esta predicción, células Clone 9 fueron sometidas a exposiciones breves con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2-5 minutos), con el fin de evaluar la dinámica de los eventos tempranos que ocurren en células Clone 9 sometidas a estrés oxidativo.

Las células fueron cargadas con Magnesium Green para estimar los niveles de Mg<sup>2+</sup> citosólico que varía recíprocamente con la concentración de ATP, Fluo-3 para estimar los niveles de Ca<sup>2+</sup> citosólico y TMRM para el registro del potencial transmitocondrial. La remoción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> antes del PNR provocó una rápida regulación del Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> citosólicos a niveles basales (Figura 11a y 11b). Este tratamiento causó una leve hiperpolarización mitocondrial (Figura 11c), fenómeno atribuible a la sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> del organelo (Castro *et al*, 2004).

Células expuestas por tiempo más prolongado a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10-30 minutos) no fueron capaces de regular las alzas de Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> o revertir la depolarización mitocondrial.

Estos resultados demuestran que las células Clone 9 son capaces de recuperar rápidamente su homeostasis iónica, además de permanecer viables en el tiempo (Figura 7b). Al prolongarse el estímulo, éstas células no fueron capaces de recuperar su homeostasis iónica y potencial transmitocondrial.



**Figura 11. Reversibilidad de los cambios iónicos y potencial transmitocondrial al remover el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> antes del PNR.** Las células fueron expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 2-5 minutos (○) o 10-30 minutos (●). **a**, Medición del Mg<sup>2+</sup> citosólico con Magnesium Green. **b**, Calcio citosólico medido con Fluo-3. **c**, Potencial transmitocondrial en presencia continua de TMRM. Estos resultados representan un experimento promedio de 8-10 células ± error estándar, resultados similares se obtuvieron en 3 experimentos independientes.

#### 4.8 La función mitocondrial determina el PNR.

Los resultados obtenidos hasta ahora dan cuenta que células Clone 9 son capaces de recuperarse frente a exposiciones breves a  $H_2O_2$  (Figuras 7 b, 8 y 11). Sobre los 10 minutos de exposición a  $H_2O_2$  ocurrió un agudo incremento de la tasa de mortalidad de estas células (Figura 7a). Al observar que la depolarización mitocondrial ocurrió al tiempo en que las células alcanzan el PNR, se idearon experimentos con el fin de revelar si el daño mitocondrial es relevante en la irreversibilidad en nuestro modelo de muerte celular.

Las células Clone 9 fueron expuestas a tiempos crecientes con  $H_2O_2$  en tampón KRH-glc SFB 10%, adicionando los inhibidores metabólicos mitocondriales rotenona 2  $\mu$ M, FCCP 2  $\mu$ M y el inhibidor de la formación del poro de transición mitocondrial CsA 100  $\mu$ M, preincubado durante 1 hora antes de agregar  $H_2O_2$ . Paralelo a estas intervenciones mitocondriales se realizaron experimentos controles con células expuestas sólo a  $H_2O_2$ , la necrosis fue evaluada posterior a 8 horas del tratamiento indicado.

La Figura 12 muestra que el tratamiento con los inhibidores metabólicos mitocondriales rotenona y FCCP en presencia de  $H_2O_2$  adelantaron significativamente el PNR en células Clone 9. Estos compuestos inhiben la síntesis de ATP mitocondrial pero tienen un efecto opuesto sobre el potencial redox celular. El tratamiento con rotenona (Figura 12a) adelantó significativamente la muerte necrótica de estas células con un  $TE_{50} = 4,9 \pm 1,3$  minutos ( $n=3$ ), comparado con el experimento control de células tratadas sólo con  $H_2O_2$  que alcanzaron valores de  $TE_{50} = 26,4 \pm 3,6$  minutos ( $n=3$ ). El tratamiento con FCCP (Figura 12b) también facilitó la lisis temprana de estas células con un  $TE_{50} = 1,8 \pm 0,4$  minutos ( $n=5$ ), al comparar el experimento control con células tratadas sólo con  $H_2O_2$ , las que murieron con un  $TE_{50} = 21,9 \pm 4,6$  minutos ( $n=5$ ).

Además se realizaron experimentos controles en donde las células fueron expuestas sólo a rotenona y FCCP, este tratamiento no afectó la viabilidad de estas células, obteniéndose valores similares a los de células controles expuestas sólo a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

También se evaluó el efecto de la inhibición de la formación del poro de transición mitocondrial en el PNR con CsA 100 µM. El tratamiento conjunto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de CsA (Figura 10c) retardó el PNR, con valores de TE<sub>50</sub>= 23,9 ± 1,6 minutos (n=3), mientras que el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> arrojó valores de ET<sub>50</sub>= 12,6 ± 1,5 minutos (n=3).

Estos experimentos muestran que la inhibición de la síntesis mitocondrial de ATP con FCCP y rotenona adelantaron significativamente el PNR en células Clone 9. Por el contrario, la inhibición de la transición de permeabilidad mitocondrial con CsA retardó el PNR. La Figura 12d se representa un resumen del desplazamiento del ET<sub>50</sub> frente a la inhibición de la fosforilación oxidativa mitocondrial e inhibición de la síntesis del poro de transición mitocondrial con CsA.

#### **4.9 La inhibición de la función mitocondrial no adelanta la sobrecarga secundaria de $\text{Ca}^{2+}$ en células Clone 9 sometidas a estrés oxidativo.**

El paso siguiente fue investigar el mecanismo por el cual la pérdida de función mitocondrial adelantó significativamente el PNR en células Clone 9 sometidas a estrés oxidativo.

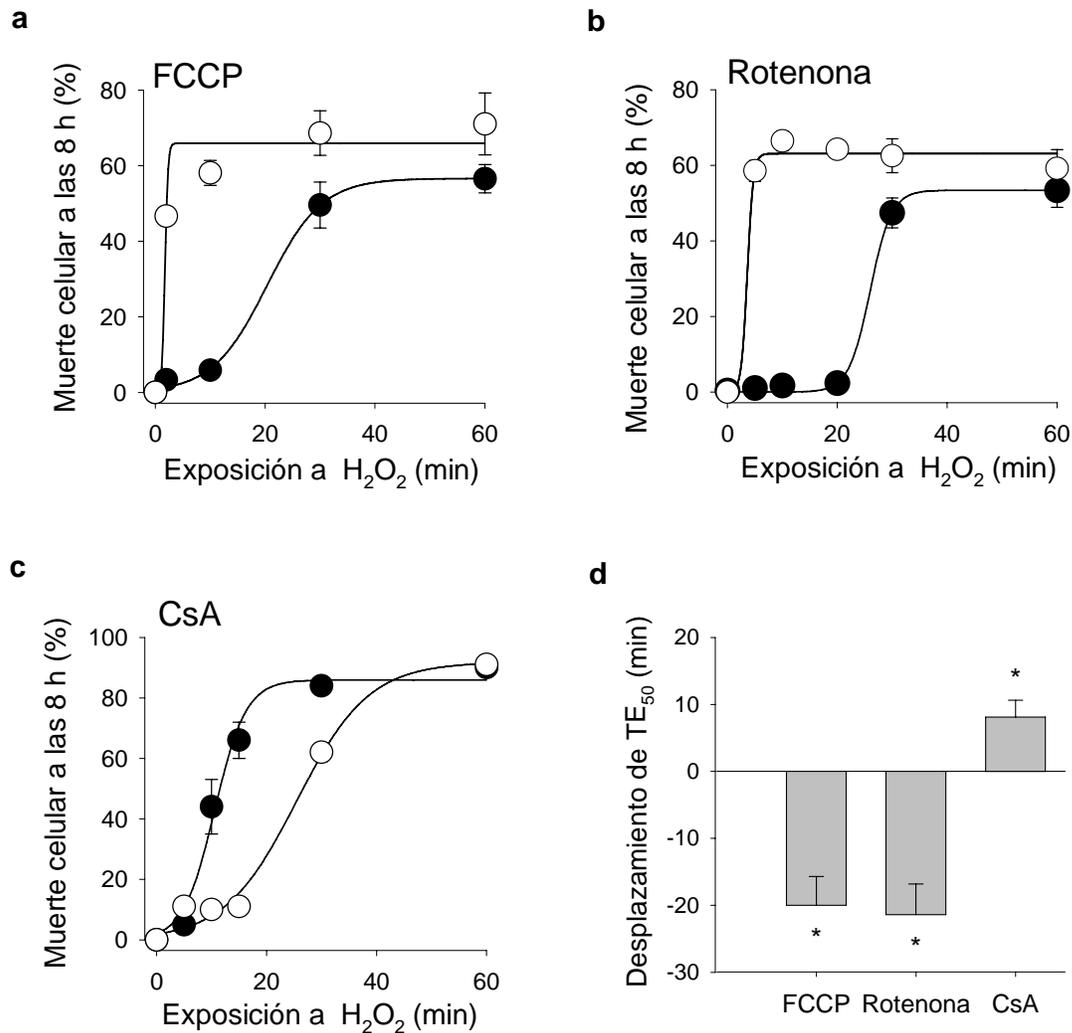
La homeostasis del calcio intracelular depende de la armonía de varios sistemas intracelulares, entre los que se han descrito proteínas citosólicas, organelos como la mitocondria, retículo endoplásmico, intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y la bomba de calcio (PMCA) ubicados en la membrana plasmática. Durante los primeros minutos de estrés oxidativo la señal del calcio intracelular alcanzó una nueva meseta con concentraciones aproximadas a los 300-400 nM (Castro *et al*, 2004). Esto sugiere que el nuevo estado estacionario del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es mantenido por la actividad de la PMCA, una bomba de calcio ATP dependiente ubicada en la membrana plasmática que posee una alta afinidad a calcio con una baja tasa del transporte (Carafoli *et al*, 2001), una pérdida de función de esta proteína probablemente desencadenaría la sobrecarga tardía de calcio en células sometidas a estrés oxidativo.

Como la depolarización mitocondrial ocurrió a tiempos en que las células comienzan a cargarse de  $\text{Ca}^{2+}$ , se evaluó la relevancia de la inhibición metabólica mitocondrial en la sobrecarga tardía del calcio citosólico inducida por estrés oxidativo.

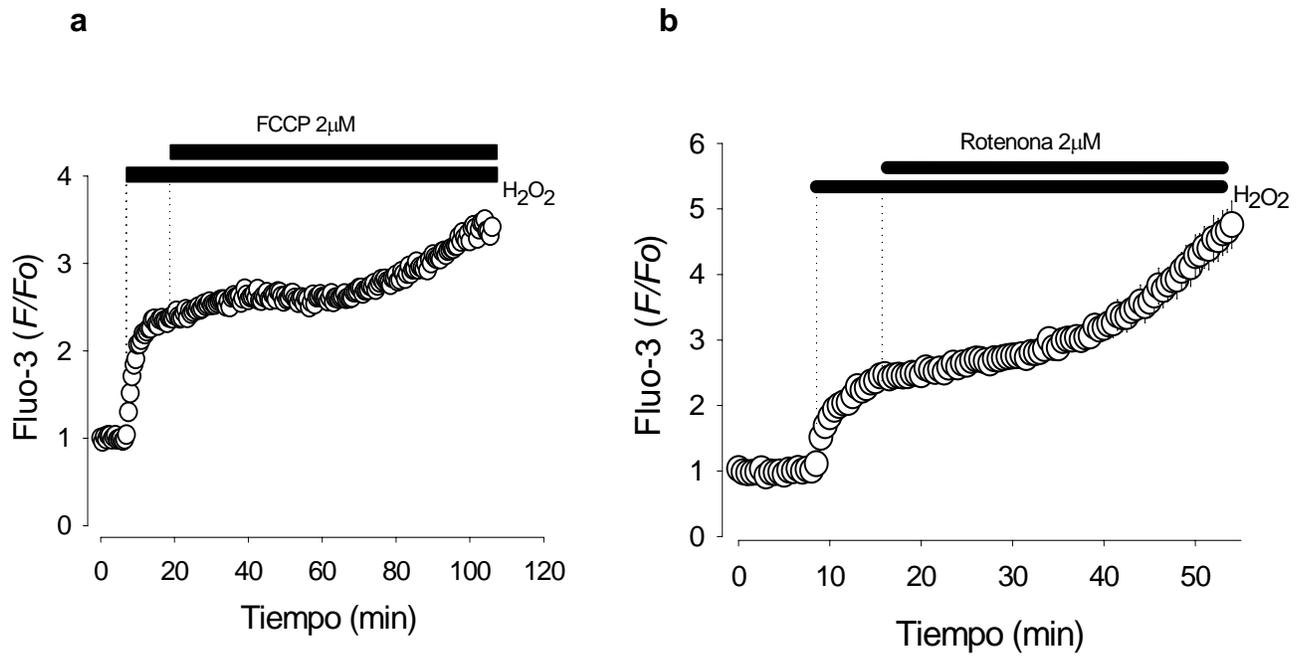
Para ello, células Clone 9 fueron cargadas con Fluo-3 y expuestas a  $\text{H}_2\text{O}_2$  en tampón KRH-glc. Una vez inducida el alza primaria del calcio citosólico con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5-10 minutos) se agregaron los inhibidores metabólicos mitocondriales rotenona 2  $\mu\text{M}$  y FCCP

2  $\mu$ M (Figura 13).

El patrón de fluorescencia de Fluo-3 no varió, indicando que la inhibición metabólica mitocondrial no es determinante en la sobrecarga necrótica del calcio citosólico en células Clone 9. Esta aproximación experimental se reprodujo en células epiteliales HeLa, obteniéndose resultados opuestos a los observados en células Clone 9. Las maniobras de inhibición de la síntesis de ATP mitocondrial con rotenona 2  $\mu$ M y FCCP 2  $\mu$ M e inhibición glicolítica con 2-desoxiglucosa (2-DOG) 5mM y ácido iodoacético (IAA) 500  $\mu$ M indujeron el alza tardía del calcio citosólico en células HeLa (Figura A.4). Estos resultados mostraron que la depleción energética en células HeLa es un evento que determina la sobrecarga tardía de calcio en este tipo celular, probablemente por un mecanismo asociado a la pérdida de función de la bomba de calcio PMCA. Este resultado preliminar nos llevó a investigar más acerca de los mecanismos responsables de la sobrecarga necrótica del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en células HeLa sometidas a estrés oxidativo. Los resultados obtenidos en células epiteliales HeLa fueron realizados en colaboración con el Sr. Joel Castro, y son presentados en el Anexo A.



**Figura 12. La función mitocondrial determina el PNR.** Se muestran experimentos similares al descrito en Figura 7. **a-c**, Las células fueron incubadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de FCCP 2 μM, rotenona 2 μM o CsA 100 μM (círculos blancos). En paralelo se efectuaron experimentos controles (círculos negros). **d**, Se observa un desplazamiento significativo del ET<sub>50</sub> (\* p<0.05) frente a los distintos tratamientos. Estos resultados representan un experimento tipo, realizado por duplicado. Resultados similares se obtuvieron en 3-5 experimentos independientes. Los datos son presentados como promedio ± error estándar.



**Figura 13. La inhibición de la función mitocondrial no adelanta la sobrecarga secundaria de Ca<sup>2+</sup> en células Clone 9 sometidas a estrés oxidativo. Células cargadas con Fluo-3 en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La inhibición de la función mitocondrial con rotenona 2 μM (a) y FCCP 2 μM (b) no indujeron la sobrecarga tardía del calcio citosólico. Los datos representan el promedio de 8-10 células ± error estándar, representativo de 3 experimentos por separado.**

## 5. DISCUSIÓN

Células Clone 9 requirieron altas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (32mM) para alcanzar la necrosis celular (Figura 5). Esta resistencia al daño oxidativo es concordante con otras líneas celulares descritas en la literatura como cultivos de hepatocitos (Starke *et al*, 1985), y otros tipos celulares como macrófagos P388D1 (Hyslop *et al*, 1988), mioblastos cardíacos (Wu *et al*, 1996), células secretoras de insulina (Herson *et al*, 1999), y células epiteliales HeLa (Barros *et al*, 2003; Castro *et al*, 2004), propiedad atribuida a las altas concentraciones de glutatión presente en estos tipos celulares

Según datos obtenidos en nuestro laboratorio por la Srta. Carolina Montenegro, la concentración de glutatión total en células Clone 9 corresponde a  $12,1 \pm 1,0$  mM, similar al contenido de glutatión observado en cultivos de hepatocitos, tipo celular que se caracteriza por presentar altas concentraciones de moléculas atrapadoras de radicales libres (Fernández –Checa *et al*, 1993).

Durante los primeros minutos de exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , células epiteliales Clone 9 experimentaron un rápido aumento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Figura 9a), además de la depleción del ATP celular y aumento del  $\text{Mg}^{2+}$  citosólico (Bittner, 2002). Posteriormente las mitocondrias de estas células se depolarizaron, con un  $t_{1/2}=14.6 \pm 2,6$  minutos (Figura 10), fenómeno que ocurrió al tiempo en que estas células sufrieron la condena irreversible hacia la necrosis, PNR= $14 \pm 2$  minutos (Figura 7a).

Estos eventos iónicos revirtieron espontáneamente al remover el  $\text{H}_2\text{O}_2$  del medio extracelular antes que las células alcanzaran el PNR (Figura 11).

Las mitocondrias de estas células sometidas brevemente a  $\text{H}_2\text{O}_2$  sufrieron una leve hiperpolarización (Figura 11c). En células HeLa se ha reportado que tras el aumento del calcio citosólico las mitocondrias actúan como capturadores de  $\text{Ca}^{2+}$ , ayudando a minimizar la sobrecarga citosólica de calcio frente a estrés oxidativo (Castro *et al*, 2004). Las mitocondrias poseen un sofisticado sistema de captura y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que permite al organelo regular la concentración de este catión en la matriz (Pozzan *et al* 2000). Existen antecedentes que describen una correlación directa entre la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz mitocondrial y la activación aguda de deshidrogenasas con el consecuente aumento de los niveles de NADH, producción de ATP y consumo de  $\text{O}_2$  (Jouaville *et al*, 1999). Algunos estímulos causan una sobrecarga letal del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, en neuronas por ejemplo la recarga de calcio mitocondrial inducida por glutamato es causal de la muerte en estas células (Stout *et al*, 1998).

Estas células rescatadas antes del punto de no retorno, permanecieron viables en el tiempo, sin rastro de apoptosis evaluada por la morfología y textura nuclear (Figura 8a), integridad del DNA genómico (Figura 8b) y actividad de caspasas (Figura 8c). Posterior a la depolarización mitocondrial, ocurrió una sobrecarga de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 6a y 6b). Estos dos cationes fueron necesarios para la necrosis (Figura 6a), ya que el retiro de estos iones inhibió significativamente la viabilidad de estas células. Este desbalance iónico que precede a la muerte celular necrótica ha sido descrito en varios tipos celulares, pero aún no se conoce a cabalidad los mecanismos moleculares que llevan a este desbalance iónico (Barros *et al*, 2002).

Uno de los mayores efectos fisiopatológicos del  $H_2O_2$  en altas concentraciones es el colapso energético celular (Eguchi *et al*, 1997; Leist *et al*, 1997) como resultado de la inhibición de la glicólisis y disfunción mitocondrial (Hyslop *et al*, 1988; Schraufstatter *et al*, 1990), además se ha descrito que en fibroblastos sometidos a estrés oxidativo existiría una sobreactivación de la enzima nuclear poli (ADP)-ribosa polimerasa (PARP) que consume ATP (Ha *et al*, 1999).

Según reportes obtenidos en nuestro laboratorio, la concentración de ATP en células Clone 9 decae dramáticamente tras la exposición a  $H_2O_2$ , con un tiempo medio de caída de  $2,9 \pm 0,6$  minutos (Bittner, 2002). Una explicación posible para esta temprana baja de ATP es atribuible al colapso glicolítico de estas células, ya que las mitocondrias perdieron su potencial minutos más tarde con un  $t_{1/2}=14.6 \pm 2.6$  minutos (Figura 10), de esta manera, es probable que posterior a la inactivación de la glicólisis, aún exista síntesis de ATP mitocondrial a través de intermediarios del ciclo de ácidos tricarboxílicos.

Cercano al PNR, las mitocondrias de estas células perdieron su potencial de manera irreversible, frenándose la síntesis de ATP mitocondrial. Este evento coincidió temporalmente con la condena irreversible de células Clone 9 hacia la necrosis celular.

Una relación causal entre la depolarización mitocondrial producida por estrés oxidativo y la irreversibilidad en la muerte necrótica en este modelo fue apoyada por el significativo adelanto del PNR al tratar las células con los inhibidores metabólicos mitocondriales rotenona y FCCP (Figura 12a y 12b). Estos inhibidores no fueron letales por sí solos, ya que las células Clone 9 sobrevivieron indefinidamente en presencia de los venenos mitocondriales. Esto indica que la producción glicolítica de ATP en estas

células es suficiente para la demanda celular. FCCP y rotenona afectan el tono redox celular de manera opuesta, lo que permite descartar este parámetro como el responsable de la temprana condena de las células.

Un mecanismo conocido por el cual la mitocondria pierde su función frente a estrés oxidativo es la formación del poro de transición mitocondrial (PTM). La inhibición de la formación del poro de transición mitocondrial con CsA retrasó significativamente el PNR, lo que indica que el PTM participa en la irreversibilidad necrótica en células Clone 9. Estos resultados confirman nuestra hipótesis de trabajo; la función mitocondrial es determinante en la irreversibilidad de la muerte celular inducida por estrés oxidativo, probablemente por un mecanismo dependiente del uso de ATP.

Teóricamente, en estas células dañadas, las sobrecargas tardías de sodio y calcio pueden resultar de una pérdida de función, es decir, una falla en las bombas ATP dependientes, o en una ganancia de función, es decir, un aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática a estos iones. Dado que los aumentos del sodio y del calcio comenzaron a tiempos en que las mitocondrias se despolarizaron, los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de una falla de bombas ATP dependientes como el mecanismo responsable de la sobrecarga necrótica de iones en este modelo.

Un resultado sorprendente fue la relación causal entre la acumulación de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en células HeLa sometidas a estrés oxidativo. Las células tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  en un tampón libre de  $\text{Na}^+$  no gatillaron la sobrecarga tardía de calcio (Figura A.2), sólo una vez regresado el sodio comenzó la recarga secundaria de calcio.

Los últimos resultados demuestran que el mecanismo involucrado en la sobrecarga necrótica de calcio inducida por estrés oxidativo en células epiteliales HeLa depende de la actividad de la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa. La inhibición farmacológica y

funcional de la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa con ouabaína 1mM y el retiro del ion  $\text{K}^+$  del medio extracelular, revirtieron el alza secundaria de calcio (Figura A.3a y A.3b). Estos tratamientos además inhibieron significativamente la necrosis (A.2b y A.3c). Estos resultados sugieren que la acumulación citosólica del ion  $\text{Na}^+$  durante estrés oxidativo es el fenómeno primario que conduce a un desequilibrio en el estado estacionario de  $\text{Ca}^{2+}$  con la consecuente acumulación del divalente.

Las concentraciones de calcio citosólico en el nuevo estado estacionario alcanzan los 200-300 nM (Castro *et al*, 2004), esto indica que este equilibrio sería mediado por la actividad de la PMCA, una bomba de calcio ATP dependiente ubicada en la membrana plasmática que posee una alta afinidad por calcio con una baja tasa de transporte. Una pérdida de función de esta proteína explicaría la sobrecarga tardía de calcio en células sometidas a estrés oxidativo. Otros mecanismos regulatorios del calcio intracelular como la bomba de calcio del retículo endoplásmico (SERCA) y el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  presente en la membrana plasmática, requieren concentraciones sobre los 500 nM de calcio para activarse, lo que descarta su participación en este modelo.

En neuronas por ejemplo el principal mecanismo de extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$  es la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , datos recientes indican que la sobrecarga tardía de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por estimulación con glutamato sería mediada por el desamblaje del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  por calpaína (Bano *et al*, 2005).

Una explicación posible al acoplamiento metabólico entre la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa y la PMCA es que ambas proteínas son dependientes de ATP.

Estos resultados demuestran que en células HeLa sometidas a estrés oxidativo, la actividad de la bomba de sodio estaría consumiendo gran parte de los remanentes de ATP, impidiendo la extrusión del calcio citosólico a través de la PMCA.

La inhibición temprana de la síntesis de ATP glicolítico o mitocondrial adelantaron significativamente el alza secundaria de calcio en estas células (Figura A.4). La dependencia del ATP celular en la homeostasis de estos cationes fue apoyada por el significativo adelanto de la acumulación secundaria de calcio en células estresadas con  $H_2O_2$  y sometidas a inhibición metabólica.

La inhibición de la bomba de  $Na^+/K^+$  ATPasa y la depleción metabólica mitocondrial en células Clone 9 sometidas a estrés oxidativo no revirtieron el alza secundaria del  $Ca^{2+}$  citosólico. Este resultado sugiere que el mecanismo involucrado en el desequilibrio del  $Ca^{2+}$  citosólico no está gobernado por el déficit energético celular. Si bien es cierto la función mitocondrial fue determinante en la irreversibilidad necrótica de estas células, la depleción de la síntesis de ATP por parte de este organelo no explica el fenómeno de sobrecarga de calcio citosólico observado en células HeLa.

Basándose en los resultados obtenidos en éste trabajo, se puede concluir lo siguiente;

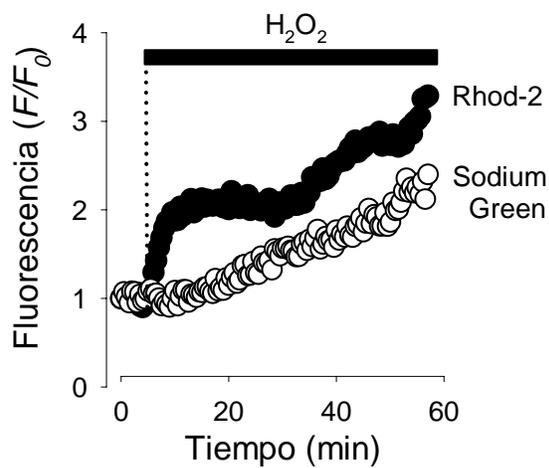
- Células HeLa y Clone 9 son resistentes al estrés oxidativo, se requirieron dosis milimolares de  $H_2O_2$  para inducir la necrosis en éstas células.
- La necrosis para estos dos tipos celulares es dependiente de la sobrecarga de iones calcio y sodio.
- La función mitocondrial determina el punto de no retorno en células Clone 9.
- En células HeLa la acumulación necrótica de calcio es un fenómeno dependiente de la función de la bomba de  $Na^+/K^+$  ATPasa, mecanismo ausente en células Clone 9 sometidas a estrés oxidativo.

**ANEXOS**

## ANEXO A EXPERIMENTOS EN CÉLULAS HELA

### A.1 $H_2O_2$ induce sobrecargas tardías de sodio y calcio en células HeLa

Células HeLa fueron cargadas simultáneamente con Sodium Green y Rhod-2 para chequear simultáneamente los niveles de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  citosólicos en células expuestas a  $H_2O_2$ . Las cinéticas de estas alzas fueron similares a las observadas en células Clone 9. El alza citosólica del calcio fue bifásica, y el alza de  $Na^+$  ocurrió antes de que se iniciara la segunda sobrecarga del calcio.



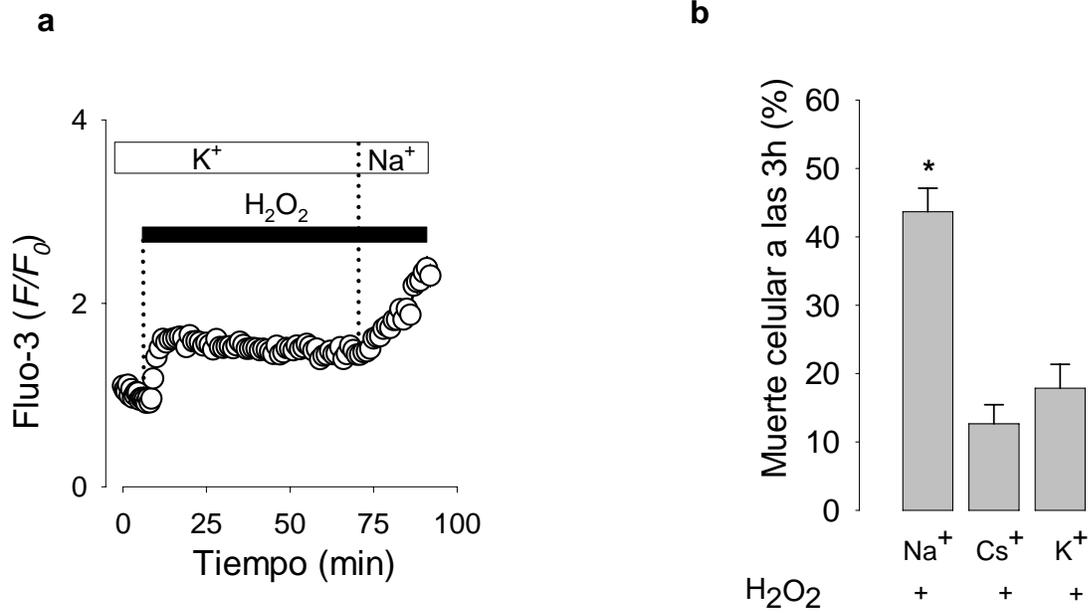
**Figura A.1  $H_2O_2$  induce sobrecargas tardías de sodio y calcio en células HeLa.**

Células cargadas en forma simultánea con Rhod-2 (círculos blancos) y Sodium Green (círculos negros) en presencia de  $H_2O_2$ . Los datos representan el promedio de 8-10 células, representativo de 3 experimentos por separado.

## **A.2 El aumento del Na<sup>+</sup> intracelular es necesario para que ocurra la sobrecarga secundaria del Ca<sup>2+</sup> citosólico. Dependencia del Na<sup>+</sup> extracelular en la muerte necrótica.**

Al observar que el inicio de la acumulación de sodio en células Hela sometidas a estrés oxidativo ocurrió antes de la sobrecarga secundaria de calcio, nos llevó a investigar el posible papel del Na<sup>+</sup> extracelular en la sobrecarga tardía del calcio citosólico. Para ello, células HeLa cargadas con Fluo-3 fueron expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un tampón KRH-glc privado de Na<sup>+</sup> y reemplazado equimolarmente por K<sup>+</sup>, esta estrategia experimental nos permitió evaluar la relevancia de acumulación del monovalente sobre la recarga secundaria de Ca<sup>2+</sup> citosólico. Este tratamiento provocó un alza primaria de calcio de la misma magnitud a la observada con el tampón KRH-glc normal, Sorprendentemente no ocurrió el alza secundaria de calcio en estas células desprovistas de Na<sup>+</sup> extracelular. El retorno del Na<sup>+</sup> al medio extracelular indujo el alza secundaria de calcio.

Este resultado revela la dependencia del sodio extracelular en la sobrecarga secundaria de calcio. Paralelamente se realizaron experimentos de muerte celular en células HeLa expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 3 horas continuas en tampón KRH-glc privado de Na<sup>+</sup> y reemplazado por Cs<sup>+</sup> o K<sup>+</sup> (Figura A.2b). Estos tratamientos protegieron significativamente la muerte de estas células. Las células controles expuestas a KRH normal alcanzaron una mortalidad de un  $43,7 \pm 3,5\%$  (n=3), la exposición a KRH-Cs<sup>+</sup> un  $12,7 \pm 2,9\%$  (n=3) y el tratamiento con KRH-K<sup>+</sup> lisó al  $17,9 \pm 3,5\%$  (n=3) de la población celular.

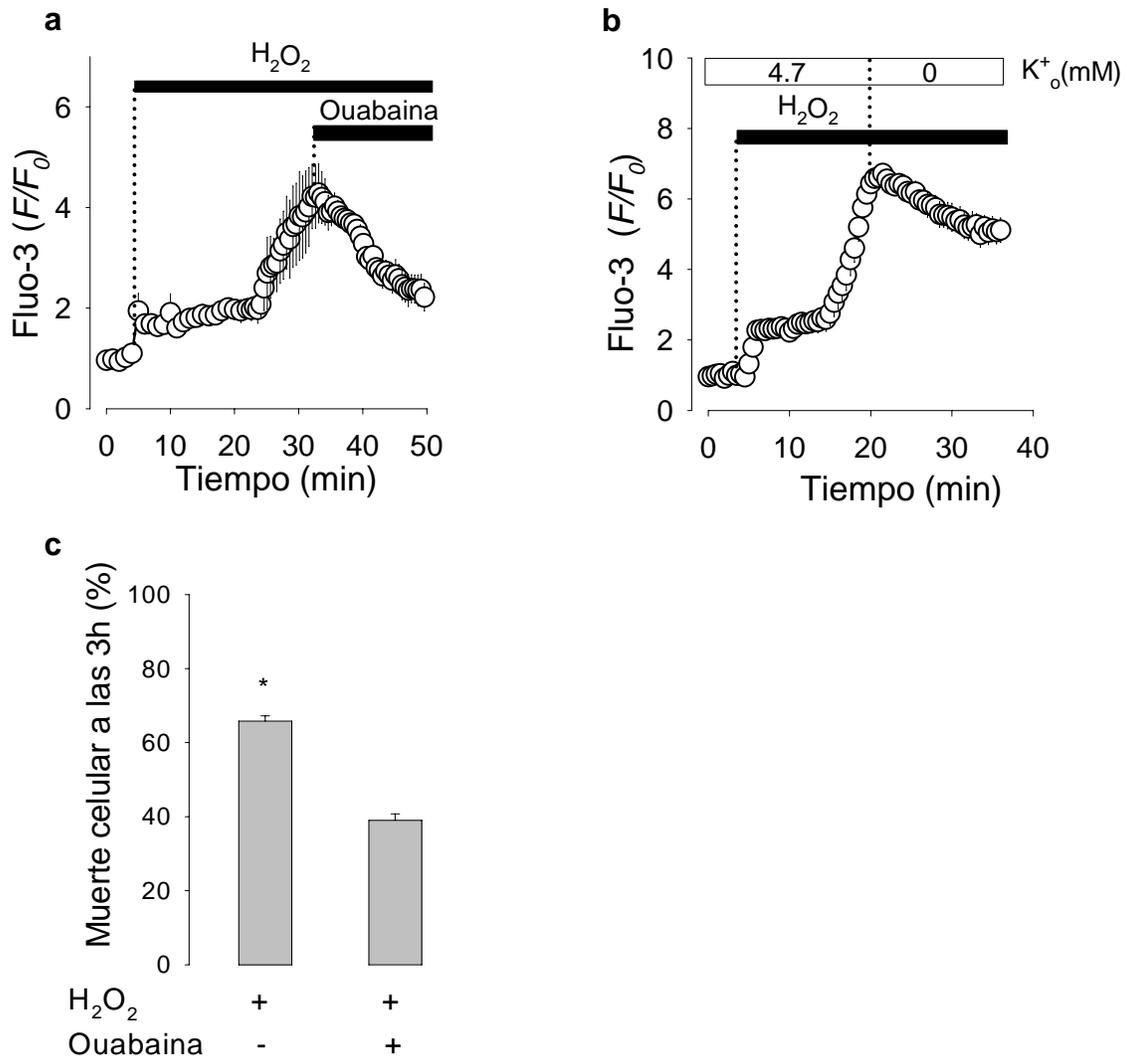


**Figura A.2 El aumento del  $Na^+$  intracelular es necesario para que ocurra la sobrecarga secundaria del  $Ca^{2+}$  citosólico. Dependencia del  $Na^+$  extracelular en la muerte necrótica. a,** Células cargadas con Fluo-3 en presencia de  $H_2O_2$ . Los datos representan el promedio de 8-10 células, representativo de 3 experimentos por separado. **b,** Las células fueron incubadas en presencia de  $H_2O_2$  en tampón KRH-glc, el  $Na^+$  fue reemplazado equimolarmente por  $Cs^+$  y  $K^+$ . El retiro del ión  $Na^+$  protegió significativamente la muerte necrótica (\*  $p < 0.05$ ). Los datos son representados como promedio  $\pm$  error estándar de 3 experimentos realizados por duplicado.

### **A.3 La inhibición de la bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa revierte el alza secundaria de calcio inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y protege de la necrosis.**

La acumulación intracelular de iones Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> en células sometidas a estrés oxidativo, activa mecanismos de regulación en la célula para mantener la homeostasis iónica al interior de la célula. El mecanismo por el cual las células regulan la concentración citosólica de iones Na<sup>+</sup> es a través de la bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa, una proteína encargada de movilizar iones Na<sup>+</sup> hacia el espacio extracelular en contra de su gradiente de concentración a expensas de la hidrólisis de ATP.

Para evaluar la participación de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa en la sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> inducida por estrés oxidativo, células HeLa fueron cargadas con Fluo-3 y expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La inhibición farmacológica (ouabaína 1 mM) y funcional (tampón KRH libre de K<sup>+</sup>) de la bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa revirtió la sobrecarga secundaria de calcio. Este resultado demuestra que la actividad de la bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa durante estrés oxidativo inhibe la extrusión del calcio citosólico. La inhibición de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa activó la salida del Ca<sup>2+</sup> acumulado en el citosol de células sometidas a estrés oxidativo. Consistente con este resultado fue la protección de la muerte necrótica en células expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de ouabaína 1 mM. Células HeLa fueron sometidas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 3 horas continuas en presencia o ausencia de ouabaína 1 mM. El porcentaje de células muertas en el tratamiento control alcanzó un 65,8 ± 1,4% (n=3), mientras que la inhibición de la bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa lisó al 39,2 ± 1,7% (n=3) de la población celular.

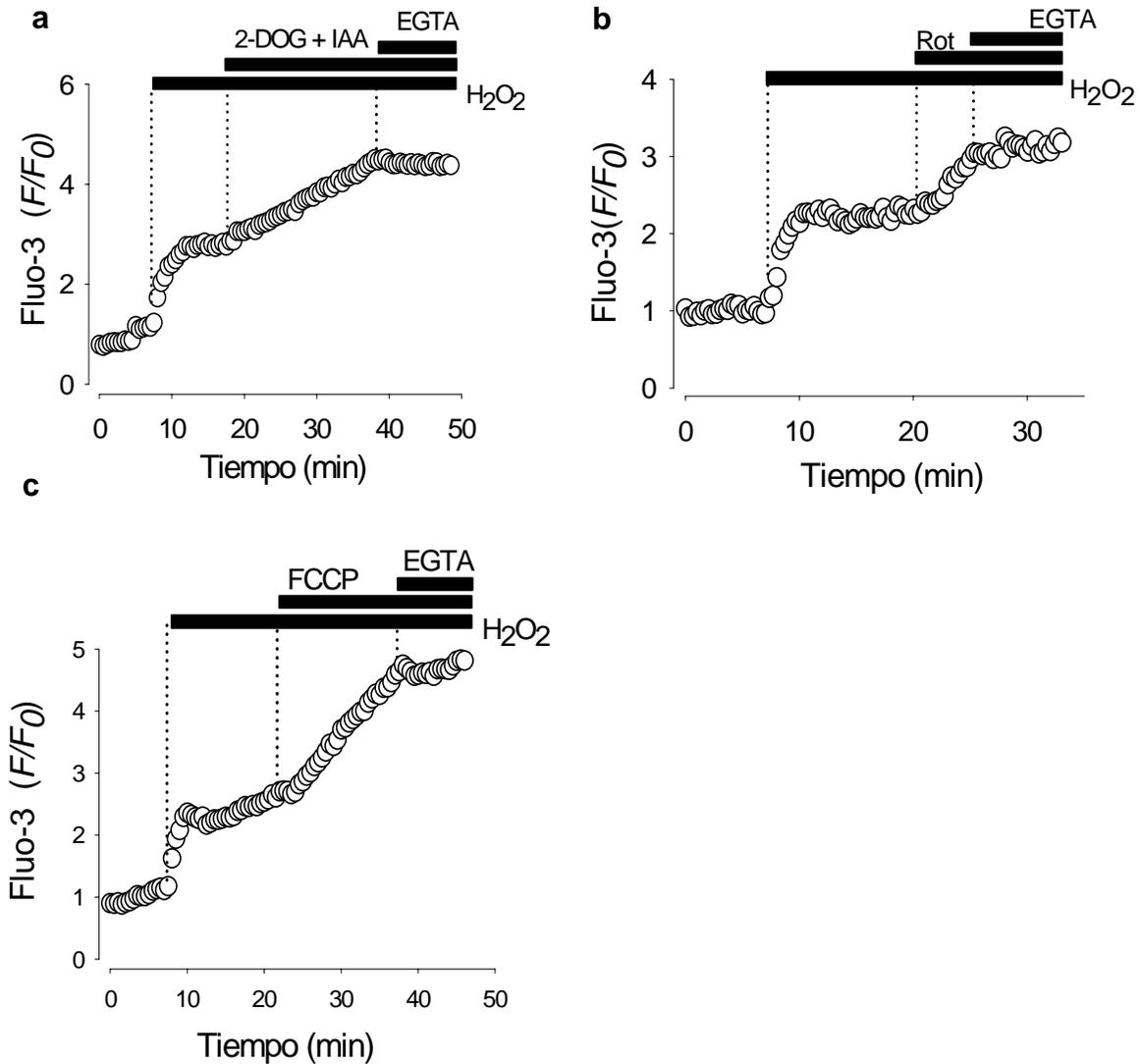


**Figura A.3 La inhibición de la bomba  $Na^+/K^+$  ATPasa revierte el alza secundaria de calcio inducida por  $H_2O_2$  y protege de la necrosis. a,b** Células cargadas con Fluo-3 en presencia de  $H_2O_2$ , el alza tardía fue revertida por la inhibición farmacológica y funcional de la bomba de  $Na^+/K^+$  ATPasa, con ouabaína 1 mM y con el tampón KRH-glc libre de  $K^+$ . Los datos representan el promedio de 8-10 células, representativo de 3 experimentos por separado. **c**, Las células fueron incubadas en presencia de  $H_2O_2$  en tampón KRH-glc. El tratamiento con ouabaína protegió significativamente la muerte necrótica (\*  $p < 0.05$ ). Los datos son representados como promedio  $\pm$  error estándar de 3 experimentos.

#### **A.4 La inhibición metabólica glicolítica y mitocondrial inducen el alza secundaria de calcio en células sometidas a estrés oxidativo.**

La dependencia de la función de la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa en la extrusión del  $\text{Ca}^{2+}$  en células sometidas a estrés oxidativo, sugiere que existe una comunicación directa entre los mecanismos de salida de los cationes  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . De esta manera la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa y PMCA utilizan la energía proveniente de la hidrólisis de ATP para movilizar estos cationes en contra de la gradiente de concentración. Existen reportes que en neuronas expuestas a glutamato la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa utilizaría el 60% del pool de ATP celular para expulsar el  $\text{Na}^+$  acumulado en el citosol tras la estimulación con glutamato (Hevner *et al*, 1992). Según estos resultados es probable que en el momento que se inicia la sobrecarga secundaria de calcio, la tasa de hidrólisis de ATP por la bomba de  $\text{Na}^+$  sea mayor a la de la PMCA. Este evento explicaría la pérdida de extrusión del divalente hacia el espacio extracelular con la consecuente acumulación del calcio intracelular.

Para evaluar la dependencia del ATP en la sobrecarga secundaria de calcio, células HeLa fueron cargadas con Fluo-3 y expuestas a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Posterior al alza inicial del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico las células fueron expuestas a los inhibidores metabólicos mitocondriales rotenona 2  $\mu\text{M}$ , FCCP 2  $\mu\text{M}$  y ácido iodoacético 500  $\mu\text{M}$ , un inhibidor de la vía glicolítica a nivel de la enzima GAPDH. Todos estos tratamientos indujeron la sobrecarga tardía de calcio, lo que sugiere que la concentración de ATP es un evento crítico que da cuenta del inicio de la sobrecarga secundaria de calcio responsable de la posterior necrosis en células HeLa sometidas a estrés oxidativo.



**Figura A.4** La inhibición metabólica glicolítica y mitocondrial inducen el alza secundaria de calcio en células sometidas a estrés oxidativo. Células cargadas con Fluo-3 en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el alza tardía fue inducida por la inhibición metabólica con ácido iodoacético 500  $\mu$ M + 2-DOG 5 mM (a) y detenida en ausencia de Ca<sup>2+</sup> extracelular, rotenona 2  $\mu$ M (b) y FCCP 2  $\mu$ M (c) en tampón KRH-glc. Los datos representan el promedio de 8-10 células  $\pm$  error estándar, representativo de 3 experimentos por separado.

**BIBLIOGRAFÍA**

Ashkenazi, A. and Dixit, V. (1998) Review: Death Receptors: Signaling and modulation. *Science*, 281, 1305-1308.

Bano, D., Young, K.W., Guerin, C.J., Lefevre, R., Rothwell, N.J., Naldini, L., Rizzuto, R., Carafoli, E., Nicotera, P. (2005) Cleavage of the plasma membrane  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger in excitotoxicity. *Cell*, 120, 275-285.

Barros, L. F., Stutzin, A., Calixto, A., Catalán, M., Castro, J., Hetz, C., Hermosilla, T (2001a) Non-selective cation channels as effectors of free radical-induced rat liver cell necrosis. *Hepatology*, 33, 114-122.

Barros, L. F., Hermosilla, T., Castro, J. (2001b) Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.*, 130, 401-409.

Barros, L. F., Castro, J., Bittner, C. X. (2002) Ion movements in cell death: from protection to execution. *Biol. Res.*, 35, 209-214.

Barros, L. F., Kanaseki, T., Sabirov, R., Morishima, S., Castro, J., Bittner, C. X., 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, 687-697.

Bittner, C.X. (2002). Evaluación de la dinámica celular de magnesio durante estrés oxidativo y del posible papel del magnesio en la muerte celular necrótica. Tesis de Grado, Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias. Univ. Austral de Chile, 11 pp.

Bronk S. F., Gores, G. J. (1991) Acidosis protects against lethal oxidative injury of liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology*, 14, 150-157.

Bronk, S. F., Gores, G. J. (1993) pH-dependent nonlysosomal proteolysis contributes to lethal anoxic injury of rat hepatocytes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **264**, 744-751.

Byrne, A. M., Lemasters, J. J., Nieminen, A. L. (1999) Contribution of increased mitochondrial free  $\text{Ca}^{2+}$  to the mitochondrial permeability transition induced by tert-butylhydroperoxide in rat hepatocytes. *Hepatology*, 29, 1523-1531.

Carafoli, E., Santella, L., Branca, D., and Brini, M. (2001) Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit. Rev. Bioat chem. Mol. Biol.* 36, 107–260.

Carini, R., De Cesaris, M. G., Splendore, R., Bagnati, M., Bellomo, G., Albano, E. (2000) Alterations of  $\text{Na}^+$  homeostasis in hepatocyte reoxygenation injury. *Biochim. Biophys. Acta*, 1500, 297-305.

Castro, J., Bittner, C. X., Humeres, A., Montecinos, V. P., Vera, J. C., Barros, L. F. (2004) A cytosolic source of calcium unveiled by hydrogen peroxide with relevance for epithelial cell death. *Cell Death. Differ.*, 11, 468-478.

Castro, J., Ruminot, I., O.H. Porras, C.M. Flores, T. Hermosilla, E. Verdugo, F. Venegas, S. Härtel, L. Michea and L.F. Barros. (2005) ATP steal between cation pumps: a mechanism linking Na<sup>+</sup> influx to the onset of necrotic Ca<sup>2+</sup> overload. Manuscrito en revisión *Cell Death. Differ.*

Colussi, C., Albertini, M. C., Coppola, S., Rovidati, S., Galli, F., Ghibelli, L. (2000) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced block of glycolysis as an active ADP-ribosylation reaction protecting cells from apoptosis. *FASEB J.*, 14, 2266-2276.

Crompton, M. (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.*, 341, 233-249.

Eguchi, Y., Shimizu, S., Tsujimoto, Y. (1997) Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res.*, 57, 1835-41840.

Ermak, G., Davies, K. J. (2002) Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol. Immunol.*, 38, 713-721.

Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y., Henson, P. M. (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit

proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest.*, 101, 890-898

Fernandez-Checa, J. C., Yi, J. R., Garcia-Ruiz, C., Knezic, Z., Tahara, S. M., Kaplowit, N. (1993) Expression of rat liver reduced glutathione transport in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.*, 268, 2324-2328.

Green, D., and Kroemer, (2004) G. Review: The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305, 626-629.

Ha, H. C., Snyder, S. H. (1999) Poly (ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96, 13978-13982.

Haralick, R., Shanmugan, K., Dinstein, I. (1973) Textural features for image classification. *IEEE Transaction on systems, man and cybernetics* SMC-3, p610-p621.

Hartel, S., Zorn-Kruppa, M., Tykhonova, S., Alajuuma, P., Engelke, M., Diehl, H. A. (2003) Staurosporine-induced apoptosis in human cornea epithelial cells in vitro. *Cytometry*, 55, 15-23.

Herson, P. S., Lee, K., Pinnock, R. D., Hughes, J., Ashford, M. L (1999) Hydrogen peroxide induces intracellular calcium overload by activation of a non-selective cation channel in an insulin-secreting cell line. *J. Biol. Chem.*, 274, 833-841.

Hevner, R. F., Duff, R. S., Wong-Riley, M. T. (1992) Coordination of ATP production and consumption in brain: parallel regulation of cytochrome oxidase and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP ase. *Neurosci. Lett.*, 138: 188-192.

Hyslop, P. A., Hinshaw, D. B., Halsey, W. A., Jr., Schraufstatter, I. U., Sauerheber, R. D., Spragg, R. G., Jackson, J. H., Cochrane, C. G. (1988) Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, 263, 1665-1675.

Jouaville, L. S., Pinton, P., Bastianutto, C., Rutter G. A., Rizzuto, R., (1999) Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96, 13807-12.

Laird, P. W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M. A., Jaenisch, R., Berns, A. (1991) Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res.*, 19, 4293.

Leist, M., Single, B., Castoldi, A.F., Kühnle, S., and Nicotera P. (1997) Intracellular Adenosine Triphosphate (ATP) Concentration: A Switch in the Decision Between Apoptosis and Necrosis *J. Exp. Med.* 18, 1481-1486.

Lemasters, J., DiGiuseppi, J., Nieminem, A., Herman, B. (1987) Blebbing, free  $\text{Ca}^{2+}$  and mitochondrial potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature*, 325, 78-81.

Majno G. and Joris I. (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.*, 146, 3-15.

Mehendale, H. M., Svensson, S. A., Baldi, C., Orrenius, S. (1985) Accumulation of  $\text{Ca}^{2+}$  induced by cytotoxic levels of menadione in the isolated, perfused rat liver. *Eur. J. Biochem.*, 149, 201-206.

Melcher, A., Todryk, S., Hardwick, N., Ford, M., Jacobson, M., Vile, R. G. (1998) Tumor immunogenicity is determined by the mechanism of cell death via induction of heat shock protein expression. *Nat. Med.*, 4, 581-587.

Padanilam, B. J. (2003) Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am. J. Physiol Renal Physiol.*, 284, F608-F627.

Pozzan, T. and Rizzuto, R. (2000) The renaissance of mitochondrial calcium transport. *Eur. J. Biochem.*, 267, 5269-5273.

Schlenker, T., Feranchak, A. P., Schwake, L., Stremmel, W., Roman, R. M., Fitz, J. G. (2000) Functional interactions between oxidative stress, membrane  $\text{Na}^{+}$  permeability, and cell volume in rat hepatoma cells. *Gastroenterology*, 118, 395-403.

Schraufstatter, I. U., Browne, K., Harris, A., Hyslop, P. A., Jackson, J. H., Quehenberger, O., Cochrane, C. G. (1990) Mechanisms of hypochlorite injury of target cells. *J. Clin. Invest.*, 85, 554-562.

Simon, F., Varela, D., Riveros, A., Eguiguren, A. L., Stutzin, A. (2002) Non-selective cation channels and oxidative stress-induced cell swelling. *Biol Res.*, 35, 215-22.

Starke, P. E., Farber, J. L. (1985) Endogenous defenses against the cytotoxicity of hydrogen peroxide in cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 260, 86-92.

Stout, A. K., Raphael, H. M., Kanterewicz, B. I., Klann E. and Reynolds I. J. (1998) Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nat. Neurosci.*, 1, 366-373.

Troyano, A., Sancho, P., Fernandez, C., de Blas, E., Bernardi, P., Aller, P. (2003) The selection between apoptosis and necrosis is differentially regulated in hydrogen peroxide-treated and glutathione-depleted human promonocytic cells. *Cell Death. Differ.*, 10, 889-898.

Voll, R.E., Herrmann, M., Roth, E.A., Stach, C., Kalden, J.R., Girkontaite, I. (1997) Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*, 390, 350 -351.

Wu, M. L., Tsai, K. L., Wang, S. M., Wu, J. C., Wang, B. S., Lee, Y. T. (1996)  
Mechanism of hydrogen peroxide and hydroxyl free radical-induced intracellular  
acidification in cultured rat cardiac myoblasts. *Circ. Res.*, 78, 564-572.