



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

“REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE Bcl-2 EN RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO
EN LA LÍNEA CELULAR L-929”

T E S I S

Que para obtener el grado académico de Doctor en Biología Experimental

P R E S E N T A

Maestro en Biología Experimental Armando Luna López

COMITÉ TUTORAL:

Dra. Mina Konigsberg Fainstein

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

México D.F., 23 de julio de 2010

Comité Tutorial de Tesis

“REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE Bcl-2 EN RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA LÍNEA CELULAR L-929”

Realizada por

M en BE Armando Luna López

El día 23 de julio de 2010 en las Instalaciones de la Universidad autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

Dra. Mina Königsberg Fainstein

Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular
Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa
mkf@xanum.uam.mx

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Laboratorio de Fisiología Celular
Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa
legq@xanum.uam.mx

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México
azentell@ifc.unam.mx

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Laboratorio de Endocrinología Molecular
Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa
pgdm@xanum.uam.mx

Los miembros del jurado de examen designados por el posgrado en Biología Experimental abajo firmantes aprobaron la Tesis “**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE Bcl-2 EN RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA LÍNEA CELULAR L-929**” realizada por el alumno Armando Luna López y se realizó la disertación pública el día 23 de julio de 2010 en las instalaciones de la Universidad autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.



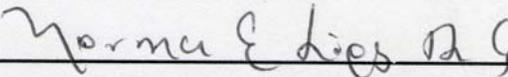
PRESIDENTE

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa




SECRETARIO

Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México



VOCAL

Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



VOCAL

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura
Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Los miembros del jurado de examen designados por el posgrado en Biología Experimental abajo firmantes aprobaron la Tesis **“REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE Bcl-2 EN RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA LÍNEA CELULAR L-929”** realizada por el alumno Armando Luna López y se realizó la disertación pública el día 23 de julio de 2010 en las instalaciones de la Universidad autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

PRESIDENTE

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

SECRETARIO

Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

VOCAL

Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

VOCAL

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura
Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

El programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa (UAM-I: 0904-0) recibe apoyo por parte del CONACYT mediante el programa **PNP-CONACYT-SEP** clave **C/PFPN-2002-35-32**. Armando Luna López agradece el apoyo recibido por CONACYT con el número de Registro de Becario 185567.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Mina Königsberg Fainstein. El trabajo de Investigación fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el No. CB-2006-1-59659.

AGRADECIMIENTOS

A mi Mamá por que me dio la oportunidad de vivir, porque me enseñó a nunca darme por vencido y porque siempre me ha amado con mis virtudes y defectos, te amo mamá.

A mi Papá por que siempre ha sido un gran amigo y porque siempre me ha enseñado a dar mi mayor esfuerzo en cualquier actividad que realicemos en la vida, Gracias por todo, te amo Papá.

A mis Hermanos, José, Alicia, Josefina, Carmen, Leopoldo, Isabel y Javier, porque siempre me han apoyado, alentado, cuidado, orientado y por su gran amor, porque no hay las palabras precisas para decirles lo mucho que los admiro y lo mucho que los quiero, siempre han sido un ejemplo a seguir, los amo hermanos.

A mis sobrinos, Teresa, Pepé, Quique, Fer, Minerva, Jorge, Gaby, Alicia, Axel, Armando, Ariel, Miguel, Dana, Alondra, Virgilio y Daniela, porque siempre puedo aprender algo de ustedes y porque siempre están en mi corazón.

A mis cuñados Enrique, Eddie e Ibed, por su apoyo incondicional en cualquier momento de mi vida.

A la Dra. Mina por su apoyo, dedicación, confianza y enseñanzas, que día a día me han ayudado a ser una mejor persona y sobre todo a dedicar mi trabajo al progreso de mi País, porque siempre me ha enseñado que ayudar a otro es ayudarse a sí mismo, ya que si crece uno crecemos todos, me siento muy orgulloso de ser su alumno.

A la Dra. Conchita que siempre me ha apoyado en mi formación, que siempre tiene un consejo para que siga progresando en mi vida profesional, por las palabras de aliento y porque en toda mi formación académica siempre estuvo presente con un excelente comentario. Muchas gracias por tratarme siempre como uno de sus alumnos.

Al Dr. Luis porque me enseñó a desarrollar mis habilidades y a creer que podemos seguir cuestionando a la naturaleza en beneficio de la humanidad, su gran apoyo y dirección han hecho crecer mi curiosidad científica y a pensar que cada día podemos alcanzar una nueva meta.

Al Dr. Zentella que con su crítica constructiva siempre me ha enseñado a dar el siguiente paso, a no conformarme con lo que puedo observar, siempre tratando de explicar lo que obtuve y él porque lo obtuve. Porque es mejor un resultado bien analizado que acumular mil resultados mal analizados.

Al Dr. Pablo que desde que lo conocí a fomentado en mí las ideas de progreso y trabajo, porque siempre tiene un momento para darme un buen consejo y unas palabras que siempre me ayudan a mejorar mi estado de ánimo y sobre todo porque me enseñó a ser una persona honesta y a ser un Biólogo Experimental.

Al Maestro José Luis Ventura, que con sus excelentes asesorías y sus invaluable comentarios hicieron posible el desarrollo de este trabajo, por su paciencia y porque me enseñó lo importante que es el trabajo del Laboratorio, por su apoyo y por su gran amistad.

A la Dra. Norma por su apoyo, confianza y amistad que durante muchos años hemos tenido y porque me ha ayudado a cumplir las metas que me he propuesto. Porque durante nuestra estancia en el Laboratorio hemos compartido momentos de triunfos y fracasos, pero a pesar de todo nos hemos mantenido unidos. Gracias por ser una gran compañera.

A Viridiana porque me ha enseñado que en los momentos más difíciles siempre hay una amiga que te puede ayudar a salir adelante y siempre esta dispuesta a compartir una nueva aventura, Gracias por ser mi amiga.

A Cristóbal por ser un gran amigo y compañero, por compartir grandes experiencias y por siempre que siempre está dispuesto a colaborar en un nuevo proyecto.

A Pako por ayudarme a realizar parte de este trabajo, por la confianza que tuviste para hacer realidad mi proyecto, por compartir duras horas de laboratorio y por ser un gran amigo.

A Jake y Mauricio por ayudarme en mi nuevo proyecto, por tolerarme y porque comprenden que Yo al igual que ustedes sigo aprendiendo, Gracias por ser mis amigos.

A mis compañeros de Generación, Tania, Angeles, Elsa, Inés, Varenka, Xóchil y Gabriel, por los grandes momentos que pasamos juntos y por su gran amistad, gracias por el apoyo que me dieron y porque siempre estarán en mi corazón.

Al Dr. José Luis Gómez Olivares por sus acertados comentarios y por sus enseñanzas durante mi estancia en la Maestría y el Doctorado en Biología Experimental.

A mis amigos Noé, Sinuhe, Julio, Gerardo y Benjamín por los grandes momentos que hemos pasado en la UAM, por su apoyo incondicional y porque tal vez el próximo año si pasemos a la siguiente ronda en el torneo de fútbol.

A mis amigos Lety, Javier y Alicia, por su apoyo, tolerancia, su gran amistad y por los grandes momentos que hemos compartido en los laboratorios de la UAM y porque siempre habrá un momento para compartir una nueva experiencia.

A mis compañeros del Laboratorio de Fisiología Celular, Karina, Denise, Cristina, Mayra, Natalia, Ileana y Argelia, por su gran apoyo, tolerancia y por los buenos momentos que pasamos en su laboratorio.

A mis amigos del Laboratorio de Bioquímica Alma, Omar, Adrián y Ambar por su apoyo, sus consejos y por su gran amistad.

Al amor de mi vida que desde que la conocí siempre me ha dado los mejores momentos de mi vida, porque sin ella nunca hubiera logrado alcanzar mis metas, porque con su cariño y comprensión me ha enseñado que la vida es un gran reto y que afrontarla juntos es lo más maravilloso que la vida me dio. Porque siempre me ayuda a salir adelante aún en los momentos más difíciles de la vida. Te amo Adriana y siempre que leas este trabajo recuerdes lo mucho que te amo.

Por último, quiero agradecer a Dios por darme la oportunidad de ayudar al prójimo, por permitirme vivir este gran momento en mi vida y por darme la oportunidad de ser Padre, que será la mejor experiencia de mi vida. Te amo Bebé.

ÍNDICE

1. Introducción	10
1.1 Especies reactivas de oxígeno	10
1.1.1 Radical superóxido	10
1.1.2 Peróxido de hidrógeno	11
1.1.3 Radical hidroxilo	12
1.2 Especies reactivas de nitrógeno	12
1.3 Antioxidantes	13
1.3.1 Superóxido dismutasa	13
1.3.2 Catalasa	14
1.3.3 Glutathion peroxidasa	15
1.3.4 Vitamina C	15
1.3.5 Vitamina E	16
1.3.6 Glutathion (GSH)	17
1.4 Estrés oxidativo	20
1.5 Hormesis y estrés oxidativo	21
1.6 Nrf2	23
1.7 Bcl-2	24
1.7.1 Participación de Bcl-2 en la regulación del estado redox celular	25
1.7.2 Bcl-2 en el mantenimiento de los niveles de GSH	26
1.7.3 Mecanismos de expresión de la proteína Bcl-2 en respuesta al estrés oxidativo	26
1.7.4 Otros mecanismos de regulación de bcl-2	27
2. Justificación	28
3. Objetivo	30
3.1 Objetivos particulares	30
4. Hipótesis	31
5. Materiales y métodos	31
5.1 Cultivo celular	31
5.2 Modelo de hormesis	31
5.3 Sobre-expresión endógena de bcl-2	32
5.4 Aislamiento de RNA, transcripción reversa y PCR	32
5.5 Análisis de Western blot	33
5.6 Inhibidor Bcl-2	33
5.7 Determinación del estado redox GSH / GSSG	34
5.8 Extracción de DNA e hidrólisis enzimática	34
5.9 Cuantificación de 8-oxo-dguc por HPLC	35
5.10 Silenciamiento por medio de siRNA de Bcl-2	36
5.11 Inmunolocalización de Nrf2 por microscopia confocal	36
5.12 Análisis de datos	36
6. Resultados	37
6.1 Inducción de un modelo de hormesis en respuesta al estrés oxidativo	37
6.2 La expresión de Bcl-2 se incrementa en respuesta al tratamiento OCH	39
6.3 Bcl-2 participa en la respuesta OCH	41
6.4 Bcl-2 induce la translocación nuclear de Nrf2 como parte de la respuesta hormética	42

6.5 El incremento de las enzimas antioxidantes GST y γ GCS es sostenido durante un intervalo largo de tiempo durante la respuesta OCH, probablemente por la participación de Bcl-2	46
6.6 La sobre-expresión de Bcl-2 induce la producción de ERO a bajos niveles y amortigua el estrés oxidativo	48
6.7 NF- κ B incrementa la expresión de Bcl-2	49
7. Discusión	51
8. Conclusiones	59
9. Perspectivas	60
10. Bibliografía	61

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO

Los radicales libres (RL) pueden ser definidos como átomos o moléculas con uno o más electrones desapareados en alguno de sus orbitales electrónicos (Halliwell y Gutteridge, 1999). Este electrón generalmente es el que le proporciona su alta capacidad reactiva. El oxígeno molecular (dioxígeno) tiene una configuración electrónica única y es por sí mismo considerado un radical, por lo que los RL derivados del oxígeno son considerados los radicales producidos por los seres vivos más importantes (Miller et al., 1990). Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son ubicuas, altamente reactivas, de tiempo de vida media muy corto, se producen en el metabolismo del oxígeno en los sistemas biológicos aeróbicos y reaccionan con las moléculas que se encuentran a su alrededor empezando con aquellas que se encuentran muy cercanas a su sitio de formación. Las ERO incluyen al radical superóxido (O_2^{\bullet}), al radical hidroxilo (OH^{\bullet}) y al peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Además habría que considerar entre las ERO a las especies reactivas de nitrógeno (ERN), que poseen tanto átomos de oxígeno como de nitrógeno, e incluyen al óxido nítrico (NO) y al radical peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$) entre las más importantes. Las ERN también participan en diferentes procesos biológicos como en el funcionamiento de los tejidos vasculares. Las ERO/ERN han sido consideradas dañinas por su reactividad, sin embargo, bajos niveles de estas son necesarias para que se lleven a cabo diferentes procesos bioquímicos, entre los que se encuentran la señalización intracelular, la diferenciación, el control del ciclo, la apoptosis, el sistema inmune, la defensa contra los microorganismos, etc (Ghosh, 1998; Tohyama y Yamamura, 2004; Bae et al., 1997; Lee et al., 1998).

1.1.1 RADICAL SUPERÓXIDO

La adición de un electrón al dioxígeno forma el radical O_2^{\bullet} (Miller et al., 1990). Este radical puede ser producido por diferentes mecanismos en donde se presenta la activación del oxígeno, ya sea por procesos bioquímicos o por radiaciones electromagnéticas, es considerado el principal ERO ya que es el que reacciona con un mayor número de moléculas para formar otras ERO secundarias en donde participa directa o indirectamente en reacciones catalizadas por metales de transición (Valko et al., 2005).

La producción del O_2^{\bullet} se origina principalmente en la mitocondria (Cadenas & Sies, 1998). La cadena de transporte de electrones es la principal fuente de ATP en las células de

mamíferos y es por tanto esencial para la vida. Durante la transducción de energía, una pequeña cantidad de electrones provenientes de la cadena de transporte de electrones se unen al oxígeno molecular para formar el O_2^{\bullet} , el cual ha sido implicado en la patofisiología de diferentes enfermedades (Kovacic et al., 2005; Valko et al., 2004). La medición de partículas sub-mitocondriales sugiere que del 1-3% de electrones provenientes de la cadena de transporte de electrones pueden generar al O_2^{\bullet} , en particular los complejos I y III. Recientemente se ha demostrado que el O_2^{\bullet} proveniente del complejo I es liberado dentro de la matriz mitocondrial, ya que no se han detectado niveles de este en mitocondrias intactas y por tanto los producidos en el complejo III son vertidos al citosol (Muller et al., 2004).

1.1.2 PEROXIDO DE HIDRÓGENO

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) puede ser producido directamente en las células principalmente por algunas enzimas oxido-reductasas, como es el caso de la glucosa oxidasa (Massey et al., 1969) y la NADPH oxidasa. Sin embargo, la mayoría del H_2O_2 es producto de la dismutación del O_2^{\bullet} (Lambeth, 2002), proveniente de la fuga de electrones de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Loschen et al., 1974; Forman y Kennedy 1974) la biotransformación de xenobióticos (McCord y Fridovich, 1970) y otras flavoproteínas (Massey et al., 1969). Otro importante sitio de producción del H_2O_2 son los peroxisomas en donde se presentan diferentes reacciones de biotransformación en donde el oxígeno es reducido a H_2O_2 por los electrones provenientes de las moléculas a detoxificar, el H_2O_2 es posteriormente convertido en agua en los propios peroxisomas (De Duve y Baudhuin, 1969). Sin embargo, el proceso bioquímico que produce más H_2O_2 en los peroxisomas es la β -oxidación de ácidos grasos, debido a las reacciones enzimáticas de las flavin oxidasas. Se ha estimado que el 35% de todo el H_2O_2 formado en el hígado de ratas es producido por estas reacciones (Boveris et al., 1972). El H_2O_2 es una ERO muy importante ya que al igual que el O_2^{\bullet} puede dar origen a otras ERO secundarias.

Por mucho tiempo se consideró a las ERO como moléculas que potencialmente podrían generar daños a las biomoléculas, pero en los últimos años se ha venido postulando a los RL y ERO como moléculas transductoras de señales: El caso particular del H_2O_2 es uno de los más importantes, ya que se ha considerado un segundo mensajero modulado por enzimas como las oxido reductasas y en especial la NADPH oxidasa y la DuOXs que incrementan sus niveles celulares (Antunes y Cadenas, 2000). El H_2O_2 es una molécula

altamente utilizada en la investigación porque es un potencial segundo mensajero ya que sus propiedades fisicoquímicas que le permiten difundir fácilmente al interior de la célula.

1.1.3 RADICAL HIDROXILO

El OH• puede ser considerado como la forma sin carga neta del ión hidroxilo. El OH• tiene una alta reactividad que lo hace sumamente peligroso y además presenta un tiempo de vida muy corto de aproximadamente 10^{-9} segundos (Pastor et al., 2000). Estas propiedades químicas le permiten reaccionar rápidamente con cualquiera de las moléculas que se encuentran a su alrededor. El OH• puede ser producido *in vivo* por reacciones en donde participan metales de transición como el fierro y el cobre (Valko et al., 2005; Leonard et al., 2004) en la reacción de Fenton como se muestra a continuación:



Sin embargo, no es la única manera que se produce *in vivo* el OH•, ya que el $\text{O}_2^{\bullet-}$ puede reaccionar con el H_2O_2 en una reacción conocida como reacción de Haber-Weiss (Liochev y Fridovich, 2002):



1.2 ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO

El óxido nítrico (NO•) es una pequeña molécula que tiene un electrón desapareado sobre el antienlace 2π y el orbital Py y es considerado un RL. El NO• es producido en diferentes tejidos por medio de la óxido nítrico sintetasa (NOS) la cual cataliza la reacción de Arginina a Citrulina y en donde produce el NO• en una reacción oxidativa en la que participan 5 electrones (Ghafourifar y Cadenas, 2005). El NO• es muy abundante se considera como una molécula que participa en muchos procesos de señalización como la neurotransmisión, la regulación de la presión sanguínea, los mecanismos de defensa, la relajación del músculo liso, la regulación del sistema inmune, etc. (Bergendi et al., 1999). El NO• tiene un tiempo de vida media de unos cuantos segundos en un medio acuoso y una alta estabilidad en un sistema libre de oxígeno. Sin embargo, tiene una gran capacidad de difusión en las membranas y en el citoplasma (Chiueh, 1999), es por ello que participa en fenómenos como la transmisión neuronal y la plasticidad sináptica, en el sistema nervioso central. En el medio intracelular NO• reacciona con el oxígeno y el agua para formar nitratos y aniones nitrito.

1.3 ANTIOXIDANTES

La exposición a las ERO producidas por los procesos fisiológicos o ambientales ha llevado a los organismos a desarrollar mecanismos de defensas (Cadenas 1997). Los organismos se protegen contra el estrés oxidativo inducido por las ERO con mecanismos que pueden ser preventivos, de reparación, defensas físicas y defensas antioxidantes. Este último es uno de los más importantes y está compuesto por enzimas antioxidantes entre las que se encuentran la Superóxido Dismutasa (SOD), GlutathionPeroxidasa (GPx) y la Catalasa (CAT) y otros no enzimáticos entre los que se encuentran el Ácido ascórbico (Vitamina C), α -Tocoferol (Vitamina E), Glutathionreducido (GSH), Carotenoides, Flavonoides y otros antioxidantes.

Las ERO pueden causar la muerte celular vía apoptosis y/o necrosis en algunos tipos celulares, las cuales pueden ser disminuidas o eliminadas por los sistemas antioxidantes (Carmody y Cotter, 2001; Kim et al., 2001; Jang y Surh, 2003). La concentración de ERO y el microambiente celular parecen ser importantes en determinar el tipo de muerte celular (Kim et al., 2001). En condiciones normales siempre existe un balance entre las ERO y las defensas antioxidantes para que los organismos se encuentren en homeostasis.

1.3.1 SUPERÓXIDO DISMUTASA

La superóxido dismutasa (SOD) se encuentra presente en todos los tipos celulares y se ha demostrado que tiene un papel muy importante en la protección de las células y tejidos contra el estrés oxidativo. Se han descrito tres isoformas de SOD, que comparten un mecanismo en común: la dismutación del O_2^{\bullet} en H_2O_2 como se puede observar en la siguiente ecuación:



La ecuación es de primer orden y tiene una constante de Michaelis Menten de $10^9 M^{-1}s^{-1}$ su actividad esta regulada por los niveles de H_2O_2 y por lo tanto presenta mecanismos de retroalimentación con las enzimas encargadas de transformar el H_2O_2 en agua como lo son la catalasa y la Glutathionperoxidasa.

La SOD de cobre y zinc (Cu/Zn SOD o SOD1) se encuentra localizada en el citosol. Es una proteína homodimérica con un peso molecular de 32.5 kDa (Fridovich y Freeman, 1986). El Cu es esencial para la reacción catalítica mientras que el Zn es importante para mantener la estructura de la proteína (Fridovich, 1975). La Cu/Zn SOD no es esencial para el desarrollo y supervivencia, por lo que los ratones KO se desarrollan normalmente hasta adultos sin presentar aparentes daños oxidativos (Tsan, 2001), la sobre-expresión de la Cu/Zn SOD no altera la expresión de la MnSOD (White et al., 1993) y tampoco

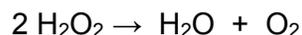
modifica su expresión cuando hay deficiencias de la MnSOD (Copin et al., 2000).

La SOD de manganeso (MnSOD o SOD2) es considerada una de las enzimas antioxidantes más importantes de la célula. Es una enzima homotetramérica con un peso molecular de 88 kDa y requiere Mn en su centro activo (Fridovich, 1975). Constituye el 10-15% de las SOD y se encuentra localizada en la mitocondria (Tsan, 2001). La sobrevivencia de los ratones ha sido relacionada a la MnSOD, ya que ratones deficientes en este gen mueren entre los 10 y 21 días de nacidos de cardiomiopatías, acidosis metabólica y neurodegeneración (Lebowitz et al., 1996; Li et al., 1995).

La SOD extracelular (ECSOD) es muy abundante en los fluidos pulmonares y en los espacios intersticiales de los pulmones de ratones y humanos. ECSOD también es muy abundante en los vasos sanguíneos y en la vía respiratoria aérea. La ECSOD es una glicoproteína de secreción en forma de tetrámero con un peso molecular de 135 kDa y requiere Cu y Zn para su actividad como la isoforma citosólica (Marklund, 1984). Característicamente la ECSOD presenta afinidad heterogénea por la heparina (Marklund, 1982), regula la actividad y modula los niveles del óxido nítrico (Oury et al., 1996). La expresión de ECSOD es inducida por interferón gamma y es inhibida por el factor de necrosis tumoral alfa, el factor de crecimiento transformante beta y la interleucina 1 alfa en cultivo de fibroblastos (Marklund, 1992).

1.3.2 CATALASA

La Catalasa (CAT) tiene una estructura homotetramérica con un peso molecular de 240 kDa (Fridovich y Freeman, 1986) cuya función principal es convertir el H₂O₂ en agua y oxígeno molecular siguiendo la siguiente reacción:

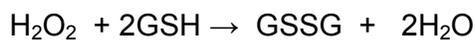


La CAT está presente en la mayoría de las células aeróbicas de animales y se encuentra en mayores proporciones en el hígado y los eritrocitos. El cerebro, corazón y músculo esquelético presentan bajas concentraciones de esta enzima. La CAT está localizada en los peroxisomas y en el citoplasma en neumocitos y macrófagos (Kinnula et al., 1995). Es considerada una de las enzimas antioxidantes más importantes en convertir el H₂O₂ en agua y oxígeno en los neumocitos de rata (Simon et al., 1989). Sin embargo se ha observado en estudios con modelos animales o en cultivos celulares, que la CAT puede ser inducida por hipoxia, oxidantes o citocinas (White et al., 1989a; Tsan et al., 1990; Shull et al., 1991), aunque existen reportes controversiales (Jornot and Junod, 1992; Pietarinen-Runtti et al., 1998). La exposición de lipopolisacáridos en ratas disminuye la expresión de la CAT (Clerch et al., 1996) y es la única enzima antioxidante que se encuentra

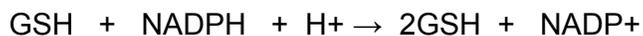
incrementada durante morfogénesis de los pulmones humanos (Asikainen et al., 1998). De manera interesante, la sobreexpresión de la CAT particularmente en la mitocondria de murinos se ha asociado con un incremento en longevidad (Schriner et al., 2005).

1.3.3 GLUTATIONPEROXIDASA

Las Glutationperoxidasas (GPx) son una familia de enzimas antioxidantes dependientes de selenio que puede ser dividida en dos grupos, las celulares y las extracelulares. En general la GPx típica es una proteína tetramérica con un peso molecular de 85 kDa, para realizar su función requiere de cuatro átomos de selenio unidos a cisteínas, lo que le confiere su actividad catalítica. La función principal de esta enzima es reducir el H₂O₂ a agua oxidando a una molécula de Glutation (GSH)(Kinnula et al., 1995) como se presenta en la siguiente ecuación:



La reducción del Glutation oxidado (GSSG) es catalizado por la Glutationreductasa como se muestra en la siguiente ecuación:



Estas dos enzimas trabajan acopladas durante el ciclo del reciclamiento del GSH (Halliwell y Gutteridge, 1989). La capacidad para poder reciclar al GSH es esencial para la defensa antioxidante y previene la pérdida de los tioles celulares (Heffner y Repine, 1989). Existen tres enzimas GPx dependientes de selenio que son diferentes genéticamente y solo una no dependiente de selenio, la forma clásica dependiente de selenio ha sido identificada en una gran variedad de células (Mullenbach et al., 1988). Estas enzimas se encuentran presentes en el citosol de la mayoría de las células. Se ha reportado una forma extracelular de GPx dependiente de selenio en los revestimientos de los epitelios pulmonares y otras células del pulmón (Avisar et al., 1996). De manera muy importante, a nivel celular se ha reportado actividad de GPx en la mitocondria (Mbemba et al., 1985; Esworthy et al., 1997).

1.3.4 VITAMINA C

El ácido ascórbico o vitamina C es muy importante en la defensa antioxidante no-enzimática, ya que esta molécula es muy eficiente en ambientes acuosos. La vitamina C trabaja en conjunto con otras moléculas antioxidantes como la vitamina E y los carotenoides. La vitamina C regenera al α -Tocoferilo (vitamina E oxidada) a su forma reducida, α -Tocoferol, en las membranas y lipoproteínas (Kojo 2004; Carr y Frei 1999).

El ácido ascórbico tiene dos grupos hidroxilo ionizables, es por ello un di-ácido (AscH_2). En condiciones de pH fisiológico, el 99.9% de la vitamina C esta presente como AscH^- , y solo en muy pequeñas proporciones como AscH_2 (0.05%) y Asc^{2-} (0.004%). La estructura química antioxidante de la vitamina C se presenta cuando se encuentra en la forma AscH , en la que puede donar electrones y reaccionar con los RL para producir una estructura estable resonante conocida como ascorbato radical libre (AscH^\bullet), el cual tiene un $\text{pK} = -0.86$, lo que le permite no protonarse y estar en su forma $\text{AscH}^{\bullet-}$. A este producto se le conoce como radical semidehidroascorbato, un radical muy poco reactivo que es considerado una molécula terminal en cuanto a la disminución de la reactividad de los RL. Se considera que los niveles de esta vitamina son una buena estimación del estado de estrés oxidativo en los sistemas biológicos (Kasparova et al., 2005; Cuzzorcrea et al., 2004).

Es reconocido que la vitamina C protege a las membranas contra la oxidación (Retsky et al., 1999), sin embargo, la ingesta de dosis muy altas ha sido un asunto sujeto a intensos debates por años (Cameron et al., 1976). Por una parte, la toma de altas dosis de vitamina C (2000 mg/día) no ha presentado reportes consistentes de sus efectos benéficos y por ello nunca ha sido totalmente establecida como un tratamiento. No obstante, se ha reportado que bajos niveles de vitamina C en el suero están relacionados con propensión a metaplasia gástrica o gastritis crónica, las cuales son consideradas lesiones pre-cancerosas (You et al., 2000). El efecto positivo de la vitamina C en la reducción del cáncer estomacal pudiera ser debido a la acción inhibitoria que presenta para contrarrestar la formación de compuestos N-nitroso, ya que impide la reacción entre los nitritos y los grupos amino. Un efecto protector de la vitamina C ha sido reportado en cáncer de pulmón y colorectal (Knekt et al., 1991). Algunos estudios *in vitro* y en animales en donde se suplementa la dieta con vitamina C, presentan evidencias de que el ascorbato puede ser pro-oxidante (Kang et al., 1998). Este efecto pudiera estar relacionado a la liberación de iones metálicos que pudieran dañar a las células. En otros reportes se ha sugerido que la vitamina C induce la descomposición de lípido hidroperóxidos que reaccionan con el DNA como lo son 4-oxo-2-nonenal, 4,5-epoxy-2(E)-decenal y 4-hidroxi-2-non-enal (Lee, Oe y Blair 2001).

1.3.5 VITAMINA E

La vitamina E es liposoluble y se han descrito ocho formas diferentes. El α -tocoferol es la más activa de las formas y es una poderosa molécula biológica antioxidante en las

membranas celulares (Burton e Ingold, 1989) cuya función principal es proteger contra la lipoperoxidación (Pryor, 2000). Como se mencionó anteriormente, la vitamina C es considerada la molécula antioxidante acuosa por excelencia. Recientes datos sugieren que el α -tocoferol y el ácido ascórbico funcionan acoplados en un proceso cíclico. Cuando se lleva a cabo la reacción antioxidante, el α -tocoferol es convertido en un radical α -tocoferilo debido a la donación de uno de sus hidrógenos lábiles a un lípido o a un radical lípidoperoxil. Por lo que en el siguiente paso de la reacción antioxidante el radical α -tocoferol es reducido a su forma original por la vitamina C (Kojo 2004).

Diferentes reportes epidemiológicos han señalado que ingerir vitamina E en una concentración de 200UI /por día reduce la incidencia de cáncer colorectal, por fomentar la apoptosis de las células cancerosas, y aumentando la expresión de p21wafi/ cip 1, un poderoso inhibidor del ciclo celular (White et al., 1997). Generalmente el efecto protector de la vitamina E se asocia a la inhibición de la formación de RL y activación de endonucleasas. Por otra parte, se han reportado efectos negativos en la combinación de las vitaminas E, C y beta caroteno para prevenir adenoma colorectal canceroso en un periodo de 4 años (Greenberg et al., 1994; Dreher y Junod 1996). Una de las sorpresas reportadas en cuanto a la dosis diaria de Vitamina E fue que 400 UI o más incrementan el riesgo de muerte, por lo que suspendió esta dosis como tratamiento (Miller et al., 2005). En resumen, la dosis apropiada de vitamina E para tener un efecto benéfico es de 200 UI diaria.

1.3.6 GLUTATION(GSH)

El antioxidante no enzimático con grupo funcional tiol mas importante es el tripéptido Glutation(GSH), ya que es considerado el mejor amortiguador redox de la célula. El GSH reducido es considerado el antioxidante soluble más abundante en los compartimentos celulares: citosol 1-11mM, núcleo 3-15mM y 5-11mM en la mitocondria (Masella et al., 2005). Se encuentra presente en los sistemas biológicos en dos formas la reducida GSH y la oxidada GSSG o Glutationdisulfuro. Entre las funciones que se han descrito del GSH se encuentra la de mantener el estado redox en el núcleo de proteínas con altos niveles de residuos de aminoácidos con sulfidrilos que son necesarias para la expresión y reparación del DNA. Un ambiente oxidado modifica rápidamente los sulfidrilos de las proteínas (proteína-SH) oxidando dos electrones y formando grupos funcionales ácido sulfénico (proteína-SOH) u oxidando un electrón formando radicales tiolil (proteína-S•) (Ji et al., 1999). Estos productos parcialmente oxidados reaccionan con el GSH y forman proteínas S-Glutatiónizadas (proteína-SSG), las cuales posteriormente podrían ser

reducidas en el ciclo del Glutathion por medio de la Glutathion reductasa y otras proteínas como la glutaredoxinas y las tioredoxinas para restaurar los sulfidrilos de las proteínas (proteína-SH). El papel del GSH es tan importante que si no estuviera presente, los tioles de las proteínas podrían ser oxidados hasta formas irreversibles como el ácido sulfínico (proteína-SO₂H) o sulfónico (proteína-SO₃H). Generalmente, la capacidad antioxidante de los compuestos tiólicos es debida a su átomo de azufre, el cual fácilmente puede reacomodar su estructura y compensar la pérdida de un electrón (Karoui et al., 1996). De esta manera se pueden producir especies radicales sulfuro como el radical tiolil (GS•). La reacción del Glutathion con un radical libre puede ser descrita de la siguiente manera:



Los radicales generados podrían dimerizarse y formar el Glutathion oxidado de la siguiente manera:



El GSSG puede ser acumulado en el interior de la célula y al relacionarlo con el GSH se puede obtener un ratio GSH / GSSG que es una buena determinación para estimar el estrés oxidativo en un organismo (Hwang et al., 1992). De lo anterior se puede deducir que altos niveles de GSSG pueden reaccionar con los grupos sulfidrilos de las proteínas para producir proteínas-Glutathion disulfuro:



La reacción del GSSG con las proteínas produce proteína—SSG que tienen tiempos de vida media más altos, esto pudiera tener como consecuencia proteínas mal plegadas.

El papel principal del GSH contra el estrés oxidativo, es que puede servir de cofactor de diferentes enzimas detoxificantes como es el caso de GPx, la Glutathion-S- transferasa entre otras; el GSH participa en el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática; GSH reacciona con el OH• y el oxígeno singulete directamente, detoxifica el H₂O₂ y lípidos peróxidos por la acción catalítica de la Glutathion peroxidasa. Además, el GSH es capaz de regenerar las otras importantes moléculas antioxidantes como las vitaminas C y E; el GSH puede reducir el radical tocoferilo de la vitamina E directamente o indirectamente vía la reducción del semidehidroascorbato a ascorbato. La capacidad del GSH para regenerar las otras moléculas antioxidantes importantes está relacionada con el estado redox celular definido por el ratio GSSG/ 2GSH. Este mecanismo tiene un alto impacto sobre el ambiente celular. Los valores medios celulares del potencial reductor para el ratio GSSG / 2GSH son dependientes del ambiente redox en donde se localicen,

de esta manera se ha podido definir que el potencial redox es -180mV en el retículo endoplasmático, mientras que en el citosol es de -232mV . Podemos entonces hablar que la compartimentalización del GSH está relacionada con los diferentes estados redox que prevalecen en las diferentes estructuras subcelulares. El ratio $\text{GSSG} / 2\text{GSH}$ en un ambiente reductor no solo está definido por el mismo ratio $\text{GSSG}/2\text{GSH}$, sino que también se debe de considerar los niveles totales de GSH. Un incremento en la concentración de GSH define el estado de reducción media hacia valores superiores. El contenido intracelular de GSH es en respuesta a factores ambientales y es una función del balance entre uso y síntesis. La exposición a ERO o a compuestos que pueden generar ERO entre los que se encuentran el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), pueden incrementar el contenido de GSH al inducir su síntesis. HNE es eliminado de las células por reacciones con GSH catalizadas por la Glutación-S-transferasa que tienen relativa especificidad por los alquenos. HNE puede activar la vía JNK, la cual posteriormente activa al complejo transcripcional conocido como la proteína activadora (AP-1). Diferentes vías de señalización son utilizadas por la célula para contrarrestar el estrés oxidativo, se ha reportado que el GSH regula la señalización redox alterando tanto sus propios niveles como su relación con el ratio $\text{GSSG}/ 2\text{GSH}$ (Jones et al., 2000). La pérdida de GSH celular se ha relacionado con la disminución de la proliferación en células endoteliales vasculares e incrementada la proliferación en fibroblastos. Esto se ha observado como un mecanismo de autofosforilación del receptor PDGF que se encuentra inhibido por bajas concentraciones celulares de GSH. El GSH está involucrado en la activación de diferentes factores de transcripción entre los que se encuentran NF- κ B, AP-1.

El GSH protege a las células contra la apoptosis, este papel protector está determinado por diferentes mecanismos multifactoriales que involucran la destoxificación y la modulación del estado redox celular, así como, sensibilidad a las diferentes vías de señalización y su interacción con pro y anti señales apoptóticas. Por lo que la importancia de los niveles de GSH son un factor importante en la protección contra la apoptosis, es posible pensar que para tener una terapia anti-cáncer es importante considerar la inducción de la apoptosis disminuyendo los niveles de GSH (Masella et al., 2005).

1.4 ESTRÉS OXIDATIVO

Las ERO son producidas en todos los organismos aeróbicos y normalmente están en la célula en un estado balanceado con las moléculas antioxidantes. El estrés oxidativo se presenta cuando este balance es perturbado por la falta de antioxidantes, generación

excesiva de ERO o por ambas. Así que, cuando los antioxidantes se encuentran en bajas proporciones y/o se incrementa la formación de ERO, se incrementa la respuesta celular para tratar de contrarrestar este evento hasta que se puede controlar o cuando la célula no lo puede controlar entonces activa el proceso de muerte. El estrés oxidativo puede generar un ambiente muy adverso o condiciones extremas en los sistemas biológicos. Un rápido indicador de que el sistema se encuentra en estrés oxidativo es determinar el incremento en la respuesta antioxidante y/o un incremento en los niveles de ERO endógenos. La formación de ERO incrementarse como una consecuencia de diferentes condiciones de estrés ambiental, entre las que se encuentran, radiación electromagnética UV, la exposición a herbicidas, temperaturas extremas, toxinas como la cercosporina y aflatoxina, contaminantes ambientales, metales y xenobióticos. Cuando el estrés oxidativo se presenta, la función de la célula es contrarrestar los efectos oxidativos y restaurar el balance redox tratando de alcanzar los parámetros homeostáticos. Este último evento de la respuesta celular puede activar o silenciar genes que codifican para enzimas de defensa, factores de transcripción y proteínas estructurales (Dalton et al., 1999; Scandalios, 2004).

En los eucariontes superiores, tanto plantas como animales, la respuesta al estrés oxidativo es muy compleja y está modulada por diferentes reguladores (Scandalios, 1997). El estado redox dependiente de ERO que modifica el reciclamiento de los tioles de los residuos de cisteínas es sumamente importante para establecer las interacciones proteína-proteína y proteína-DNA que son fundamentales para los procesos de transducción de señales y para la regulación de la actividad de algunos factores de transcripción (Dalton et al., 1999; Delaunay y Scandalios, 2004; Storz e Imlay, 1999; Kiley y Storz, 2004; Ruis y Schuller, 1995; Moradas-Ferreira y Costa, 2000; Isnard y Toledano, 2000), como es el caso de la activación del factor NF- κ B y la proteína AP-1, conocidos por tener una participación fundamental en procesos como la proliferación, diferenciación y morfogénesis, los cuales pueden ser estimulados por diferentes agentes que convergen en un mecanismo común que involucra la producción de ERO. Un mecanismo que se ha descrito, es que al incrementarse la producción de H_2O_2 se tiene como consecuencia la activación redox de NF- κ B y en el cual participa una forma activa de la proteína Rho que es una GTPasa que responde a la modificación del estado redox celular (Gabbita et al., 2000).

Las fuentes de ERO, tanto extracelulares como intracelulares, son capaces de modular la expresión de genes. Dosis bajas de H_2O_2 (<20 μ M) pueden producir cambios en la fosforilación de proteínas reguladoras específicas entre las que se encuentra la proteína

cinasa B también conocida como Akt. La acción directa de la señalización por H_2O_2 en la regulación diferencial de genes antioxidantes en plantas y animales, es debida a las interacciones proteína-DNA en la región del elemento de respuesta antioxidante (ARE; TGACTCA), NF- κ B y el elemento 2 de respuesta al ácido abscísico (ACGT) en los promotores de estos genes. Además la inducción de la expresión de genes de defensa, otros papeles del desbalance redox en plantas incluyen muerte directa de patógenos, la modificación de la estructura de la pared celular y la inducción de la muerte celular programada (Scandalios 1997). En levaduras y animales, el estrés oxidativo puede llevar a la detención de la división celular y a la progresión del ciclo celular (Paulovich et al., 1997). Un claro ejemplo de como la ERO pueden tener un papel benéfico fue cuando se observó que el $O_2^{\bullet-}$ desempeñaba un papel importante en la infección por microbios, en donde su actividad puede ser comparada con la de un antibiótico de amplio espectro (Babior 1984.). En plantas, la respuesta a la invasión por patógenos también involucra un desbalance redox que tiene que ver con un aumento transitorio de grandes cantidades de ERO (Doke 1997).

El estado de estrés oxidativo generado por el incremento de ERO desempeña papeles diferentes, y en ocasiones opuestos, durante diferentes procesos celulares. Por ejemplo, el H_2O_2 puede actuar de una manera relevante en los procesos de transducción de señales por medio de la activación de NF- κ B, mientras que en condiciones patológicas de estrés oxidativo el H_2O_2 puede inducir la apoptosis o la necrosis. El estado estable de los niveles de ERO en las células es crítico y es determinante para determinar si la célula debe de incrementar los niveles de ERO o active mecanismos que modulen la respuesta antioxidante celular.

1.5 HORMESIS Y ESTRÉS OXIDATIVO

La hormesis puede definirse como: “Un proceso en el cual la exposición a bajas dosis de un agente químico o un ligero cambio en los factores ambientales inducen un efecto benéfico adaptativo a la célula u organismo, que lo protege cuando es expuesto a dosis más elevadas”.

La hormesis es un concepto fundamental en la teoría evolucionista. Desde sus inicios hasta estos momentos, la vida en la tierra ha existido en ambientes adversos en los cuales las células han sido expuestas a RL y otras sustancias tóxicas. Para evitar la extinción los organismos han desarrollado mecanismos complejos para contrarrestar esos ambientes. Típicamente esas vías de respuestas horméticas involucran a proteínas como canales iónicos, cinasas, desacetilasas y factores de transcripción, que regulan la

expresión de genes que codifican para proteínas citoprotectoras. Han sido identificadas diferentes categorías de proteínas que se expresan en la respuesta hormética, entre las que se encuentran proteínas “chaperonas” como las proteínas de choque térmico, enzimas antioxidantes como la SOD y la GPx y factores de crecimiento como el factor de crecimiento relacionado a la insulina y el factor neurotrófico derivado del cerebro (Mathers et al., 2004; Mattson et al., 2004; Young et al., 2004). En algunos casos los organismos han utilizado las propiedades químicas de los agentes tóxicos incorporándolos dentro de sus vías metabólicas o de señalización. Ejemplos de ellos son el oxígeno en la respiración, el monóxido de carbono como molécula de señalización en las neuronas, el hierro y el selenio, metales potencialmente tóxicos, que son utilizados en las funciones de diferentes enzimas.

Se han estudiado muchos casos de como las células y organismos responden de forma bifásica a químicos o ambientes de estrés, entre los cuales podemos mencionar exposición a xenobióticos, cambios en la temperatura, radiación, entre otros. Uno de los modelos más estudiados en los experimentos de hormesis es el llamado pre-acondicionamiento isquémico, este se produce cuando un órgano como el corazón o el cerebro son sujetos a una ligera isquemia, y cuando posteriormente se les expone a una isquemia mayor, las células presentan resistencia a la muerte (Yellon y Downey, 2003; Pong, 2004). La isquemia presenta una respuesta bifásica dependiente de la dosis, en periodos ligeros de isquemia presenta efectos protectores y altas exposiciones de isquemia presentan daño celular. Los mecanismos celulares y moleculares que están presentes durante el pre-acondicionamiento isquémico han empezado a entenderse y estos podrían involucrar estrés oxidativo que induce vías de señalización citoprotectoras en donde participan la activación de cinasas, cambios en la funcionalidad mitocondrial y la expresión de genes que codifican enzimas antioxidantes y proteínas chaperonas (Juhaszova et al., 2004).

Una observación común en los estudios de hormesis, es que la exposición a bajas concentraciones de un tipo de agente hormético puede proteger a las células u organismos contra más de un tipo de estrés. Un ejemplo de esto son las células expuestas a ligeros aumentos en la temperatura, que pueden protegerse contra el daño oxidativo o a toxinas como el cianuro (Li et al., 2002). Algunos fitoquímicos presentan efectos benéficos por activar las vías de señalización de respuesta al estrés. Las vías que típicamente están involucradas en la activación de cinasas y factores de transcripción, presentan un incremento en la producción de proteínas citoprotectoras entre las que se encuentran enzimas de la fase II de detoxificación, enzimas antioxidantes, proteínas de

choque térmico, factores de crecimiento y proteínas involucradas en la regulación del metabolismo energético celular (Mattson y Cheng, 2006). Ejemplos de estas respuestas incluyen la activación del factor de transcripción Nrf2 por sulforafano y curcumina (Lee y Surh, 2005); la activación de desacetilasas de histonas y sus factores de transcripción blancos FOXO por acción del resveratrol (Frescas et al., 2005); y la activación del receptor transitorio al potencial (TRP) y canales de calcio por la capsaicina y alicina (Bautista et al. 2005).

1.6 Nrf2

Se han descrito respuestas adaptativas mediadas por diferentes factores de transcripción en respuesta al estrés oxidativo, como el receptor de activación de la proliferación por peroxisomas gamma (PPAR γ), (Collino et al., 2006), la sirtuina (silent mating type information regulation 2 homolog) 1 (SIRT1) (Brunet et al., 2004), El factor activador de la transcripción tipo 4 tor 4 (ATF4) (Harding et al., 2003), los factores de transcripción Sp1/Sp3 (Ryu et al., 2003), la proteína p53 (Finkel y Holbrook, 2000) y algunas otras.

Un factor de transcripción muy importante que participa en la regulación de la protección antioxidante, principalmente en la fase II de detoxificación, es el factor de transcripción Nrf2 (Nuclear Factor Erythroid 2-related factor) que regula la expresión inducible de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes, mediante su unión a una secuencia específica del ADN conocida como ARE (de sus siglas en inglés: Antioxidant Response Element), que puede ser activada por diversos compuestos oxidantes y/o electrófilos de naturaleza química muy diversa. La actividad del factor Nrf2 se encuentra constitutivamente reprimida debido a su unión con una proteína citoplásmica llamada Keap1 y al citoesqueleto. Dicha unión fomenta la permanente degradación de Nrf2 por el proteosoma, por lo que el control primario de su función radica principalmente en su distribución subcelular, más que en la síntesis *de novo*.

Nrf2 tiene la capacidad de controlar algunos aspectos diferentes de la protección celular, entre las que se incluyen la reparación del DNA (Aoki et al., 2007), el metabolismo de los grupos hemo (Ishii et al., 2000), la reducción de quinonas (Itoh et al., 1997), el flujo de transporte (Maher et al., 2007), y fundamentalmente la síntesis de Glutathione (Sekhar et al., 2002a) Estas funciones solo representan una fracción de las muchas funciones de la actividad transcripcional de Nrf2 que comienzan a estudiarse con gran detalle.

A pesar de ser una molécula altamente conservada en diferentes especies, la función de Nrf2 se ha adaptado a la presión de la selección natural para proporcionar los máximos beneficios al organismo. Sin embargo, se ha observado claramente que la dinámica de

activación de Nrf2 se encuentra en función del ambiente redox que está determinado por los niveles de las moléculas que contienen en su estructura química al grupo funcional sulfhidrilo que determinan el rango de actividad fisiológica. Este rango está relacionado a las condiciones que la célula puede responder a estímulos que pueden ser benéficos o dañinos y en los cuales la activación transcripcional de Nrf2 es importante para la sobrevivencia celular. Se ha observado que la modulación de la activación de Nrf2 en eventos tóxicos agudos es incrementando las defensas celulares antioxidantes, sin embargo, este evento no es claro en los eventos crónicos, ya que un aumento sostenido de la actividad de Nrf2 no sería benéfico para el organismo.

1.7 Bcl-2

La apoptosis es un proceso altamente regulado, que involucra cambios en la expresión de distintos tipos de genes. Uno de ellos es el proto-oncogene *bcl-2* que codifica para una proteína integral de membrana de 26kDa, que se encuentra localizada en la envoltura nuclear en parte del retículo endoplasmático y en la membrana externa mitocondrial. El producto del gen *bcl-2* se ha observado que prolonga la sobrevivencia celular, ya que puede impedir la muerte celular inducida por una gran variedad de estímulos y tratamientos entre los que se encuentran, agentes quimioterapéuticos, radiación, H₂O₂, carencia de factores de crecimiento, neurotoxinas entre otros (Kim et al., 2001, Zhon et al., 1993; Blum et al., 2001). A pesar de que se han hecho una gran cantidad de investigaciones, aún se desconoce el mecanismo exacto por el cual Bcl-2 impide la apoptosis. La localización de Bcl-2 en el sitio en donde se generan la mayor cantidad de RL y la evidencia que las ERO son capaces de inducir la apoptosis en diferentes líneas celulares, han llevado a proponer la posibilidad de que Bcl-2 podría prevenir la apoptosis por participar como una molécula antioxidante o por suprimir la producción de RL. Datos experimentales de estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que Bcl-2 podría bloquear la apoptosis a través de la regulación de los mecanismos de defensa celular antioxidante (Hockenbery et al., 1993, Kane et al., 1993). Los niveles de OH[•] generados por agentes como el ácido 3-nitropropionico, disminuyeron en células que sobre-expresan Bcl-2 en comparación con las células transfectadas con el vector (Amstad et al., 2001; Bogdanov, et al., 1999). La sobre-expresión ectópica de Bcl-2 también disminuye la acumulación de peróxidos inducida por tratamientos con TGF-β, β-Lapacona o adriamicina (Huang y Chou, 1998; Chau et al., 1998; Lawrence et al., 1996). Además de los reportes anteriores es muy aceptado que la sobre-expresión o la inducción de Bcl-2 confiere resistencia ante daños oxidativos, ya que Bcl-2 disminuye la lipoperoxidación, el daño oxidativo al DNA y

proteínas inducido por una gran cantidad de estímulos (Bruce-Keller et al., 1998; Fabisiak et al., 1997; Myers et al., 1995; Lee et al., 2001; Gangmin et al., 1999; Godley et al., 2002).

1.7.1 PARTICIPACIÓN DE Bcl-2 EN LA REGULACIÓN DEL ESTADO REDOX CELULAR

Se ha observado que las células que sobre-expresan Bcl-2 tienen incrementado los niveles de expresión de las enzimas antioxidantes, así como un aumento en la concentración de GSH (Lee et al., 2001). Diferentes líneas de investigación sugieren que el efecto de Bcl-2 sobre la expresión o actividad de las enzimas antioxidantes son tipo celular específico. Por ejemplo, Bcl-2 incrementa la actividad de la CAT en la línea celular de feocromocitoma de rata PC12 pero no en la línea celular hipotalámica GT1-7. La actividad de la GPx y la GR en las líneas anteriores que sobre-expresan Bcl-2 fue similar respecto a las células control transfectadas (Ellerby et al., 1996). Por otra parte, astrocitos que sobre-expresan Bcl-2 presentan incremento en la actividad de SOD y GPx, pero la línea celular de linfoma hematopoyético murino FL5-12 no presentó algún cambio en la actividad de ninguna enzima antioxidante cuando fue transfectada con Bcl-2 (Papadopoulos et al., 1998). Células de teratocarcinoma NT-2/D1 y de neuroblastoma SK-N-MC transfectadas con Bcl-2 muestran un incremento en la actividad de SOD Cu/Zn, pero no en las enzimas SOD Mn, GPx y GR (Lee et al., 2001b). Por otra parte, ratones Knockout (KO) para Bcl-2 presentan patologías asociadas con defectos en las enzimas antioxidantes (Hochman et al., 1998). También se ha reportado que la sobre-expresión de Bcl-2 mimetiza el efecto de sobre-expresar SOD en modelos experimentales *in vitro* o *in vivo* (Merad-Saidoune et al., 1999) y sorprendentemente el fenotipo de ratones KO para la SOD es similar al fenotipo de los ratones KO para Bcl-2 (Huang et al., 1997). Los resultados anteriores sugieren distintas funciones de Bcl-2 en la regulación del estado redox celular en respuesta al estrés oxidativo.

1.7.2 Bcl-2 EN EL MANTENIMIENTO DE LOS NIVELES DE GSH

Se ha observado que células que sobre-expresan Bcl-2 tienen incrementados los niveles de GSH y además cuando se disminuye la expresión de Bcl-2 también disminuyen los niveles de GSH (Ellerby et al., 1996; Voehringer 1999). Por lo tanto, Bcl-2 podría bloquear los mecanismos de apoptosis a través de la modulación del metabolismo del GSH ya que se ha reportado que la disminución de los niveles de GSH intracelular están relacionados con el inicio de la apoptosis. Cuando las líneas celulares PC12 y GT1-7 fueron

transfectadas con Bcl-2, sus niveles totales de GSH se elevaron sin encontrarse alteraciones significativas en las actividades de las enzimas GPx y GR, indicando que la sobre-expresión de Bcl-2 establece un estado redox celular altamente reducido (Ellerby et al., 1996). Además, Bcl-2 puede alterar la compartimentalización del GSH ya que con lleva a una relocalización del GSH desde el citosol al núcleo, este desplazamiento podría cambiar el potencial redox nuclear, induciendo un ambiente altamente reductor (Voehringer et al., 1998). El GSH nuclear podría participar como un regulador transcripcional de NF- κ B, AP-1 y p53 debido a la alteración en el estado redox nuclear (Toledano et al., 1994). Los cambios transcripcionales fueron observados en células con diferentes niveles de expresión de Bcl-2 los cuales fueron determinados por microarreglos, lo cual sugiere que el GSH actúa mediante un mecanismo dependiente de Bcl-2 en donde regula la transcripción por alterar el ambiente redox celular (Voehringer et al., 2000; Ellerby et al., 1996, Rahman y MacNee, 2000).

1.7.3 MECANISMOS DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA Bcl-2 EN RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO

La regulación de la expresión de la proteína Bcl-2 en respuesta al estrés oxidativo vía del factor de transcripción NF- κ B ha sido demostrada en cultivos de la línea celular del feocromocitoma (PC12), transfectada para sobre-expresar *bcl-2* y resistir la muerte celular por apoptosis inducida con H₂O₂. Por otra parte, se ha visto que los niveles de expresión de la proteína Bcl-2 no sólo se ven alterados por moléculas involucradas directamente con el estado de estrés oxidativo. Entre las moléculas inductoras más importantes se puede mencionar a TNF- α , la que participa en una vía de transducción de señales en la que se involucra la expresión de Bcl-2 y la respuesta antioxidante. TNF- α se une a su receptor membranal cambiando su estructura promoviendo su asociación con la proteína TRADD, que por su parte, se asocia con TRAF-2 de dos maneras. La primera está relacionada con la activación del factor de transcripción AP-1 y el aumento en la expresión de genes involucrados en la respuesta antioxidante debidas al estado de estrés oxidativo, que activa la vía JNK. En la segunda forma, también conocida como la vía clásica o canónica de NF- κ B, TRAF-2 estimula a la cinasa del factor nuclear κ B (NIK), que a se vez fosforila a la cinasa que actúa sobre I κ B (IKK), que por su parte, fosforila a I κ B, el inhibidor de NF- κ B. Una vez fosforilado el inhibidor, este es ubiquitinado y degradado por el proteosoma; dejando en libertad a NF- κ B que migra al núcleo y activa la expresión de genes involucrados en la supervivencia celular entre los que destaca Bcl-2 (Hadad, 2004).

La expresión de la Bcl-2 es muy diversa en diferentes tipos de tejidos y sus niveles dependen del estado de diferenciación, de esta manera se ha observado que en células comprometidas a un linaje celular específico o totalmente diferenciadas, los niveles de expresión de Bcl-2 son altos, por el contrario en aquellos tipos celulares poco comprometidos y que tienen una tasa elevada de duplicación los niveles de la expresión de Bcl-2 son bajos (Crescenzi et al., 2003; Adams y Cory 2007). Nuestro grupo de trabajo demostró que la concentración de Bcl-2 determinada en homogeneizados de pulmón, hígado, riñón y bazo de ratón, aumenta gradualmente en forma directamente proporcional con la edad del organismo, desde recién nacidos y hasta 24 meses de edad (López-Araiza et al., 2006). Sin embargo, si se obtienen cultivos primarios de fibroblastos de pulmón provenientes de ratones jóvenes y viejos, y se les cultiva hasta llegar a la senescencia *in vitro*, el contenido de Bcl-2 no aumenta, por lo que es probable que sea necesario otro estímulo ausente del cultivo para que aumente la expresión de esta proteína (Konigsberg et al., 2006).

1.7.4 OTROS MECANISMOS DE REGULACIÓN DE Bcl-2

La proteína Bcl-2 es susceptible a ser fosforilada por varias cinasas, como por ejemplo la cinasa regulada por señales extracelulares (extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2). El sitio de fosforilación es una tirosina en la región BH3 y al parecer la fosforilación es una señal para que Bcl-2 sea degradada vía el proteosoma (Pérez-Galán et al., 2008). Por otro lado, se ha sugerido que existe una relación entre los niveles de Ca^{+2} y la presencia de Bcl-2 en la membrana del RE y de la mitocondria. Se sabe que Bcl-2 es dirigida a estas membranas gracias a la participación de la chaperona FKBP38 (proteína de unión 38 a FK506). FKBP38 es una proteína multimérica que pertenece a una familia de peptidil-prolil cis/trans isomerasas (PPIasas). Estas enzimas son proteínas que participan durante el proceso de plegamiento, biogénesis, ensamble y transporte intracelular de otras proteínas. Además catalizan la isomerización cis/trans de las prolinas, lo cual confiere actividad biológica a la conformación nativa de algunas proteínas. Las proteínas FKBP comparten características estructurales como es el dominio N-terminal con actividad de PPIasa, seguido de la repetición de tres tetratricopéptidos (TPR) y un motivo de unión a calmodulina (CaM). Asimismo, cuenta con un sitio de anclaje a la membrana en el C-terminal. Por lo que se le ha co-localizado con Bcl-2 en las membranas externas de la mitocondria y la de RE (Edlich et al., 2005). Ahora se sabe que para que FKBP38 se active, se requiere de la presencia de Ca^{+2} y CaM para que se forme un complejo $Ca^{+2}/CaM/FKBP38$, el cual cambia su conformación y es capaz de unirse a Bcl-

2. Se ha propuesto que el complejo $\text{Ca}^{+2}/\text{CaM}/\text{FKBP38}$, no solo transporte a Bcl-2 a la mitocondria y RE, sino que le permita anclarse en las membranas junto a Bcl-2 e interactuar con dicha proteína. Esto cambiaría la conformación de Bcl-2 y favorecería su unión con Bad permitiendo el inicio de la apoptosis. Se ha reportado que al aumentar los niveles de Ca^{+2} se favorece el complejo antes mencionado y se induce la apoptosis, así mismo, al inhibir la liberación del Ca^{+2} de sus reservorios celulares con el agente inhibidor conocido como GPI1046 o empleando RNAi contra FKBP38 se previene la apoptosis mediada por Bcl-2 (Edlich et al., 2007; Hinds et al., 2003).

2. JUSTIFICACIÓN

Desde que los organismos incorporaron al oxígeno dentro de su metabolismo, se han visto obligados a desarrollar diferentes estrategias que les han permitido adaptarse al efecto de generar ERO. Estas moléculas altamente reactivas, que pueden generar daños a las biomoléculas, han sido relacionadas con diferentes procesos fisiológicos como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas y el envejecimiento entre otros. Sin embargo, no solo se les ha relacionado en procesos dañinos, también se ha descrito que son necesarias para que se lleven a cabo diferentes procesos benéficos para los organismos, como lo son los procesos de diferenciación y transducción de señales.

Para que se lleven a cabo ambos procesos, es necesario que existan modulaciones en el estado redox, es decir que haya un estado oxidante que pudiera o no llegar a ser de estrés oxidativo potencialmente capaz de generar daño oxidativo.

Las respuestas celulares que se han descrito en respuesta al estrés oxidativo son muy variadas y dependen del nivel de estrés que se haya generado. Entre las respuestas celulares más descritas se encuentra el incremento en la expresión de enzimas antioxidantes, la reparación del daño a las biomoléculas y la expresión de proteínas involucradas en la muerte o sobrevivencia celular. Resulta interesante estudiar la interrelación que existe entre las diferentes respuestas celulares que se presentan en respuesta al estrés oxidativo o cambios en el estado redox, ya que parece existir una correlación entre ellas. Por otra parte, la respuesta celular es dependiente de la intensidad del estímulo y de alguna manera las células pueden responder drásticamente al inducir la muerte celular ante un daño severo o dar respuestas del índole adaptativo para contrarrestar eventos más intensos de estrés oxidativo y que pudieran ser letales para el organismo, a esta respuesta adaptativa se le conoce como hormé시스.

La necesidad de conocer la respuesta celular a diferentes intensidades de estímulos oxidativos, nos han llevado a proponer modelos horméticos, que colaborarán en la comprensión de las relaciones entre las diferentes respuestas celulares dicho estrés.

Algunas de las relaciones más importantes ha estudiar, son aquellas que se presentan entre las proteínas encargadas de la respuesta antioxidante y las proteínas que participan en la sobrevivencia celular. Entre las muchas relaciones que pueden ser analizadas, resulta interesante estudiar la que se presenta entre los factores de transcripción que responden a la modificación del estado redox celular, como es el caso de Nrf2 y NF- κ B, que además, participan en la regulación de la expresión de las enzimas antioxidantes. Adicionalmente NF- κ B también regula la expresión de proteínas que participan en la regulación de la muerte celular como es el caso de la proteína Bcl-2, que además de ser una proteína antiapoptótica que también ha sido relacionada con funciones antioxidantes.

Los resultados adquiridos en la respuesta celular antioxidante en modelos horméticos, serán de gran utilidad, ya que además de ayudar a entender las interacciones que se presentan en las respuestas adaptativas, es posible que se puedan aplicar en diferentes modelos de patologías y fenómenos asociadas al estrés oxidativo, como lo son los modelos de isquemia-reperfusión, enfermedades neurodegenerativas y envejecimiento. Adicionalmente, se podrían establecer las condiciones necesarias para tratar de responder preguntas asociadas a la resistencia que presentan algunas líneas celulares cancerígenas a los tratamientos de quimioterapia.

3. OBJETIVO

Determinar los mecanismos que regulan la expresión de la proteína Bcl-2 en respuesta al estrés oxidativo y determinar su participación en la respuesta antioxidante en la línea celular de fibroblastos de pulmón de ratón L-929.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer un modelo de sobrevivencia debido a la expresión endógena de Bcl-2 como respuesta al estrés oxidativo.
- Determinar el daño al DNA ante diferentes retos de estrés oxidativo.
- Determinar si la sobre-expresión endógena de Bcl-2 en respuesta a diferentes retos oxidativos tiene efecto sobre el estado Redox celular
- Determinar la expresión de Bcl-2/BAX ante diferentes retos de estrés oxidativo.
- Determinar el efecto protector de Bcl-2 en un modelo de sobre-expresión endógena de Bcl-2.
- Determinar la respuesta antioxidante en el modelo de sobre-expresión endógena de Bcl-2.
- Determinar la expresión de enzimas antioxidantes en el modelo de sobre-expresión endógena de Bcl-2.
- Determinar la activación de Nrf2 ante diferentes retos de estrés oxidativo.
- Determinar la activación de NF-κB en el modelo de sobre-expresión endógena de Bcl-2 en respuesta al estrés oxidativo.
- Determinar el mecanismo que regula la expresión de Bcl-2 en la vía transduccional de NF-κB.

4. HIPÓTESIS

Debido a que Bcl-2 es una proteína de supervivencia celular relacionada con la respuesta antioxidante, se espera que al modificar el estado Redox celular mediante un reto oxidativo se incrementen los niveles de expresión de Bcl-2 y que esto conlleve a contribuir o sostener el mecanismo protector durante la respuesta hormética.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 CULTIVO CELULAR

La línea celular L929 de fibroblastos de pulmón de ratón, fue cultivada a 37°C con una atmósfera de 95% de aire y 5% CO₂. Las células se cultivaron en Medio Esencial Mínimo (MEM GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA) suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS; GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA), 5% de suero de ternera (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA), 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomina (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD). El medio fue reemplazado cada dos o tres días y las células fueron triplicadas cuando llegaron a confluencia. Todos los experimentos se realizaron en condiciones de subconfluencia.

5.2 MODELO DE HORMESIS

Se sembraron células L-929 a una densidad de 3×10^5 en cajas de 24 pozos (Corning, Acton MA, USA). Después de 12 h se les administró el tratamiento con diferentes concentraciones de H₂O₂ por 24 h y posteriormente se evaluó la viabilidad celular por medio de la técnica de exclusión del colorante azul tripano. Posteriormente se eligieron 2 concentraciones de los tratamientos con H₂O₂, las cuales deberían de ser opuestas en cuanto a su efecto sobre la viabilidad celular. De esta manera se eligieron a los tratamientos con 50 y 200 µM de H₂O₂ y se expuso a la línea celular L-929 a diferentes intervalos de tiempo (0, 3, 6, 9, 15 h).

Una vez evaluada la viabilidad celular, se eligió el tiempo de exposición al H₂O₂ en el cual el tratamiento con 200 µM de H₂O₂ mostrara 50% de viabilidad celular y el tratamiento con 50 µM de H₂O₂ en donde no se encontrara una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control sin tratamiento.

Una vez establecido que el tiempo de exposición al H₂O₂ era de 9 h, se trató a 3X10⁵ células L-929 por ese tiempo y posteriormente se administraron dosis letales de H₂O₂ (200,300 y 400 µM) durante 3 h y posteriormente se evaluó la viabilidad celular.

5.3 SOBRE-EXPRESIÓN ENDÓGENA DE Bcl-2

Para determinar si la expresión de Bcl-2 fue inducida en respuesta a los retos oxidativos, las células fueron tratadas con las dos concentraciones de H₂O₂ elegidas, a diferentes períodos de exposición. Las células L-929 fueron sembradas a una densidad de 5X10⁶ células en cajas de petri de 100mmX20mm (Corning, Acton MA, USA). Después de 12 h las células fueron incubadas con 50 µM H₂O₂ disuelto en el medio de cultivo durante 0, 3, 6, 9 y 12 h a 37 °C y 5% CO₂; Después de los tratamientos con H₂O₂, se aislaron el RNA y las proteínas totales para determinar la expresión de Bcl-2 y Bax.

5.4 AISLAMIENTO DE RNA, TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y PCR

El RNA total fue extraído de las células tratadas con 1 mL del reactivo de Trizol^R (Invitrogen, Carlsbad, CA USA) de acuerdo al protocolo descrito por Chomczynski (1993). La integridad del RNA fue confirmada por electroforesis en geles de agarosa 1.2 %. El RNA mensajero de cada muestra fue convertido a cDNA, utilizando el sistema de pre-amplificación SuperscriptTM (Invitrogen, Carlsbad, CA USA) de acuerdo a las instrucciones del productor.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue realizada con los siguientes primers: *bcl-2* (250 pb): 5'-CGG CTT TGC AGA GAT GTC CA-3' (forward) y 5'- ATG CCG GTT CAG GTA CTC AG5' -3' (reverse), *bax* (230 pb): 5'-GAA CAG ATC ATG AAG ACA GG-3''(forward) y 5'-GCA AAG TAG AAG AGG GCA AC-3' (reverse);el gen de *ciclofilina* fue utilizado como control de normalización (450pb) y se utilizaron los siguientes primers 5'-CCC CAG CGT GTT CTT CGA CAT-3 (forward) y 5'-GCT GGT CTT GCC ATT CCT GGA 3' (reverse). La Reacción fue completada con 5 µL de amortiguador PCR, 1.5 µL de MgCl₂ 50 mM, 1 µL dNTP's master mix 10 mM, 0.3 µL del primer *cyclophilin* 20 mM, 1 µL del primer Bcl-2 o Bax 20 mM, 1 U GoTaq polimerasa (Promega, Madison WI, USA), 5 µL del producto de retrotranscripción y 34.6 µL de agua ultrapura para PCR.

Las reacciones de amplificación de PCR fueron realizadas de acuerdo a las siguientes condiciones: 94 °C durante 5 min (Temperatura inicial de desnaturalización), temperaturas de amplificación: desnaturalización 94 °C durante 30 s, alineamiento 57 °C durante 30 s, y elongación 72 °C durante 30 s, se repitió la secuencia de temperaturas de amplificación durante 35 ciclos, finalmente se aplicó una última temperatura de elongación de 72 °C

durante 3 min. Los productos de PCR fueron separados por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 %, para visualizar los productos de PCR a cada muestra se le adicionó 1 μ L de bromuro de etidio con una concentración de 1 mg/mL. La expresión del mRNA fue cuantificada usando un analizador de imágenes Kodak IMAGEN GEL DOC, con un software Kodak 3.1, y se utilizó el mRNA de *ciclofilina* como gen de normalización signal. Los datos fueron expresados en unidades arbitrarias (A.U.).

5.5 ANALISIS DE WESTERN BLOT

La expresión de las proteínas Bcl-2, Bax, GST, γ GCS, α kB, en la línea celular L929 fue determinada por medio de la técnica de Western blot. Las células tratadas fueron despegadas con tripsina y resuspendidas en el amortiguador de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 120 mM NaCl, 0.5% NP40, 100 mM NaF, 0.2 mM NaVO₃, 1 μ g/mL aprotinina, 1 mM PMSF, 1 μ g/mL leupeptina). Los homogenados celulares fueron incubados a 4 °C durante 10 min y posteriormente centrifugados a 14000 rpm a 4°C durante 20 min. La concentración de proteínas fue determinada en el sobrenadante utilizando el reactivo comercial de Bradford (BioRad, Hercules CA, USA) (Bradford, 1976). Los lisados celulares fueron separados en un gel SDS-PAGE al 12 % y transferido a una membrana de PVDF (BioRad, Hercules CA, USA). Las Membranas fueron bloqueadas con TBS-Tween 0.1 %, 5 % leche libre de grasa durante 1 h, y posteriormente se incubó con un anticuerpo monoclonal α -Bcl-2 o α -Bax (Neomarker, Fremont CA, USA) durante 2 h. Las membranas fueron lavadas tres veces con TBS-Tween e incubadas con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rabano (Pierce, Rockford IL, USA) durante 1 h. Después se lavó la membrana tres veces, los blots fueron revelados utilizando un reactivo quimioluminiscente comercial (Supersignal[®] Pierce, Rockford IL, USA).

5.6 INHIBIDOR Bcl-2

Para determinar sí el efecto citoprotector fue inducido por el tratamiento con el H₂O₂ o por la expresión de Bcl-2, utilizamos un pre-tratamiento con la molécula HA14-1 (Etil - [2 - amino - 6 - bromo - 4 - (1 - ciano - 2 - etoxi - 2 - oxoetil)] - 4H -cromen -3-carboxilato) (Calbiochem) (Wang, J.L. 2000) un inhibidor que interactúa con el dominio BH3 impidiendo la función antiapoptótica de Bcl-2. El inhibidor HA14-1 es una molécula que se disuelve en solventes orgánicos como el dimetil sulfóxido (DMSO) que puede ser tóxico para las células, por lo que se realizaron curvas de viabilidad con diferentes concentraciones de DMSO y con ello se determinó la concentración en la que se debería

de disolver el inhibidor HA14-1 que no fuera nociva. La concertación de HA14 empleada fue de 10 μ M en 0.2% DMSO, el inhibidor fue adicionado al medio de cultivo y las células fueron pre-tratadas durante 4 h y posteriormente se adicionó el H₂O₂ 50 μ M durante 9 h, y después se aplicaron tratamientos con dosis letales de H₂O₂ durante 3 h mas para posteriormente evaluar la viabilidad celular.

5.7 DETERMINACIÓN DEL ESTADO REDOX GSH/GSSG

La concentración de GSH y GSSG fue determinada por medio de HPLC usando la técnica descrita por Fariss y Reed (1987) con algunas modificaciones. Las células tratadas fueron recolectadas con 1 mL de ácido perclórico (Sigma) al 10 %, y el pellet sonificado durante 45 s, posteriormente se centrifugó a 5000 xg durante 5 min a 4 °C. Del sobrenadante se tomaron 250 μ L y se le adicionaron 50 μ L de ácido iodoacético (Sigma) 100 mM en 0.2 mM de purpura de m-cresol (Sigma). Este mismo procedimiento se realizó para los estándares de GSH y GSSG. Para neutralizar el pH ácido se adicionaron 240 μ L de una mezcla de KOH/KHCO₃ y se incubaron durante 1 h en la oscuridad, posteriormente se adicionó 1 mL de 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno (Sigma) al 1% en etanol al 100% grado HPLC. Los N-Dinitrofenoles derivatizados fueron inyectados en un sistema cromatográfico (Controlador Waters 600 acoplado a un detector VIS-UV 486 Waters), y separados en una columna 3-aminopropil de (5 μ m; 4.6 mm X 20 cm; Custom LC, Houston, TX). La fase móvil fue eluida a un flujo de 1 mL/min en un gradiente con las siguientes condiciones 8 min con un flujo de 80 % de la fase móvil A (Metanol al 80 %) y 20 % de la fase móvil B (Acetato de sodio 4 M) y posteriormente se aplicó el gradiente de 25 min en forma lineal hasta llegar a 1 % de A y 99 % de B. Los N-dinitrofenoles derivatizados fueron detectados a una longitud de onda de 365 nm.

5.8 EXTRACCIÓN DE DNA E HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

El DNA se aisló utilizando el método caotrópico de NaI (Wang et al., 1994), y modificado por Matos y colaboradores (2001). Después de los tratamientos 1X10⁶ células fueron colectadas y resuspendidas en 1 mL de solución de lisis (0.32 M sacarosa, 5 mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100, 5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM desferroxamina, pH 7.5). Los homogenados celulares se centrifugaron a 1500 xg durante 10 min, se recuperaron los pellets y se resuspendieron en 0.6 mL de una solución 10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 10 % SDS y 0.15 mM desferroxamina a pH 8.0, después se adicionaron 30 μ L de RNasa A (10 mg/mL) y 20 μ L de RNasa T1 (1000 U/mL). Ambas enzimas fueron previamente diluidas

en una solución que contenía 10 mM Tris-HCl, 1 mM de EDTA y 2.5 mM de desferroxamina a pH 7.4). La mezcla de reacción fue incubada durante 1 h a 37°C. Posteriormente se adicionaron 30 µL de proteinasa K (20 mg/mL) y se volvió a incubar 1 h a 37 °C. Después se centrifugó a 5000 xg durante 15 min a 4°C, la fase líquida fue colectada y se adicionó 1 mL de una solución 7.6 M NaI, 40 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA-Na₂, 0.3 mM desferroxamina a pH 8.0, junto con 2 mL de isopropanol grado biología molecular (Sigma), el contenido del tubo fue mezclada por inversión y refrigerado a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a 9000 xg durante 15 min a 4°C y el precipitado formado fue lavado con 1 mL de isopropanol al 60% (v/v) , posteriormente se realizó un segundo lavado con 1 mL de etanol (Sigma) al 70% (v/v) y después se centrifugó a 9000 xg durante 15 min, el pellet de DNA fue disuelto en 150 µL de desferroxamina 0.1 mM.

La concentración de DNA fue determinada espectrofotométricamente a 260 nm y su pureza fue determinada de acuerdo al cociente A_{260}/A_{280} . El cociente de pureza de las muestras fue >1.75.

Para cada inyección se utilizaron 100 µg de DNA los cuales fueron diluidos en un volumen total de 100µL con una solución que contenía 4 µL de acetato de sodio 1M y 5 unidades de nucleasa P₁; la solución fue incubada a 37°C durante 30 min. Después se le adicionaron 150 µL de una solución 1M de Tris-HCl (pH 7.4) y 3 unidades de fosfatasa alcalina de *E. coli* y se incubó a 37°C durante 1 h. Las muestras fueron centrifugadas y la fase acuosa fue analizada por HPLC.

5.9 CUANTIFICACIÓN DE 8-oxo-dGuo POR HPLC

El DNA digerido (100 µg) fue inyectado en un sistema cromatográfico, el cual estaba compuesto de un controlador Waters 600, un detector VIS/UV 486 Waters y un detector electroquímico INTRO (Antec Leyden, Leiden, The Netherlands). La separación de los nucleósidos se realizó en una columna supelcosil LC-18 de 250 x 4.6 mm con un tamaño de partícula de 5 µm (Supelco, Bellefonte, PA) en una cromatografía de fase reversa. La fase móvil (50 mM de fosfato monobásico de potasio a pH 5.5 y metanol al 8%) fue eluída isocráticamente a un flujo de 1 mL/min. Los nucleósidos fueron detectados espectrofotométricamente con en el detector Waters VIS/UV una longitud de onda de 254 nm y posteriormente la detección del aducto 8-oxo-desoxiguanosina (8-oxo-dGuo) fue

realizada a 290 mV en el detector EC.

5.10 SILENCIAMIENTO POR MEDIO DE siRNA DE Bcl-2

La línea celular L-929 se cultivó en cajas 33 mm de diámetro a un 30% de confluencia y 24 h antes se le cambió el medio de cultivo por medio OPTI-MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA USA), libre de suero y antibiótico (1mL por pozo). Pasado ese tiempo, las células fueron transfectadas con 100 pmol de siRNA para Bcl-2 (Santa Cruz, Biotechnology sc-29215) utilizando el reactivo de lipofectamina TM RNAiMAX (13778-075), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). Después de 24 h de la transfección se verificó la expresión de Bcl-2 mediante un análisis de Western Blot como fue descrito anteriormente.

5.11 INMUNOLocalización DE Nrf2 POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Se sembraron 5×10^4 células de la línea L-929 en portaobjetos de borosilicato. Después de 24 h se les administraron los tratamientos. Las células se lavaron 2 veces con PBS y posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 30 min. Se lavaron 2 veces con PBS y se bloquearon durante 1 h con solución de bloqueo (2 % albumina sérica bovina, 1 % de leche descremada y 1 % de Triton X100 en PBS). Posteriormente se incubó 1 h con el anticuerpo primario anti-Nrf2 con una dilución 1:50 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), se lavo 3 veces con PBS-tween al 2 % y después se incubó durante 1 h con el anticuerpo secundario acoplado a FITC anti-conejo con una dilución 1:200, finalmente se tiñó con Yoduro de propidio (10 ng/mL) durante 15 min para observar el DNA e identificar los núcleos, las células fueron montadas con medio de montaje especial para fluorescencia (Dako Cytomation, Glostrup Denmark). Las imágenes fueron capturadas con un microscopio confocal LSM-META-Zeiss Axioplan.

5.12 ANÁLISIS DE DATOS

Los datos se reportaron como la media de al menos tres experimentos independientes por triplicado \pm la Desviación Estándar. Se les aplicó una prueba de ANOVA seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tuckey-Kramer con un nivel de probabilidad de 0.05 como criterio mínimo de significancia.

6. RESULTADOS

6.1 INDUCCIÓN DE UN MODELO DE HORMÉISIS EN RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO

Para poder evaluar la respuesta hormética ante la exposición de un reto moderado de estrés oxidativo inducido con H_2O_2 , se determinaron los límites de sobrevivencia de la línea celular L-929 frente a dicho reto. El primer paso fue incubar a la línea L-929 con diferentes concentraciones de H_2O_2 durante 24 h y evaluar la viabilidad celular. Como se puede observar en la figura 1A, se presentó una viabilidad del 42 % después del tratamiento con 50 μM de H_2O_2 , mientras que la viabilidad observada después del tratamiento con 200 μM fue del 15%. En el siguiente experimento se evaluó la viabilidad celular de la línea L-929 a tiempos más cortos de exposición; en la figura 1B se observan los resultados obtenidos. Es importante destacar que las células tratadas con 50 μM de H_2O_2 durante 9 h presentaron el 100 % de viabilidad, mientras que las expuestas a 200 μM solo mostraron una viabilidad del 48 %. Para valorar el modelo de respuesta hormética, se evaluaron algunos parámetros fisiológicos que permitieran establecer una respuesta adaptativa frente a la inducción del estado oxidativo, por tal motivo se evaluó el estado redox celular determinando el cociente de concentración entre el GSH y el GSSG (GSH/GSSG). Como se puede observar en la figura 1C, el tratamiento con 50 μM de H_2O_2 no mostró diferencias estadísticamente significativas, mientras que el tratamiento con 200 μM ocasionó que disminuyera 32 % el cociente GSH/GSSG ($p \leq 0.05$). Otro parámetro fisiológico importante de analizar durante la exposición al reto oxidativo, fue el daño al DNA. Esto se realizó por medio de la cuantificación del aducto 8-oxo-desoxiguanosina (8-oxo-dG). Como puede observarse en la figura 1D, el tratamiento con 50 μM de H_2O_2 no indujo daño al DNA, mientras que el tratamiento con 200 μM incrementó 65% los niveles de 8-oxodG ($p \leq 0.05$). Estos últimos resultados concuerdan con la viabilidad observada en la figura 1B y por ello se decidió emplear la concentración de 50 μM de H_2O_2 durante 9 h, como un modelo de condición hormética oxidativa, la cual en lo sucesivo se le llamará OCH. También se usó la concentración de 200 μM de H_2O_2 durante el mismo tiempo, como un modelo de comparación al que se denominará condición no hormética, NO-H.

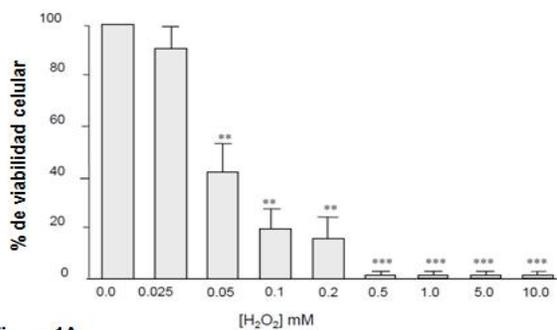


Figura 1A

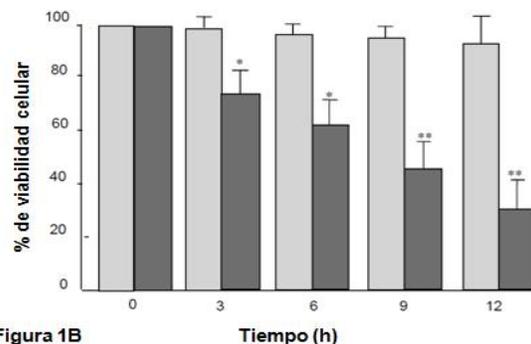


Figura 1B

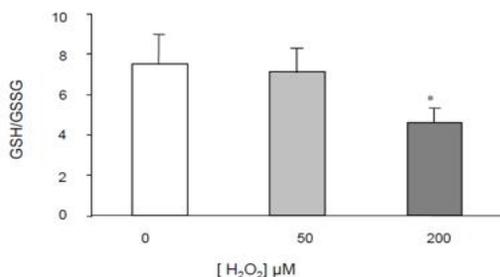


Figura 1C

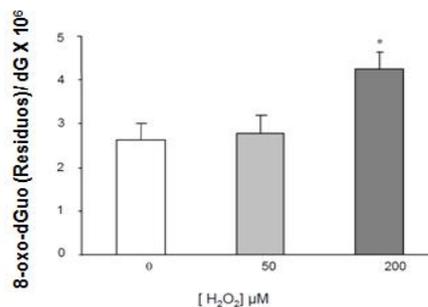


Figura 1D

Figura 1. Modelo de respuesta hormética en respuesta al estrés oxidativo (OCH).

A. Determinación de la viabilidad de las células L929 en respuesta al estrés oxidativo con diferentes concentraciones de H₂O₂ (0-10mM) durante 24 h.

B. Viabilidad celular durante diferentes intervalos de tiempo (0-12 h) con tratamientos de 50 μM (Barras claras) y 200 μM (Barras oscuras) de H₂O₂.

C. Estado redox celular, determinado por el cociente GSH/GSSG después del tratamiento con 50 y 200 μM de H₂O₂ durante 9 h.

D. Daño oxidativo al DNA cuantificado por la concentración molar de 8-oxodGuo entre la concentración de dGuo (8-oxodGuo/dGuo); El DNA fue obtenido después del tratamiento con 50 o 200 μM H₂O₂ durante 9 h, como se describió en material y métodos.

Cada punto representa la media ± D.S. de 9 determinaciones producto de tres experimentos independientes. La significancia estadística con respecto al control fue marcada con (*) p < 0.05, (**) p < 0.001; (***) p < 0.0001

Para determinar la protección adquirida por la respuesta hormética, se evaluó la viabilidad celular después de someter a la línea L-929 a la condición OCH y la NO-H durante 9 h, posteriormente las mismas células se trataron con concentraciones de 200, 300 y 400 μM de H₂O₂ durante 3 h (el diseño experimental se muestra en la parte superior de la figura 2).

Al evaluar la viabilidad celular después de los acondicionamientos OCH y NO-H, se observó que las células OCH presentaron una viabilidad del 80 % para el tratamiento con 200 μM de H₂O₂ y 68 % para el tratamiento con 300 y 400 μM, estos resultados presentaron diferencias estadísticamente significativas (p≤0.001) con respecto a las células control no acondicionadas (NT). Las células de la condición NO-H mostraron una viabilidad de 10 al 15 % y fueron estadísticamente diferentes con respecto al tratamiento OCH (p≤0.0001), como se puede observar en la figura 2.

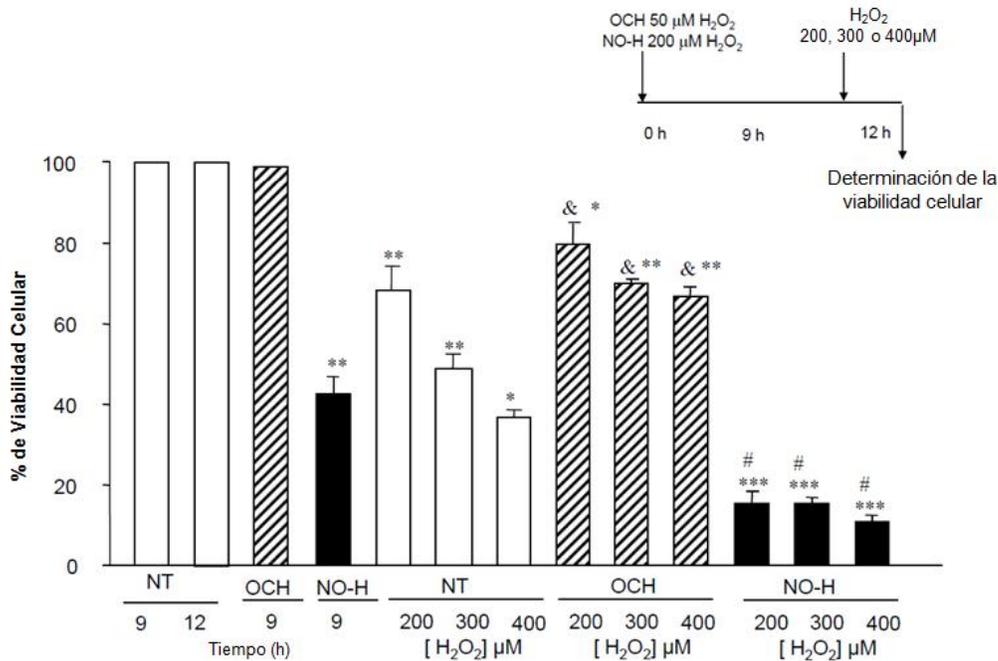


Figura 2. Viabilidad Celular después del tratamientos OCH y NO-H, y posterior a un reto oxidativo severo. La viabilidad celular fue determinada después de 3 h de tratamiento con concentraciones letales de H₂O₂ (200, 300 y 400 μM) después de los tratamientos con las concentraciones OCH (50 μM de H₂O₂, 9 h) y NO-H (200 μM de H₂O₂, 9 h). NT células no tratadas. Cada punto representa la media ± D.S. de 9 determinaciones producto de tres experimentos independientes. La significancia estadística con respecto al control fue marcada con (*) p < 0.05, (**) p < 0.001; (***) p < 0.0001 y con (&) para las que son diferentes con los controles + H₂O₂ y con (#) cuando se compara con otros grupos.

6.2 LA EXPRESIÓN DE Bcl-2 SE INCREMENTA EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO OCH.

Para determinar si la expresión de Bcl-2 se incrementa en respuesta a retos oxidativos moderados, las células fueron tratadas con 50 μM de H₂O₂ durante diferentes períodos de tiempo y posteriormente se determinó la expresión de dicha proteína.

La máxima expresión del mRNA para Bcl-2 se observó a las 9 h (figura 3A), coincidiendo con la respuesta hormética. Así mismo se trató a las células con dosis más altas de H₂O₂ (100, 150 y 200 μM) y se observó que en esas concentraciones, los niveles de expresión del mRNA no presentaron diferencias con respecto al control, sugiriendo que las células sólo incrementan la expresión de Bcl-2 en respuesta a ligeros cambios en el estado oxidativo (figura 3B). Para determinar si los cambios en la expresión de Bcl-2 formaban parte de una respuesta de sobrevivencia, se determinó la expresión del mRNA de la proteína pro-apoptótica Bax en las mismas condiciones antes mencionadas (NT, 50, 100, 150 y 200 μM, 9 h). Los resultados indicaron que solo el tratamiento con 200 μM de H₂O₂ indujo el incremento en la expresión del mRNA de Bax de una manera estadísticamente significativa (figura 3B). Para correlacionar la expresión de los mRNA y los niveles de

expresión de la proteína Bcl-2 y Bax, se determinó la expresión de ambas proteínas por medio de Western Blot, después de los tratamientos OCH y NO-H. En la figura 3C se puede observar que Bcl-2 incrementó su expresión con respecto al control durante el OCH, mientras que no presentó cambios en el NO-H. Por el contrario, el tratamiento OCH no modificó la expresión de Bax, mientras que el NO-H si incremento la expresión de Bax con respecto al control. Estos cambios fueron estadísticamente significativos ($p \leq 0.05$) en función de los análisis densitométricos (Figura 3C); estos mismos valores fueron utilizados para determinar el índice Bcl-2/Bax, el cual fue 1.120 ± 0.038 para el tratamiento OCH y 0.798 ± 0.056 para el tratamiento NO-H. Un índice Bcl-2/Bax ≥ 1 sugiere sobrevivencia celular mientras que un valor menor de 1 sugiere muerte celular.

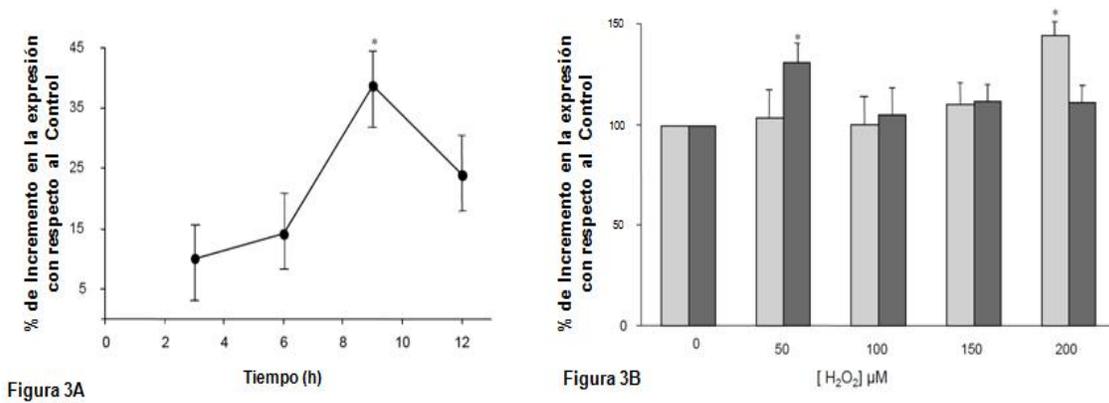


Figura 3A

Figura 3B

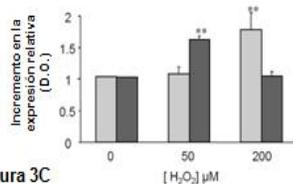
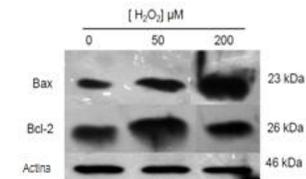


Figura 3C

Figura 3: Incremento en la expresión de Bcl-2 durante los tratamientos OCH y NO-H.

- A. La expresión del mRNA de Bcl-2 fue determinada durante diferentes intervalos de tiempo, de 0 a 12 h, con el tratamiento OCH como se describió en materiales y métodos.
 B. La expresión de los mRNA de Bcl-2 (Barras oscuras) y Bax (Barras claras) fueron determinadas después de 9 h con tratamientos de 50, 100, 150 y 200 μM de H₂O₂.
 C. Imagen de un Western Blot representativo de la expresión de las proteínas Bcl-2 y Bax después de 9 h de tratamiento. El análisis densitométrico se realizó normalizando con actina como control de cargado. Bax es representado en las barras claras y Bcl-2 en las barras oscuras.

Cada punto representa el valor de la media de 3 experimentos independientes \pm D.S. La significancia estadística con respecto al control fue marcada con (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.001$.

6.3 PARTICIPACIÓN DE Bcl-2 EN LA RESPUESTA OCH

Para tratar de establecer cual es la participación de Bcl-2 en la respuesta hormética, se utilizaron dos estrategias. La primera fue el silenciamiento de la expresión de Bcl-2 con siRNA y la segunda fue utilizando la molécula HA14-1, la cual puede inhibir fuertemente la actividad de Bcl-2, ya que impide la interacción entre Bcl-2 y Bax, así como, Bcl-2 y Bim. La imagen del Western Blot insertado en la figura 4 muestra que 100 y 150 pmol de siRNA fueron necesarios para inhibir casi en la totalidad la expresión de la proteína Bcl-2, por lo que para el siguiente experimento se decidió utilizar 100 pmol para silenciar a Bcl-2 en el tratamiento OCH.

Para el experimento con el inhibidor, se prosiguió con el siguiente diseño experimental: las células L-929 fueron pre-tratadas durante 4 h con el inhibidor de Bcl-2, HA14-1, después se acondicionaron de manera OCH y finalmente se trataron con una dosis letal de 300 μ M de H₂O₂ por 3 h adicionales.

Para el experimento de silenciamiento, se esperaron 24 h después de la transfección del siRNA de Bcl-2, y las células fueron tratadas exactamente con las mismas condiciones que las células inhibidas con HA14-1, excepto con el pre-tratamiento con HA14-1. Los resultados observados en la figura 4 muestran que el efecto protector observado del OCH se abatió cuando Bcl-2 fue inhibido con HA14-1 (barra Negra $p < 0.0001$) y de igual manera, aunque en menor magnitud, cuando Bcl-2 se silenció con siRNA (barra rayada $p < 0.0001$); demostrando la importancia de Bcl-2 durante la respuesta hormética.

Un dato relevante es que el solo tratamiento con HA14-1 disminuye la viabilidad celular 24% confirmando la participación de Bcl-2 en la homeostasis celular. Debido a que no hay diferencias significativas entre la inhibición con HA14-1 y la inhibición con siRNA, los siguientes experimentos fueron hechos solo con HA14-1.

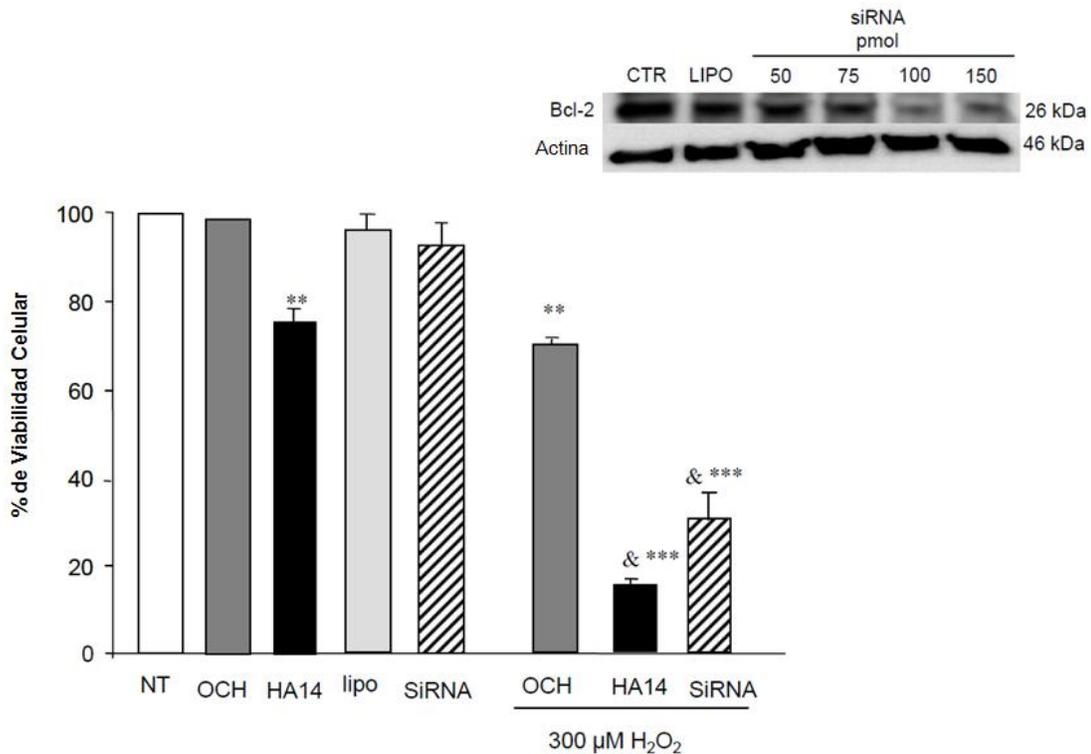


Figura 4. Bcl-2 participa en la supervivencia celular en la respuesta hormética.
 La viabilidad celular fue evaluada después de 3 h de exposición a concentraciones letales de 300 μM H₂O₂. OCH (barras gris oscuro), inhibición de Bcl-2 con HA14-1 (barras negras), Bcl-2-siRNA (barras rayadas).
 La barra denominada como lipo es el control de transfección con lipofectamina y el inserto es un Western Blot representativo que muestra la inhibición de la expresión de Bcl-2 con siRNA. Cada punto representa el valor medio ± D.S. de 6 determinaciones realizadas en tres experimentos independiente.
 La significancia estadística fue calculada con respecto al control (*) o con respecto al tratamiento OCH. (&) y (*) p < 0.05, (**) p < 0.001; (***) p < 0.0001.

6.4 Bcl-2 INDUCE LA TRANSLOCACIÓN NUCLEAR DE Nrf-2 COMO PARTE DE LA RESPUESTA HORMÉTICA.

Durante la hormesis, la respuesta adaptativa generalmente se avoca a modificar las condiciones del sistema biológico, incrementando la resistencia de dicho sistema a agresiones de mayor intensidad que las que originaron la respuesta inicial. Los mecanismos que principalmente tienden a aumentar son los de reparación y/o defensa.

Nrf2 es un factor de transcripción que responde a los cambios en el estado redox celular y que induce la expresión de enzimas antioxidantes y de proteínas de fase II de detoxificación. Es por ello que la translocación nuclear de Nrf2 fue evaluada durante los primeros 120 min después del tratamiento de pre-acondicionamiento con H₂O₂, como una primera respuesta al tratamiento oxidativo (figura 5A) y posteriormente a tiempos largos durante la respuesta OCH (7.5 – 10 h), como la respuesta que pudiera asociarse al incremento encontrado de Bcl-2 (figura 5B).

En la figura 5A se observa que la translocación nuclear después del pre-acondicionamiento inicial con H₂O₂ fue muy rápida, ya que se presentó entre los primeros

25 y 30 min. Posteriormente se observa que disminuye la translocación, también de manera rápida. Sugiriendo que Nrf2 podría migrar al núcleo como parte de la respuesta primaria al cambio en los niveles de ERO, pero que posiblemente abandona rápidamente el núcleo, o bien es degradado en poco tiempo.

Para verificar que la translocación de Nrf2 está asociada con el incremento de Bcl-2, las células de la línea L-929 fueron pre-tratadas con el inhibidor de Bcl-2 antes del tratamiento OCH. Los resultados en la figura 5 muestran que cuando las células son pre-tratadas con HA14-1, la translocación de Nrf2 es abrogada. Los tratamientos con PDGF (30 ng/mL por 1 h) y H₂O₂ (0.3 mM durante 30 min) fueron utilizados como control positivo de la translocación nuclear de Nrf2.

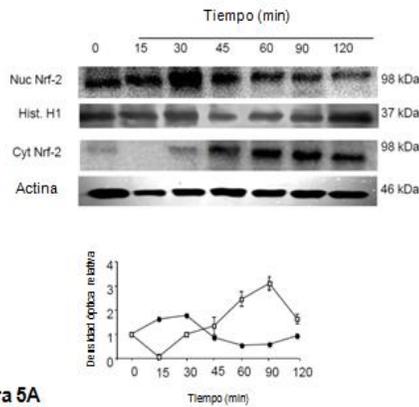


Figura 5A

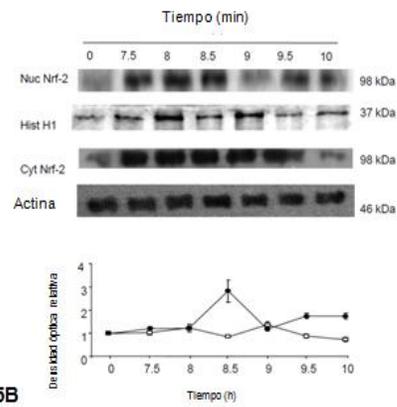


Figura 5B

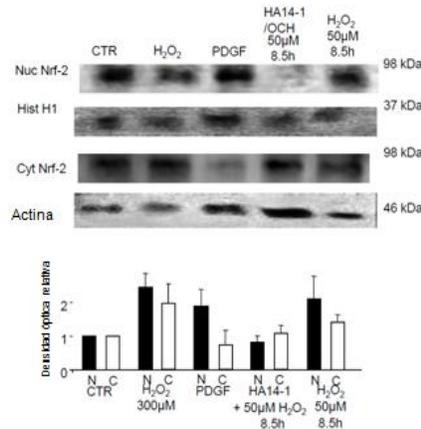


Figura 5C

Figura 5: El incremento en la expresión de Bcl-2 correlaciona con la translocación nuclear de Nrf2.

A. La translocación de Nrf2 al núcleo fue determinada cuantificando los niveles de Nrf2 en las fracciones nuclear y citosólica Western Blot a los primeros minutos después del tratamiento OCH (120 min), como se describió en materiales y métodos

B. La translocación nuclear de Nrf2 en el intervalo de tiempo que correlaciona con la máxima expresión de Bcl-2 (7.5 - 10 horas) después del tratamiento OCH.

C. La translocación al núcleo de Nrf2 fue determinada a las 8.5 h posteriores al tratamiento OCH. El tratamiento con H₂O₂ 0.3 mM durante 30 min y con PDGF 30 ng/mL durante 1 h fueron utilizados como control positivo y el tratamiento con HA14-1 10 µM fue utilizado para inhibir a Bcl-2.

Las figuras son Western blot representativas de tres experimentos independientes para cada figura. El análisis densitométrico fue normalizado con Histona H1(Nuclear) y Actina (Citosol).

Este resultado fue confirmado con experimentos de inmunolocalización sub-celular en donde se observó la presencia del factor Nrf2 en el núcleo a los 30 min posteriores al tratamiento OCH (línea 2, Figura 6); y su salida del núcleo a las 2h (línea 3, Figura 6). Para determinar si el incremento de Bcl-2 era capaz de activar a Nrf2 en una segunda ocasión, se evaluó la translocación de Nrf2 al núcleo durante el intervalo de tiempo de 7.5 a 10 h con el tratamiento OCH. Como se observa en la figura 5B, la máxima translocación nuclear de Nrf2 se encontró a las 8.5 h, lo cual correlaciona con el máximo incremento observado para Bcl-2 a las 9 h.

Las inmunolocalizaciones sub-celulares también mostraron la presencia de Nrf-2 en el núcleo a las 8.5 h (línea 4, Figura 6), mientras que a las 10 h se encuentra en el citoplasma (línea 5, Figura 6).

Finalmente, para confirmar que cuando Nrf2 se encuentra en el núcleo, este puede unirse a su secuencia consenso de DNA, se realizaron ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) en un intervalo de tiempo de 1 a 10 h. En la figura 7A se observa que a 1 hora Nrf2 se une al DNA, correlacionando con el tiempo de la primera translocación que se presenta en respuesta al tratamiento oxidativo, y que esta disminuye con el tiempo; Nrf2 se une nuevamente al DNA a las 8.5 horas posteriores al tratamiento OCH, esta segunda translocación es la que ha sido asociada al incremento de Bcl-2 y la cual fue abrogada cuando se utilizó el inhibidor HA14-1. A las 10 horas se observó Nrf2 no se une al DNA. La figura 7B muestra el super-retardo corroborando que Nrf2 fue la proteína que estábamos ensayando. Los resultados presentados hasta ahora indican que Nrf2 es activada dos veces durante la respuesta al tratamiento con OCH. La primera es en respuesta al cambio en el estado Redox durante el tratamiento con H₂O₂, y la segunda es probablemente asociada al incremento de Bcl-2, como parte de la respuesta sostenida de supervivencia inducida por Bcl-2.

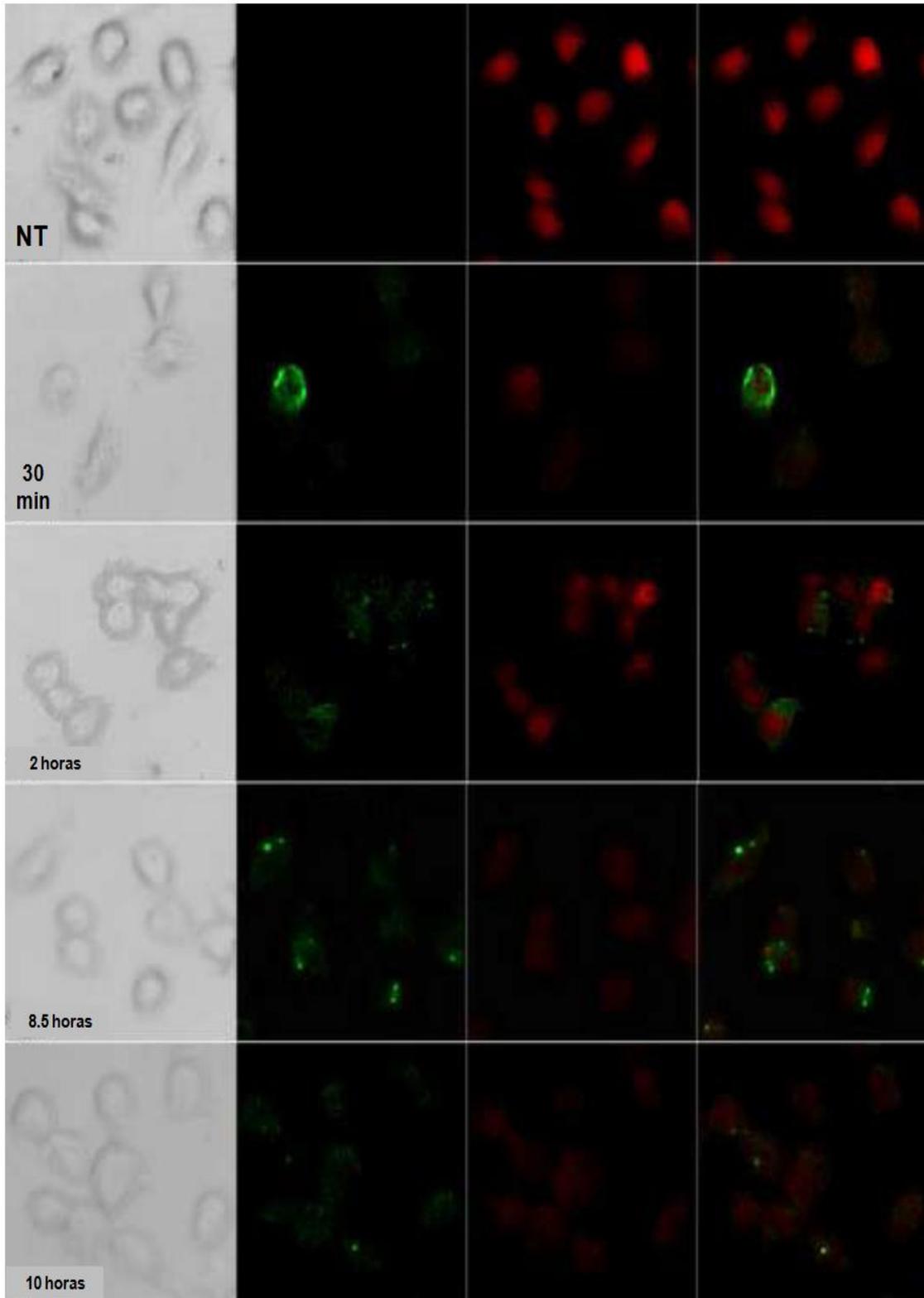


Figura 6: Localización sub-celular de Nrf2 por Inmunofluorescencia.
 La figura muestra imágenes representativas obtenidas con un microscopio confocal LSM-META-Zeiss Axioplan 2 imaging con un aumento de 30X.
 Nrf2 fue teñido con un anticuerpo anti-conejo acoplado a FITC, mientras que el núcleo fue teñido con Yoduro de propidio. Las células L-929 fueron tratadas con 50 μ M H_2O_2 durante 30 min (línea 2), 2 h (línea 3), 8.5 h (línea 4) o 10 h (línea 5). Las Células en la línea 1 no recibieron tratamiento (NT).

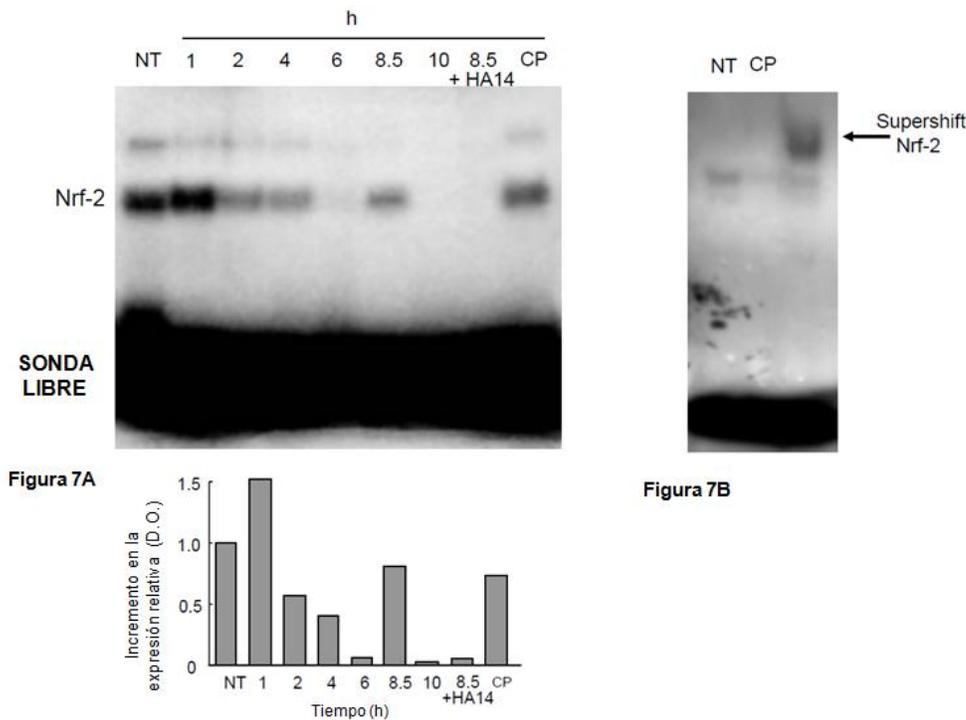


Figura 7: Determinación de la unión Nrf2 a su secuencia consenso de DNA

A. La unión de Nrf2 a su secuencia consenso de DNA fue determinada por medio de un ensayo EMSA como se describió en materiales y métodos. La unión de Nrf2 a su secuencia en el núcleo fue determinada después del tratamiento OCH en los siguientes intervalos de tiempo 1, 2, 4, 6, 8.5, 10 h. El inhibidor HA14-1 fue usado únicamente en el tratamiento de 8.5 h (columna 8). La sonda fría (CP) fue determinada después de 1 h de tratamiento OCH utilizando 50% de sonda no marcada y 50% de sonda marcada.
 B. En el último carril se muestra el super-retardo de Nrf2. La sonda fría (CP) fue evaluada utilizando 90 % de sonda no marcada y 10% de sonda marcada. NT significa muestra no tratada.
 La figura muestra un gel representativo de dos experimentos independientes.

6.5 EL INCREMENTO DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES GST Y γ GCS ES SOSTENIDO DURANTE UN INTERVALO LARGO DE TIEMPO DURANTE LA RESPUESTA OCH, PROBABLEMENTE POR LA PARTICIPACIÓN DE BCL-2

Las proteínas GST y γ GCS fueron evaluadas como parte de la respuesta antioxidante activado por el factor de transcripción Nrf2 a través de su elemento de respuesta antioxidante (ARE). Ambas enzimas incrementaron significativamente su expresión ($p \leq 0.05$) a partir de las 3 horas posteriores al tratamiento OCH y continuaron su incremento hasta las 9 horas (figura 8A y B). Los niveles de expresión de las proteínas GST y γ GCS fueron determinados a largos intervalos de tiempo después del tratamiento OCH (Figura 8C y D). Los niveles de GST se mantienen elevados a las 15 horas e incrementan sus niveles después de la re-exposición con las concentraciones letales de H₂O₂, mientras que la expresión de la proteína γ GCS no presentó un incremento después de la re-exposición, ya que el sistema no requiere síntesis de novo de GSH. Las células pre-tratadas con HA14-1 y que posteriormente se les trató con la concentración OCH, disminuyeron los niveles de expresión de GST y γ GCS como se puede observar en

las figuras 8C y 8D, sin embargo, se sugiere que Bcl-2 es necesaria para la expresión de estas enzimas. El incremento encontrado en GST y γ GCS durante el tratamiento con OCH correlaciona con la contribución del sistema antioxidante del GSH como parte de la respuesta antioxidante y sugiere que la expresión de estas enzimas podría ser parte de la respuesta hormética mediada por Nrf2.

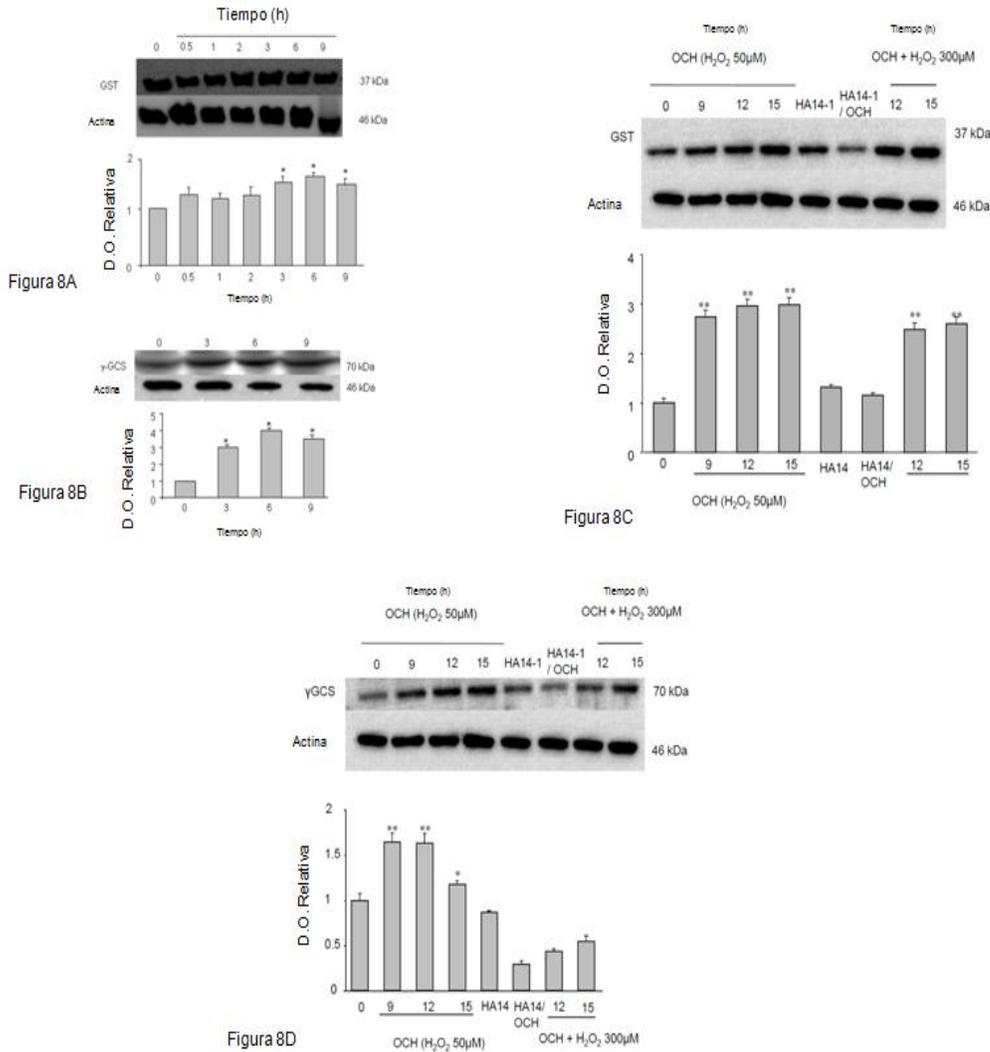


Fig. 8. Respuesta antioxidante después de tratamiento OCH.

La expresión de la enzima GST (Figura 8A) y γ GCS (Figura 8B) durante diferentes tiempos hasta las 9 h posteriores al tratamiento OCH fueron determinadas por Western blot. El análisis densitométrico se normalizó utilizando actina como control.

La expresión de la enzimas GST (Figura 8C) y γ GCS (Figura 8D) en las horas posteriores al re-tratamiento con concentraciones letales.

Las determinaciones se realizaron por Western blot. El análisis densitométrico se normalizó utilizando actina como control. Cada punto representa la media \pm D.S. de tres determinaciones en tres experimentos independientes. La significancia estadística con respecto al control fue marcada con (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.001$ marcada con (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.001$.

6.6 LA SOBRE-EXPRESIÓN DE BCL-2 INDUCE LA PRODUCCIÓN DE ERO A BAJOS NIVELES Y AMORTIGUA EL ESTRÉS OXIDATIVO.

Para tratar de tener entender la participación de Bcl-2 en la respuesta hormética mediada por la activación de Nrf2, se determinó la producción de ERO por medio de citometría de flujo a las 8.5 y 10 h después del tratamiento OCH. Como se muestra en la figura 9, los tratamientos a las 8.5 y 10 h no presentaron diferencias estadísticamente significativas. De manera interesante, cuando la línea L-929 fue pre-tratada con el inhibidor HA14-1, después del tratamiento con OCH, los niveles de ERO se incrementaron, apoyando la idea de que Bcl-2 pudiera ser un modulador del estado redox celular (barra negra en la figura 9).

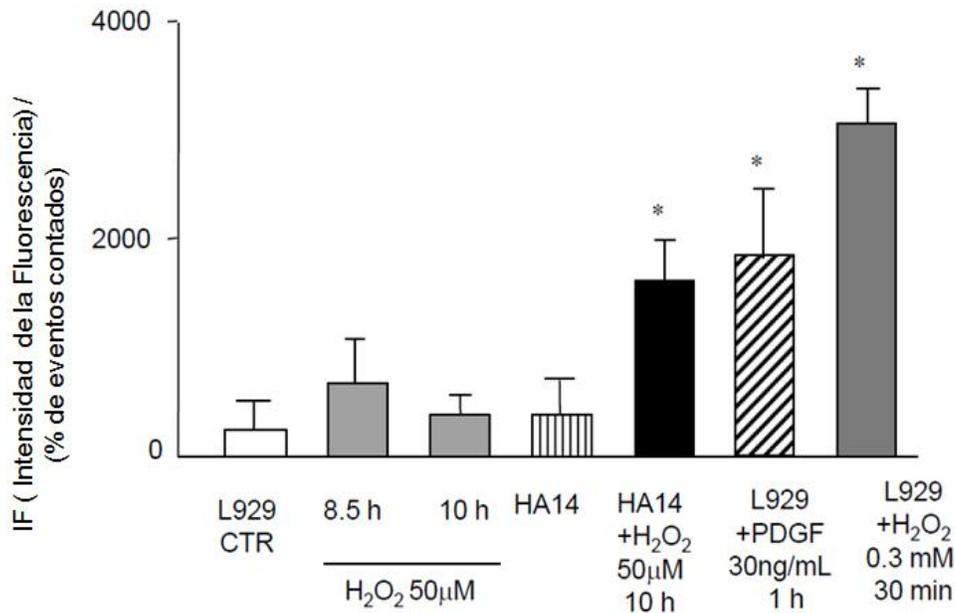


Figura 9: Producción de ERO determinada por citometría de flujo

Los niveles de ERO se cuantificaron a las 8.5 y 10 h posteriores al tratamiento OCH. Los tratamientos con 0.3 mM de H₂O₂ durante 30 min y PDGF 30 ng/mL durante 1 h fueron usados como controles positivos y el tratamiento con 10 µM de HA14-1 fue utilizado para inhibir a Bcl-2.

Cada punto representa la media ± D.S. de 9 determinaciones realizadas en tres experimentos independientes. La significancia estadística se marco con respecto a las células control con una (*) p < 0.05.

6.7 NF- κ B INCREMENTA LA EXPRESIÓN DE Bcl-2

El factor de transcripción NF- κ B es reconocido por responder a las modificaciones en el estado redox celular. Asimismo se ha reportado que puede incrementar la expresión de Bcl-2, ya que en el promotor del gen *bcl-2* se encuentran dos elementos de respuesta a κ B. Por eso se evaluó la participación de este factor de transcripción en el incremento de la expresión de Bcl-2 en presencia del péptido SN-50 el cual inhibe al factor de transcripción NF- κ B.

Se realizaron Western Blots de la proteína de Bcl-2 después de tratamientos OCH, NO-H y OCH pre-tratada con el inhibidor SN-50. Como se puede observar en la figura 10A, la expresión de Bcl-2 se incrementó durante OCH y se abatió en el tratamiento NO-H y el pre-tratado con el inhibidor SN-50, este resultado sugiere una importante participación de NF- κ B en la regulación de la expresión de Bcl-2. Para corroborar que NF- κ B participa en respuesta al estrés oxidativo inducido por el tratamiento OCH, se evaluó la activación del NF- κ B por medio del ensayo EMSA y se encontró un incremento gradual de la activación con respecto al tiempo de exposición al tratamiento OCH, observándose un máximo de activación a los 180 min (Figura 10B).

Para tratar de entender el mecanismo de activación de NF- κ B, se evaluaron distintas cinasas transductoras que se sabe que participan en procesos relacionados con la sobrevivencia celular y la respuesta antioxidante. En particular se evaluaron PI3K, Akt y PKC, junto con sus diferentes inhibidores específicos: Wortmanina para inhibir a PI3K, Akt II para Akt y Queleritrina para PKC. Posteriormente se les trato con OCH únicamente durante 1 hora. En la figura 10C se muestra que tanto la Wortmanina como el Akt II inhiben la activación de NF- κ B con respecto al tratamiento OCH, con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$, mientras que la Queleritrina abroga la activación de NF- κ B con un nivel de significancia de $p \leq 0.0001$.

Los resultados anteriores fueron corroborados por medio de un Western Blot donde se evaluó la expresión de α -I κ B inhibidor biológico de NF- κ B. Por lo que estos resultados sugieren la participación de estas cinasas en la regulación de la expresión de la proteína Bcl-2 en respuesta a un tratamiento hormético con H₂O₂.

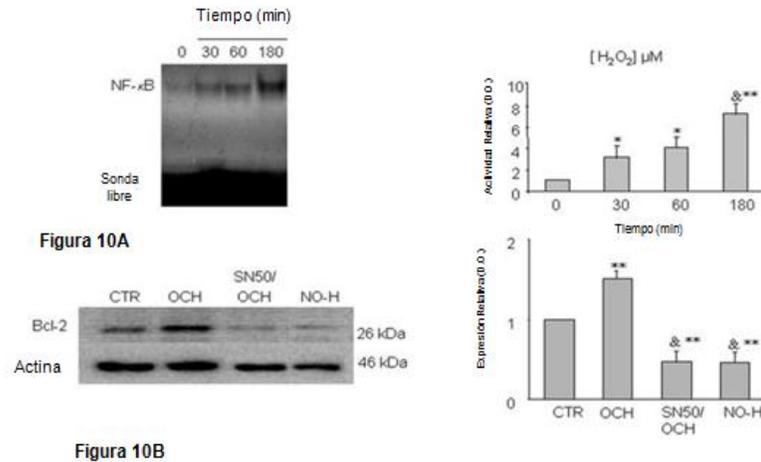


Figura 10B

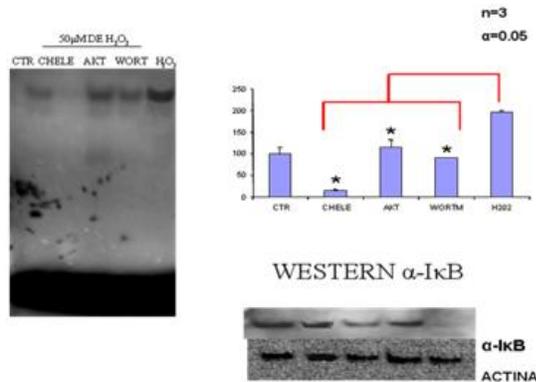


Figura 10C

Figura 10: Nf-κB Incrementa la expresión de Bcl-2

- Se determinó la activación de Nf-κB mediante EMSA en la línea L-929 después de ser incubadas con el tratamiento OCH y se evaluó en diferentes intervalos de tiempo y se expresó la activación en unidades de densidad óptica relativa.
 - Se determinó la participación de Nf-κB en la regulación de la expresión de Bcl-2 por medio de Western Blot, utilizando el péptido inhibidor SN50 y se normlizó la expresión de Bcl-2 utilizando actina como proteína de carga.
 - Se determinaron las cinasas transductoras que participan en la activación de Nf-κB durante la respuesta homeética, para ello se utilizaron inhibidores para cada una de las cinasas transductoras (Queleritrina para PKC; Wortmanina para PI3K y Akt II para Akt).
- Cada punto representa el valor medio ± D.S. de 3 determinaciones realizadas en tres experimentos independientes.
La significancia estadística fue calculada con respecto al control (*) p < 0.05, (**) p < 0.001

7. DISCUSIÓN

El oxígeno es el principal productor de ERO, por lo que los organismos que tienen un metabolismo aeróbico han tendido que aprender a adaptarse y lidiar con estas especies. Así, la capacidad de respuesta a las ERO en particular y al estrés oxidativo en general, varía entre especies y es diferente en cada uno de los tejidos y órganos. Es claro que la mayoría de los mecanismos son comunes en la generalidad de las especies, pero cada tejido puede presentar respuestas antioxidantes particulares ante los diferentes agentes inductores de estrés oxidativo (Halliwell y Gutteridge, 1999; Limón-Pacheco y Gonsebatt 2009). Las respuestas que se pueden presentar están condicionadas a la intensidad y al tiempo de duración del estímulo. Las respuestas pueden ser adaptativas, por ejemplo, la modulación de los mecanismos de biotransformación e inducción de los mecanismos antioxidantes; o bien respuestas que activan a las vías transduccionales que inducen la muerte celular. Sin embargo, la producción de bajos niveles de ERO que no inducen estrés oxidativo ya que no matan a las células, sino que solo modulan el estado redox hacia un estado más oxidante, pueden servir como señales de activación de los mecanismos de reparación, adaptación, sobre-vivencia y transformación (Forman et al., 2004).

En este trabajo se evaluó la respuesta celular ante diferentes retos de estrés oxidativo con H_2O_2 en la línea celular L-929. Se encontró que el tratamiento con una concentración de $50 \mu M$ de H_2O_2 durante 9 h, produce un estado de pre-acondicionamiento que le permite a las células sobre-vivir ante dosis letales de H_2O_2 (200,300 y $400 \mu M$). Este mecanismo corresponde a lo esperado como una respuesta hormética, por lo que se le denominó respuesta hormética oxidante (OCH). Los parámetros fisiológicos evaluados a las 9 h posteriores al tratamiento con $50 \mu M$ de H_2O_2 , como el daño al DNA y el estado redox celular sugieren que ante este reto, la célula es capaz de montar una respuesta antioxidante eficiente. Este resultado nos llevó a buscar y tratar de entender cual sería el mecanismo que estaría activando la respuesta hormética, y cuáles serían las proteínas participantes en este proceso. Entre este grupo de proteínas deberían encontrarse algunas que estuvieran asociadas a proporcionar sobrevivencia celular y que de alguna manera también participaran en la respuesta antioxidante. Una de las proteínas que cumplía con dichas características fue la proteína Bcl-2, puesto que tiene una importante participación en la regulación de la muerte celular y se ha asociado a protección

antioxidante.

La proteína Bcl-2 que tiene un peso de 26 kDa y se encuentra localizada en la envoltura nuclear, en el retículo endoplásmico y en la membrana externa mitocondrial. Se ha observado que Bcl-2 prolonga la sobrevivencia celular bloqueando la muerte celular inducida por una gran cantidad de estímulos y tratamientos entre los que se encuentran los agentes quimioterapéuticos, la radiación ionizante, el H₂O₂, la privación de factores de crecimiento y las neurotoxinas entre otras. (Kim et al., 2001; Zhong et al., 1993).

Debido a que Bcl-2 se localiza en la mitocondria y este es uno de los sitios de mayor producción de radicales libres, se ha propuesto que puede tener una función antioxidante por disminuir la cantidad de ERO. El mecanismo exacto es aún controvertido. Se ha propuesto que pudiera ser un atrapador de radicales libres o bien ser un modular de su generación o liberación (Amstad et al., 2001; Bogdanov et al., 1999).

Cuando se evaluaron los niveles de expresión de Bcl-2 en este trabajo, se encontró un aumento en la sobreexpresión de la proteína en el tratamiento OCH, que al correlacionarla con su contraparte Bax se encontraba en mayor proporción (mayor cantidad de Bcl-2 que de Bax). Lo anterior sugiere que Bcl-2 en este modelo se encuentra bloqueando la función de muerte inducida por Bax. Uno de los hallazgos más importantes del trabajo, fue el demostrar la participación de Bcl-2 en el proceso hormético, ya que al inhibir su función con siRNA y con el inhibidor HA14-1, se perdió el efecto protector obtenido con el pre-acondicionamiento con 50 µM de H₂O₂.

Así mismo, las condiciones adaptativas observadas durante el tratamiento OCH se asocian a niveles elevados de expresión de las enzimas involucradas en la respuesta antioxidante, principalmente a las involucradas en el metabolismo o ciclo del GSH, como lo son las enzimas γGCS y la GST. Lo que apoya la idea de que después de la adaptación, la célula es capaz de responder de una manera eficiente al reto oxidativo cuando se aumenta el insulto a dosis letales de H₂O₂.

Sin embargo, persisten las preguntas: ¿Cómo podría Bcl-2 participar en la activación de la respuesta antioxidante?, ¿Cuál es su participación durante la respuesta hormética?.

En este trabajo demostramos que los niveles de máxima expresión de las enzimas antioxidantes estudiadas se presentan a partir de las 3 h posteriores al tratamiento con 50 µM de H₂O₂ y que su sobreexpresión se mantiene constante hasta las 9 h. Ahora bien, la primera fase en el aumento en la expresión de las enzimas antioxidantes (la de 3 h) se puede explicar por una activación de algunos factores de transcripción involucrados en la respuesta antioxidante como lo son NF-κB y Nrf2, ya que ambos tienen elementos de

respuesta en los promotores de las enzimas antioxidantes γ GCS y GST y que además se sabe que estos factores de transcripción se activan ante la modulación del estado redox celular (Yang et al., 2001; Mulcahany y Gipp., 1995), en este caso el primer estímulo oxidativo sería el H_2O_2 empleado para generar las condiciones OCH. La segunda fase (la expresión después de las 9 h), se caracteriza por sostener los niveles máximos de expresión de estas enzimas a tiempos largos. A este respecto, aquí se demostró que Nrf2 juega un papel fundamental en sostener los niveles de expresión de γ GCS y GST a tiempos largos; ya que la segunda translocación de Nrf2 al núcleo está correlacionada con el aumento en la expresión de Bcl-2, como parte de la respuesta hormética.

La hipótesis que propone a la proteína Bcl-2 como un participante durante la respuesta OCH fue basada en la idea original de Hockenbery (Hockenbery, et al. 1993) quién sugirió que Bcl-2 incrementa la capacidad redox celular y además protege a las células contra la muerte inducida por oxidantes. La hipótesis anterior es soportada por los resultados encontrados por algunos investigadores que demostraron que la sobreexpresión de Bcl-2 protege a las células contra el daño oxidativo (Steinman, 1995; Meredith et al., 1998; Vairo et al., 2000; Lee et al., 2001; Kowaltowski et al., 2004; López-Diazguerrero et al., 2006; Seyfried et al., 2006; Zimmermann et al., 2007), a través del incremento de los mecanismos antioxidantes particularmente el sistema del GSH, como ha sido observado por nuestro grupo y otros (Meredith et al., 1998; Zimmermann, et al., 2007;). Esto ha sugerido que Bcl-2 sea capaz de modular la liberación de ERO mitocondrial a través de un mecanismo que todavía es desconocido (Steinman, 1995; Seyfried, et al., 2006). Esta hipótesis ha generado un gran interés para estudiar el posible mecanismo de interacción entre Bcl-2 y Nrf2 en el cual se proponga una posible vía de sobrevivencia. No obstante, a la fecha y hasta donde se ha revisado, no existen otros reportes donde relacionen la relación de Bcl-2 con Nrf2.

Lo que si es muy interesante, es que existen una gran cantidad de estudios donde se ha observado la inducción de la expresión de Bcl-2 para mantener la sobrevivencia celular. Por lo que un aumento en los niveles de Bcl-2 también ha sido encontrado en otras respuestas horméticas, como las inducidas con condiciones farmacológicas en células madre mesenquimales de rata derivadas de la médula ósea, las cuales fueron tratadas con trimetazidina y después expuestas a condiciones letales oxidativas (Wisel et al., 2009); este mismo efecto se observó en células PC-12 pre-tratadas con H_2O_2 en donde se indujo un respuesta contra la apoptosis (Tang et al., 2005). Bcl-2 también se incrementó

como parte del efecto neuroprotector de la cicloheximida (Furukawa et al., 1997). Todos estos reportes apoyan la idea de que Bcl-2 sea una proteína que incrementa su expresión como respuesta de supervivencia frente a retos moderados de distintos tóxicos y que favorece las vías de protección.

Para tratar de entender si el incremento de Bcl-2 está relacionado con el aumento de la respuesta antioxidante que se presenta en la respuesta hormética en este modelo en particular, las células que lograron adaptarse al ambiente oxidativo y que presentaron la respuesta hormética de supervivencia al ser tratadas con dosis letales oxidativas, fueron pre-tratadas con HA14-1 o silenciadas con siRNA para Bcl-2, en ambas situaciones se observó que el efecto hormético protector fue abrogado, soportando la idea de que Bcl-2 participa en la respuesta de supervivencia. Estos resultados también soportan el hecho de que HA14-1 es un apropiado inhibidor de Bcl-2 como ha sido descrito previamente (Zimmermann et al., 2005; Kweon et al., 2006; Oliver et al., 2007).

Nuestros resultados indican que Nrf2 se transloca al interior del núcleo en los primeros minutos posteriores al tratamiento OCH y después a las 8.5 h.

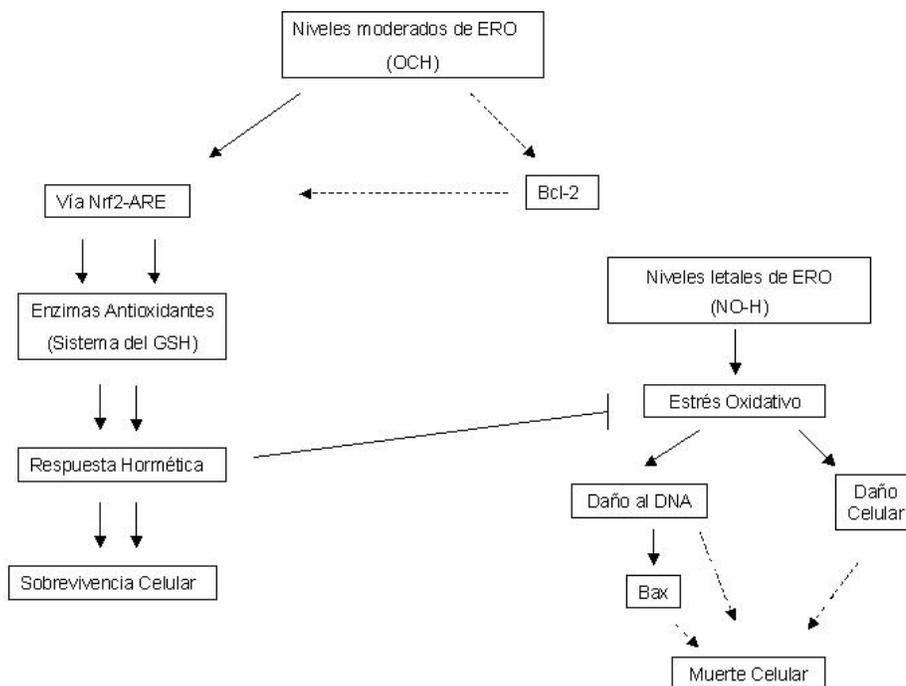
La primera activación de Nrf2, a la primera hora, podría darse en respuesta al tratamiento con 50 μ M de H₂O₂ para inducir la OCH. Como Bcl-2 se incrementó en respuesta a este mismo tratamiento de manera máxima entre 8 y 9 h, se evaluó una segunda la translocación al núcleo de Nrf2 en el intervalo de tiempo comprendido entre las 7.5 y 10 h posteriores al tratamiento OCH. De manera interesante, se encontré que en este período, la máxima translocación de Nrf2 se presentaba a las 8.5 h posteriores al tratamiento OCH, correlacionando muy estrechamente con la máxima expresión de Bcl-2 a las 9 h. Estos resultados sugieren que el incremento en la expresión de Bcl-2 podría modificar el estado redox celular para tratar de inducir o mantener respuesta antioxidante a través de una segunda activación de Nrf2. Cuando las células L-929 fueron pre-tratadas con HA14-1, esta segunda translocación nuclear de Nrf2 fue también abrogada.

El hecho de que nuestros resultados no presentan cambios significativos en el estado redox celular (GSH/GSSG) o en los niveles de ERO (Citometría con H₂DCF), sugieren que la activación de Nrf2 se asocia más a un cambio sutil en el balance redox que a un estado más definido de estrés oxidativo, por lo cual no fue detectado por determinaciones analíticas realizadas. Aunado a la activación de Nrf2 a través de las variaciones en el estado redox, se ha reportado que la activación de Nrf2 también puede ser modulada por modificaciones post-traduccionales como las fosforilaciones en los aminoácidos treonina o

serina por diferentes cinasas como la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K), la protein cinasa c (PKC), la cinasa del amino terminal de c-Jun (JNK) o la cinasa reguladora de señales extracelulares (ERK). La fosforilación por estas enzimas aparentemente facilita la disociación de Nrf2 de su inhibidor Keap-1, promoviendo la translocación nuclear de Nrf2 y su actividad transcripcional (Itoh et al., 2004; Levy et al., 2009). No obstante, el incremento de ERO que encontramos cuando Bcl-2 fue inhibida con HA14-1 (Figura 9) sugiere un papel amortiguador del daño oxidativo dependiente de Bcl-2.

Ahora bien, si de verdad Bcl-2 es capaz de sostener la respuesta hormética por activar al factor de transcripción Nrf2, este efecto debería ser reflejado en el contenido enzimático celular. Nuestros resultados muestran que esto si se cumple en el caso de la proteína GST, que mantiene sus altos niveles de expresión a 15 h de exposición al tratamiento con OCH. El incremento de esta proteína fue mayor cuando se trató a las células con un mayor reto oxidativo y su expresión fue abrogada cuando fueron tratadas con el inhibidor HA14-1, apoyando la idea de que Bcl-2 podría ayudar a mantener la respuesta hormética. Nuestros datos están de acuerdo con la hipótesis de que la sobre-expresión de Bcl-2 puede inducir protección contra la depleción de GSH (Celli et al., 1998; Howard et al., 2009).

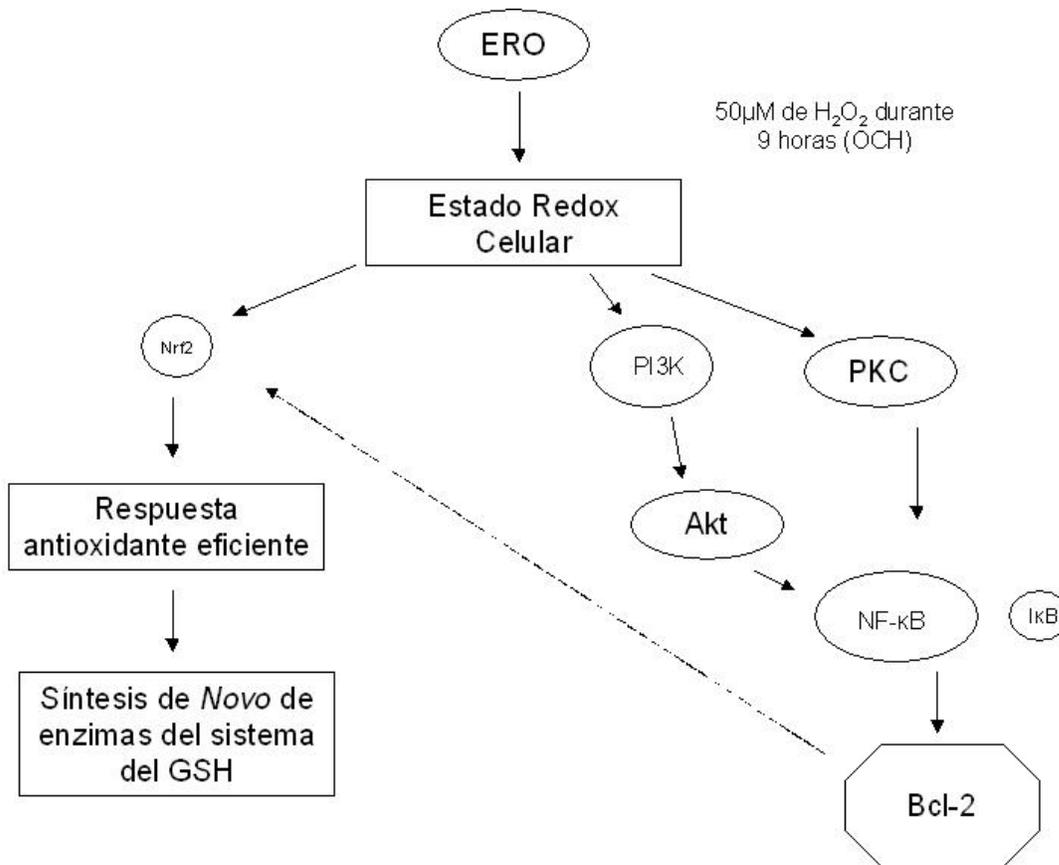
En resumen, las bajas dosis de ERO incrementan la expresión de la proteína Bcl-2 probablemente como parte de la respuesta de sobrevivencia. El aumento de Bcl-2 al parecer es capaz de modular el estado redox celular activando la vía Nrf2, y de esta manera contribuye a sostener la respuesta hormética.



Respuesta Hormética mediada por el incremento en la expresión de Bcl-2: Los niveles moderados de ERO incrementan la respuesta antioxidante (Sistema del GSH) activando la vía transcripcional Nrf2-ARE como parte de la respuesta hormética que promueve la supervivencia celular, como parte de esta respuesta se incrementan los niveles de expresión de la proteína Bcl-2 que participa en una segunda activación de la vía Nrf2-ARE que induce un incremento en la respuesta antioxidante que le permite a las células de la línea L-929 resistir estrés oxidativo inducido con dosis letales de H₂O₂ disminuyendo el daño al DNA y la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax.

No obstante, este podría no ser el único mecanismo por el cual la sobreexpresión fisiológica de la proteína Bcl-2 contribuya al incremento del GSH y a la supervivencia celular. Se ha observado que Bcl-2 interactúa directamente con el GSH a través del dominio BH3 regulando los niveles de GSH mitocondrial (Zimmermann et al., 2007). El GSH mitocondrial se ha revelado como una molécula esencial para las funciones celulares y la supervivencia, que de no estar presente induce la muerte por apoptosis (García-Ruiz y Fernández-Checa, 2006).

Por otro lado, para explicar el aumento en los niveles de expresión de la proteína Bcl-2 en los fibroblastos de pulmón de ratón de la línea L-929, se ha considerado que puede ser producto de la activación del factor de transcripción NF-κB, el cual tiene un elemento de respuesta en el promotor P2 del gen *bcl-2* y que además se sabe que responde ante cambios en el estado redox celular (Catz y Johnson, 2001; Rahman, 2000). En este trabajo se comprobó que existe una activación de NF-κB desde los 30 min posteriores al tratamiento OCH y que presenta una activación máxima a los 180 min. Esto se correlaciona con el aumento en la expresión de Bcl-2. También se encontró que la vía transduccional para la activación de NF-κB es mediante la activación de cinasas sensibles a la modificación del estado redox celular como lo son Akt y PKC, ya que al utilizar inhibidores contra estas cinasas transductoras de señales como lo son Akt II (Akt) y Queleritrina (PKC) se disminuyó la activación del factor de transcripción NF-κB.



NF-κB participa en el mecanismo de regulación de la proteína Bcl-2: La modificación del estado redox celular con el tratamiento OCH activa a diferentes cinasas transductoras sensibles al estrés oxidativo como PI3K, Akt y PKC, que activan al factor de transcripción NF-κB que regula la expresión de la proteína Bcl-2 en respuesta al estrés oxidativo. El incremento en la expresión de Bcl-2 incrementa la respuesta antioxidante vía el factor de transcripción Nrf2 como parte de la respuesta hormética.

Finalmente, nuestros datos aportan información acerca de un mecanismo que relaciona a la proteína Bcl-2 y al factor de transcripción Nrf2 como parte de la respuesta de sobrevivencia celular frente a retos oxidativos moderados durante un tratamiento OCH. Esto es importante debido al hecho de que el incremento en la expresión de Bcl-2 y la activación sostenida de Nrf2 han sido relacionadas con la inmortalización y la tumorigénesis celular (Giménez-Bonafé et al., 2009; Kensler y Wakabayashi, 2010). Se ha reportado que numerosos agentes quimioterapéuticos anticancerígenos generan ERO como parte de su mecanismo de toxicidad, esto es importante para ser considerado, ya que las células tratadas con estos agentes podrían responder ante este reto oxidativo incrementando la expresión de Bcl-2 y la activación de Nrf2 promoviendo los mecanismos de adaptación o resistencia, e induciendo la sobrevivencia de las células oncogénicas y su proliferación.

Esta observación tiene un valor como herramienta clínica, ya que un aumento en la

respuesta hormética antioxidante involucraría a Bcl-2 y Nrf2 como un efecto colateral de estos agentes, lo que necesariamente llevaría al diseño de mecanismos que disminuyeran la función de estas proteínas involucradas en la respuesta hormética.

Todo lo anterior indica que nuestros resultados contribuyen al entendimiento de los mecanismos de la respuesta hormética; los estudios realizados sobre este fenómeno y los resultados que se han obtenido podrían utilizarse para diseñar herramientas terapéuticas, sobre todo en donde se involucren cambios en el estado redox celular como los que se han descrito en procesos como la isquemia-reperfusión, el cáncer y el envejecimiento.

8. CONCLUSIONES

- Los tratamientos con dosis subletales de H₂O₂ pueden inducir una respuesta hormética en la línea celular L-929.
- La respuesta hormética inducida con H₂O₂ le confiere protección a la línea celular L-929 contra retos oxidativos letales.
- La respuesta hormética al tratamiento con H₂O₂ induce el incremento en la expresión de la proteína de supervivencia Bcl-2 y el incremento en la expresión de enzimas antioxidantes como GST y γ GCS mediada por el factor de transcripción Nrf2.
- La proteína Bcl-2 participa en la activación del factor de transcripción Nrf2 posiblemente como parte de la respuesta hormética.
- Bcl-2 es una proteína esencial en la respuesta hormética ante el estrés oxidativo inducido con dosis moderadas de H₂O₂ en la línea celular L-929.
- El incremento en la expresión de Bcl-2 en la respuesta hormética inducida por H₂O₂ en la línea celular L-929 es regulado por el factor de transcripción NF- κ B.
- Las cinasas transductoras PI3K, Akt y PKC participan en la activación del factor de transcripción NF- κ B en respuesta al tratamiento hormético inducido con H₂O₂.

9. PERSPECTIVAS

- Determinar la participación de la proteína Bcl-2 en la regulación del estado redox celular.
- Determinar la interacción de Bcl-2 con la molécula de GSH.
- Determinar la localización sub-celular de Bcl-2 en respuesta al estrés oxidativo.
- Determinar la participación de la proteína FKBP-38 en la localización sub-celular de Bcl-2 en respuesta al estrés oxidativo.
- Determinar la vía de transducción de señales que regulan la expresión de Bcl-2 en la respuesta hormética.
- Determinar la vía de transducción de señales que regulan la activación de Nrf2 en la respuesta hormética.
- Determinar la duración del efecto protector de la respuesta hormética.
- Establecer modelos *in vivo* de la respuesta hormética.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Adams JM, Cory S. (2007) The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26:1324-1337.
- Amstad PA, Liu H, Ichimiya M, Berezsky IK, Trump BF, Buhimschi IA, Gutierrez PL. (2001) BCL-2 is involved in preventing oxidant-induced cell death and in decreasing oxygen radical production. *Redox Rep.* 6:351–362.
- Antunes F, Cadenas E. (2000) Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. *FEBS Lett.* 475:121–126.
- Asikainen T, Raivio KO, Saksela M, Kinnula VL. (1998) Expression and developmental profile of antioxidant enzymes in human lung and liver. *Am J Respir. Cell Mol Biol.* 19: 942–949.
- Avissar N, Finkelstein JN, Horowitz S, Willey JC, Coy E, Frampton MW, Watkins RH, Khullar P, Xu YL, Cohen HJ. (1996) Extracellular glutathione peroxidase in human lung epithelial lining fluid and in lung cells. *Am J Physiol.* 270: L447–L455.
- Babior BM. (1984). The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Inv*, 73: 599-601.
- Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, Rhee SG. (1997) Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 272: 217–221.
- Bautista DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterner O, Hogestatt, ED, Julius D, Jordt SE, Zygmunt PM. (2005) Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 102: 12248–12252.
- Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M. (1999) Chemistry physiology and pathology of free radicals. *Life Sc.* 65: 1865–1874.
- Blum D, Torch S, Nissou M-F, Verna J-M. (2001) 6-Hydroxydopamine-induced nuclear factor-kappaB activation in PC12 cells. *Biochem Pharmacol.* 62:473–481.
- Bogdanov MB, Ferrante RJ, Mueller G, Ramos LE, Martinou JC, Beal MF. (1999) Oxidative stress is attenuated in mice overexpressing BCL-2. *Neurosci Lett.* 262: 33–36.
- Boveris A, Oshino N, Chance B. (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 128: 617–630.

- Bruce-Keller AJ, Begley JG, Fu W, Butterfield DA, Bredesen DE, Hutchins JB, Hensley K, Mattson MP. (1998) Bcl-2 protects isolated plasma and mitochondrial membranes against lipid peroxidation induced by hydrogen peroxide and amyloid b-peptide. *J Neurochem.* 70: 31–39.
- Burton GW, Ingold KU. (1989) Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Ann NY Acad Sci.* 570: 7–22.
- Cadenas E. (1997) Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors.* 6:391–397.
- Cadenas E, Sies H. (1998) The lag phase. *Free Radic Res.* 28: 601–609.
- Cameron E, Pauling L. (1976) Supplemental ascorbate in supportive treatment of cancer—prolongation of survival times in terminal human cancer. Part 1, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 73: 3685–3689.
- Carmody RJ, Cotter TG. (2001) Signalling apoptosis: a radical approach. *Redox Rep.* 6:77–90.
- Carr A, Frei B. (1999) Does Vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J.* 13: 1007–1024.
- Chau YP, Shiah SG, Don MJ, Kuo ML. (1998) Involvement of hydrogen peroxide in topoisomerase inhibitor b-lapachone-induced apoptosis and differentiation in human leukemia cells. *Free Radic Biol Med.* 24:660–670.
- Chiueh CC. (1999) Neuroprotective properties of nitric oxide. *Ann NY Acad Sci U.S.A.* 890: 301–311.
- Catz SD, Jonson JL. (2001) Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kB and its significance in prostate cancer. *Oncogene.* 20: 7342-7351.
- Clerch LB, Wright A, Chung DJ, Massaro D. (1996) Early divergent lung antioxidant enzyme expression in response to lipopolysaccharide. *Am J Physiol.* 271:L949–L954.
- Celli A, Que FG, Gores GJ, LaRusso NF. (1998) Glutathione depletion is associated with decreased Bcl-2 expression and increased apoptosis in cholangiocytes. *Am J Physiol.* 275:749-757.
- Copin JC, Gasche Y, Chan PH. (2000) Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase does not prevent neonatal lethality in mutant mice that lack manganese superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med.* 28: 1571–1576.
- Crescenzi E, Palumbo G, Brady HJ. (2003) Bcl-2 activates a programme of premature senescence in human carcinoma cells. *Biochem J.* 375:263-274.

- Curtin JF, Donovan M, Cotter TG. (2002) Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods*. 265: 49–72.
- Cuzzocrea S, Thiemermann C, Salvemini D. (2004) Potential therapeutic effect of antioxidant therapy in shock and inflammation. *Curr Med Chem*. 11:1147–1162.
- Dalton TP, Shertzer HG, Puga A. (1999). Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 39: 67-101.
- De Duve C, Baudhuin P. (1969) Peroxisomes microbodies and related particles. *Physiol Rev*. 46:323–357.
- Delaunay A, Isnard A, Toledano MB. (2000) H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J*. 19: 5157-5166.
- Doke N, Scandalios JG. (1997) The oxidative burst: roles in signal transduction and plant stress. In: *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Cold Spring Harbor. 785-813.
- Dreher D, Junod AF. (1996). Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer*. 32:30–38.
- Edlich F, Weiwad M, Erdmann F, Fanghänel J, Jarkzowski F, Rahfeld JU, Fischer G. (2005) Bcl-2 regulator FKBP38 is activated by Ca²⁺/calmodulin. *EMBO J*. 24:2688-2699.
- Edlich F, Maestre-Martínez M, Jarkzowski F, Weiwad M, Moutty MC, Malesevic M, Jahreis G, Fischer G, Lücke C. (2007) A novel calmodulin/ Ca²⁺ target recognition activates the Bcl-2 regulator FKBP38. *J Biol Chem*. 282: 36496-36504.
- Ellerby LM, Ellerby HM, Park SM, Holleran AL, Murphy AN, Fiskum G, Kane DJ, Testa MP, Kayalar C, Bredesen DE. (1996) Shift of the cellular oxidation–reduction potential in neural cells expressing Bcl-2. *J Neurochem*. 67:1259–67.
- Esworthy RS, Ho YS, Chu FF. (1997) The GPx1 gene encodes mitochondrial glutathione peroxidase in the mouse liver. *Arch Biochem Biophys*. 340: 59–63.
- Fabisiak JP, Kagan VE, Ritov VB, Johnson DE, Lazo JS. (1997) Bcl-2 inhibits selective oxidation and externalization of phosphatidylserine during paraquat-induced apoptosis. *Am J Physiol*. 272:675–84.
- Farris MW, Reed DJ. (1987) High performance liquid chromatography of thiols and disulfides: Dinitrophenol derivatives. *Methods Enzymol*. 143:101-109.
- Frescas D, Valenti L, Accili D. (2005) Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *J Biol Chem*. 280:20589–20595.

- Fridovich I. (1975) Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 44: 147–159.
- Fridovich I, Freeman B. (1986) Antioxidant defenses in the lung. *Annu Rev Physiol.* 48:693–702.
- Forman HJ, Kennedy J. (1974) Role of superoxide radical in mitochondrial dehydrogenase reactions. *Biochem Biophys Res Commun.* 60:1044–1050.
- Forman HJ, Fukuto JM, Torres M. (2004) Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am J Physiol Cell Physiol.* 287: C246–C256.
- Furukawa K, Estus S, Fu W, Mark RJ, Mattson MP. (1997) Neuroprotective action of cycloheximide involves induction of Bcl-2 and antioxidant pathways. *J Cell Biol.* 136: 1137–1149.
- Gabbita SP, Robinson K, Stewart C, Floyd R, Hensley K. (2000) Redox regulatory mechanisms of cellular signal transduction. *Archives Biochem Biophys.* 376: 1-13.
- Gangmin D, Joseph HS, Kathryn JI, Ben VH, Carl WC. (1999) Bcl-2 facilitates recovery from DNA damage after oxidative stress. *Exp Neurol.* 159:309–18.
- Ghafourifar P, Cadenas E. (2005) Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci.* 26:190–195.
- Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. (2006) Redox regulation of hepatocyte apoptosis. *J Gastroenterol Hepatol.* 21:3-6.
- Ghosh JMC. (1998) Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Pro Nat Aca Scien.* 95: 13182–13187.
- Giménez-Bonafé P, Tortosa A, Pérez-Tomás R. (2009) Overcoming drug resistance by enhancing apoptosis of tumor cells. *Curr Cancer Drug Targets.* 9:320-40.
- Godley BF, Jin GF, Guo YS, Hurst JS. (2002) Bcl-2 overexpression increases survival in human retinal pigment epithelial (ROC) cells exposed to H₂O₂. *Exp Eye Res.* 2002:74:663–9.
- Greenberg ER, Baron J.A., Tosteson T.D., Freeman D.H., Beck G.J., Bond J.H. (1994). Clinical-trial of antioxidant vitamins to prevent colorectal adenoma. *N Engl J Med.* 331:141–147.

- Haddad JJ. (2004) On the antioxidant mechanisms of Bcl-2: a retrospective of NF- κ B signalling and oxidative stress. *Biochem Biophys Res Comm.* 322: 355-363.
- Halliwell B, Gutteridge J M C. (1999) *Free radicals in biology and medicine* (3rd ed.) Oxford University Press.
- Heffner JE, Repine JE. (1989) Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis.* 140:531–554.
- Hinds MG, Lackmann M, Skea GL, Harrison PJ, Huang DCS, Day CL. (2003) The structure of Bcl-w reveals a role for the C-terminal residues in modulating biological activity. *EMBO J.* 22:1497-1507.
- Hochman A, Sternin H, Gorodin S, Korsmeyer S, Ziv I, Melamed E, Offen D. (1998) Enhanced oxidative stress and altered antioxidants in brains of Bcl-2-deficient mice. *J Neurochem.* 71:741–8.
- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin X, Milliman C, Korsmeyer SJ. (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell.* 75:241–51.
- Howard AN, Bridges KA, Meyn NRE, Chandra J. (2009) ABT-737, a BH3 mimetic, induces glutathione depletion and oxidative stress. *Cancer Chemother Pharmacol.* 65:41–54.
- Huang TT, Yasunami M, Carlson EJ, Gillespie AM, Reaume AG, Hoffman EK, Chan PH, Scott RW, Epstein CJ. (1997) Superoxide-mediated cytotoxicity in superoxide dismutase-deficient fetal fibroblasts. *Arch Biochem Biophys.* 344:424–32.
- Huang YL, Chou CK. (1998) Bcl-2 blocks apoptotic signal of transforming growth factor-beta in human hepatoma cells. *J Biomed Sci.* 5: 185–91.
- Hwang C, Sinskey AJ, Lodish HF. (1992) Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic-reticulum. *Science.* 57: 1496–1502.
- Itoh K, Tong KI, Yamamoto M. (2004) Molecular mechanism activating Nrf2-Keap-1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med.* 36:1208-1213.

- Jang HH, Surh YJ. (2003) Protective effects of resveratrol on b-amyloid induced oxidative PC12 cell death. *Free Radic Biol Med.* 34: 1100–10.
- Ji YB, Akerboom TPM, Sies H, Thomas JA. (1999) S-nitrosylation and S-glutathiolation of protein sulfhydryls by S-nitroso glutathione. *Arch Biochem Biophys.* 362: 67–78.
- Jones DP, Carlson JL, Mody VC, Cai JY, Lynn MJ, Sternberg P. (2000) Redox state of glutathione in human plasma. *Free Rad Biol Med.* 28: 625–635.
- Jornot L, Junod AF. (1992) Response of human endothelial cell antioxidant enzymes to hyperoxia. *Am J Respir Cell Mol. Biol.* 6: 107–115.
- Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, Ziman BD, Wang S, Ytrehus K, Antos CL, Olson EN, Sollott SJ. (2004) Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest.* 113:1535-49.
- Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, Hahn H, Gralla EB, Valentine JS, Ord T, Bredesen DE. (1993) Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science.* 262:274–7.
- Kang SA, Jang YJ, Park H. (1998) In vivo dual effects of Vitamin C on paraquat-induced lung damage: dependence on released metals from the damaged tissue. *Free Rad Res.* 28:93–107.
- Karoui H, Hogg N, Frejaville C, Tordo P, Kalyanaraman B. (1996) Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxynitrite—ESR-SPIN trapping and oxygen uptake studies. *J Biol Chem.* 271: 6000–6009.
- Kasparova S, Brezova V, Valko M, Horecky J, Mlynarik V, Liptaj T, Vancova O, Ulicna O, Dobrota D. (2005) Study of the oxidative stress in a rat model of chronic brain hypoperfusion. *Neurochem.* 46: 601–611.
- Kensler TW, Wakabayashi N. (2010) Nrf2: friend or foe for chemoprevention? *Carcinogenesis.* 31:90-99.

- Kiley PJ , Storz G. (2004) Exploiting thiol modifications. *PloS Biolo.* 2: 1714-1717.
- Kim HJ, So YJ, Jang JH, Lee JS, Oh YJ, Surh YJ. (2001) Differential cell death induced by salsolinol with and without copper: possible role of reactive oxygen species. *Mol Pharmacol.* 60:440–9.
- Kinnula VL, Crapo JD, Raivio KO, (1995) Biology of disease: generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Lab Invest.* 73: 3–19.
- Knekt P, Jarvinen R, Seppanen R, Rissanen A, Aromaa A, Heinonen OP, Albanes D, Heinonen M, Pukkala E, Teppo L. (1991) Dietary antioxidants and the risk of lung-cancer. *Am J Epidemiol.* 134: 471–479.
- Kojo S. (2004) Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem.* 11:1041–1064.
- Kowaltowski AJ, Fenton RG, Fiskum G. (2004) Bcl-2 family proteins regulate mitochondrial reactive oxygen production and protect against oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 37:1845-1853.
- Königsberg M, López-Díazguerrero NE, Aguilar MC, Ventura JL, Gutierrez-Ruiz, MC, Zentella A. (2004) Senescent phenotype achieved in vitro is indistinguishable, with the exception of Bcl-2 content, from that attained during the in vivo aging process. *Cell Biol Intern* 28:641-651.
- Kovacic P, Pozos R S, Somanathan R, Shangari N, O'Brien P J. (2005) Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: Focus on electron transfer, free radicals, and structure–activity relationships. *Curr Med Chem.* 12: 2601–2623.
- Kweon M, Adhami VM, Lee JS, Mukhtar H. (2006) Constitutive overexpression of Nrf2-dependent heme oxygenase-1 in A549 cells contributes to resistance to apoptosis induced by epigallocatechin 3-gallate. *J Biol Chem.* 281:33761–33772.
- Lambeth JD. (2002) Nox/Duox family of nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) oxidases. *Curr Opin Hematol.* 9:11–17.

- Lawrence MS, Ho DY, Sun GH, Steinberg GK, Sapolsky RM. (1996) Overexpression of Bcl-2 with herpes simplex virus vectors protects CNS neurons against neurological insults in vitro and in vivo. *J Neurosci.*16:486–96.
- Lebowitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright Jr J, Dionne L, Lu N, Huang S, Matzuk MM.(1996) Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxidase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 9782–9787.
- Lee M, Hyun DH, Marshall KA, Ellerby LM, Bredesen DE, Jenner P, Halliwell B. (2001) Effect of overexpression of BCL-2 on cellular oxidative damage, nitric oxide production, antioxidant defenses, and the proteasome. *Free Radic Biol Med.* 31:1550–1559.
- Lee M, Hyun DH, Halliwell B, Jenner P. (2001) Effect of overexpression of wild-type and mutant Cu/Zn-superoxide dismutases on oxidative stress and cell death induced by hydrogen peroxide, 4-hydroxynonenal or serum deprivation: potentiation of injury by ALS-related mutant superoxide dismutases and protection by Bcl-2. *J Neurochem.* 78:209–20.
- Lee JS, Surh YJ, (2005) Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Lett.* 224:171–184.
- Lee SH, Oe T, Blair IA. (2001) Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins. *Science* 292:2083–2086.
- Lee YJ, Galoforo SS, Berns CM, Chen JC, Davis BH, Sim JE, Corry PM, Spitz DR. (1998) Glucose deprivation-induced cytotoxicity and alterations in mitogen-activated protein kinase activation are mediated by oxidative stress in multidrug-resistant human breast carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry.* 273: 5294–5299.
- Levy S, Jaiswal AK, Forman HJ. (2009) The role of c-Jun phosphorylation in EpRE activation of phase II genes. *Free Radic. Biol. Med.* 47:1172-1179.
- Leonard SS, Harris G K, Shi X. (2004) Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med.* 37: 1921–1942.

- Li F, Mao HP, Ruchalski KL, Wang YH, Choy W, Schwartz JH, Borkan SC. (2002) Heat stress prevents mitochondrial injury in ATP depleted renal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283: C917–C926.
- Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov, S, Ursell PC, Olson JL, Noble L J, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ. (1995) Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet.* 11:376–381.
- Limón-Pacheco J, Gonsebatt ME. (2009) The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mut Res.* 674:137–147.
- Liochev SI, Fridovich I. (2002) The Haber–Weiss cycle—70 years later: An alternative view. *Redox Rep.* 7:55–57.
- Liu Y, Naumovski L, Hanawalt P. (1997) Nucleotide excision repair capacity is attenuated in human promyelocytic HL60 cells that overexpress BCL2. *Cancer Res.* 57:1650–3.
- López-Araiza H, Ventura JL, López-Diazguerrero NE, González-Marquez H, Gutiérrez-Ruiz MC, Zentella DA, Königsberg FM. (2006) Organ- and Tissue-specific Alterations in the Anti-apoptotic Protein Bcl-2 in CD1 Female Mice of Different Ages. *Biogerontol.* 7:63-67.
- López-Diazguerrero NE, López-Araiza H, Conde-Pérezprina JC, Bucio L, Cárdenas MC, Ventura JL, Covarrubias L, Gutiérrez-Ruiz MC, Zentella A, Königsberg M. (2006) Bcl-2 protects against oxidative stress while inducing premature senescence. *Free Rad Biol Med.* 40:1161-1169.
- Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohe L. (1974) Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett.* 42:68
- Lu SC. (1999) Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J.* 13:1169–83.

- Marklund SL. (1982) Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 79: 7634–7638.
- Marklund SL. (1984) Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J Clin Invest.* 74: 1398–1403.
- Marklund SL. (1992) Regulation of cytokines of extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in fibroblasts. *J Biol Chem.* 267: 6696–6701.
- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. (2005) Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem.* 16:577–586.
- Massey V, Strickland S, Mayhew S G, Howell L G, Engel P C, Matthews R G, Schulman M, Sullivan PA. (1961) The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun.* 36:891.
- Mates JM, Perez-Gomez C, De Castro IN. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 32: 595–603.
- Matos HR, Capelozzi VL, Gomes OF, Mascio PD, Medeiros MH. (2001) Lycopene inhibits DNA damage and liver necrosis in rats treated with ferric nitrilotriacetate. *Arch Biochem Biophys.* 15:171-177.
- Mathers J, Fraser JA, McMahon M, Saunders RD, Hayes JD, McLellan LI. (2004) Antioxidant and cytoprotective responses to redox stress. *Biochem Soc Symp.* 71: 157–176.
- Mattson MP, Cheng A. (2006) Neurohormetic phytochemicals: Low-dose toxins that induce adaptive neuronal stress responses. *Trends Neurosci.* 29:632–639.
- Mattson MP, Maudsley S, Martin B. (2004) A neural signaling triumvirate that influences ageing and age-related disease: insulin/IGF-1 BDNF and serotonin. *Ageing Res Rev.* 3: 445–464.

- Mbemba F, Houbion A, Raes M, Remacle J. (1985) Subcellular localization and modification with ageing of glutathione, glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in human fibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* 838:211–220.
- McCord JM, Fridovich I. (1970) The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. II. The mechanism of the mediation of cytochrome c reduction by a variety of electron carriers. *J Biol Chem.* 245: 1374–1377.
- Merad-Saidoune M, Boitier E, Nicole A, Marsac C, Martinou JC, Sola B, Sinet PM, Ceballos-Picot I. (1999) Overproduction of Cu/Zn-superoxide dismutase or Bcl-2 prevents the brain mitochondrial respiratory dysfunction induced by glutathione depletion. *Exp Neurol.* 158:428–36.
- Meredith MJ, Cusick CL, Soltaninassab S, Sekhar KS, Lu S, Freeman ML.(1998) Expression of Bcl-2 increases intracellular glutathione by inhibiting methionine – dependent GSH efflux. *Biochem Biophys Res Com.* 248:458-46.
- Métrailler-Ruchonnet I, Pagano A, Carnesecchi S, Ody C, Donati Y, Barazzzone-Argiroffo C. (2007)Bcl-2 protects against hyperoxia-induced apoptosis through inhibition of the mitochondria-dependent pathway. *Free Radic Biol Med.* 42:1062-1074.
- Miller D.M, Buettner GR, Aust SD. (1990)Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Radic Bio. Med.* 8: 95–108.
- Miller ER, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E. (2005). Meta-analysis: High-dosage Vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med.* 142:37–46.
- Moradas-Ferreira P, Costa V.(2000). Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defenses, damage and death. *Redox Report.* 5:277-285.
- Mullenbach GT, Tabrizi A, Irvine BD, Bell GI, Tainer JA, Halliwell RA. (1988) Selenocysteine's mechanism of incorporation and evolution revealed in cDNAs of three glutathion peroxidases. *Protein Eng.* 2: 239–246.

- Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem.* 279: 49064–49073.
- Mulcahy RT, Gipp JJ. (1995) Identification of a putative antioxidant response element in the 5'-flanking region of the human gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 209:227–33.
- Myers KM, Fiskum G, Liu Y, Simmens SJ, Bredesen DE, Murphy AN. (1995) Bcl-2 protects neural cells from cyanide/aglycemia-induced lipid oxidation, mitochondrial injury, and loss of viability. *J Neurochem.* 65:2432–40.
- Oury TD, Day BJ, Crapo JD. (1996) Extracellular superoxide dismutase in vessels and airways of human and baboons. *Free Radic Biol. Med.* 20:957–965.
- Oliver L, Mahe B, Grée R, Vallette FM, Juin P. (2007) HA14-1, a small molecule inhibitor of Bcl-2, bypasses chemoresistance in leukaemia cells. *Leukemia Res.* 31:859–863.
- Papadopoulos MC, Koumenis IL, Xu L, Giffard RG. (1998) Potentiation of murine astrocyte antioxidant defence by bcl-2: protection in part reflects elevated glutathione levels. *Eur J Neurosci.* 10:1252–60.
- Pastor N, Weinstein H, Jamison E, Brenowitz M. (2000) A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence specific binding. *J Mol Biol.* 304: 55–68.
- Paulovich AG, Toczysky DP, Hartwell LH. (1997) When checkpoints fail. *Cell.* 88: 315-321.
- Pérez-Galán P, Roué G, López-Guerra M, Nguyen M, Villamor N, Montserrat E, Shore GC, Campo E, Colomer D.(2008)Bcl-2 phosphorylation modulates sensitivity to the BH3 mimetic GX15-070 (Obatoclax) and reduces its synergistic interaction with bortezomib in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia.* Jul 3. DOI.
- Pietarinen-Runtti P, Raivio KO, Saksela M, Asikainen TM, Kinnula VL. (1998) Antioxidant enzyme regulation and resistance to oxidants of human bronchial

epithelial cells cultured under hyperoxic conditions. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 19: 286–292.

- Pong K. (2004) Ischaemic preconditioning: therapeutic implications for stroke? *Expert Opin Ther Targets.* 8:125–139.
- Pryor WA. (2000) Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Rad Biol Med.* 28 :141–164.
- Rahman I, MacNee W. (2000) Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches. *Free Radic Biol Med* 28:1405–20.
- Retsky KL, Chen K, Zeind J, Frei B. (1999) Inhibition of copperinduced LDL oxidation by Vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation. *Free Rad Biol Med.* 26 :90–98.
- Ruis H , Schuller C. (1995) Stress signaling in yeast. *BioEssays.* 17: 959-965.
- Scandalios JG. (1997) *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses.* Cold Spring Harbor Laboratory Press Plainview NY U.S.A.
- Scandalios JG. (2004) Genomic responses to oxidative stress. In: Meyers RA (Editor), *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine.* Vol. 5. 2nd edn. Wiley-VCH Weinheim Germany. 489-512.
- Schriener SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, Remmen HV, Wallace DC, Rabinovitch PS. (2005) Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science.* 308: 1909–1911.
- Seyfried, J, Evert BO, Schwarz CS, Schaupp M, Schultz JB, Klockgether T, Wüllner U. (2003) Gene dosage-dependent effects of *bcl-2* expression on cellular survival and redox status. *Free Radic Biol Med.* 34:1517-1530.
- Simon RH, DeHart PD, Nadeau DM. (1989) Resistance of rat pulmonary alveolar epithelial cells to neutrophil-and oxidant-induced injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1:221–229.

- Shull S, Heintz, NH, Periasamy M, Manohar M, Janssen YM, Marsh JP, Mossman BT. (1991) Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *J Biol Chem.* 266:24398–24403.
- Steinman HM. (1995) The Bcl-2 Oncoprotein functions as a pro-oxidant. *J Biol Chem.* 270: 3487-3490.
- Storz G, Imlay JA. (1999) Oxidative stress. *Current Opin Microbiol.* 2:188-194.
- Tang XQ, Feng JQ, Chen J, Chen PX, Zhi JL, Cui Y, Guo RX, Yu H M. (2005) Protection of oxidative preconditioning against apoptosis induced by H₂O₂ in PC12 cells: mechanisms via MMP, ROS, and Bcl-2. *Brain Res.* 1057: 57-64.
- Tohyama YTT, Yamamura HB. (2004) cell responses to oxidative stress. *Curr Pharma Design.* 10: 835–839.
- Toledano MB, Kullik I, Trinh F, Baird PT, Schneider TD, Storz G. (1994) Redox-dependent shift of OxyR-DNA contacts along an extended DNA-binding site: a mechanism for differential promoter selection. *Cell.*78:897–909.
- Tsan MF, White JE, Santana TA, Lee CY. (1990) Tracheal insufflation of tumor necrosis factor protects rats against oxygen toxicity. *J Appl Physiol.* 68: 1211–1219.
- Tsan MF. (2001) Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity: lessons from transgenic and knockout mice. *Int J Mol Med.* 7:13–19.
- Vairo G, Soos T, Upton TM, Zalvide J, Decaprio JA, Ewen ME, Koff A, Adams JM. (2000) Bcl-2 retards cell cycle entry through p27Kip1, pRb relative p130, and altered E2F regulation. *Mol Cell Biol.* 20:4745-4753.
- Valko M, Morris H, Cronin MTD. (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 12:1161–1208.
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes C J, Telser J. (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* 266:37–56.

- Voehringer DW, McConkey DJ, McDonnell TJ, Brisbay S, Meyn RE. (1998) Bcl-2 expression causes redistribution of glutathione to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 95:2956–60.
- Voehringer DW. (1999) BCL-2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity. *Free Radic Biol Med.* 27: 945–50.
- Voehringer DW, Hirschberg DL, Xiao J, Lu Q, Roederer M, Lock CB, Herzenberg LA, Steinman L, Herzenberg LA. (2000) Gene microarray identification of redox and mitochondrial elements that control resistance or sensitivity to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 2680–5.
- Wang JL, Liu D, Zhang ZJ, Shan S, Han X, Srinivasula SM, Croce CM, Alnemri ES, Huang Z. (2000) Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 7124-9.
- Wang L, Hirayasu K, Ishizawa M, Kobayashi Y. (1994) Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS. *Nuc Acids Res.* 11:1774-1775.
- Wisel S, Khan M, Kuppusamy ML, Mohan IK, Chacko SM, Rivera BK, Sun BC, Hideg K, Kuppusamy P.(2009)Pharmacological preconditioning of mesenchymal stem cells with trimetazidine (1-[2,3,4-trimethoxybenzyl]piperazine) protects hypoxic cells against oxidative stress and enhances recovery of myocardial function in infarcted Herat through Bcl-2 expression. *J Pharmacol Exp Ther.* 329:543-550.
- White CW, Ghezzi P, McMahon S, Dinarello C.A, Repine JE. (1989) Cytokines increase rat lung antioxidant enzymes during exposure to hyperoxia. *J Appl Physiol.* 66: 1003–1007.
- White CW, Nguyen DH, Suzuki K, Taniguchi N, Rusakow LS, Avraham KB, Groner Y. (1993) Expression of manganese superoxide dismutase is not altered in transgenic mice with elevated level of copper-zinc dismutase. *Free Radic Biol Med.* 15:629–636.

- White E, Shannon JS, Patterson RE. (1997) Relationship between vitamin and calcium supplement use and colon cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark Rev.* 6: 769–774.
- Yang H, Wang J, Huang ZZ, Ou X, Lu SC. (2001) Cloning and characterization of the 50-flanking region of the rat glutamate-cysteine ligase catalytic subunit. *Biochem J.* 357:447–55.
- Yellon DM, Downey JM. (2003) Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev.* 83:1113-51.
- You WC, Zhang L, Gail MH, Chang YS, Liu WD, Ma JL, Li JY, Jin ML, Hu YR, Yang CS, Blaser MJ, Correa P, Blot WJ, Fraumeni JF, Xu GW. (2000) Gastric cancer: *Helicobacter pylori*, serum Vitamin C, and other risk factors. *J Natl Cancer Inst.* 92: 1607–1612.
- Young JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU. (2004) Pathways of chaperone mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5: 781–791.
- Zhong LT, Sarafian T, Kane DJ, Charles AC, Mah SP, Edwards RH, Bredesen DE. (1993) bcl-2 inhibits death of central neural cells induced by multiple agents. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90:4533–7.
- Zimmermann AK, Loucks FA, Le SS, Butts BD, Flores-McClure ML, Bouchard RJ, Heidenreich KA, Linseman DA. (2005) Distinct mechanisms of neuronal apoptosis are triggered by antagonism of Bcl-2/Bcl-x(L) versus induction of the BH3-only protein. *J Bim Neurochem.* 94:22-36.
- Zimmermann AK, Loucks FA, Schroeder EK, Bouchard RJ, Tyler KL, Linseman DA. (2007) Glutathione binding to the Bcl-2 homology-3 domain groove: a molecular basis for Bcl-2 antioxidant function at mitochondria. *J Biol Chem.* 282:29296-29304.