



**Departamento de Bioquímica Biología
Molecular III e Inmunología
Universidad de Granada**

TESIS DOCTORAL

**INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS T
LEUCÉMICAS POR EL EXPOLISACÁRIDO B100
SULFATADO**

**Tesis doctoral presentada por Diana Carranza Domínguez para optar
al título de Doctora por la Universidad de Granada**

Granada, Mayo 2014

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Diana Carranza Domínguez
D.L.: GR 2424-2014
ISBN: 978-84-9083-151-9

Alondra de mi casa,

ríete mucho.

Es tu risa en los ojos
la luz del mundo.

Ríete tanto
que en el alma al oírte,
bata el espacio.

Tu risa me hace libre,
me pone alas.

Soledades me quita,
cárcel me arranca.

Boca que vuela,
corazón que en tus labios
relampaguea.

Es tu risa la espada
más victoriosa.

Vencedor de las flores
y las alondras.

Rival del sol.
Porvenir de mis huesos
y de mi amor.

La carne aleteante,
súbito el párpado,
el vivir como nunca
coloreado.

¡Cuánto jilguero
se remonta, aletea,
desde tu cuerpo!

Desperté de ser niño.

Nunca despiertes.

Triste llevo la boca.

Ríete siempre.

Siempre en la cuna,
defendiendo la risa
pluma por pluma.

Miguel Hernandez

A Otto la luz de mi vida

Ha sido difícil llegar hasta aquí, a lo largo de estos años he vivido multitud de experiencias que me han hecho crecer, madurar, reír y llorar. Algunos desengaños duros pero siempre constructivos, muchas sorpresas agradables y retos por conseguir que una vez alcanzas parecen pequeños cuando antes resultaban gigantes. Muchas horas de laboratorio y muchas horas en casa trabajando. Siempre pensé que merecía la pena y esta tesis se la dedico, además de a las personas que confiaron en mi, a todas las familias con cuyos hijos padecen Ataxia-Telangectasia, gracias por vuestra colaboración, vuestra fuerza y vuestra confianza, sois todos un ejemplo, especialmente vuestros niños.

También quisiera agradecer a mis compañeros y jefes, a Enrique y Ana que tanto miedo me daban la principio. A Mari Carmen, la Mari, que tanto me ayudó en mis primeros años y a la que tantas veces interrumpí en su despacho y agobié los fines de semana con mails eternos acerca de posibles experimentos y textos que había leído, gracias también por escucharme, apoyarme en lo personal y lo profesional y gracias por las prisas de estos últimos días. A María Jose por aquellos años también, espero que la vida te de lo que quieres y que seas feliz. A Jorge, mi Jorga, para mi eres perfecto tal y como eres y te quiero sin cambiarte nada, gracias por todas y cada una de las horas que hemos pasado juntos riendo, llorando y peleando. Por todos los vinos, cañas, cenas, fiestas y días de trabajo eres un sol, Dieguito, tu también. A los que se fueron muy a mi pesar, Zulema, Rafa, Irene sabéis que estáis en mi corazón y que os extraño, gracias por aquellas cenas (Zule ummm todavía me acuerdo de tu pastela moruna), las risas y las cervezas cuando algo iba mal o porque todo iba bien, todos nuestros planes y nuestras conversaciones, ánimos y experiencias que fueron de las mejores que he vivido en Granada. Raquel no se muy bien lo que ha pasado pero también he de darte las gracias a ti puesto que sean como sean las cosas ahora mismo antes fueron preciosas. Ester no te he incluido en el grupo de los que se fueron porque para mi es como si todavía estuvieses aquí, casi no me puedo creer que te hayas marchado a Boston. Mi Ester, Esterpi, Megapi, eres una de las mejores personas que conozco y te quiero muchísimo siempre una sonrisa, un consejo, siempre con ilusión y positiva, riéndote de lo malo y compartiéndolo todo, siempre tan generosa, discreta, cuantas historias hemos vivido, siempre las últimas con Jorge, recuerdo tantas cosas que no pueden caber en un folio. Solo puedo agradecerte y decirte que te quiero, para ti solo tengo buenos deseos y mucha esperanza, confío en ti y en todas tus posibilidades se que siempre estarás ahí y yo aquí para ti. Todos vosotros habéis sido y seréis mas que compañeros, sois mis amigos.

Api, Osmany os deseo lo mejor en Méjico y Colombia.

Domi siempre tan callado y discreto, paciente y entero eres una buenísima persona y espero que llegues a conseguir todo lo que desees. Manu nunca tuvimos mucho contacto y

quiero que sepas que me arrepiento, me parto contigo pero mucho, mucho, muchísimo. A todas las personas que vinieron a hacer el TFM y se fueron seguro que, aunque no sea aquí, si perseveráis obtendréis lo que queréis solo es una cuestión de confianza y trabajo.

Lucia se que vales mucho y tienes mucha fuerza quizá no sea tu mejor momento pero todo se pasa hasta lo malo. Eres generosa, positiva, graciosa y trabajadora conseguirás todo aquello que quieras, gracias por la alegría, las risas, las conversaciones y por todas las horas que hemos pasado juntas en el laboratorio. Alejandro eres brillante (como tu futuro) y muy buena persona, razonable, fuerte y honesto me gustas mucho y me alegro de haberte conocido, gracias por esa ayuda de última hora. Gustavo, Raula, Rocio mil y una gracias por los vinos, las aventuras, las conversaciones, gracias por todo y enhorabuena. A todas las personas del Genyo desde los técnicos, a los compañeros de otros laboratorios, gracias Chole por permitirme aprender durante todo un año y gracias Ángela y Eva (sois preciosas, tiernas y de lo mejor), Sari por ser tan reivindicativa, Laura (eres bondad), Martita (siempre tan tajante me encantas), Parse (risas y verduras), Santi y Martín Muñoz (la pareja del año), David (mi chico chica), Thomas (siempre tan formal), Suyi (eres fuerza pura), Auri (preciosa). Para terminar con las personas del laboratorio quisiera agradecer a todo mi grupo y mi jefe. Sara, que te voy a decir, nos perdimos los primeros años pero hemos aprovechado los últimos y es lo que cuenta, me hubiese gustado conocerte mejor antes, gracias por tu apoyo, tus risas, tus ánimos cuando los necesitaba, por haber sido compañera de tesis con lo que ello conlleva, por traerme las correcciones de la discusión, eres una de las personas que más me ha entendido estos meses y mas me ha ayudado. Gracias por tus bromas y tonterías, por aquel mail, por las conversaciones sobre ciencia, por las demás también, como no, si son las mas importantes. Gracias por ser como eres y por pensar como lo haces, eres un ejemplo y te considero mi amiga. Pablo el parecido no tiene nada que ver con la realidad eres tierno, amable y aunque eres un poco desastre (como yo) siempre que me ha hecho falta me has echado una mano y te lo agradezco, contigo siempre se aprende algo en una conversación, gracias Pablo. Karina, otra persona en la que se ejemplifica la frase anterior, gracias por los consejos ,me reído mucho contigo y aprendido de tu asertividad entre otras muchas cosas, gracias. Gloria, la pequeña Gloria, la recién llegada. Tendrás tu beca lo se, harás un buen trabajo y todo ira bien y los que seguimos aquí te ayudaremos en lo que necesites, mucha suerte. Juan Diego, que por mucho que te hayas ido siempre serás del grupo de Ignacio, eres un panzón de reir, solo tu puedes llenar un autobús, te deseo toda la felicidad. Jefe, que te voy a escribir a ti, solo puedo dedicarte un enorme GRACIAS, no solo porque confiaste en mi y me distes una oportunidad de oro sino por el apoyo (a pesar de estos últimos días tan estresantes), sobre todo en lo personal. Sabes que te respeto y aunque no siempre hemos estado de acuerdo en todo en ese consiste

¿no?. Nos hemos dado mucha vidilla “prenda” y te aprecio de corazón creo que eres buena persona y una de tus mejores cualidades es la libertad con la que nos tratas. Gracias por tener una relación de tu a tu y por cada conversación y reunión. Rosa, Eva, Judit sois como mis hermanas, no puedo enumerar las anécdotas, las situaciones, en definitiva todo lo que hemos vivido pero si puedo agradecer cada una de ellas, os quiero muchísimo y sois parte de mi familia. Merce, Bego sois preciosas y nos hemos reído tanto. Lucia eres mi hermana de alma y yo la tuya siempre estaremos unidas y siempre existirán esos lazos que nada tienen que ver con la sangre pero que te unen mucho mas fuerte, te quiero con todo mi corazón. Stuart, te extraño. Carmen, Alejandra, Xoana a todas vosotras y todas las demás me gustaría agradecer todos los años de carrera y todo lo que vivimos juntas. Martiña, Retropaula, Ñarri pequeñarri haya donde estéis se que no leeréis esto próximamente pero os quiero incluir también por los Campanilleros y el Cabaret. Lo mismo ocurre con Paula y Marta, espero que nos equivocaseis y que si lo hicisteis lo halláis sabido solucionar. Edu, Eduvino, EduMiller, mi Edu, mi rallito solo contigo puedo hacer encuestas sobre un bolso de naranjas y al mismo tiempo tener una conversación donde brutalmente dices lo que piensas, gracias por esa sinceridad, por ser mi amigo del alma, porque siempre seré tu novia la del pelo rosa, por cada momento que hemos pasado juntos, por cada conversación, por tantas cosas que siempre tengo presentes eres mi otro hermano de alma y te quiero y admiro muchísimo. Isra, imagino que tu tampoco lo leerás, gracias porque sin ti no se si hubiera llegado a Granada, gracias por tu paciencia, calma, sinceridad, por ser siempre tan cariñoso, por quererme tantísimo e incondicionalmente, por aceptarme tal y como soy sin querer cambiarme, por estar siempre que te necesité, por dármelo todo a cambio de nada y perdóname porque no lo supe hacer bien y lo siento muchísimo, siempre te llevaré en el corazón porque eres el perfecto ejemplo de la bondad hecha persona, no te quise como tu querías pero te quise.

Eva, Hugh y Puri de vosotros he aprendido mucho y os doy las gracias por todo.

Y los mas importantes:

Gracias mamá por estar ahí siempre, por ser tan valiente, por ser un ejemplo para mi. Eres la persona mas fuerte, íntegra y curiosa que conozco, tuve mucha suerte al escogerte aunque no lo recuerde, eres una de las mejores cosas que me ha pasado en la vida.

A ti te lo debo todo, eres amor en estado puro y nunca podré agradecerte lo suficiente todo lo que has hecho, soy un reflejo de ti o al menos pretendo serlo y para ti es también este pequeño libro, siempre las dos. Abuelito, abolo como te decía de pequeña, eres un ser humano excepcional, me has enseñado tanto, tantísimo, te quiero con toda mi alma y nado en tus ojos, gracias por tu confianza y apoyo, sin ti y sin mamá no estaría aquí. Gracias abuela Estilita, te fuiste demasiado pronto, me gustaría que estuvieses aquí. Gracias tíos y tías, Irene, Aida y Jorge por todas y cada una de las cosas que hemos vivido y dicho. Abuelita Alfonsa y abuelo Manolo me gustaría haber tenido mas tiempo, haber podido hablar con vosotros pero se que me veis y que sois felices. Trini y familia (porque no puedo nombraros a todos), gracias por cada miligramo de felicidad que me disteis cuando era niña, por esas vacaciones interminables, Omar, Black, el hámster, las tortugas y todos nosotros. Nunca podre olvidarlo porque fueron de los momentos mas felices de mi niñez. A pesar de todo el tiempo que ha pasado os quiero tanto que no lo puedo expresar. Tía, porque para mi lo eres, gracias por venir a despedirte antes de marcharte, ahora lo entiendo. Papa te quiero y todo pasó, te fuiste estando orgulloso de mi y te echo de menos me hubiese gustado recuperar el tiempo perdido pero la vida es lo que es y no pude, lo siento. Isa, Emi y Maite, tíos y primos aun tenemos mucho tiempo.

Chole esta tesis no sería posible sin ti, tu me diste lo que mas quiero en este mundo que es Otto, tendría muchas cosas que agradecerte pero sobre todo a este angelito que es nuestra vida, todo lo demás sobra decirlo porque ya lo sabes, siempre estarás en mi de una manera o de otra, nunca olvidaré a My Bloody, aquel camping, aquel portal, aquellos días en los que todo era emocionante, aquel amor sin fronteras y siento si alguna vez te hice daño pues nunca quise, me quedo solo con lo bueno. Otto, hijo mío, te quiero tanto, tantísimo que no tengo palabras y las que encuentro se ahogan en mi garganta entre lágrimas. Gracias por tus sonrisas, por dejar que me pierda en tus ojos, por quererme incondicionalmente, por perdonar mis ausencias (sabes que te dedicaría todo mi tiempo si pudiera), gracias por habernos elegido, por regalarme felicidad cada día, por confiar en mi, gracias por existir porque desde que llegaste la vida es vida para mi, porque me enseñas cosas pequeñas cada día y esas son las mas importantes, te quiero con toda mi alma y te dedico cada pequeña palabra aquí escrita. Eres un regalo y espero estar a la altura porque eres tan especial que me lo pones difícil. Cada mañana cuando sale el sol pienso en ti, cada noche me duermo pensando en ti y en tu carita, en esa sensibilidad que tienes, se que ves mucho mas allá de lo que parece, atraviesas a las personas y las cosas con esos ojos vivos y esa mirada tan habladora, hasta callado dices cosas importantes. Siempre te defenderás bien en la vida y solo espero poder ayudarte y que te sientas siempre apoyado y querido por mi.

A todos a los que he recordado (Carmen, Marisa, Luisa, Puri y familia) y a los que olvidé, a todas aquellas personas que pasan como una pequeña ráfaga de viento pero siempre te enseñan algo, gracias a la vida, gracias porque esta tesis es posible en gran medida a vosotros.

I. INDICE

I. INDICE	1
II. RESUMEN	7
III. INTRODUCCIÓN.....	11
1. Exopolisacáridos bacterianos.....	13
1.1. Generalidades.....	13
1.2. Estructura y composición química de los EPSs.	15
1.3. Propiedades físicas de los EPSs.....	18
1.4. Principales funciones biológicas de los EPSs.....	19
1.5. EPSs derivados de microorganismos extremófilos.....	21
1.6. Aplicaciones biomédicas de los EPSs	23
1.6.1. Actividades biológicas de los EPSs sulfatados.	26
1.6.2. EPSs sulfatados producidos por microorganismos halófilos.	27
1.7. Caracterización del EPS B100 producido por Halomonas stenophila	28
2. Apoptosis	31
2.1. Generalidades.....	31
2.2. Caspasas.....	34
2.3. Vías de inducción de apoptosis.....	36
2.3.1. Vía extrínseca o de los receptores de muerte.	37
2.3.2. Vía intrínseca o vía mitocondrial.....	38
2.3.2.1. Formación de poros en la MME a cargo de miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2.....	39
2.3.2.2. Poro mitocondrial de permeabilidad transitoria (MPTPC) 42	
2.4. Mecanismos reguladores de la apoptosis.	50
2.4.1. Inhibidores de caspasas: IAPs y c-Flip.....	50
2.4.2. MAPKs (quinasas activadas por mitógeno) y regulación de la apoptosis.....	53
2.4.2.1. Familia JNKs.....	54
2.4.2.2. Familia p38-MAPKs	57
2.4.2.3. Familia ERKs.....	58
2.4.3. Vía de la Fosfo-Inositol-3-quinasa PI3K.....	59
2.5. Especies reactivas del oxígeno y apoptosis.....	61
2.5.1. Daños mitocondriales provocados por las ROS.....	65
2.5.2. Papel de las ROS/NOS en la vía extrínseca de apoptosis.....	66
2.5.3. Papel de las ROS en la vía intrínseca de apoptosis.....	66

2.5.4. Papel de ASKI/JNK en la apoptosis desencadenada por ROS.....	69
2.5.5. Sistemas anti-oxidantes celulares	71
2.5.5.1. El glutatión como sistema redox.....	73
IV. OBJETIVOS	77
V. MATERIALES Y MÉTODOS	81
1. Producción de los EPSs B100.....	83
2. Células y cultivos celulares.....	84
3. Reactivos y anticuerpos.....	86
4. Análisis de la activación de Bak.....	87
5. Determinación del número de células apoptóticas.....	88
6. Inmunodetección de proteínas mediante western blot.....	89
7. Determinación de la producción de anión superóxido y la caída de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	90
8. Determinación de la producción de peróxido de hidrógeno..	91
9. Cambios en el contenido intracelular de glutatión (GSH_i).....	92
10. Micro-array de genoma completo.....	92
VI. RESULTADOS	95
1. Caracterización de la vía utilizada por el EPS B100S para inducir apoptosis en células Jurkat.....	97
1.1. B100S provoca la activación de la proteína pro-apoptótica Bak en células Jurkat.....	97
1.2. La sobreexpresión de las proteínas anti-apoptóticas, Bcl-2 y Bcl-xL protege a las células Jurkat de la apoptosis inducida por B100S. ...	99
1.3. La ausencia de caspasa-9 protege a las células Jurkat de la apoptosis inducida por B100S.....	103
1.4. El EPS B100S provoca la caída del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y producción de especies reactivas del oxígeno.....	105
2. Implicación de los cambios mitocondriales producidos por el EPS B100S en la inducción de apoptosis en células Jurkat.....	107
2.1. Caracterización de la producción de ROS en la apoptosis inducida por el EPS B100S en células Jurkat.....	107
2.2. El EPS B100S provoca depleción de los niveles intracelulares de glutatión (GSH).....	109
2.3. El antioxidante N-Acetil-Cisteína protege parcialmente a las células Jurkat de la apoptosis inducida por el EPS B100S.....	111
2.4. EL antioxidante porfirina de manganeso protege completamente a las células Jurkat de la apoptosis inducida por el EPS B100S:	114

2.5. Efecto de la sobreexpresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl- χ L sobre la producción de ROS inducida por el exopolisacárido B100S.	116
2.6. El poro mitocondrial de permeabilidad transitoria no está implicado en la inducción de apoptosis llevada a cabo por el EPS B100S sobre células Jurkat	118
3. Inducción de apoptosis como respuesta al tratamiento combinado de B100S con otros quimioterapéuticos.	120
3.1. Efecto de los inhibidores de MAPK sobre la apoptosis inducida por B100S en células Jurkat.....	120
3.2. Efecto de la inhibición de la vía PI3K sobre la apoptosis inducida por B100S en células Jurkat.....	122
3.3. Efecto de la inhibición de la síntesis proteica sobre la apoptosis inducida por B100S en células Jurkat.	123
3.4. Efecto de la combinación de B100S con otros quimioterapéuticos sobre la apoptosis inducida en células leucémicas.	124
4. Efecto de tratamiento con B100S sobre linfocitos primarios.	126
4.1. Inducción de apoptosis por B100S en células leucémicas T y B primarias.....	126
4.2. Determinación de la toxicidad del EPS B100S a dosis altas sobre linfocitos de sangre periférica de donantes sanos.....	128
5. Regulación génica durante la apoptosis inducida por B100S en células Jurkat.	129
VII. DISCUSIÓN	135
VIII. CONCLUSIONES.....	157
IX. REFERENCIAS	161
X. PUBLICACIONES.....	209

II. RESUMEN

Las neoplasias de células T son un grupo de enfermedades muy heterogéneas con características epidemiológicas, moleculares y clínicas muy variables. Se trata de enfermedades muy agresivas que requieren tratamiento inmediato y en general, se caracterizan por su mal pronóstico clínico con una alta morbilidad y mortalidad. A pesar de los últimos años avances en el tratamiento de leucemias linfoblásticas agudas T (T-ALL), la supervivencia sin recaídas en los cinco años posteriores al tratamiento quimioterapéutico sigue, de momento, estrechamente ligada a la edad de los pacientes. Por tanto, es imperativo el desarrollo de nuevos quimioterapéuticos eficaces, de acción rápida y selectiva que, al mismo tiempo, sean compatibles con la supervivencia de estos pacientes.

Por otro lado, una de las principales adaptaciones de los microorganismos a los ambientes extremos es la producción de exopolisacáridos (EPSs) que les protegen de las condiciones adversas permitiéndoles colonizar este tipo de hábitats. Dada su heterogeneidad estructural, los EPS presentan numerosas propiedades físico-químicas, contando con un gran potencial de aplicación en los sectores farmacéutico y clínico. Dentro de los microorganismos extremófilos, las bacterias halófilas producen EPSs con un inusual número de grupos sulfatos en su estructura que realizan una gran contribución a su potencial biológico, posibilitando el desarrollo de nuevas drogas con diferentes propiedades, como inmuno-supresoras, inmuno-estimuladoras o antitumorales, a partir de los mismos. Debido a esta circunstancia nuestro grupo, en colaboración con el Dpto de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, analizó la actividad antitumoral de un panel de EPSs aislados a partir de bacterias halófilas pertenecientes al género *Halomonas*. El EPS B100 excretado por la especie *Halomonas stenophila* ejerce una potente inhibición del crecimiento en diversas líneas tumorales hematopoyéticas. No obstante, solo la forma químicamente sulfatada en el laboratorio es capaz de inhibir el crecimiento a través de la inducción de apoptosis, indicando que su actividad citotóxica depende del grado de sulfatación de

este EPS y resultando ser dosis-dependiente. Dicha inducción se restringe a líneas leucémicas del linaje T, sin resultar tóxico para los linfocitos T de sangre periférica de donantes sanos. Dado el gran potencial anti-tumoral de este exopolisacárido nos propusimos caracterizar la apoptosis inducida por la forma sulfatada del EPS B100 (B100S) en la línea leucémica T Jurkat. Encontramos que B100S ejerce su efecto pro-apoptótico a través de la vía intrínseca con una potente activación temprana de la proteína pro-apoptótica Bak, producción de especies reactivas del oxígeno (H_2O_2 y O_2^-), caída del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), depleción de los niveles de GSH intracelular y activación de las caspasas iniciadoras -9 y -8, así como de la caspasa-3 efectora y degradación de PARP. La sobreexpresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl_xL protege a las células Jurkat de la apoptosis, producción de ROS, caída del $\Delta\Psi_m$ y corte de caspasas inducidas por B100S. Además, en ausencia de caspasa-9, B100S no es capaz de inducir apoptosis en células Jurkat, confirmando la implicación de la vía intrínseca y la caspasa-9 como iniciadora de ruta de inducción de apoptosis activada por B100S confirmando nuestra hipótesis inicial. La utilización de antioxidantes de diversa naturaleza reveló que B100S activa esta vía de señalización mediante una potente y temprana producción de ROS, independiente de la formación del poro mitocondrial de permeabilidad transitoria, sin la cual pierde su capacidad apoptogénica. También se analizaron los efectos de la combinación de este exopolisacárido con inhibidores de cinasas que controlan las principales vías de señalización celulares, así como con otros quimioterapéuticos, pudiéndose observar una potenciación del efecto pro-apoptótico de este EPS en algunos casos, determinándose la implicación de p38-MAPK en la señalización apoptótica iniciada por el mismo y observándose que, al menos parcialmente, B100S requiere la síntesis proteica para ejercer su efecto. Finalmente, también se analizaron los cambios en la expresión génica a las 4 y 6h de tratamiento con B100S mediante un array de expresión de genoma completo.

III. INTRODUCCIÓN

1. Exopolisacáridos bacterianos

1.1. Generalidades

El término **exopolisacárido**, definido por *Sutherland en 1971*, hace referencia a todos aquellos polisacáridos que forman parte de la envuelta externa de las células microbianas, donde además de desarrollar una función estructural, protegen al microorganismo, y participan en la adhesión del mismo a diferentes tipos de superficies (*Sutherland, 1972, 1989*). Los EPSs se encuentran en la superficie externa de los microorganismos en forma de cápsulas unidas a la misma por interacciones no covalentes, formando cápsulas difusas, o, también, pueden ser excretados al medio en forma de finas capas amorfas y mucosas denominadas “Slimes”, que incluyen a todas las bacterias de una población.

Los biofilms/slimes se pueden encontrar en ambientes sólidos y acuosos, en tejidos de plantas y animales y en sistemas artificiales (filtros, calentadores, sistemas de aire acondicionado, tuberías etc). Su formación permite a estos organismos unicelulares participar de un estilo de vida multicelular temporal en el que el comportamiento en grupo facilita la supervivencia en ambientes adversos (*Geesy, 1982*).

Dentro del biofilm las poblaciones mixtas de bacterias se agrupan en torno a una **matriz extracelular**, que ellas mismas producen, y que representa entre el 50% y el 90% de la biomasa total (*Flemming and Wingender, 2010*). Esta matriz va a estar formada por: agua, polímeros extracelulares (EPS), proteínas de unión a carbohidratos, pili, flagelos, fibras adhesivas, ADN extracelular y en general múltiples derivados de la propia lisis celular, que van a actuar como un andamio tridimensional estructurando el biofilm (*Figura 1*)(*Christensen, 1989; Conrad et al., 2003; Flemming and Wingender, 2010; Gjermansen et al., 2005; Sauer et al., 2004; Zhang et al., 1998*).

Por tanto, los componentes estructurales de la matriz forman una estructura compacta y altamente hidratada que permite que las bacterias, dada su proximidad, establezcan relaciones e intercambien ADN, al mismo tiempo que las protege de la desecación, la depredación, la oxidación, la radiación, etc. (Flemming and Wingender, 2010; Koo et al., 2010). No obstante, si las condiciones del biofilm se vuelven desfavorables, los microorganismos que lo producen pueden, por un lado, dejar de sintetizar los componentes de la matriz y por otro, secretar enzimas que destruyan los componentes específicos para poder dispersarse (Gjermansen et al., 2010).

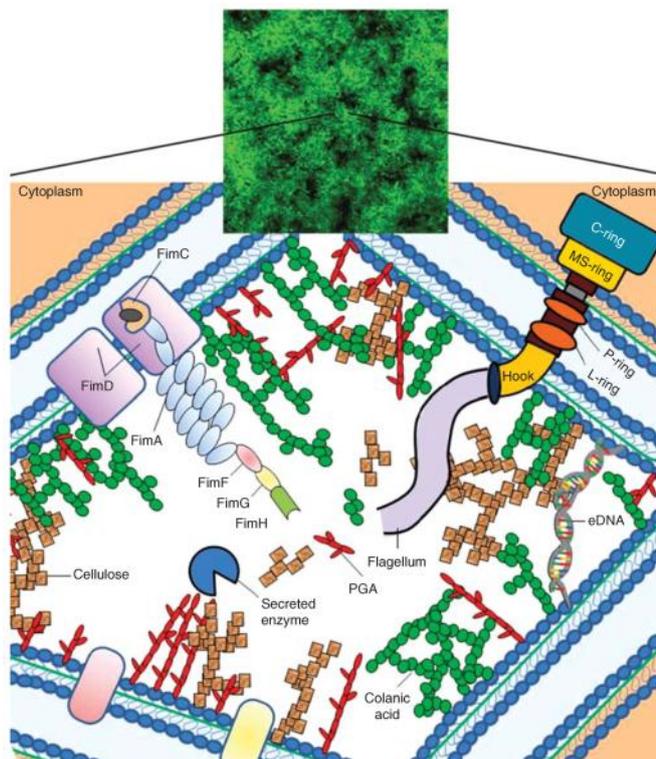


Figura 1. Representación esquemática de la composición de la matriz extracelular de *E.coli*. Se muestran los componentes estructurales como EPSs, celulosa, poliglucosamina, flagelos, pili y CUP (Chaperone Usher Pathway) (Extraído de (Kostakioti et al., 2013)).

Los componentes clave de los biofilms son los EPS. Estos van a determinar las propiedades físico-químicas y biológicas de los biofilms, así como la integridad funcional de los mismos (revisado por (Sutherland, 1990)).

Los EPS son producidos en ambientes naturales tanto por procariotas como por eucariotas. Así, se han observado en diversas especies de arqueas, bacterias, microalgas y hongos. La mayoría de las especies de microalgas producen este tipo de polisacáridos. Existe un número muy reducido de especies de hongos capaces de sintetizarlos, si bien es cierto que los pocos EPS aislados de hongos tienen un gran interés debido a sus propiedades físicas y farmacológicas. Además, los EPS son producidos por procariotas patógenos de humanos, plantas y animales, pero también por especies saprofitas (revisado por (Sutherland, 1990; Wingender et al., 1999)).

1.2. Estructura y composición química de los EPSs.

Los **EPS** son moléculas complejas, que varían en su composición. Están constituidas por unidades simples y repetitivas de azúcares, unidas mediante enlaces **glicosídicos**, que originan estructuras lineales o ramificadas. Los **hidratos de carbono** más comunes en este tipo de moléculas son D-glucosa, D-galactosa y D-manosa. También pueden presentar N-acteilaminoazúcares, aminoazúcares, azúcares neutros como L-ramnosa, L-fucosa y 6-desoxihexosas y otro tipo de carbohidratos poco comunes en los EPS, tales como L-hexosas, la forma furanosa de la glucosa y la galactosa (Sutherland, 2001).

A pesar de que algunos EPSs pueden ser neutros, la mayoría son polianiónicos debido a la presencia de **ácidos urónicos**, **piruvato** ligado en forma de cetal, **succinato**, y **residuos inorgánicos** como fosfatos y raramente sulfatos (Lindberg, 1990; Sutherland, 2001; Sutherland, 1990). Los **grupos fosfato** son comunes en los EPS producidos por bacterias GRAM⁻, mientras que los grupos **sulfatos** son sustituyentes inorgánicos específicos de polisacáridos eucarióticos, EPS de bacterias halófilas y arqueas.

Los **cationes** también forman parte de los exopolisacáridos, especialmente, de los polianiónicos. (Anton et al., 1988; Lindberg, 1990; Llamas et al., 2010; Mata et al., 2008; Nicolaus et al., 2004; Parolis et al., 1996; Quesada et al., 2004).

Mientras que los EPS sintetizados por eucariotas presentan **pentosas** en su composición, estas apenas forman parte de la composición de los EPS producidos por procariotas (De Philippis et al., 2005).

En la composición de los exopolisacáridos también se pueden encontrar **sustituyentes orgánicos**, unidos mediante enlace éster o cetal. Entre los que no contribuyen a la carga total pero sí a la conformación molecular, se encuentran los restos de acetato, propionato, glicerato, succinato y 3-hidroxibutanoato, que dotan a los polisacáridos de cierta naturaleza lipofílica muy útil de cara a posibles aplicaciones industriales (Sutherland, 2001). Por último, mencionar la presencia de **aminoácidos** (Serina, taurina, tirosina, ácido L-glutámico, etc) como sustituyentes orgánicos (Sutherland, 1994; Weon-Taek et al., 1999).

La mayoría de los EPSs, sobre todo bacterianos son **heteropolisacarídicos**, es decir, están formados por 2-5 monómeros diferentes. No obstante, también existen **homopolímeros** formados por un solo tipo de monosacárido, este sería el caso del curdlano bacteriano o del escleroglucano fúngico. Algunos de los EPSs heteropoliméricos más conocidos son: xantano, gelano, alginato, succinoglicano y el ácido hialurónico.

El Xantano, es el EPS bacteriano con mayor interés industrial hasta la fecha y es secretado únicamente por *Xanthomonas campestris* (Lilly et al., 1958).

Compuesto principalmente por glucosa, manosa, ácido glucurónico, piruvato y residuos acetilo, se utiliza como: 1) estabilizante de emulsiones para la fabricación de helados y salsas de ensaladas, 2) agente floculante, estabilizante de espumas y gelificante y 3) inhibidor de la formación de cristales, agente suspensor y viscosizante en cosméticos, productos farmacéuticos, alimentos congelados, pastillas, jarabes azucarados, pesticidas, tintas de impresora, pinturas, salsas etc (Sutherland, 1994, 1998).

Alginatos, son EPSs lineales producidos por diferentes especies de algas y bacterias. El contenido en grupos O-acetilo y en los carbohidratos es lo que determina sus propiedades físico-químicas, estructurales y funcionales (Clementi, 1997; Sutherland, 1994).

El succinoglicano, es un polímero de glucosa, galactosa, piruvato y succinato con gran interés en la industria del petróleo (Simseka and Campanellac, 2009) .

El ácido hialurónico, es un polímero lineal de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina, producido por varios tipos de bacterias (Pseudomonas, Streptococ y Azotobacter), cuya capacidad de retención de agua es tan elevada que, normalmente, se utiliza en la producción de cosméticos como agente hidratante, aunque también, tiene aplicaciones clínicas, en cirugía ocular por ejemplo (Sutherland, 1998).

1.3. Propiedades físicas de los EPSs.

La composición química, estructura primaria/secundaria y la masa molecular de los diferentes EPSs van a determinar sus propiedades **físico-químicas**, reológicas y su configuración final (Figura 2). Los enlaces de tipo (1,2)- α , (1,6)- α otorgan mayor **flexibilidad** y **solubilidad** acuosa a los EPSs que los (1,3)- α o los (1,4)- α . Así mismo, el bajo contenido en grupos acil reduce la **viscosidad**. Las estructuras secundarias van a estar influenciadas por el tipo de **sustituyentes orgánicos e inorgánicos** que presenten, al igual que las estructuras terciarias, en las que la disposición de los mismos es extremadamente importante. En la mayoría de los EPSs la conformación mas favorable es aquella en la que las fracciones cargadas se localizan en la periferia, donde pueden interaccionar fácilmente con agua e iones. Este tipo de estructuras terciarias se encuentran, sobre todo, a bajas temperaturas y en presencia de sales (Sutherland, 2001).

Por otro lado, **la acetilación** de los EPSs bacterianos impide la interacción entre las cadenas del polímero y los cationes, favoreciendo la formación de geles. No obstante, se pueden producir algunas uniones a cationes, especialmente Ca^{2+} . Cuando los alginatos se unen a cationes se producen EPSs altamente viscosos con propiedades viscoelásticas muy interesantes para la industria. Los polisacáridos acetilados son muy resistentes a las lixiviaciones que causan su destrucción (Sutherland, 2001).

A pesar de compartir estructuras primarias similares, muchos EPSs difieren en solubilidad, propiedades físicas y reológicas. Esto se debe fundamentalmente a la estructura terciaria de estas macromoléculas y a las interacciones intermoleculares (Parolis et al., 1996; Sutherland, 2001; Sutherland, 1990; Sutherland, 1994, 1998).

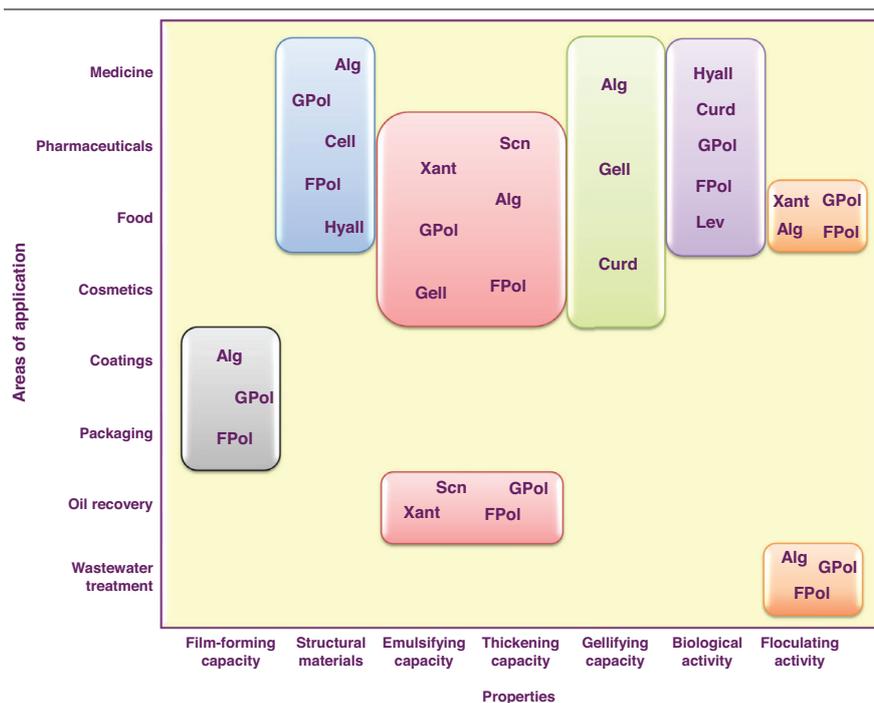


Figura 2. Correlación entre las propiedades físico-químicas de los EPSs mas utilizados industrialmente y sus aplicaciones. Abreviaturas: Alg, alginates bacterianos; Curd, curdlan (homopolímero); FPol, FucoPol; Gel, Gelano; Hyall, ácido hialurónico, GPol, GalactoPol; Lev, Levan; Scn, Succinoglicano; Xan, Xantano (Extraído de (Freitas et al., 2011)).

1.4. Principales funciones biológicas de los EPSs.

Los microorganismos invierten una gran cantidad de energía y carbono en la producción de EPSs por lo que estos han de resultarles altamente beneficiosos y han de desempeñar múltiples funciones (Chen y col., 1995a,b), entre ellas:

- Tal y como ya se comentó en el apartado de generalidades, los EPSs intervienen en la **adhesión microbiana a diferentes superficies**, donde forman biofilms para establecer un modo de vida multicelular efímero. Estas biopelículas constituyen un entorno dinámico en el que las poblaciones, de diferentes tipos de bacterias, alcanzan un estado homeostático y se organizan en función de la disponibilidad de nutrientes (Sutherland, 2001).

Así, en el cuerpo humano la mayoría de los microorganismos saprofitos se encuentran unidos a tres tipos de superficies: piel, mucosas y dientes.

- Los EPSs participan en **procesos de morfogénesis** como la formación de cuerpos fructificantes y mixosporas en los que actúan como lubricantes y adhesivos (Sutherland, 1989)

- **Protección frente a la desecación y fluctuaciones de agua, variaciones de pH, altas/bajas temperaturas y depredadores:** Los EPSs protegen a los microorganismos que se agrupan en su interior de la desecación y de las posibles fluctuaciones de agua, dado que actúan como un reservorio de la misma cuando el ambiente se vuelve desfavorable en este sentido (Robertson y Firestone, 1992; Whitfield y Valvano, 1993). También ralentizan la desecación de las bacterias de suelo y de las hifas de aquellos hongos capaces de producirlos (Evans et al., 1991; Whitfield and Valvano, 1993).

- **Protección frente agentes antimicrobianos:** los EPSs, en función de su naturaleza iónica, pueden unirse eficazmente a determinados agentes antimicrobianos inutilizándolos. Esto tiene un gran impacto a nivel clínico, sobre todo, en lo que se refiere al material quirúrgico (catéteres, juntas artificiales, válvulas cardíacas etc) ya que la formación de biofilms sobre estas superficies confiere, a las bacterias incluidas en su interior, **resistencia a determinados antibióticos** (Mah et al., 2003; Moskowitz et al., 2004). De la misma forma, los EPSs, pueden actuar como barrera frente a las células del sistema inmunitario generando resistencias frente a anticuerpos y el complemento. Este sería el caso de los encapsulados *Streptococcus pneumoniae* y *S. agalactia* (De Vuyst and Degeest, 1999; Wingender et al., 1999).

- **Protección frente a cationes metálicos tóxicos:** multitud de EPS, se utilizan actualmente en biorremediación como agentes protectores. Un buen ejemplo son determinados alginatos y gelanos, capaces de adsorber cationes tóxicos como: Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} (Geddie and Sutherland, 1993).

- **Agentes que facilitan la infección:** esta función es especialmente importante para aquellas especies de microorganismos que infectan plantas. Los EPSs viscosos alteran el suministro de agua y nutrientes solubles de la planta disminuyendo su biodisponibilidad (Kammenberg and Brewin, 1994).

- **Reserva de nutrientes y energía:** esta es una función muy poco común ya que la mayoría de los microorganismos no son capaces de catabolizar sus propios EPS (Cerning, 1990). Sin embargo, la mayoría de los nutrientes atrapados en la matriz de los EPSs/biofilms, como proteínas, pueden ser utilizados como fuente de carbono y energía, proceso extremadamente común entre los microorganismos (Wolfaardt et al., 1995).

1.5. EPSs derivados de microorganismos extremófilos.

Se denominan **extremófilos** a aquellos microorganismos que viven en ambientes donde las condiciones físico-químicas son extremas e inusuales (Horikoshi, 1995). Este tipo de ambientes son una fuente importante de bacterias, arqueas, algas y hongos con múltiples e interesantes aplicaciones en diferentes campos (Horikoshi and Grant, 1998).

Los microorganismos extremófilos han desarrollado distintas estrategias para adaptarse y colonizar este tipo de ambientes, lo que les permite compensar los efectos deletéreos de las condiciones tan adversas (altas temperaturas, altas concentraciones de sales, bajo pH, niveles elevados de radiación etc). Entre las adaptaciones, la **producción de EPSs** es una de las más comunes (Nichols et al., 2005). Los EPSs son un componente importante de los polímeros extracelulares que rodean a los microorganismos que habitan en ecosistemas antárticos, hipersalinos, manantiales geotérmicos profundos y fuentes hidrotermales, etc, dado que les proporcionan una barrera de protección muy eficiente en estos ambientes tan hostiles (Nichols et al., 2005; Nicolaus et al., 2010).

Las inusuales vías metabólicas utilizadas por algunos extremófilos suscitaron el interés por estos como productores de EPSs con características novedosas e inusuales. Así, algunos biofilms producidos por extremófilos son capaces de resistir altas presiones y/o temperaturas e incluso descender el punto de congelación del agua en las proximidades de la comunidad. Las bacterias termofílicas también han desarrollado este tipo de estrategias en ambientes terrestres (Lin et al., 2011).

A pesar de que en los últimos años se han realizado grandes avances en el estudio de las propiedades estructurales y tecnológicas de los EPSs producidos por extremófilos, estas son tan variadas y distintas a las que normalmente se encuentran en los polímeros tradicionales, que es necesario trabajar mucho mas. No obstante, los conocimientos acumulados son suficientes como para poder afirmar que tanto los microorganismos extremófilos, como los EPSs producidos por estos, tienen importantes **aplicaciones biotecnológicas** en procesos como la fermentación rápida (termófilos) o la formación de emulsiones estables realizada por los psicrófilos (m.o que viven por debajo de los 5°C).

A diferencia de lo que sucede con los mesófilos (patógenos en su mayoría), los microorganismos extremófilos proporcionan productos no patogénicos adecuados para la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética, tales como, emulsionantes, estabilizantes, gelificantes, coagulantes, anticoagulantes, espesantes, etc. Por tanto, el valor comercial de los EPSs sintetizados por microorganismos que viven en ambientes extremos es incalculable (Nicolaus et al., 2010).

1.6. Aplicaciones biomédicas de los EPSs

Como ya se ha comentado, la producción y las aplicaciones de los diferentes EPSs han sido objeto de intensas investigaciones en las últimas décadas. Algunos EPS (homo y heteropolisacáridos, neutros y polianiónicos) ya están disponibles a nivel comercialmente y otros se encuentran en fase de desarrollo.

Dado que se trata de macromoléculas biológicas estructuralmente muy heterogéneas, sus propiedades físico-químicas son muy amplias y por tanto cuentan con un gran potencial de aplicación en sectores como el **farmacéutico y la medicina**. Así, se han venido aplicando en oftalmología, biomedicina, cirugía ortopédica, ingeniería de tejidos, implantación de diversos dispositivos médicos, órganos artificiales, prótesis, odontología, reparación de huesos, liberación de fármacos, sensores para el diagnóstico, síntesis de nanopartículas y desarrollo de infinidad de fármacos (revisado por (Shih, 2010)).

En **1980**, la Farmacopea americana **USPXX** incluyó los EPS oficialmente en el campo farmacéutico (USP, 2006). Desde entonces se han venido utilizando habitualmente como elementos auxiliares en la formulación, y como materiales para el envasado y las envueltas.

Uno de los primeros **EPSs** que demostró tener aplicaciones biomédicas fue el producido por las cepas de **Staphylococcus epidermidis** y **S. Lugdunensis** cuyo glucocalix inhibía la proliferación de linfocitos activando la producción monocítica de prostaglandinas (PGE₂) (Stout et al., 1992).

Otros ejemplos se pueden encontrar en el reino Fungi. Los **EPSs** producidos por la especie **Phellinus linteus** son capaces de sensibilizar a la apoptosis inducida por doxorubicina en líneas de cáncer de próstata, inhibir el crecimiento e inducir procesos apoptogénicos en líneas de cáncer de pulmón y ejercer **efectos antitumorales** en células de cáncer de mama (Collins et al., 2006; Guo et al., 2007; Sliva et al., 2008; Zhu et al., 2007). Otros EPSs producidos por hongos están implicados en la **liberación de TNF α** , tienen **actividad insulínica** (estimulando la producción de insulina y protegiendo a las células productoras de agentes diabetogénicos), **anticlastogénica**, **antioxidante** e **inmunomoduladora**, entre otras muchas (Hwang et al., 2008; Lung and Huang, 2011; Miranda et al., 2008; Radic and Injac, 2009; Rodrigues et al., 2011).

Las algas marinas son otra fuente importante de EPSs con potenciales aplicaciones biomédicas. Por ejemplo, el EPS sulfatado Porphyran, producido por el género de rodofíceas *Phorphyra*, induce **apoptosis** en células tumorales gástricas mediante la inhibición de la vía de supervivencia PI3K/AKT (Kwon and Nam, 2007).

Como se avanzó en el apartado anterior las inusuales características de los EPSs producidos por los microorganismos extremófilos han acrecentado el interés por este tipo de expolímeros.

- *Alteromonas infernus*, un mesófilo heterotrófico que vive a grandes profundidades en la proximidades de fuentes hidrotermales localizadas al sur de la cuenca de Guayas (sur de California), produce EPSs de bajo peso molecular que, tras ser modificados y sulfatados en el laboratorio, permiten sintetizar un mimético de la heparina con bajo poder **anticoagulante**. Además, a partir de esta misma especie se han aislado EPSs que tras ser sulfatados artificialmente muestran gran **actividad angiogénica**. Estos EPSs podrían utilizarse para acelerar la cicatrización de heridas vasculares, así como, en la regeneración del tejido vascular tras procesos de isquemia, solos o junto con VEGF, dado que su leve actividad anticoagulante reduce el riesgo hemorrágico (Matou et al., 2005; Raguene et al., 1997; S. et al., 2001). Estos EPSs también inhiben la osteoclastogénesis, acelerando la diferenciación osteoblástica y ejerciendo una fuerte inhibición del proceso de formación de nódulos mineralizados regulando, así, la reabsorción ósea (Velasco et al., 2011).

- *Bacillus licheniformis* es un microorganismo termotolerante, aislado en las fuentes termales marinas localizadas en la isla de Vulcano (Italia), que produce dos tipos de exopolisacáridos EPS-1 y EPS-2. Ambos presentan actividades **antivirales e inmunomoduladoras**, bloquean la replicación del virus HSV-2 aumentando la producción de citoquinas inflamatorias, especialmente IL-2, IFN- γ TNF- α e IL-8. Este perfil de citoquinas dirige la diferenciación de los linfocitos T colaboradores dirigiendo respuestas de tipo Th1 que bloquean la replicación viral (Arena et al., 2009; Arena et al., 2006).

- Otro ejemplo de exopolisacárido con actividad inmunomoduladora lo podemos encontrar entre aquellos excretados por la bacteria termofílica *Thermus aquaticus* YT-1. TA-1 ejerce su efecto inmunomodulador a través de la activación del receptor TLR-2 (Toll-like receptor 2), presente en la membrana plasmática de macrófagos, activando la respuesta inmunitaria innata.

Dirige la producción de citoquinas, especialmente, TNF- α e IL-6 y óxido nítrico (NO), facilitando la destrucción de las bacterias mediante el conocido golpe oxidativo, y además favorece la presentación antigénica realizada por los macrófagos a los linfocitos T (R.I. adaptativa). Dado que actúa como un agonista del TLR-2 se ha sugerido que el EPS TA-1 podría utilizarse como adyuvante (Lin et al., 2011).

1.6.1. Actividades biológicas de los EPSs sulfatados.

La mayoría de los EPS que muestran actividades biológicas comparten la presencia de grupos sulfatos en su composición. De hecho, parece que la presencia de los mismos realiza una gran contribución al potencial biológico de los EPSs (Wu and Chen, 2006). Por ejemplo, en el caso de los producidos por *Alteromonas infernus* (EPS-1/2), sus formas nativas carecían de ese carácter anticogulante y actividad angiogénica, por lo que debían ser sulfatados artificialmente en el laboratorio (S. et al., 2001). Existen otros EPSs sulfatados con múltiples y potenciales aplicaciones en clínica que hacen posible el desarrollo de nuevas drogas, inmunosupresoras o inmunomestimuladoras, a partir de los mismos.

Además de todos estos efectos, los polisacáridos sulfatados tienen **actividad antitumoral, inhibiendo** los procesos de **metástasis** y **proliferación** de células tumorales, a través de su unión a factores de crecimiento y a moléculas de adhesión. Algunos de ellos pueden, además, **inducir apoptosis** y diferenciación de las células tumorales a través de mecanismos que actualmente no están bien caracterizados (Tao et al., 2006; Wu and Chen, 2006). Este tipo de EPSs pueden ser utilizados en la terapia contra el cáncer y algunas enfermedades autoinmunes, en la prevención de rechazos de órganos trasplantados, así como adyuvantes en el desarrollo de vacunas.

1.6.2. EPSs sulfatados producidos por microorganismos halófilos.

Los microorganismos halófilos son un tipo de microorganismos adaptados a ecosistemas salinos o hipersalinos, donde la radiación solar es elevada, los valores de pH son alcalinos, existen aceptores de electrones distintos al oxígeno y las temperaturas son altas. En este tipo de ambientes, los microorganismos excretan exopolisacáridos que les protegen de las condiciones adversas en las que han de desarrollarse.

Una de las principales características de los EPSs producidos por bacterias halófilas es su **alto contenido en grupos sulfato**. La sulfatación permite diferenciar a estos EPS de los producidos por los restantes procariontes, dado que, a excepción de los sintetizados por algas y arqueas como *Haloferax mediterranei* y *Haloarcula japónica*, pocas bacterias identificadas son capaces de sintetizarlos (Anton et al., 1988; Nicolaus et al., 2004; Parolis et al., 1996).

Teniendo en cuenta las importantes y distintas propiedades biológicas de los EPS sulfatados el Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, liderado por las doctoras Quesada y Bejar, ha descrito hasta 11 especies de bacterias halófilas, productoras de exopolisacáridos sulfatados, pertenecientes a la familia *Halomonadaceae*, 3 especies de la familia *Alteromonadaceae*, algunas especies pertenecientes a los géneros *Salipiger* y *Palleronia* y la cianobacteria halofílica *Aphanotece halophytica* (revisado por (Molina et al., 2012)).

1.7. Caracterización del EPS B100 producido por *Halomonas stenophila*.

Tal y como se mencionó en el apartado anterior, se han identificado, has el momento, 11 especies productoras de EPSs sulfatados de la familia ***Halomonadaceae***. La Doctora Quesada y cols han conseguido aislar y caracterizar diferentes EPSs sulfatados producidos por 8 especies de bacterias halófilas pertenecientes al género ***Halomonas*** (revisado por (Molina et al., 2012)). Los EPSs producidos por estas bacterias presentan composiciones químicas y propiedades funcionales muy distintas a las de los EPSs ya comercializados y utilizados por la industria, siendo su contenido en grupos sulfatos de especial interés (Llamas et al., 2011). Debido a esta circunstancia nuestro grupo, liderado por el Doctor Ignacio Molina, analizó la actividad antitumoral de un panel de EPSs aislados a partir de un nuevo grupo de bacterias halófilas pertenecientes al género *Halomonas*, encontrando que los EPSs excretados por 2 nuevas cepas de la especie *Halomonas stenophila* (N12^T y B100) ejercen una potente inhibición del crecimiento en algunas líneas tumorales (Ruiz-Ruiz et al., 2011).

Estas dos nuevas cepas, N12^T y B-100, fueron aisladas de los humedales salinos de El Sabinar y San Pedro del Pinatar (Murcia). Los exopolisacáridos producidos por ellas, fueron sometidos a un proceso de sulfatación química posterior a su síntesis, lo que aumentaba considerablemente su efecto anti-proliferativo. Sin embargo, mientras que el EPS N12 simplemente inhibe la proliferación celular induciendo una detención del ciclo celular, la forma sulfatada del exopolisacárido B100S induce una importante apoptosis específica de células T. Dado que ni las formas nativas de ambos polímeros, y tampoco la forma sulfatada del EPS N12 demuestran tener este efecto citotóxico, se puede afirmar que el proceso de sulfatación del EPS B100S es crítico, ya que transforma a este exopolisacárido en un compuesto bioquímicamente activo (Ruiz-Ruiz et al., 2011).

Composición química (%p/p)								
CH*	Prot	Uro	Acet	Pir	Hex	Cenizas	Sulfatos	Fosfatos
32,2	16,25	4,1	0,25	2,7	2,4	16,5	7,9	0,25
*Monosacáridos (%p/p)								
Glu	Man	Gal	Ram	Fuc	Ara	Sil	AGal	AGlc
44,5	15	40,5	ND	ND	ND	ND	ND	0 ND

Tabla 1. Composición química del EPS B100. Abreviaturas: CH (Hidratos de Carbono); Prot (proteínas); Uro (Ácidos urónicos); Acet (Grupos Acetilo); Pir (Ácido pirúvico); Hex (Hexosaminas); Glu (Glucosa); Man (Manosa); Gal (Galactosa); Ram (Ramnosa); Fuc (Fucosa); Ara (Arabinosa); Sil (Silosa); AGal (Ácido Galacturónico); AGlc (Ácido Glucurónico) (Mata et al, datos no publicados).

B100 es un exopolisacárido liofilizado altamente viscoso con un peso molecular de $3,75 \times 10^5$ Da (tabla 1). El proceso de sulfatación química aumenta la viscosidad de este, que también se eleva en presencia de sales como el NaCl, dificultando su disolución en soluciones acuosas en las que adopta una estructura ordenada en forma de doble hélice muy similar a la de EPSs como el Xantano o el Maurano que, al igual que B100, presentan *per se* grupos sulfatos en su composición (Figura 3) (Mata et al, datos no publicados) No obstante, la viscosidad detectada es termorreversible y no se ve afectada por procesos de congelación-descongelación (Ruiz-Ruiz et al., 2011). De la misma forma, la actividad anti-tumoral del exopolisacárido B100S (sulfatado) tampoco se ve afectada por su congelación-descongelación repetida (Ruiz-Ruiz et al., 2011).

Nuestro grupo analizó el efecto citotóxico de este EPS sulfatado en un amplio panel de células primarias y tumorales, observando que solo inducía apoptosis en líneas leucémicas T. El EPS, por tanto, no tenía ningún efecto en células tumorales pertenecientes a otros linajes hematopoyéticos y no hematopoyéticos (como por ejemplo líneas de cáncer de mama MCF-7 o SkBr3), y tampoco inducía toxicidad en linfocitos T aislados de los PBMCs de donantes sanos (incluso cuando estos eran tratados durante 10 días con dosis elevadas) (Ruiz-Ruiz et al., 2011)

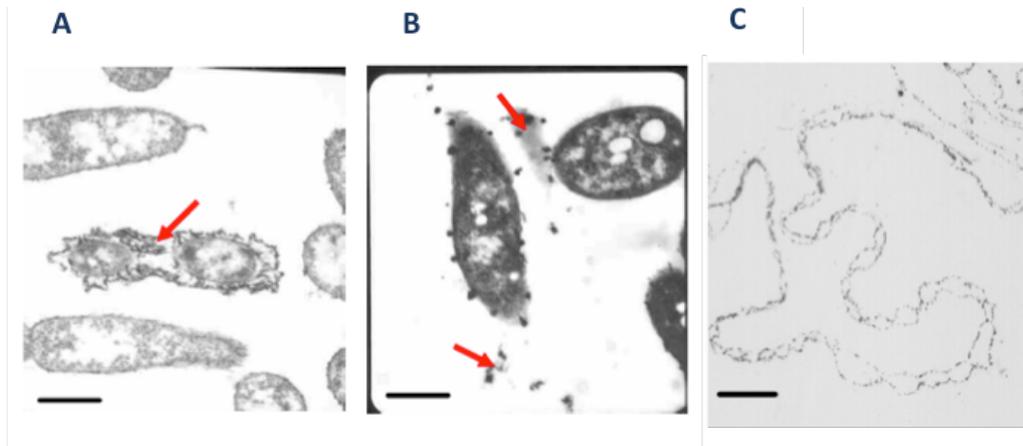


Figura 3. A y B, Microscopía electrónica de transmisión de *Halomonas stenophila* cepa B-100 en medio MY líquido al 7,5% (p/v) de sales, tras su incubación durante 18-24 (A) y 120 horas (B). Las flechas se encuentran señalando la disposición del exopolisacárido. Barra: 1 μm . . C) Microscopía electrónica de una solución acuosa, al 1% (p/v), del EPS B100 producido por *Halomonas stenophila*. Barra: 1 μm (Mata *et al*, datos no publicados).

2. Apoptosis

2.1. Generalidades.

El término apoptosis o muerte celular programada (programmed cell death, PCD) fue acuñado en 1972 por el australiano Kerr y sus colaboradores Wyllie y Currie quienes lo describieron como un fenómeno biológico, con amplias implicaciones en el desarrollo de los tejidos, caracterizado por la fragmentación del ADN genómico (Kerr et al., 1972). La apoptosis es un tipo de muerte fisiológica en la que se producen una serie de eventos, genéticamente programados y controlados, que dirigen la destrucción de la célula sin que se liberen al espacio extracelular sustancias dañinas que puedan desencadenar una reacción inflamatoria. Se trata de un proceso en el que la célula participa activamente y que se caracteriza por una reducción del volumen celular (debido a una deshidratación temprana), acompañada de la condensación, tanto del citoplasma como de la cromatina, con núcleos picnóticos y fragmentación del ADN agregado en el llamado “patrón en escalera” (en nucleosomas de 180pb o múltiplos de estos). La fragmentación del ADN es un elemento altamente distintivo, que no se observa en ninguna otra circunstancia y que permitió diferenciar células apoptóticas cuando no existían marcadores moleculares específicos. También se produce una fragmentación del retículo endoplasmático, aparato de Golgi y las redes mitocondriales con la consiguiente liberación de proteínas al citoplasma que termina por colapsar. La membrana plasmática, a pesar de que no pierde su integridad física y su permeabilidad, se ve aumentada tan solo ligeramente, forma profusiones e invaginaciones que le dan a la célula un aspecto burbujeante durante el proceso, conocido como zeiosis. Estas irregularidades membranosas dividen a la célula en los llamados cuerpos apoptóticos en cuyo interior se pueden encontrar restos de ADN y orgánulos con morfología normal o condensada (Fadok et al., 1992; Wyllie et al., 1980).

Con la finalidad de que estos cuerpos apoptóticos sean reconocidos y eliminados tiene lugar un proceso de Flip-Flop no específico del fosfolípido fosfatidilserina desde la cara citosólica de la membrana plasmática (donde se localiza normalmente) a la cara externa de la misma. De este modo, los cuerpos apoptóticos son reconocidos y fagocitados por macrófagos y células adyacentes sin que se produzca activación de la respuesta inmunitaria (revisado por (Volinsky and Kinnunen, 2013) (Figura 4).

Otras moléculas que podrían facilitar la fagocitosis de células apoptóticas son la calreticulina (a través de CD91), lipoproteínas de bajo peso molecular oxidadas (ox-LDL) que podrían ser reconocidas por receptores carroñeros como SR-A y lox1, ICAM3 (intercellular adhesion molecule-3) y algunos receptores en los macrófagos que podrían reconocer ligandos aun no identificados como lectinas y miembros de la familia de las integrinas. Además, existen sospechas fundadas acerca de la existencia de un receptor específico para la fosfatidilserina (PS). Por ultimo, la exposición de la PS podría favorecer la opsonización de la célula apoptótica por el componente iC3b del complemento, favoreciendo la captación de los cuerpos apoptóticos mediante integrinas (receptores para el complemento CR3/4) (revisado por (Faddeel et al., 2010; Taylor et al., 2008)).

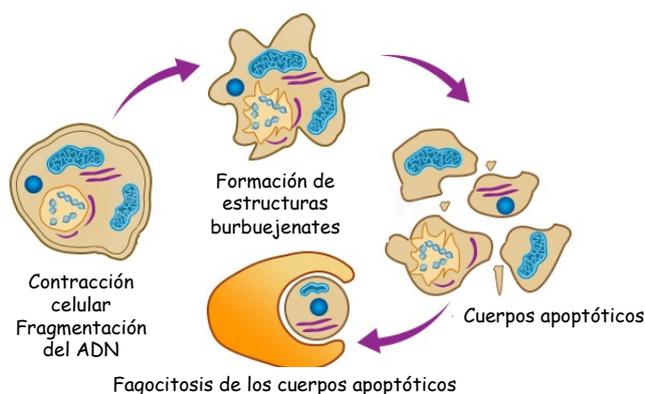


Figura 4: Cambios morfológicos sufridos por la célula durante la muerte por apoptosis.

El **proceso apoptótico** tiene un claro e importante **significado biológico** en los organismos pluricelulares, ya que mantiene el control sobre el número de células en los tejidos durante el desarrollo embrionario, así como en algunos sistemas del organismo adulto y permite eliminar células innecesarias y potencialmente peligrosas (inmunológicamente autorreactivas, infectadas o células cuyo ADN este dañado) (Reed, 1998).

Los defectos en el desarrollo de este proceso o en la regulación del mismo, tales como una apoptosis deficiente o excesiva, van acompañados de numerosas patologías. Así, un **exceso de células apoptóticas** contribuye al desarrollo de enfermedades como patologías degenerativas, hepatitis tóxica y fulminante, isquemia cardíaca, pancreatitis, tiroiditis, etc. Mientras que **defectos** en este proceso conducen al desarrollo de enfermedades autoinmunes, contribuyen a las infecciones virales y son claves en la patogénesis tumoral (revisado por (Cory et al., 2003). Los **fallos durante el proceso apoptótico** contribuyen al desarrollo de **neoplasias** y a la **carcinogénesis** de varias formas. Por un lado la vida media de la célula ya no está limitada por las divisiones celulares y es mayor. Por otro lado, esta extensión de la vida media posibilita la acumulación de mutaciones y alteraciones epigenéticas (silenciamiento epigenético de genes supresores de tumores) que le permiten escapar de la vigilancia y destrucción llevadas a cabo por el sistema inmunitario, así como del control ejercido a través de los puntos de control del ciclo celular. Por tanto, el desarrollo normal y la correcta regulación del proceso apoptótico son fundamentales a la hora de esquivar el desarrollo de un proceso tumoral y el entendimiento de dicho proceso es fundamental no solo para entender la biología del cáncer sino, también, para el desarrollo de nuevas drogas antitumorales con las que combatirlo (Reed, 1999).

2.2. Caspasas

Las CASPASAS (Caspase, Cysteine ASPartyl-specific proteASES son una familia de proteínas muy conservada a lo largo del proceso evolutivo que constituyen el núcleo central de la maquinaria apoptótica, orquestando (casi en exclusiva) el desmantelamiento de estructuras clave para la supervivencia celular. Su nombre se debe a la presencia de un residuo de Cys localizado en su sitio catalítico y a su acción, ya que cortan a sus dianas en un residuo de Asp (Wolf and Green, 1999).

Comparten una estructura similar, presentando tres dominios: un propéptido N-terminal de longitud variable, seguido por una subunidad larga (p20) y una pequeña (p10) en el extremo C-terminal, que han de separarse durante la activación (figura 5). La subunidad larga contiene el centro activo donde se encuentra el residuo Cis formando parte de un motivo conservado QACXG. Los residuos que conforman el sitio de unión para el sustrato se localizan en las subunidades grande y pequeña, aunque el sitio dominante, que determina la especificidad de sustrato, esta en la subunidad pequeña. Separando el propéptido y la subunidad grande se encuentra un lugar de corte en Asp, mientras que, la subunidad grande esta separada de la pequeña por uno o dos motivos de corte en Asp (Stennicke and Salvesen, 1998).

Las caspasas se expresan constitutivamente en el citoplasma celular en forma de **zimógenos** y su activación requiere una proteólisis secuencial: primero la subunidad grande (unida al prodominio) se separa de la pequeña, para posteriormente, también escindirase del prodominio, gracias a los lugares de corte en Asp que las separan. De este modo, se forma un heterotetrámero compuesto por dos subunidades largas unidas a dos subunidades pequeñas, en el que el centro activo, debido al proceso de reorganización, ha adquirido su conformación activa (Stennicke and Salvesen, 1998).

La presencia de Asp en los sitios de corte para la maduración evidencia la capacidad de las caspasas para autoactivarse y poder ser activadas por otras caspasas como parte de la cascada apoptótica. Atendiendo este hecho se puede decir que existen dos tipos de caspasas: caspasas iniciadoras y caspasas efectoras.

Las **caspasas iniciadoras** (caspasas -2, 8, 9 y 10): están presentes en forma de monómeros inactivos en células sanas y son las primeras en activarse tras un estímulo apoptótico. Se caracterizan por presentar prodomínos largos que pueden ser de dos tipos: dominios efectores de muerte (DED) y dominios de reclutamiento y activación de caspasas (CARD) (figura5). Ambos están estructuralmente relacionados y facilitan la interacción con proteínas adaptadoras que presenten los mismos motivos.

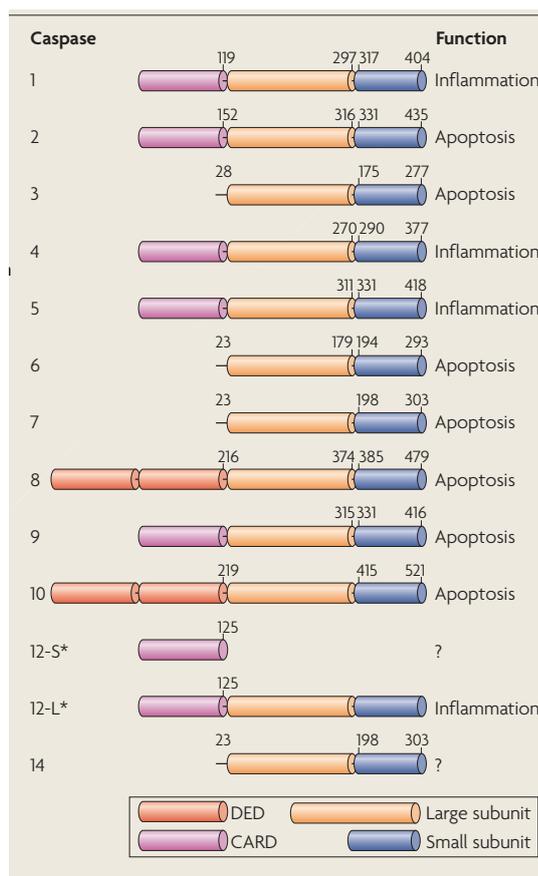


Figura 5. Representación esquemática de la estructura de las caspasas en mamíferos. En la figura se muestran los principales dominios de las caspasas así como los procesos en los que participan (apoptosis/inflamación) (Extraído de (Taylor et al., 2008)).

La activación de las caspasas apicales tiene lugar en plataformas o complejos de activación que estarán formados por ellas mismas y por proteínas adaptadoras que interaccionarán con los dominios DED o CARD de estas. De este modo se producen cambios conformacionales que provocan la oligomerización de las caspasas que, constituye la primera señal para la autoproteólisis (Boatright et al., 2003).

Las **caspasas efectoras** (caspasa -3, 6 y 7): son activadas/procesadas por las caspasas iniciadoras y se caracterizan por presentar propéptidos cortos que carecen de dominios CARD y DED. Las caspasas efectoras realizan la mayor parte de la proteólisis que tiene lugar durante la fase de demolición apoptótica y, por tanto, son las responsables de la mayoría de los cambios asociados al proceso apoptótico ya que degradan proteínas esenciales para la supervivencia celular (figuras 5 y 7)(Taylor et al., 2008).

2.3. Vías de inducción de apoptosis.

Existen dos vías principales a través de las que se puede inducir apoptosis: 1) la **vía extrínseca**, también denominada vía de los **receptores de muerte**, dado que se pone en marcha tras la unión de dichos receptores a sus ligandos correspondientes, y 2) la **vía mitocondrial**, también conocida como **vía intrínseca**, ya que se inicia principalmente en respuesta a estímulos internos tales como, daños genotóxicos irreparables, hipoxia, concentraciones extremadamente altas de calcio citosólico, stress oxidativo severo, estrés en el retículo endoplásmico, activación de oncogenes, infección viral, etc.

2.3.1. Vía extrínseca o de los receptores de muerte.

Los **receptores de muerte** (**TNFR1**, **Fas/CD95**, **TRAIL-R1**, **TRAIL-R2**, **etc**) son una serie de proteínas transmembrana que presentan homología estructural con los receptores TNF α de tipo I. Se caracterizan por tener, en el dominio C terminal de su porción intracitoplasmática, una secuencia de 80 kDa conocida como dominio de muerte (**DD**), capaz de activar la maquinaria apoptótica de la célula (Tartaglia et al., 1993) (Figura 6).

Los **ligandos de muerte** son proteínas transmembrana de tipo II también pertenecientes a la superfamilia del TNF. A pesar de que existen más de 19 ligandos, los más destacados son: **TNF** (tumor necrosis factor), **FasL/CD95L**, **TRAIL/APO2L** (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand). Los ligandos se unen a sus receptores a través del dominio de homología a TNF (**THD**, TNF homology domain) que se asocia a los dominios extracelulares **CRDs** de los receptores provocando su trimerización y el reclutamiento de **proteínas adaptadoras**, como FADD (Banner et al., 1993) (revisado por (Bodmer et al., 2002)). Estas proteínas cuentan con dominios **DD** homólogos a los del receptor y, a través de dominios **DED**, van a reclutar a las caspasas iniciadoras -8 y/o -10, formándose un complejo denominado Death induction signal complex, DISC donde se activarán dichas caspasas (figura 6). (Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996) (revisado por (Aggarwal, 2003; Bodmer et al., 2002; Croft, 2009)).

Existe, también un segundo tipo de receptores, conocidos como **receptores “señuelo”** (Decoy receptors) que carecen de dominios de señalización intracelular y que, por tanto, no pueden transmitir la señal apoptótica. Dichos receptores compiten por los ligandos de muerte modulando, así, la vía extrínseca (Figura 8). Algunos de ellos se producen mediante splicing alternativo del ARNm del receptor activo, mientras que otros son el producto de genes distintos (Gruss and Dower, 1995).

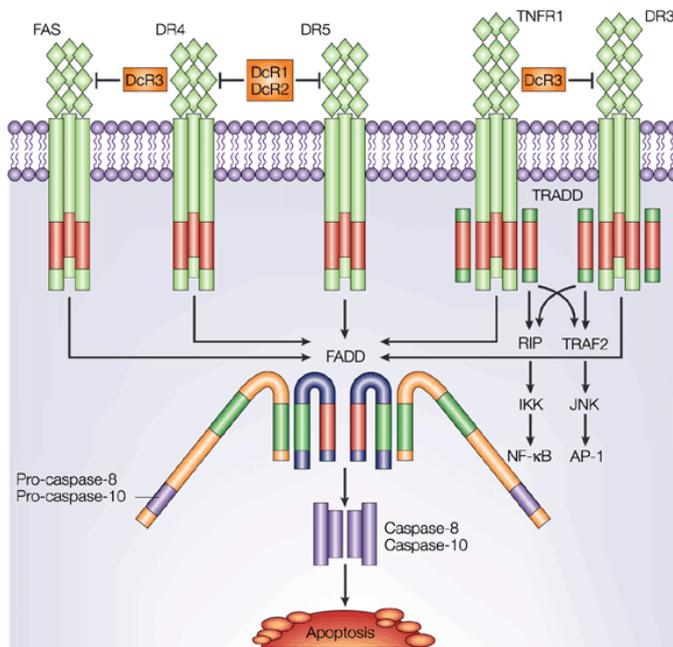


Figura 6. Vía extrínseca o de los receptores de muerte: Tras la unión de FASL, APO2L/TRAIL o TNF a los receptores de muerte FAS, DR4, DR5, DR3 o TNFR1 se forma el complejo inductor de muerte (DISC) en el que van a participar: la proteína adaptadora FADD y, en el caso del TNFR1 un segundo adaptador (TRADD), que a través de sus DD van reclutar y activar a las caspasas -8 y -10, desencadenando el proceso apoptótico. Los receptores señuelo/decoy (DcR) compiten, por el ligando, con aquellos que si pueden transducir la señal inhibiendo su función y el

proceso apoptótico. Dominios de muerte (rojo), dominios efectores de muerte (azul), dominios de las caspasas (verde) y receptores señuelo (naranja) (Ashkenazi, 2002).

2.3.2. Vía intrínseca o vía mitocondrial.

Se denomina así dada la importancia que adquiere la mitocondria en el desarrollo del proceso apoptótico. Se trata, probablemente de la ruta apoptótica mas común tanto a nivel fisiológico como patológico (revisado por (Hotchkiss et al., 2009)).

Se dispara en respuesta a daños en el ADN (agentes genotóxicos, radiación ionizante y UV, etc) y estrés celular interno (estrés oxidativo, hipoxia, retirada de factores de crecimiento, etc) Las vías de señalización activadas por este tipo de estímulos causan una permeabilización de la membrana mitocondrial externa (**MOMP**, mitochondrial outer membrane permeabilization), un punto de no retorno que conduce a la célula hacia una apoptosis inminente que, en este caso, va a ir acompañada de una caída del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), y que va a ser orquestada mediante tres mecanismos:

1) liberación de proteínas mitocondriales activadoras de caspasas, 2) liberación de moléculas involucradas en la muerte celular programada independiente de caspasas, como AIF, y 3) pérdida de funciones mitocondriales esenciales para la supervivencia celular (Green and Kroemer, 2004).

La activación de la caspasa -9 se produce en el apoptosoma, una estructura formada tras la activación de la vía intrínseca de apoptosis. La activación de esta vía conduce a la liberación de citocromo c mitocondrial, que se une al adaptador APAF-1. APAF-1 recluta a la caspasa 9 a través de los dominios CARD, que comparten ambos, formándose el apoptosoma donde, en presencia de ATP, se activará dicha caspasa (Zou et al., 1999).

Actualmente, se contemplan dos mecanismos generales para explicar la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MEM). El primero involucra tanto a esta como a la membrana mitocondrial interna (MMI), mientras que el segundo, solo implica a la MME. La puesta en marcha de uno u otro dependerá del contexto, del estímulo y/o del tipo celular (Hotchkiss et al., 2009).

2.3.2.1. Formación de poros en la MME a cargo de miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2.

La familia de proteínas Bcl-2 controla la apoptosis, vía mitocondria, a través de un intrincado y fuertemente regulado sistema de interacciones entre sus miembros. Esta familia de proteínas incluye miembros con actividad anti-apoptótica y pro-apoptótica que bloquean o promueven, respectivamente, la permeabilización de la MME (MOMP) (revisado por (Moldoveanu et al., 2014)). En base a su actividad apoptótica y sus dominios de homología conservados (Bcl-2 Homology, BH), se pueden clasificar en tres grupos: **Anti-apoptóticos, efectores (pro-apoptóticos) y activadores directos (BH3-Only)** (Figura 7) (Renault and Chipuk, 2014).

Clase I, miembros anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, A1/Bfl-1, y Mcl-1): todas las proteínas pertenecientes a esta clase van a utilizar sus dominios de homología a Bcl2, BH1-BH4, para interactuar con proteínas unidas a la cara citosólica de las membranas celulares. Los dominios BH1-BH3 forman un **surco hidrofóbico**, constituido por cinco α -hélices anfipáticas rodeando dos α -hélices hidrofóbicas centrales, en el que el extremo C-terminal de la hélice α_8 actúa de caperuza (Figura 7). Este bolsillo es conocido como “surco BC”, debido a que puede unir la α -hélice del dominio BH3 de proteínas pro-apoptóticas de la misma familia (revisado por (Moldoveanu et al., 2014)).

Clase II, efectores pro-apoptóticos: Dentro de este grupo se encuentran, por un lado, Bax y Bak expresados en la mayoría de los tejidos, y por otro, Bok/Mtd cuya expresión se encuentra restringida, casi por completo, al tejido reproductivo. Se trata de proteínas multidominio capaces de formar oligómeros, en respuesta a diversos estímulos apoptóticos, que perturban la estructura lipídica normal de la MME desestabilizándola. De esta forma constituyen largos **poros lipídicos responsables de la MOMP** y, por tanto, de la liberación de factores pro-apoptóticos. Por ello son también conocidos como efectores, y en ausencia de ambos la célula es incapaz de disparar procesos apoptóticos frente a diversos estímulos (figura 7) (Wei et al., 2001).

Clase III, activadores directos (BH3-Only), dentro de este grupo se encuentran proteínas que tan solo contienen un dominio de homología Bcl2, tales como: Bad, Bim/Bod, Bid, Bmf, Bik/Nbk, Noxa, Puma/Bbc3, Blk, Hrk/DP5, Nip3 y BNip3. A través de su dominio BH3, estas proteínas interactúan, por un lado, directamente con proteínas pro-apoptóticas multidominio, como Bax y Bak, estimulando su actividad, y por otro, con los miembros anti-apoptóticos inhibiendo su función. Por ello, se les conoce como sensibilizadores/activadores.

Algunos de ellos, como **Bid**, **Puma** y **Bim**, comparten características estructurales comunes tanto con los miembros anti-apoptóticos como con los efectores pro-apoptóticos de esta familia lo que les permite interactuar con ambos (figura 7) (revisado por (Moldoveanu et al., 2014)).

Existen diferentes modelos para explicar como las proteínas BH3-Only llevan a cabo la activación de los efectores Bax y Bak: 1) *Modelo activador*, según el cual las proteínas BH3-Only transmitirían el estímulo apoptótico uniéndose directamente a Bax y Bak provocando un cambio estructural y su activación; y 2) *Modelo depressor*, en el que los miembros BH3-Only interactuarían con los miembros anti-apoptóticos como Bcl-2 o Bcl-xL permitiendo que estos liberen a Bax y Bak. (revisado por (Lomonosova and Chinnadurai, 2008)).

Aunque los detalles iniciales de la activación de los efectores pueden diferir, Bak y Bax posteriormente presentan un mecanismo de activación común que requiere la formación de un dímero simétrico esencial para la oligomerización y la formación del multímero que desestabilizaría la MME formando poros lipídicos en la misma que provocarían la MOMP (Dewson and Kluck, 2009; Dewson et al., 2009).

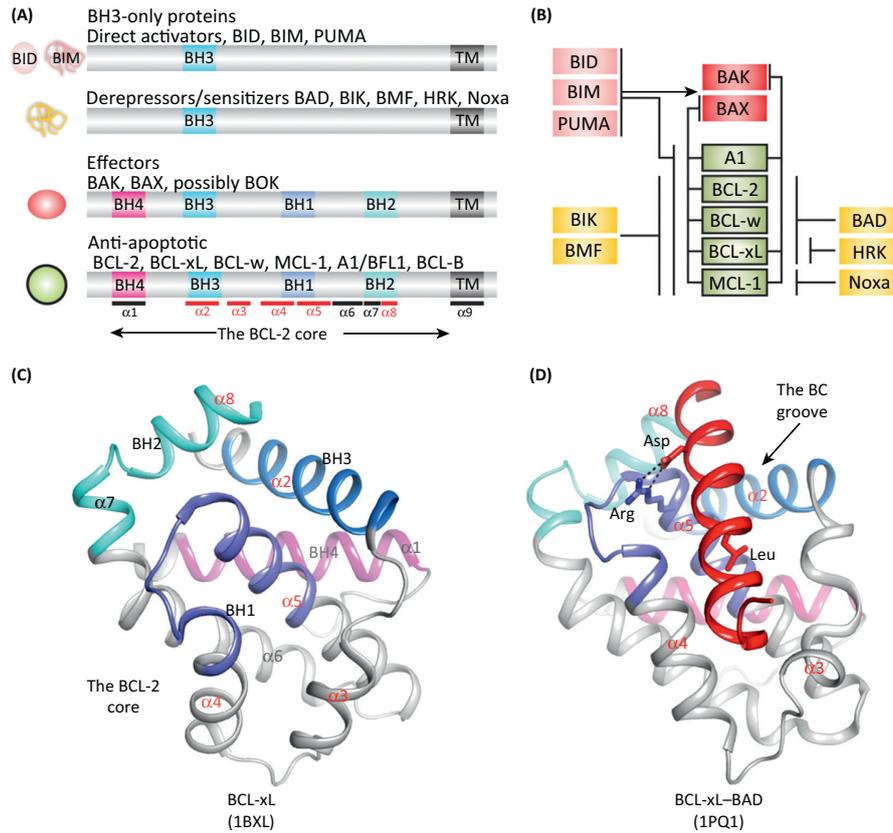


Figura 7. Estructura, función e interacciones de las proteínas de la familia Bcl-2: A) Representación esquemática de los miembros de esta familia, donde se detalla el corazón Bcl2 formado por los cuatro dominios de homología (BH) y de unión a la membrana mitocondrial (TM, hélice $\alpha 9$). Los dibujos situados a la izquierda hacen referencia a la estructura globular (redondos) o intrínsecamente desordenada de estos miembros. La posición aproximada de las hélices también está marcada y las que forman parte del bolsillo hidrófobo BC se ven en rojo en la parte inferior. B) Representación esquemática de las interacciones establecidas entre los distintos miembros de la familia Bcl-2 coloreados igual que en la figura A. C) Estructura del corazón Bcl-2 del miembro anti-apoptótico Bcl-xL. D) Representación de la pareja formada por Bcl-xL y Bad, destacando la unión del dominio BH3 de la segunda al surco BC de la primera. También se muestran las cadenas laterales de Leu y Asp, conservadas en el dominio BH3 de Bad, llevando a cabo las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas (respectivamente) con los sitios complementarios en el corazón Bcl-2 de Bcl-xL (extraído de (Moldoveanu et al., 2014)).

2.3.2.2. Poro mitocondrial de permeabilidad transitoria (MPTPC)

El segundo mecanismo implicado en la permeabilización de la MME se basa en la formación de un poro, un canal inespecífico, en la membrana mitocondrial que supone un punto de encuentro entre las membranas mitocondriales interna y externa.

Dicho canal, denominado poro mitocondrial de permeabilidad transitoria (**MPTPC**, mitochondrial permeability transition pore complex), al ser permeable a solutos que no superen 1,5kDa, permite la salida de protones y, por tanto, rompe el desequilibrio natural de H^+ establecido a lo largo de la **MMI**, inhibiendo, así, la síntesis de ATP, provocando la caída del potencial de membrana mitocondrial (**MMP**) y la liberación de citocromo c a través de este poro. Al mismo tiempo, permite una entrada masiva de agua a la matriz mitocondrial que provoca la ruptura de la MME con la consiguiente liberación del contenido mitocondrial en el citoplasma, incluyendo factores proapoptóticos que desencadenarán la activación de la caspasa iniciadora -9 (Rasola and Bernardi, 2007; Szabo and Zoratti, 1993).

La apertura del MPTPC está regulada positivamente por aumentos en el flujo de Ca_2^+ y producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), y negativamente por los nucleótidos de adenina y el aumento de grupos fosfato (Pi). Además, es sensible a las variaciones de pH.

La composición del MPTPC, así como su naturaleza permanente o transitoria son aun cuestiones controvertidas. El modelo hipotético clásico, que ya se ha avanzado, establece que sus componentes principales son: el canal aniónico mitocondrial dependiente de voltaje (**VDAC**) como componente de la MME, el transportador de nucleótidos de adenina (**ANT**) como componente de la MMI y la ciclofilina D (**Cyp-D**) como componente de la matriz. Sin embargo, estudios genéticos recientes revelan que VDAC no forma parte del mismo y ANT cumple una función reguladora (Figura 8) (Baines, 2009; Forte and Bernardi, 2005; Szabo et al., 1993; Szabo and Zoratti, 1993). Según el modelo propuesto por Giorgio y cols, en un estado fisiológico el MPTPC estaría abierto y la CyPD enmascararía un lugar crítico para la unión de grupos de fosfato (Pi) y para el estado de apertura/cierre del poro. La adición de ciclosporina A, el mayor desensibilizador del MPTPC y el mejor descrito, desplazaría a la CyPD desenmascarando el sitio de unión para el Pi.

Si la concentración de fosfatos es lo suficientemente elevada estos se unirán al sitio regulador y el MPTPC se cerrará, en una reacción fácilmente reversible si la concentración de Pi disminuye (Giorgio et al., 2010).



Figura 8. Regulación del estado del MPTPC. Se esquematiza el MPTPC, con la ciclofilina D como único componente del poro, y la regulación que la ciclosporina ejerce sobre la apertura del mismo (adaptado de (Giorgio et al., 2010)).

Modelos propuestos para explicar la permeabilización de la MME

Las discrepancias acerca de la composición y regulación del MPTPC han llevado a proponer diferentes modelos que respudiesen a las debilidades del clásico planteado por Szabo y Zoratti (Suh et al., 2013; Szabo et al., 1993). En el modelo inicial VDAC es un componente del MPTPC que permite la liberación de citocromo c a través de la hinchazón mitocondrial. En el segundo modelo, VDAC se perfila como un canal independiente, que se forma por homo-oligomerización o mediante hetero-oligomerización con Bax y Bak. En este caso VDAC tendría una función pro-apoptótica ya que despolarizaría la membrana mitocondrial mediante la pérdida de H^+ , permitiendo la liberación de citocromo c mediante los canales que forma con Bax y Bak, sin que se llegue a producirse hinchazón y rotura mitocondriales. Sin embargo, dado que existen algunos sistemas en los que la liberación de citocromo c precede a la pérdida del $\Delta\Psi_m$ o incluso este no llega a caer hasta las etapas finales del proceso apoptótico, y teniendo en cuenta que las células VDAC^{-/-} presentan mayor sensibilidad a determinados estímulos apoptóticos McCommins y cols proponen un tercer modelo donde VDAC desempeñaría un papel anti-apoptótico (McCommins and Baines, 2012; Shimizu et al., 2000; Szabo and Zoratti, 1993).

Actualmente el modelo desarrollado por McCommis y Baines, aunque incompleto, es el que mejor se ajusta al paradigma del MPTPC (Figura 9).

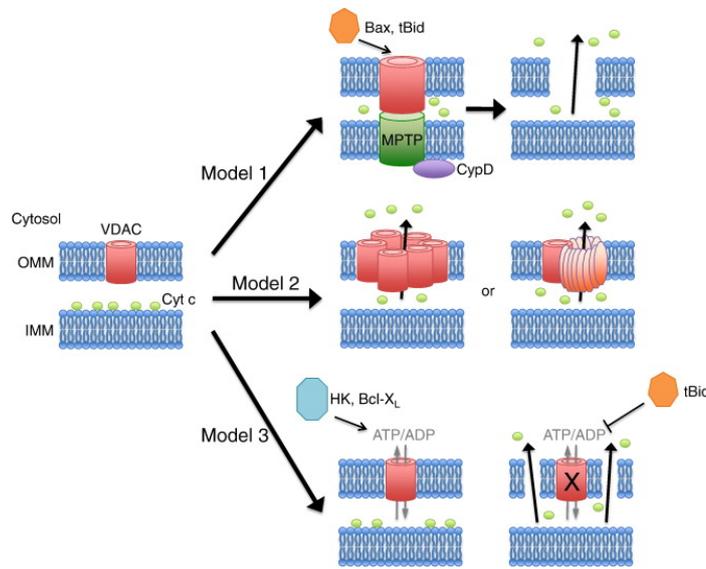


Figura 9. Modelos sobre la estructura y funcionamiento del poro mitocondrial de permeabilidad transitoria o MPTPC: 1) Modelo propuesto por Szabo y Zoratti y cols en el que VDAC, ANT y la ciclofilina D se consideran componentes esenciales del MPTPC. 2) Modelo propuesto Shimizu donde VDAC es independiente del MPTPC y colabora con Bax y Bak; 3) modelos propuesto por McCommis y Baines, en el que VDAC no forma parte del MPTPC

y protegé de la liberación de citocromo en condiciones fisiológicas. Fisiológicamente la conductividad de VDAC es baja, permitiendo un intercambio de ATP/ADP, a través de la MME, que permite mantener el $\Delta\Psi_m$ y el funcionamiento normal de la ETC. Así, la **hexokinasa citosólica HKII** compete con **Bcl-X_L** por unirse al VDAC. Tras el estímulo apoptótico Bcl-X_L desplaza a HKII y ocupa su lugar liberando al efector pro-apoptótico Bax. Bax, además de abrir poros en la MME, desplazaría a Bcl-X_L de su unión con VDAC y éste se cerraría con la colaboración de Bidt. Los metabolitos se acumularían en el IMS impidiendo la respiración normal, provocando una caída del $\Delta\Psi_m$ y su posterior caída y liberando citocromo c (McCommis and Baines, 2012). Sin embargo, este modelo sigue sin explicar cómo se produce la permeabilización de la MME y una liberación específica de citocromo c y no de otros factores pro-apoptóticos. (Extraído de (McCommis and Baines, 2012).

2.3.2.3. Progresión del proceso apoptótico tras la permeabilización de la MME.

Independientemente del mecanismo que utilice la maquinaria celular para permeabilizar la MME, tras este evento se van a liberar al citosol proteínas del espacio intermembranoso que actuarán como factores pro-apoptóticos desencadenando el desmantelamiento celular. Además, como consecuencia de la caída del potencial de membrana mitocondrial se producirá un desequilibrio importante en la cadena de transporte electrónico que conducirá a un déficit de ATP y en último término a la muerte celular.

En primer lugar se produce una **liberación de factores pro-apoptóticos**: tales como: AIF, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, endonucleasa G y citocromo c, que provocarán la activación de caspasas y nucleasas, además, de neutralizar la acción de determinados inhibidores de la apoptosis. Además, la permeabilización de la MME conduce a un **desacoplamiento de la cadena de transporte electrónico (ETC, electric transport chance)** que, a su vez, desemboca en una caída de la fosforilación oxidativa y por tanto a un descenso en la producción de ATP.

Las mitocondrias son orgánulos especializados en la conversión de energía oxidativa en energía química. La **fuerza protomotriz**, generada por la cesión de electrones entre los complejos de la ETC será utilizada, finalmente, por la ATP sintetasa (complejo V) para sintetizar ATP en un proceso conocido como **fosforilación oxidativa** (Mitchell, 1966, 1972). La permeabilización de la MME (evento temprano y crucial en la vía intrínseca) está asociada a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y, dado que este es un componente de la fuerza protomotriz, al descenso de la fosforilación oxidativa. Por tanto, la MOMP provoca el **desacoplamiento** de la **fosforilación oxidativa** y la oxidación de sustratos, que es una de las principales características del **proceso apoptótico**. La pérdida total del $\Delta\Psi_m$ tiene lugar en las fases finales de la apoptosis, dado que este proceso requiere energía, aquellas células apoptóticas que sufren una dramática disminución de sus niveles de ATP terminan muriendo por necrosis (Bossy-Wetzell et al., 1998; Eguchi et al., 1997).

Dependiendo del tipo celular y del estímulo apoptótico la pérdida del $\Delta\Psi_m$ puede ser necesaria para la evolución de la apoptosis o simplemente puede producirse como consecuencia de la misma por lo que algunos autores piensan que tan solo amplifica el proceso apoptótico (revisado por (Ly et al., 2003)).

Participación de las caspasas en la caída del $\Delta\Psi_m$: el papel que juegan las **caspasas** en el **desacoplamiento de la ETC** también es controvertido. El modelo que mejor explica estas discrepancias establece que la pérdida de potencial ($\Delta\Psi_m$) tiene lugar en dos pasos: una **despolarización parcial temprana** e independiente de caspasas y una **despolarización tardía** que dependería de estas (Marzo et al., 2001). Este modelo viene avalado por múltiples trabajos (Larochette et al., 1999; Pardo et al., 2001; Ricci et al., 2004).

Caída del $\Delta\Psi_m$ y liberación de citocromo c la disociación del citocromo c de la cardiolipina impide que el complejo III (citocromob-c1/citocromo c oxidasa) de la ETC pueda aceptar electrones contribuyendo a la **despolarización de la membrana mitocondrial** y la **apoptosis** vía intrínseca (Garcia-Ruiz et al., 1997; Green and Reed, 1998; Scaife, 1966; Sun et al., 2010). Muchas evidencias indican que la liberación de citocromo c, y no la caída del $\Delta\Psi_m$, es el paso clave que compromete a la célula a morir por apoptosis (revisado por (Huttemann et al., 2011)). Dado que el proceso apoptótico requiere ATP, y el citocromo c es esencial para su síntesis, aquellas células que dispongan de citocromo c en exceso serán capaces de morir por apoptosis ya que, pese a su liberación, dispondrán de una cantidad suficiente, unida a la ETC, como para soportar la producción de ATP necesaria en la fase de demolición. Mientras que, aquellas cuya expresión inhibidores de caspasas sea alta no podrán liberar suficiente citocromo c sin que la pérdida de ATP sea tan grave como para sucumbir por necrosis (Green and Reed, 1998).

3) Alteración del potencial de oxido-reducción celular.

Esta alteración es una consecuencia de la permeabilización mitocondrial y del desacoplamiento de la cadena de transporte electrónico.

A pesar de que durante la respiración normal apenas se producen ROS, las células pueden responder al aumento de las concentraciones endógenas/exógenas de estos aumentando su propia producción de ROS, en un fenómeno conocido como **RIRR (ROS-induced ROS release)** (Zorov et al., 2000). La fase RIRR puede deberse a la apertura del **MPTPC** (provocada por el aumento de ROS) (Zorov et al., 2000), o a la apertura canal aniónico de la membrana mitocondrial interna (**IMAC**, Inner Mitochondrial Membrane Anion Channel) (Aon et al., 2003; Brady et al., 2004; Cortassa et al., 2004). Independientemente de cual sea el tipo de canal responsable de la permeabilización, la apertura del mismo provoca un aumento del potencial transmembrana que dirige la producción de ROS, a través del transporte reverso de electrones, en los complejos I y III de la ETC.

Por otro lado, la **liberación de citocromo c** al citosol provoca un aumento de la producción de ROS (en los complejos I y III) y la pérdida de las funciones antioxidantes que realiza en la MMI, donde elimina electrones desapareados que podrían formar O_2^- , y actúa como un importante scavenger de H_2O_2 (Basova et al., 2007; Kushnareva et al., 2002). Actualmente, el modelo más aceptado para explicar la producción de ROS, en células sanas y estresadas, debida a la liberación de citocromo c es el propuesto por Hüttemann y cols en 2011 (**figura 10**) (revisado por (Hüttemann et al., 2011)).

Esta producción de ROS, debida a todos los cambios mitocondriales ya descritos, provoca una mayor permeabilización de la MME y además daña componentes celulares básicos para la supervivencia como, el ADN nuclear y mitocondrial, las membranas celulares y numerosas proteínas.

El papel de las ROS en el proceso apoptótico también es controvertido, así como, su cinética respecto a la de los acontecimientos mitocondriales, la necesidad de su participación en la amplificación del proceso etc. Seguramente su relevancia dependerá del sistema: tipo celular y estímulo apoptótico. Su papel como desencadenantes del proceso apoptótico se revisará mas adelante.

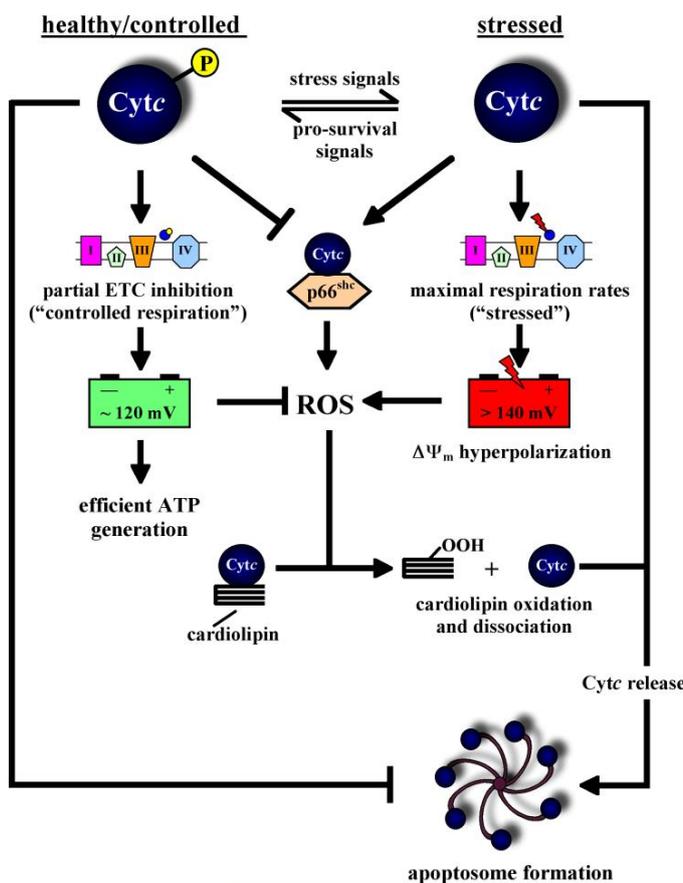


Figura 10. Regulación de la respiración mitocondrial, la producción de ROS y el proceso apoptogénico mediante la fosforilación del citocromo c: El citocromo c en su estado fosforilado controla la respiración previniendo la producción de ROS, mientras que, la desfosforilación del mismo en respuesta al estrés celular, impide que pueda ejercer dicho control elevándose la producción de ROS. Normalmente, las vías de señalización celulares

mantienen el potencial de membrana $\Delta\Psi_m$ bajo (80 y 140mV) sin que se generen cantidades significativas de ROS pero permitiendo la producción de ATP . El estrés celular promueve una excesiva liberación de Ca^{2+} y la activación de fosfatasas, y ambos a su vez provocan la desfosforilación de numerosas proteínas mitocondriales, incluido el citocromo c. Los ratios de transferencia electrónica aumentarían hasta un nivel máximo provocando, a su vez, el aumento del $\Delta\Psi_m$ y la producción de ROS que dañarían gravemente a los componentes esenciales de la célula, contribuyendo al proceso apoptótico. Además, su liberación permite la formación del apoptosoma, con activación de caspasa-9 y caspasas efectoras (extraído de (Huttemann et al., 2011)).

2.4. Mecanismos reguladores de la apoptosis.

La muerte celular programada esta sometida a una regulación fuerte y específica que se establece a través de proteínas que inhiben la señalización del proceso apoptogénico, o mediante la activación de rutas de supervivencia que impiden la apoptosis espontánea o accidental. En esta regulación es fundamental el balance entre receptores señuelo, receptores pro- y anti-apoptóticos, y los miembros de la familia Bcl-2. No obstante, existen otros mecanismos relevantes para la regulación del proceso apoptogénico que se resumen a continuación.

2.4.1. Inhibidores de caspasas: IAPs y c-Flip.

Las caspasas están sometidas a diversos tipos de regulación transcripcional y postraduccional: fosforilación, nitrosilación, sulfatación, etc (Earnshaw *et al.*, 1999), degradación en el proteosoma (Huang *et al.*, 2000), compartimentalización etc, todos ellos procesos que regulan tanto su expresión como su actividad. Pero además, la activación de las caspasas puede inhibirse mediante su interacción con las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) y la proteína inhibidora de FLICE (c-FLIP).

Proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs): (XIAP, X-linked inhibitor of apoptosis; c-IAP1; c-IAP2; ML-XIAP; NAIP, IAP neuronal; Bruce y Survivina), se trata de un grupo de proteínas estructural y funcionalmente similares que regulan la apoptosis, citoquinesis, migración celular y transducción de señales (Oberoi-Khanuja *et al.*, 2013). Esta familia de proteínas, conservada a lo largo del proceso evolutivo, fue identificada por primera vez en baculovirus por su capacidad para impedir la activación de caspasas en la célula infectada (Clem *et al.*, 1991). Las IAPs son las únicas proteínas endógenas capaces de regular la actividad de las caspasas iniciadoras y efectoras (figura 11)(revisado por (Dubrez *et al.*, 2013)).

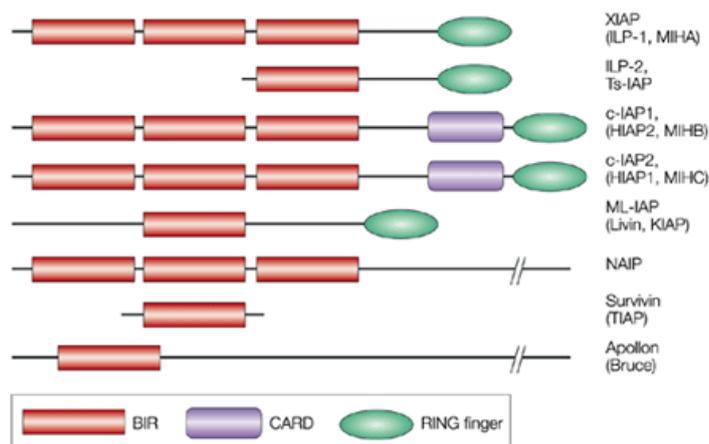


Figura 11. Familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) en mamíferos: los nombres alternativos se muestran en paréntesis. Xiap es el miembro más caracterizado y conocido. Los dominios BIR (en rojo) se unen al centro activo de las caspasas inhibiéndolas antes de acceder a su sustrato, los dominios RING (en verde) actúan como ubiquitín ligasas

induciendo la autodegradación de la propia proteína IAP y de la caspasa unida a ella. Además, las proteínas c-IAP y c-IAP2 cuentan con **dominios CARD**, para el reclutamiento de caspasas, que permiten regular la degradación de las mismas mediante su interacción a través de estos (texto revisado por (Dubrez et al., 2013)) (figura extraída de (Salvesen and Duckett, 2002)).

Las proteínas inactivadoras de la apoptosis participan en las principales vías de inducción de apoptosis. En el vía extrínseca, bloquean a las caspasas efectoras -3 y -7, deteniendo, así, la casacada apoptótica iniciada por la caspasa-8. En la vía intrínseca actuan a tres niveles: 1) interaccionan directamente con la caspasa-9, a través de sus dominios BIR, impidiendo su procesamiento en el apoptosoma; 2) mediante sus dominios CARD compiten con la caspasa-9 por su unión a Apaf-1; y 3) a través de sus dominios RING inhiben directamente a las caspasas activadas. Además, llevan a cabo una regulación no canónica de la vía de NF_κB (Gyrd-Hansen et al., 2008) (figura11 y 12).

c-FLIP (Flice Inhibitori Protein): se trata de una proteína que inhibe la activación de las caspasas-8 y -10 implicadas en la apoptosis mediada por receptores de muerte. Esta proteína, que se identificó por primera vez en γ -herpesvirus y baculovirus (Thome et al., 1997), presenta diferentes isoformas aunque solo se detectan dos a nivel proteico: **FLIP largo** de 55 kDa (**FLIP_L**) y **FLIP corto** (**FLIP_S**) de 26 kDa (Hu et al., 1997) (figura12).

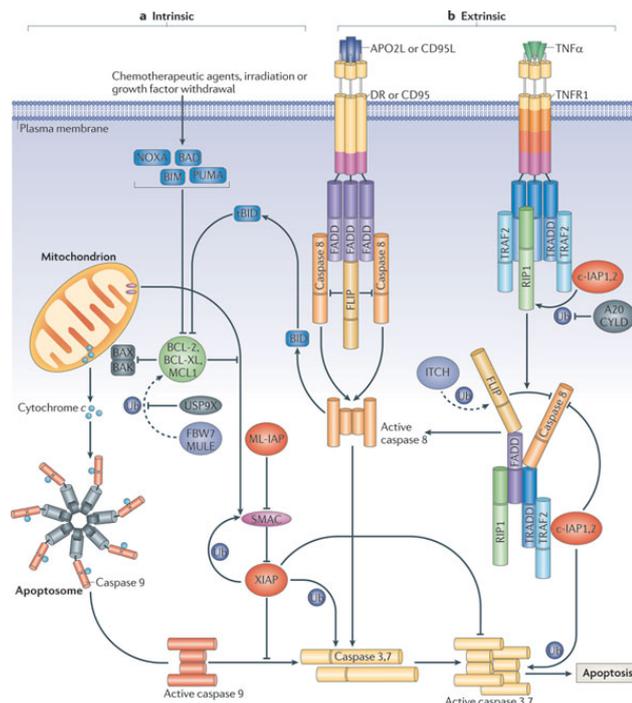


Figura 12. Inhibición de la activación de caspasas llevada a cabo por las IAPs y FLIP : los IAPs regulan la activación de caspasas. c-IPA1/2 ubiquitinan a las caspasas -3 y -7 y al adaptador de muerte RIP1 impidiendo la activación de la caspasa -8. XIAP también inhibe a las caspasas- 3 y -7 y a la caspasa-9. Xiap es inhibido por Smac/Diablo, al mismo tiempo Xiap junto con la survivina y ML-IAP, inhiben a Smac/Diablo favoreciendo la supervivencia. Xiap también compite con la caspasa-9 por su unión a Apaf-1 a través de sus dominios CARD. FLIP_S al presentar dos dominios DED muy similares a los de las caspasas-8 y -10, compite con ellas por su union al DISC (Scaffidi et al., 1999). Mientras

que, FLIP_L impide que estas caspasas sean reclutadas al mismo gracias al anclaje en el DISC de una de las dos fracciones resultantes de la proteólisis de su dominio activo, impide que las caspasas-8 y -10 sean reclutadas al mismo (Krueger et al., 2001). Por ultimo, se muestran los efectos de diversas ligasas de ubiquitina E3. como FBW7 y Mule que favorecen la apoptosis ubiquitinizando a sus respectivos sustratos como Mlc-1 (sus acciones pro-apoptóticas se denotan con flechas discontinuas). También existen desubiquitiniasas que pueden favorecer la apoptosis (CYLD) o inhibirla (USP9X) (extraido de (Vucic et al., 2011)).

2.4.2. MAPKs (quinasas activadas por mitógeno) y regulación de la apoptosis.

La superfamilia de las MAPK (Mitogen-activated protein kinases) está compuesta por un grupo de cinasas citosólicas, muy conservadas, que transmiten señales desde la membrana plasmática al núcleo, a través de una cascada de fosforilaciones promoviendo respuestas específicas.

Responden a estímulos extracelulares (factores de crecimiento, hormonas, citocinas, etc) y a diferentes tipos de estrés como daños en el ADN, choque térmico, isquemia, citoquinas pro-inflamatorias, estrés oxidativo, radiación UV, ceramida, y cambios en la osmolaridad o en el metabolismo (revisado por (Wada and Penninger, 2004)).

Se han identificado cuatro familias de MAPKs en organismos pluricelulares: 1) familia ERKs (Extracellular signal-regulated kinases), 2) familia JNKs (c-Jun N-terminal kinases), 3) p38-MAPKs, y 4) la recientemente aislada ERK5/BMK1 (Big MAPK kinase 1) y ERK7 y ERK8 (Cargnello and Roux, 2011; Colecchia et al., 2012; Wada and Penninger, 2004).

Las rutas de señalización controladas por **MAPKs** tienen una especial importancia en la **regulación de la apoptosis** y del **crecimiento de células tumorales hematopoyéticas**, de ahí, que se sigan realizando estudios que permitan caracterizar los mecanismos precisos a través de los cuales ejercen este tipo de efectos (Sui et al., 2014). El caso de las vías controladas por JNK y p-38 es especialmente controvertido ya que, además de compartir reguladores comunes que las pueden activar simultáneamente, sus efectos finales pueden ser similares o antagónicos, demostrando una estrecha relación entre ambas que se hace evidente cuando p-38 es capaz de inhibir a JNK en contextos muy determinados (revisado por (Sui et al., 2014)).

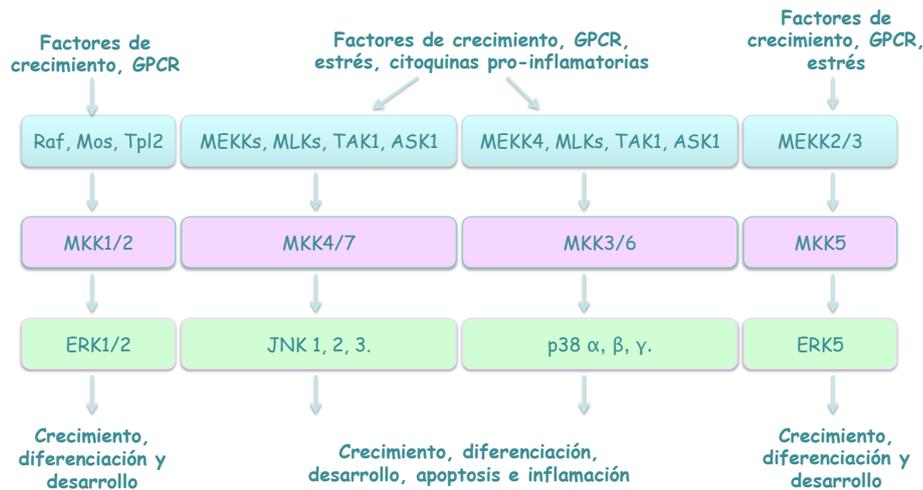


Figura 13. Módulos de activación de las principales cinasas activadas por mitógeno (MAPK). (Adaptado de (Sui et al., 2014; Wada and Penninger, 2004)).

2.4.2.1. Familia JNKs

La familia JNKs está constituida por tres miembros JNK1, JNK2 y JNK3, aunque, mediante splicing alternativo se producen hasta 10 isoformas distintas. Además, JNK 1/2 sufren un segundo procesamiento que da lugar a las isoformas α y β con distintas especificidades de sustrato (Gupta et al., 1996).

A esta familia también se la conoce con el nombre de SAPKs (stress-activated protein kinases), ya que están implicadas principalmente en respuestas frente al estrés. Las JNKs son activadas por MKK4/7 (figura 13). Los efectos provocados por la activación de esta ruta van a depender del tipo celular, del estado de maduración o diferenciación, el número de pase y el estado de ciclo celular en el que se encuentre la línea. Así, JNK1, 2 y 3 pueden funcionar como **supresoras de tumores**, a través de sus efectos pro-apoptóticos, y activar fenómenos relacionados con **supervivencia, proliferación y tumorigénesis** (revisado por (Wada and Penninger, 2004)).

JNK y apoptosis

La cinasa JNK activa procesos apoptogénicos como respuesta frente a diversos tipos de estímulos tales como: daños genotóxicos provocados por radiaciones ionizantes (UV y rayos γ), hiperosmolaridad, isquemia-reperusión, choque térmico, peróxidos, determinadas citoquinas pro-inflamatorias, unión de FasL-Fas, ceramida, inhibidores de la síntesis proteica y drogas quimioterapéuticas, entre otros (Wada and Penninger, 2004).

JNK fosforila a c-Jun aumentando su estabilidad y su actividad transcripcional. Este factor de transcripción (FT) forma parte del complejo AP1 constituido por heterodímeros de FTs pertenecientes a las familias: Jun, Fos, Maf y ATF (figura 17). Dada la variabilidad de AP1, este puede unirse a diferentes elementos de respuesta, dirigiendo la transcripción de proteínas anti- y pro-apoptóticas (revisado por (Sui et al., 2014))(Shaulian and Karin, 2001, 2002; Whitfield et al., 2001). Teniendo en cuenta que **JNK2** fosforila y transactiva a otros FTs como **p53** y **c-Myc**, parece que el papel crítico de esta MAPK en el proceso apoptogénico no tiene por qué estar mediado específicamente por AP1 (figrua 14) (Dhanasekaran and Reddy, 2008; Fuchs et al., 1998; Johnson and Nakamura, 2007).

Cuando se producen daños en el ADN y en presencia de agentes estresantes para la célula, JNK aumenta la actividad transcripcional de **p53**, estabilizándola mediante la fosforilación de diferentes residuos según el estímulo apoptótico y aliviando la inhibición a la que se ve sometida por **Mdm2** (Buschmann et al., 2001; Cheng et al., 2003; Fuchs et al., 1998; She et al., 2002). No obstante, JNK promueve, también, respuestas de tipo proliferativo e incluso neoplásico (revisado por (Wada and Penninger, 2004)).

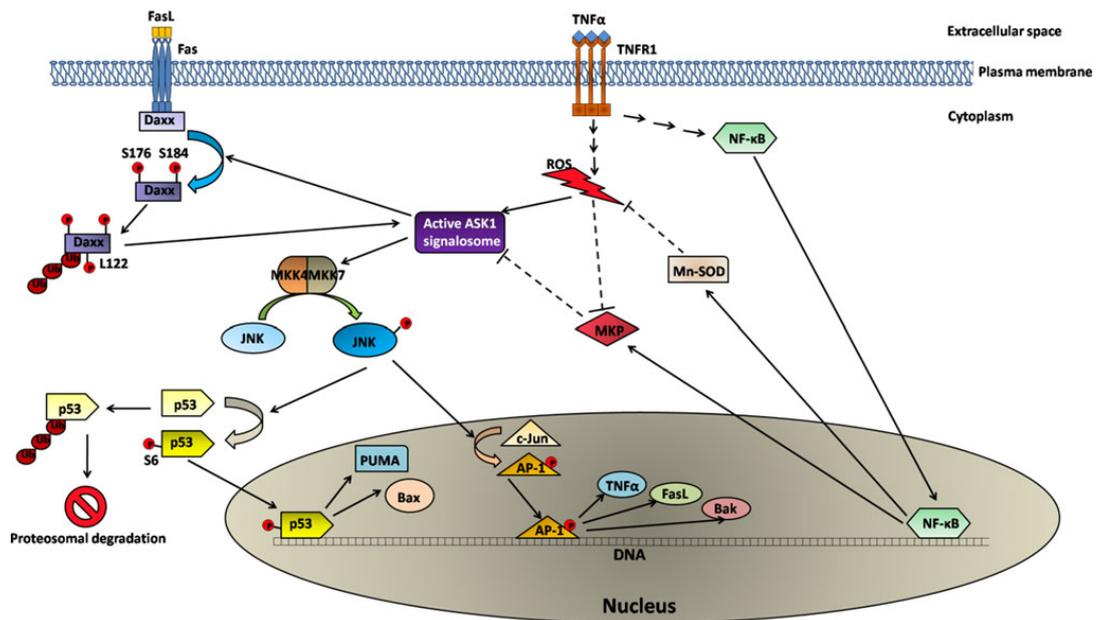


Figura 14. Efectos pro-apoptóticos indirectos/nucleares derivados de la activación de ASK1 y JNK. El esquema muestra la relación entre el estrés oxidativo y la vía intrínseca de inducción de apoptosis. Se muestran las acciones directas de JNK en el núcleo mediadas por los FTs c-Jun (AP1), p53 y c-Myc. Las siglas Ub representan eventos de ubiquitinación, los puntos rojos representan estados fosforilados y las flechas triples pasos intermedios (extraído de (Sinha et al., 2013)).

JNK también favorece la apoptosis de acuerdo a una estrategia directa, resumida en la figura 20, en la que destacan las siguientes acciones: 1) colabora en la liberación de **citocromo c del IMS** (Chauhan et al., 2003; Kharbanda et al., 2000; Tournier et al., 2000); 2) favorece la permeabilización de la MME fosforilando a los miembros pro-apoptóticos y anti-apoptóticos de la familia Bcl2 para inducir o reprimir, respectivamente, su actividad (Dhanasekaran and Reddy, 2008; Lei and Davis, 2003; Lei et al., 2002; Madesh et al., 2002; Marani et al., 2002; Puthalakath et al., 1999; Puthalakath and Strasser, 2002; Wang et al., 2007) (Srivastava et al., 1999; Yamamoto et al., 1999); y 3) proteoliza a **Bid** formando un fragmento de 21kDa, **Bid_j**, que favorece la liberación de Smac/Diablo, entre otros factores pro-apoptóticos (Dhanasekaran and Reddy, 2008; Madesh et al., 2002).

2.4.2.2. Familia p38-MAPKs

Esta familia de MAPKs esta constituida por 4 isoformas, p38 α , p38 β , p38 γ y p38 δ , cuyas funciones biológicas pueden converger o ser distintas. La primera isoforma es la mejor caracterizada y la que se expresa en un mayor número de tejidos. Tal y como se avanzó, esta vía **comparte activadores apicales con la familia JNKs**, con la que colabora ofreciendo respuestas no redundantes. Las MKK3 y MKK6 encargadas de fosforilar a las diferentes isoformas de p38-MAPK (figura 13)(revisado por (Wada and Penninger, 2004)).

Tal y como sucedía con la vía JNK, las vías de señalización controladas por las diferentes isoformas de p38 pueden inducir una gran variedad de respuestas celulares que incluyen: apoptosis frente a diversos estímulos, supervivencia, crecimiento celular y diferenciación (Liu et al., 2003; Park et al., 2002; Porras et al., 2004; Sarkar et al., 2002). Inhibidores de p38-MAPK inhiben la muerte celular inducida por activación (AID) (Zhang et al., 2000). También existen algunos estudios que ponen de manifiesto su papel pro-apoptótico tras la unión del **TNF α** , **TGF β** o **TRAIL** a sus respectivos receptores, además, de los fenómenos apoptóticos mediados por **ROS**, para algunos de los cuales esta cinasa es imprescindible (figura 15) (Edlund et al., 2003; Saurin et al., 2000; Valladares et al., 2000; Zhuang et al., 2000). También se la ha relacionado con la **apoptosis vía mitocondria**, dado que es capaz de provocar la translocación de proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 y de desencadenar la liberación de citocromo c. Además, interviene en la formación de los **cuerpos apoptóticos** y la **condensación de la cromatina** nuclear (Deschesnes et al., 2001).

En general, los estudios realizados determinan que esta familia de cinasas son necesarias para la supervivencia celular o la muerte por apoptosis dependiendo del tipo celular, el estímulo y las condiciones (Tanaka et al., 2002).

2.4.2.3. Familia ERKs

La familia Erk está constituida por dos miembros, ERK1 y ERK2, que se activan en respuesta a señales extracelulares como la presencia de ciertas citoquinas, factores de crecimiento, ligandos de receptores asociados a proteínas G, carcinógenos, etc, ofreciendo respuestas anti-apoptóticas y proliferativas, por lo que en general se la asocia con la supervivencia. No obstante, la respuesta celular variará en función de la intensidad y duración de la señal, si estas son prolongadas suscitan diferenciación celular, mientras que, si son de corta duración favorecen la proliferación. ERK1/2 son activadas mediante la fosforilación por MKK1/2, quienes a su vez son activadas por la familia Raf, entre otras (figuras 13 y 15) (revisado por (Wada and Penninger, 2004)). Una vez activadas, ERK1/2 fosforilan dianas nucleares y citoplasmáticas como la proteína cinasa ribosomal S6 p90RSK, la fosfolipasa A2 o factores de transcripción como c-Myc o Elk- 1, y proteínas STAT (revisado por (Wada and Penninger, 2004)).

Dado que **K-Ras**, **H-Ras** y **N-Ras**, así como otros proto-oncogenes de esta vía están mutados en el 30% de los cánceres humanos, el módulo Raf-MEK-ERK es el mejor caracterizado en mamíferos. Se ha estudiado especialmente en leucemias crónicas y agudas, así como en linfomas y mieloma múltiple, lo que ha permitido determinar su implicación en la generación de respuestas mitogénicas que contribuyen al inicio y desarrollo de neoplasias de origen hematológico (Repasky et al., 2004). A través de la fosforilación de **FOXO3A** regula negativamente la vía mitocondrial, favoreciendo la supervivencia de las células tumorales (Ley et al., 2005; Park et al., 2010).

Dado el carácter dual de las MAPK p38 y JNK y la implicación de la vía ERK en el desarrollo de neoplasias, es probable que sea necesario determinar cuál es el mejor momento para inhibir/inducir la activación de estas tres rutas y ajustarlo al tipo celular con el objeto de aumentar la eficacia de diferentes terapias contra el cáncer y evitar efectos indeseables.

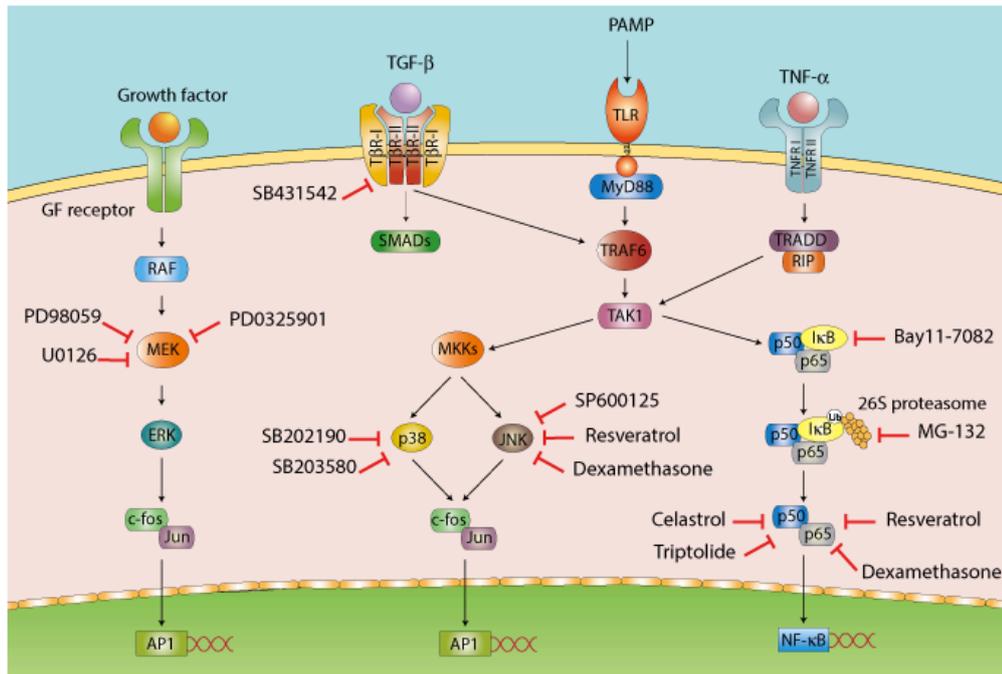


Figura 15. Módulos de activación de las principales cinasas activadas por mitógeno (MAPK) y sus principales inhibidores. Dado que la actividad de ERK1/2 se encuentra aumentada en ciertos tipos de tumores y dado que p-38 y JNK están estrechamente relacionadas con la resistencia/sensibilidad a algunos fármacos antitumorales, estos módulos de señalización son una diana terapéutica con la que se trabaja desarrollando nuevas drogas quimioterapéuticas que permitan inhibir o potenciar la actividad de dichas cinasas. Los inhibidores de p38 SB 203580/SB202190 o los inhibidores de ERK1/2 PD-184352 o PD-98059 se encuentran ya en las últimas fases de sus correspondientes ensayos clínicos y parecen ser eficaces en el tratamiento de determinados tipos de cancer (Bain et al., 2007; Sui et al., 2014; Wada and Penninger, 2004). También se incluyen los inhibidores de NF κ B (extraído de InvivoGen, Innovation within Reach).

2.4.3. Vía de la Fosfo-Inositol-3-cinasa PI3K

Convierte PIP2 en fosfatidil inositol 3, 4, 5 trifosfato (**PIP3**), un segundo mensajero que conduce a la activación de **Akt** via **PDK1** (phosphatidylinositol-dependent kinase 1) (figura 16). Akt favorece respuestas de supervivencia y de tipo proliferativo inhibiendo, entre otros, a la familia de FTs **FOXO** encargados de mediar eventos apoptóticos y de arresto celular. La activación anormal de esta vía suscita respuestas proliferativas y anti-apoptóticas relacionadas con procesos carcinogénicos (revisado por (Cully et al., 2006; Engelman, 2009; Rodon et al., 2013)).

La vía PI3K puede ser activada por el proto-oncogén Ras, entre otros, conectando esta ruta de supervivencia con otras similares como la de ERK. El supresor de tumores **PTEN** (phosphatase with tensin homology) inhibe la señalización de este vía desfosforilación del PIP3 (figura 16). Dado que **p53** interacciona con los FTs de la familia FOXO, su estado de activación afecta a la señalización vía PI3K favoreciendo la **apoptosis** y el **arresto celular** (revisado por (Rodon et al., 2013)).

Además, Akt interacciona con **mTOR3**, proteína implicada en procesos de angiogénesis a través del factor inducible por hipoxia (**HIF-1**) que, a su vez, está relacionado con la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (**VEGF**) en situaciones de hipoxia (figura 16). La excesiva activación de la señalización integrada por esta proteína se ha registrado hasta en el 50% de los cánceres humanos (Engelman, 2009; Rodon et al., 2013; Sarbassov et al., 2005).

Dada la estrecha relación que existe entre esta vía y los procesos tumorales, se han desarrollado moléculas inhibitoras específicas, siendo una de las más importantes el inhibidor de PI3K, **LY-294002** (Alladina et al., 2005; Bain et al., 2007; Engelman, 2009; Rodon et al., 2013; Sarbassov et al., 2005).

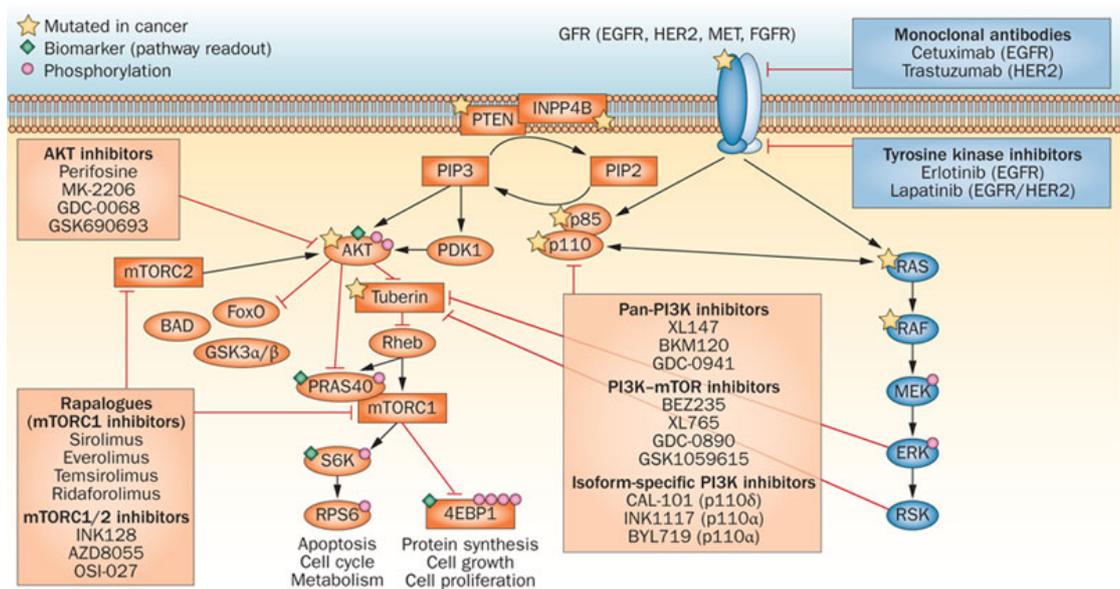


Figura 16. Vía de señalización de la PI3K y sus principales dianas terapéuticas. La vía PI3K se pone en marcha en respuesta a la activación de los receptores tirosín cinasa (RTKs) que fosforilan al sustrato del receptor de la insulina (IRS), que a su vez, tiene a bien fosforilar a la subunidad p85 de la PI3K, provocando un cambio conformacional en ella que la permite unirse a la subunidad catalítica p110 para ser completamente funcional. PI3K, entonces convierte al PIP2 en fosfatidil inositol 3, 4, 5 trifosfato (PIP3), un segundo mensajero que conduce a la activación de Akt mediante la activación de PDK1 (phosphatidylinositol-dependent kinase 1). También puede ser activada por el proto-oncogén Ras en respuesta a la unión de factores de crecimiento a los receptores RTKs. Ras puede activar a PI3K mediante su interacción directa con la subunidad catalítica de PI3K o indirectamente (Extraído de(Rodon et al., 2013)).

2.5. Espécies reactivas del oxígeno y apoptosis.

El término **ROS** hace referencia a aquellas entidades químicas que, a bajas concentraciones, actúan como segundos mensajeros intracelulares, y comprende todas las moléculas derivadas del oxígeno. Aquellas ROS que pueden existir de forma independiente y que presentan electrones desapareados en su última capa u orbital, además, son **radicales libres**. Se trata de productos generados de forma inevitable por el metabolismo celular que tienen una elevada reactividad por lo que pueden dañar componentes celulares esenciales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Freeman and Crapo, 1982). Dado que el espín no puede ser

compensado por la rotación, en sentido inverso, de un electrón apareado, los radicales libres son ROS mas reactivas que sus correspondientes no-radicales. Así, las ROS se pueden clasificar en dos categorías: 1) Especies reactivas del oxígeno no radicales, y, 2) Radicales libres ((Beckman and Crow, 1993) (tabla 2).

Cualquier proteína o sistema enzimático, con capacidad para transferir electrones, puede generar ROS como subproductos de esta reacción de transferencia. Sin embargo, la mitocondria es la principal fuente de ROS en las células no fagocíticas (Chance et al., 1979) (Figura 17). Datos cuantitativos, obtenidos a partir de mitocondrias aisladas indican que un 1-2% del oxígeno total consumido en este orgánulo se destina a la producción de ROS, de hecho, se estima que el 80% del

Especies reactivas del oxígeno (ROS)	
ROS no radicales	Radicales libres
Peróxido de hidrógeno H ₂ O ₂	Anión superóxido O ₂ ⁻
Ácido hipocloroso HClO	Radical hidroxilo OH·
Oxígeno singlete ¹ O ₂	Radical peroxilo ROO·
Ozono O ₃	Radical alcoxilo RO·
Oxígeno molecular O ₂	Radical tiilo RS·
	Óxido nítrico NO·
	Dióxido de nitrógeno NO ₂ ·
	Radical peroxinitrito ONOO·
	Radical triclorometilo CCl ₃ ·

Tabla 2. Especies reactivas del oxígeno.

anión superóxido (O₂⁻) se genera a nivel de la cadena de transporte electrónico (ETC) mitocondrial, durante la fosforilación oxidativa, siendo los complejos I y III los máximos productores de ROS, si bien es cierto que esto depende del tejido y de la especie (Abate et al., 1990; Abe and Berk, 1999).

La primera especie reactiva del oxígeno generada en los sistemas biológicos es el radical libre O₂⁻, que se produce por la reducción directa e incompleta del O₂ cuando el complejo IV de la ETC, **citocromo oxidasa**, cataliza la conversión del oxígeno molecular a agua. La mayoría del O₂⁻ generado en la célula se produce por el **transporte reverso** de electrones hacia el complejo I, debido a la elevada fuerza protomotriz generada por la actividad de los complejos III y IV de la ETC cuando el potencial ΔΨ es elevado.

Sin embargo, en condiciones **fisiológicas** el **potencial $\Delta\Psi$ es bajo** y los electrones se transfieren con normalidad desde el complejo II al III, siendo al producción de **ROS baja** (figura 17) (Liu et al., 2002).

El **O_2^-** tiene una **vida media** muy **corta** ya que su reacción de **dismutación**, bien sea espontánea o catalizada por la superóxido dismutasa (**SOD**), es muy favorable.

El **peróxido de hidrógeno** (H_2O_2), producido por esta reacción y el generado por las oxidasas de flavoproteínas, puede difundir a través de las membranas biológicas, y a pesar de que su capacidad oxidativa es menor que la del O_2^- , en presencia de metales puede dar lugar al **radical hidroxilo** (OH^\cdot) a través de la **reacción de Fenton/Harber-Weiss**. Este radical, sin embargo, sí que es una molécula extremadamente reactiva y tóxica que puede reaccionar con los ácidos grasos poliinsaturados produciendo **radicales alcoxilo** (RO^\cdot) y **peroxilo** (ROO^\cdot) (Figura 18) (Freeman and Crapo, 1982).

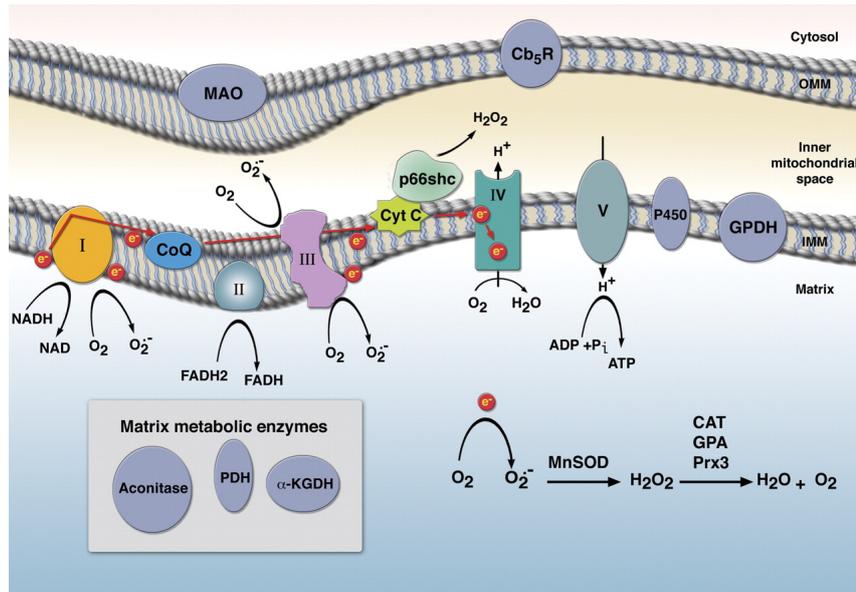


Figura 17. Generación de ROS a nivel mitocondrial. Las principales fuentes de ROS mitocondriales son los complejos I y III. Mientras que en el primero forma O_2^- solo en la matriz, el complejo III libera O_2^- tanto hacia la matriz mitocondrial como hacia el espacio intermembrana (IMS). Se muestra la producción de O_2^- y H_2O_2 por los principales sistemas enzimáticos: citocromo oxidasa, monoamino oxidasa (MAO), citocromo B5 reductasa (Cb5R) localizada en la MME, glicerol-3-fosfatodeshidrogenasa (GPDH), varios enzimas pertenecientes al complejo citocromo p450 de la MMI, enzimas de la matriz mitocondrial como la piruvato deshidrogenasa (PDH) y la α -cetoglutarato deshidrogenasa (α -KGDH). Se muestran también los principales sistemas antioxidantes, tales como la porfirina de manganeso (MnSOD) que dismuta O_2^- a agua oxigenada, rápidamente catabolizada por la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y la peroxiredoxina 3 (Prx3) (Extraído de (Circu and Aw, 2010)).

Además, el radical superóxido (O_2^-) reacciona con el **óxido nítrico** (NO^-) produciendo **especies reactivas del nitrógeno** como el **radical peroxinitrito** ($ONOO^-$) y el **dióxido de nitrógeno** (NO_2^-) que también provocan daños celulares y estrés nitrosativo (Figura 18) (Squadrito and Pryor, 1998).

Por último, las enzimas del ciclo de Krebs, como la α -cetoglutarato o la piruvato deshidrogenasa, se encuentran entre los 10 sistemas mitocondriales que más ROS producen. El **aumento de NADH** se relaciona con **incrementos significativos** en la producción de H_2O_2 llevados a cabo por el enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa. Ante este aumento de la carga oxidativa, el complejo I de la ETC produce aún más ROS, **acelerando la muerte por apoptosis** (Tretter and Adam-Vizi, 2004).

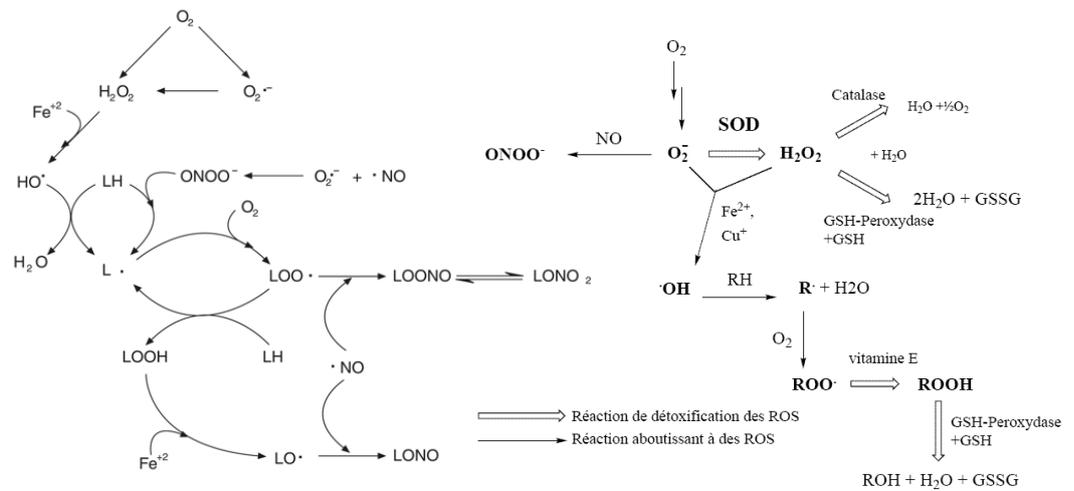


Figura 18. Principales reacciones que producen ROS y NOS.

2.5.1. Daños mitocondriales provocados por las ROS.

Dado que la mitocondria es el principal orgánulo productor de ROS, también es el más perjudicado cuando su producción se eleva dada su exposición a los mismos. Así, el **ADN mitocondrial** (ADNmt), al estar localizado cerca de la ETC (fuente de ROS) y desprovisto de proteínas protectoras, es especialmente sensible a la acción de especies reactivas del oxígeno. Además, la capacidad de los sistemas de reparación por **escisión de nucleótidos** es muy limitada a nivel mitocondrial, de forma que, cuando las ROS producen roturas de cadena simple o sitios abásicos en el ADNmt, normalmente se desencadenan **procesos apoptóticos** (Ricci et al., 2008).

Por otro lado, al codificar 13 polipéptidos de la ETC, los daños en esta molécula descienden la función respiratoria, con el consiguiente aumento en la producción ROS y el **descenso en la producción de ATP** (Clayton, 1984). De hecho, actualmente se considera que el daño producido por niveles elevados de $O_2\cdot^-$ y $HO\cdot$ en el ADNmt juega un papel crucial en la apoptosis celular aunque el mecanismo, a través del que se produce la señalización que conduce a tal efecto, de momento no se conoce con exactitud (Circu and Aw, 2010).

2.5.2. Papel de las ROS/NOS en la vía extrínseca de apoptosis.

Los estudios más recientes indican que las **ROS** podrían tener una función directa en la **vía extrínseca** de inducción de apoptosis, mediando la **agrupación y activación** de estos **receptores** en **balsas lipídicas**. La formación de estas balsas tiene lugar tras la unión de ligandos como FasL o $TNF\alpha$ a sus correspondientes receptores en la membrana plasmática, lo que provoca el reclutamiento y activación de la **NADPH oxidasa** (Nox) y la generación de ROS. Las ROS así generadas oxidan a la proteína **esfingomielinasa ácida**, desencadenando un tipo de señalización que culmina con la producción de **ceramida** y la agrupación de los receptores de muerte en balsas lipídicas que sirven como plataformas que facilitan su activación y, por tanto, la apoptosis (revisado por (Circu and Aw, 2010)).

2.5.3. Papel de las ROS en la vía intrínseca de apoptosis.

La presencia de altos niveles de ROS intracelulares, así como, el daño mitocondrial que estos provocan, desencadenan la permeabilización del MME y la liberación de factores pro-apoptóticos (Zorov et al., 2000).

La permeabilización de la MME corre a cargo de las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak, mientras que, la MMI es permeabilizada por la formación del MPTPC.

Las **ROS**, a través de **JNK y p38**, llevan a cabo fosforilaciones inactivantes en las proteínas anti-apoptóticas y activantes sobre los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl2 (figuras 14 y 20).

El MPTPC se abre con el aumento de los niveles de Ca_2^+ , el **estrés oxidativo**, la **oxidación de tioles** y la alteración de la cantidad de nucleótidos de pirimidina.

Además, la modificación de los grupos thiol mediada por las ROS también afecta al transportador de nucleótidos de adenina **ANT** y favorecen el cierre de **VDAC** y, por tanto, la acumulación de metabolitos. Ocasionalmente, el cierre de VDAC provoca la formación de canales de ceramida, mediada por Bid truncado, que permiten la liberación de citocromo c (figura 19) (Rostovtseva et al., 2005). Aunque no está del todo claro si la pérdida de $\Delta\Psi_m$ precede o no a la liberación de factores pro-apoptóticos es incuestionable que la liberación de los mismos contribuyen a la disipación de este y a la pérdida de la homeostasis bioquímica que se manifiesta en la caída de los niveles de **ATP, NADPH y GSH** (debido a su oxidación) y el **aumento** de los niveles de **ROS** debido al desacoplamiento y los múltiples fallos que se producen en la ETC. El estrés oxidativo, así generado, contribuye al proceso apoptótico oxidando lípidos, proteínas, dañando el ADNmt y nuclear, y provocando un descenso aún mayor del $\Delta\Psi_m$, estableciéndose así un **feedback positivo** que conduce a la célula hacia la muerte por **apoptosis** (revisado por (Sinha et al., 2013)).

El citocromo c es uno de los factores pro-apoptóticos liberados más importantes (figura 19), no solo por la contribución que realiza durante la activación de la pro-caspasa-9 sino porque forma parte de uno de los complejos más importantes de la ETC y elimina ROS en el IMS. La liberación de citocromo c, a su vez, provoca un aumento de la producción de ROS en los complejos I y III de la ETC y priva a la MMI de sus funciones antioxidantes ocasionando daños aún mayores en este orgánulo ya debilitado (Basova et al., 2007; Kushnareva et al., 2002).

Por otro lado, la producción de ROS favorece la liberación de **AIF** de la MMI. La liberación de esta flavoproteína provoca un descenso en la actividad del complejo I de la ETC y en la fosforilación oxidativa que redundan en un aumento de ROS que, de nuevo, favorecen su liberación, estableciéndose un **feedback positivo** que permite la salida de suficiente AIF desde la mitocondria al núcleo y la correspondiente condensación y fragmentación de la cromatina (Figura 19) (Natarajan and Becker, 2012).

La liberación de Smac/Diablo facilitada por **Bidj** (dependiente de las ROS) antagoniza los efectos inhibitorios de las **IAPs** facilitando la activación de las caspasas iniciadoras y efectoras (figura 19). Al mismo tiempo la liberación de citocromo c permite la formación del apoptosoma y la activación de la **caspasa-9** que, a su vez, activará a la **caspasa -3**, quien llevará a cabo la demolición celular cortando numerosas proteínas importantes para el funcionamiento y el mantenimiento de las estructuras celulares, entre las que se encuentra la subunidad **p75 del complejo I de la ETC** (Ricci et al., 2004). De este modo, las caspasas contribuyen a la **caída del $\Delta\Psi_m$** , amplificando el proceso **apoptótico** (Larochette et al., 1999; Pardo et al., 2001). Por tanto, las especies reactivas del oxígeno y el estrés oxidativo en general son capaces de desencadenar procesos apoptóticos a través de la vía intrínseca.

ASK1 desempeña un papel protagonista en el escenario que dibujan las ROS, dado que puede funcionar como un sensor Redox, detectando el grado de estrés oxidativo y su duración y, dependiendo de este, dirigir a la célula hacia procesos de proliferación, supervivencia y diferenciación, o hacia la muerte por apoptosis cuando los niveles de ROS son elevados o se mantienen durante largos periodos de tiempo (revisado por (Circu and Aw, 2010)). Además la formación del heterodímero **ASK1-ASK2** estimula la activación de las cinasas JNK y p38 y de la caspasa-3 potenciando la señal apoptótica, desempeñando un papel decisivo durante la señalización en respuestas al estrés oxidativo (figuras 14 y 20) (revisado por (Sinha et al., 2013)).

Efectos de la vía de señalización ASK1-JNK

La señalización de ASK1 conduce a la activación de las MAPK JNK y p38. Se ha encontrado que en ausencia de ASK1 la activación transitoria de JNK inducida por el estrés oxidativo, derivado de la unión de TNFR1 a TNF α , se produce con la misma intensidad que en las células WT y suscita respuestas de diferenciación y supervivencia. Sin embargo, las activaciones duraderas de ambas cinasas, que conducen a la muerte celular por apoptosis, requieren una fuerte activación de ASK1 y solo se producen en células WT (revisado por (Sinha et al., 2013)).

Tal y como se describió en el apartado 2.4.2.1., una vez que ASK1 ha activado a JNK esta, a su vez, puede activar la señalización apoptogénica siguiendo una estrategia mitocondrial directa (figura 20) o indirecta, translocándose al núcleo donde activa distintos FTs (revisado por (Sinha et al., 2013)).

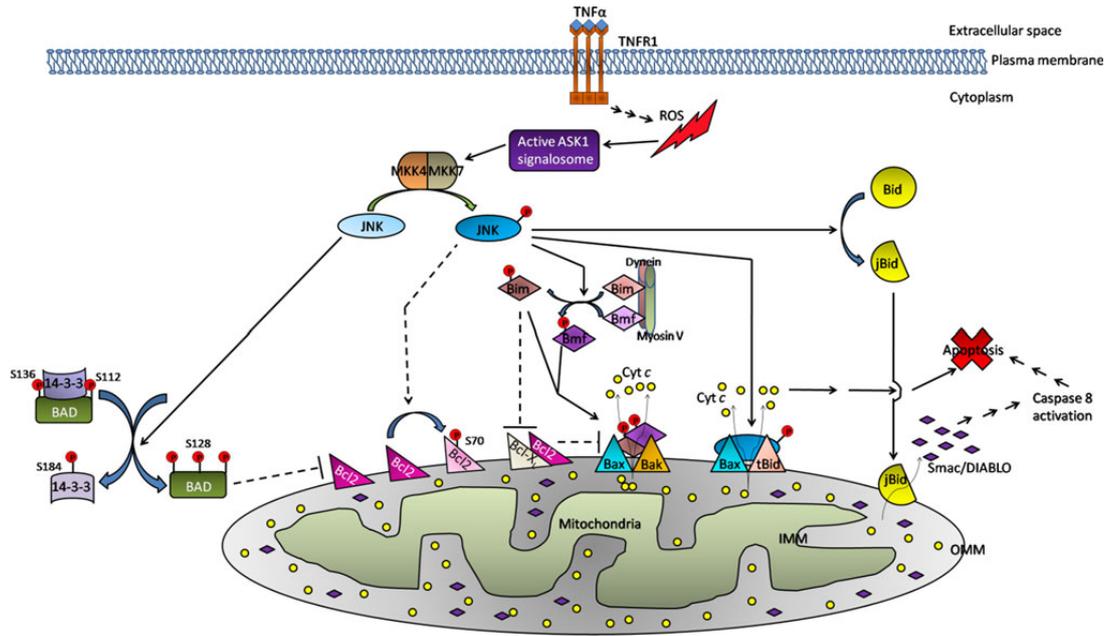


Figura 20. Efectos pro-apoptóticos derivados de la activación de ASK1 y JNK. Representación esquemática de la relación que existe entre la vía extrínseca de inducción de apoptosis, el estrés oxidativo, la activación de ASK1/JNK y la permeabilización de la MME. Se muestran los efectos directos de JNK a nivel mitocondrial, pero no los indirectos o nucleares. Las líneas discontinuas representan eventos de inhibición, los puntos rojos representan el estado fosforilado de las diferentes proteínas y, por último, las flechas triples indican que hay pasos intermedios que se han omitido en el esquema (extraído de (Sinha et al., 2013)).

2.5.5. Sistemas anti-oxidantes celulares

Teniendo en cuenta la facilidad con la que se producen ROS y NOS y dado su gran potencial oxidativo, es lógico que las células hayan desarrollado una serie de sistemas que les permitan antagonizar los efectos nocivos de los mismos. Por tanto, en condiciones normales los efectos deletéreos provocados por las ROS son contrarrestados por sistemas anti-oxidantes directos o indirectos (Clarkson and Thompson, 2000).

El término redox se utiliza para describir el balance entre NAD/NADH, NADP/NADPH y/o GSH/GSSG, y su relación con los diferentes conjuntos de metabolitos y el control del metabolismo (Krebs and Gascoyne, 1968; Rebrin and Sohal, 2004).

Los desequilibrios/cambios en el estado redox celular pueden provocar: el paso de un estado quiescente a un estado proliferativo, arresto celular e incluso apoptosis, dependiendo de la magnitud del desequilibrio y de la duración de este. De esta forma, niveles elevados de ROS y NOS van a aumentar la actividad de los sistemas anti-oxidantes celulares.

Los sistemas redox directos son aquellos que interaccionan directamente con estos evitando la producción de nuevos radicales libres. Entre ellos se encuentran: superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (Gpx), la catalasa y la tiorredoxina reductasa (Trx) (tabla). Además, existen sistemas no enzimáticos como: las vitaminas E y C, la coenzima Q o el β -caroteno que también contribuyen a la eliminación de ROS y NOS (Clarkson and Thompson, 2000).

Sistema superóxido dismutasa: existen 4 formas de SOD: Mn-SOD (SOD₂ de la matriz mitocondrial), Cu,Zn- SOD (SOD₁ citoplasmática), Ni-SOD, y la SOD extracelular. Todas ellas catalizan la conversión de O₂⁻ a H₂O₂ (Harju et al., 2004; Kinnula and Crapo, 2004).

La catalasa: es una hemoproteína peroxisómica especializada en la conversión de H₂O₂ a agua. Se trata de uno de los enzimas conocidos más eficientes dado que no se satura a ninguna concentración de peróxido de hidrógeno. Cataliza la conversión de H₂O₂ a O₂ y H₂O, disminuyendo las posibilidades de formación de radical hidroxilo (vía R. de Fenton).

También, se une al NADPH reducido que aumenta su capacidad catalítica al tiempo que la protege de su inactivación (Kirkman et al., 1999).

Sistema redox	Reacción en la que participa
Superóxido dismutasa	$O_2^- + O_2 + 2H^+ \Rightarrow H_2O_2$
Catalasa	$2H_2O_2 \Rightarrow 2H_2O + O_2$
Glutatión	$H_2O_2 + 2GSH \Rightarrow GSSG + 2H_2O$
Tiorredoxina	<p> $Sustrato_{ox} \xrightarrow{TrxR} Sustrato_{red} + NADP^+$ (consumiendo $NADPH + H^+$) $Trx-S_2 \xrightarrow{Trx-(SH)_2} Trx-(SH)_2$ $Prx_{ox}/Proteína-S_2 \xrightarrow{Trx-(SH)_2} Prx_{red}/Proteína-(SH)_2 + Producto_{ox}$ </p>

Tabla 3. Principales sistemas anti-oxidantes directos.

2.5.5.1. El glutatión como sistema redox

El glutatión (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina, GSH) es, probablemente, el sistema redox más importante para el sustento de la homeostasis redox, manteniendo un ambiente óptimo que permite el correcto funcionamiento de las proteínas celulares. Se trata del tiol de bajo peso molecular más importante y abundante en las células eucariotas. El enzima glutatión peroxidasa cataliza la reducción del H₂O₂ y otros peróxidos, cediendo los electrones, resultantes de la reacción, al GSH que se oxida a glutatión disulfuro (GSSG). El GSSG es reducido, a su vez, por el enzima glutatión reductasa a GSH, de forma que, en condiciones fisiológicas la forma predominante de glutatión en la célula es el GSH. Así, aproximadamente el 90% del GSH celular total se encuentra en forma reducida gracias a la síntesis citosólica *de novo*, la reducción enzimática del GSSG y a la absorción de GSH extracelular (Meister and Tate, 1976). Por tanto, el ratio GSH/GSSG ofrece una buena medida del estrés oxidativo celular (Schafer and Buettner, 2001).

Una vez sintetizado/reducido/importado el GSH va a participar en reacciones redox y en procesos de detoxificación al conjugarse gracias al enzima glutatión-S-transferasa (GST). También puede ser transportado al espacio extracelular, con gasto de ATP y mediante los transportadores MRP1/2 (Multidrug-resistance protein).

El GSH es importado por diferentes orgánulos y tras su oxidación será transportado de nuevo al citosol, en forma de GSSG, para ser reducido (revisado por (Ortega et al., 2011)). Parece que la especificidad del sistema GSH radica, al menos en parte, en su compartimentación. La distribución única del GSH, y de otros pares redox, parece estar dividida en compartimentos redox que se localizan a su vez, en los diferentes compartimentos celulares (citosol, mitocondria, retículo endoplasmáticos y núcleo) (Circu and Aw, 2008).

Funciones del GSH

En el **citósol** predomina el GSH altamente reducido (2-10nM), donde es imprescindible para diversos procesos metabólicos celulares. Por otro lado, el GSH va a reprimir la transcripción de genes pro-apoptóticos puesta en marcha por las ROS (Balendiran et al., 2004; Kretz-Remy and Arrigo, 2002). De hecho, numerosos factores de transcripción están regulados por la oxidación/reducción de las cisteínas localizadas en sus dominios de unión al ADN, como es el caso de Nfr2, NFkB o p53 (Arrigo, 1999; D'Alessio et al., 2004). Por tanto, a través de estas modificaciones y del mantenimiento del estado reducido de los puentes disulfuro en los residuos de cisteína, el GSH puede modificar los niveles de expresión de numerosos genes, regular la actividad de diferentes receptores de tirosín cinasas, enzimas y proteínas transportadoras, así como, regular la activación de cinasas como PKC o MAPKs muy relacionadas con los procesos apoptóticos (Franco et al., 2009). En el **retículo endoplasmático** el GSH regula los ROS producidos y colabora con la proteína disulfuro isomerasa (PDI, protein disulfide isomerase) (Chakravarthi et al., 2006; Jessop and Bulleid, 2004; Meister and Anderson, 1983). Por tanto, la reducción de los niveles de GSH, debida al estrés oxidativo, provoca el despliegue de diversas proteínas, proceso conocido como UPR (unfolding protein response), y el inicio de procesos apoptogénicos (Frans and Kaiser, 2000). En el **núcleo** permite el correcto funcionamiento de las proteínas en este compartimento, al tiempo que protege al ADN de posibles daños provocados por el estrés oxidativo y la radiación UV (Chen et al., 2003; Markovic et al., 2007; Voehringer et al., 1998).

La forma **mitocondrial** del GSH (GSHmt) preserva la integridad de las proteínas mitocondriales y los lípidos, al mismo tiempo que controla la generación de ROS protegiendo al ADN mitocondrial de los potenciales daños que podría sufrir. La cantidad de GSHmt varía en función del tipo de célula y es mantenida mediante transporte activo de GSH desde el citósol a la matriz mitocondrial (Soderdahl et al., 2003).

La proteína anti-apoptótica Bcl2 parece que preserva las funciones del GSH en el IMS mediante las interacciones que establece con este a través del surco hidrofóbico/surco BC, facilitando la disponibilidad inmediata de GSH en la mitocondria. De esta forma, cuando un estímulo apoptótico impide dicha interacción el transporte de GSH al interior de la mitocondria se interrumpe por completo y este se pierde, ya que sale de nuevo al citoplasma, evento que contribuye a la cascada apoptótica (Zimmermann et al., 2007).

El sistema GSH/GSSG mantiene la homeostasis redox colaborando con otras proteínas redox, de modo que, las tioredoxinas (Trxs) desempeñan un papel crítico en la regulación redox del GSH/GSSG. Se trata de proteínas pequeñas que se expresan de forma ubíqua y que poseen dos sitios redox catalíticamente activos (Cis-XX-Cis), colaborando con el sistema glutaredoxina (Grx) en la reducción reversible de los puentes disulfuro proteicos (Nakamura et al., 1997). El NADPH y la Trx reductasa son los encargados de mantener las cisteínas de la Trx en un estado reducido activo (Nakamura et al., 1997).

GSH, apoptosis y quimioterapia

EL GSH, dadas sus funciones, es crítico para la supervivencia celular. Descenso o agotamiento de los niveles de GSH sensibiliza e induce apoptosis en numerosas células tumorales, mientras que los niveles altos de este tiol se relacionan con la resistencia a la misma (revisado por (Circu and Aw, 2008; Franco et al., 2009; Ortega et al., 2011; Traverso et al., 2013)). Aunque la relación entre GSH y apoptosis no está completamente caracterizada, la deplección de este tiol se considera uno de los marcadores de la progresión apoptótica y parece que es un evento necesario para este proceso en diferentes sistemas celulares (Franco et al., 2007; Franco et al., 2009).

Así, el inhibidor de la γ -GCS (y por ende de la síntesis de GSH) BSO (Buthionine sulfoximine) facilita y potencia las respuestas a diferentes estímulos apoptogénicos, tales como la unión de TNF, y diversos ligandos de muerte a sus receptores correspondientes en células T (Armstrong et al., 2002; Cazanave et al., 2007; Franco et al., 2007; Friesen et al., 2004; Morales et al., 1998; Tormos et al., 2004). Sin embargo, la suplementación del medio de cultivo con GSH, NAC (N-acetyl-L-cysteine) o S-adenosilmetionina (sendos precursores de la cisteína) protegen frente a la apoptosis desencadenada por diversos estímulos (Cazanave et al., 2007; Franco et al., 2007; Wang and Cederbaum, 2006). El GSH también regula la apertura y el cierre del MPTPC; así, la depleción de GSHmt induce apoptosis debida a la apertura de este poro incluso cuando las ROS se mantienen en niveles fisiológicos (Beatrice et al., 1984; Kowaltowski et al., 2001). Por otro lado, la síntesis de GSH esta paradójicamente regulada por el estrés oxidativo a través de la sobreexpresión del enzima γ -glutamato-cisteína-ligasa. Por tanto, cuando los niveles de ROS son altos (pero no comprometen la viabilidad celular) el aumento de la síntesis de GSH confiere protección frente al estrés oxidativo (Parmentier et al., 2000; Usatyuk et al., 2006).

IV. OBJETIVOS

Los exopolisacáridos bacterianos producidos por microorganismos halófilos presentan un contenido en grupos sulfato poco común. Dicha sulfatación, además de diferenciar a estos EPS de los producidos por otros procariotas, dota a este tipo de macromoléculas de importantes y diferentes propiedades biológicas. B100 es un exopolisacárido, producido por el microorganismo halófilo, *Halomonas stenophila*, que presenta un elevado contenido en grupos sulfato (7,9%). Tras ser sometido a un proceso de sulfatación en laboratorio, que aumenta el porcentaje de sulfatos hasta el 23%, B100S logra inhibir el crecimiento de diversas líneas tumorales, induciendo apoptosis en algunos casos y especialmente en la línea celular de leucemia T Jurkat.

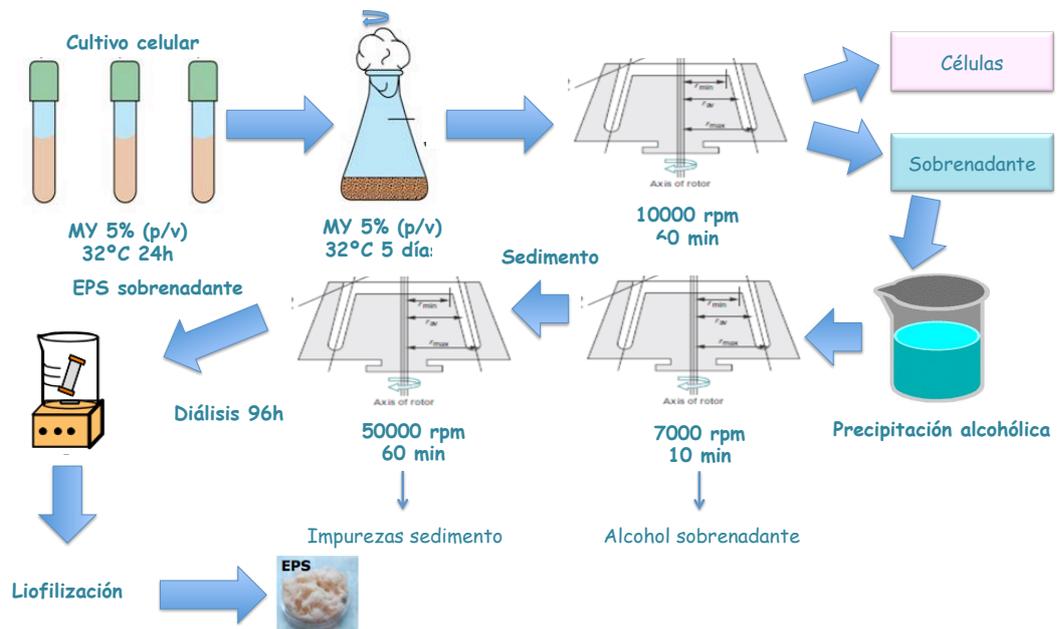
Dado el interés en identificar los mecanismos íntimos que regulan esta inducción de apoptosis en células Jurkat, abordamos los siguientes objetivos:

1. Caracterizar la vía de señalización utilizada por el EPS B100S para inducir apoptosis en células Jurkat, así como los elementos que confieren resistencia o sensibilidad a la apoptosis.
2. Identificar los mediadores bioquímicos más relevantes en este proceso de inducción de apoptosis, en especial, los relacionados con la producción de especies reactivas del oxígeno, y determinar la relevancia de las mismas en el proceso apoptogénico dirigido por el EPS B100S en células Jurkat.
3. Estudiar las modificaciones del proceso apoptótico en células leucémicas T como respuesta al tratamiento combinado de B100S con otros inhibidores o drogas quimioterapéuticas.
4. Determinar el patrón de modulación génica que se produce en células Jurkat tras la exposición a B100S, para identificar los principales genes y vías de señalización responsables del desencadenamiento de la apoptosis.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Producción de los EPSs B100.

El exopolisacárido fue proporcionado por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, siguiendo la metodología descrita por Quesada y cols en 1993 y que se resume en la figura adjunta (Quesada et al., 1993).



Representación esquemática del proceso de extracción del EPS B100S. Los cultivos se llevaron a cabo en medio MY al 5% (p/v) de sales. Partiendo de 5ml de cultivo de cada una de las cepas, obtenido tras el crecimiento de las mismas durante 24h a 32°C, se inoculó 1ml del volumen total en 4 matraces Erlenmeyer, con una capacidad de 500ml, que contenían 150ml del mismo medio de cultivo y se procedió al cultivo en agitación (100rpm) durante 5 días. Los cultivos bacterianos fueron posteriormente centrifugados a 10.000rpm durante 60 minutos en una centrífuga (Sorvall RC-5B, rotors GSA). A continuación se le añadió al sobrenadante 3 volúmenes de etanol al 96% frío (-80°C) y se dejó precipitar durante 12 h a 4°C, tras las cuales se recogió el precipitado del material extracelular (EPS) mediante centrifugación a 7.000 rpm durante 10 minutos, con la intención de eliminar el etanol. Para eliminar completamente las posibles trazas de alcohol, este se dejó evaporar y se solubilizó el precipitado en agua destilada. El material extracelular en solución se purificó mediante ultracentrifugación (Ultracentrífuga Beckman L8-M, rotor 50T) a 50.000 rpm durante 60 min y se dializó durante 72h en agua destilada, utilizando membranas Midicell con un tamaño de poro de 12-140000 Da. Por último, se liofilizó el EPS para poder determinar la producción por gravimetría.

Sulfatación

La sulfatación del EPS también fué llevada a cabo por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, de acuerdo con el protocolo descrito por Nishiro y Nagumo en 1992 (Nishino and Nagumo, 1992).

Aproximadamente 0,5g de EPS fueron disueltos en 50ml de dimetilformamida, manteniendo esta solución en agitación durante 2h a RT (temperatura ambiente). Posteriormente, la mezcla se incubó durante 2h más a 45°C con el objeto de favorecer la dispersión del EPS en el disolvente. A continuación, se adicionó lentamente un exceso del complejo piridina-SO₃ y se mantuvo la reacción durante 2h más a 45°C para, finalmente, detenerla adicionando 20ml de agua destilada. Se ajustó el pH a 9 con NaOH 3M y se dializó de nuevo con agua destilada para, por último, liofilizarla y recuperar el polímero.

2. Células y cultivos celulares

Las líneas de células T leucémicas Jurkat, MOLT-4 y HPB-ALL y la línea de leucemia promielocítica humana HL-60 fueron obtenidas de la ATCC (ciudad). Todas ellas fueron mantenidas en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino (GIBKO, California, USA) al 10%, L-glutamina 1 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (Cambrex). Se cultivaron en frascos de 75 cm² tratados (Nunc, Thermo scientific EEUU) dentro de un incubador a 37 °C y 5% de CO₂.

Las células Jurkat deficientes en caspasa 9 (Jurkat w/o C₉) y la misma línea en la que se reconstituyó la expresión de esta caspasa (Jurkat C₉) fueron cedidas por el Dr. Klaus Schulze-Osthoff (Interfaculty of Biochemistry, University of Tübingen, Alemania).

La línea Jurkat w/o C₉, también denominada JMR, es el resultado de un screening realizado en el laboratorio del Dr. Schulze-Osthoff en un amplio panel de células Jurkat obtenido de la ATCC (VA); esta línea resultó ser resistente a la apoptosis inducida por diversas drogas genotóxicas debido a la ausencia de expresión de caspasa 9 (Samraj et al., 2007). La reconstitución de la expresión de esta caspasa iniciadora se llevó a cabo en el mencionado laboratorio, mediante electroporación de la línea Jurkat w/o C₉ con el vector pET23b-Casp9-His, al que previamente se le había incorporado un epítipo Flag en su extremo N-terminal. Dicha construcción fue cedida al laboratorio del Dr. Schulze-Osthoff por el Dr. Salvensen (Srinivasula et al., 1998; Srinivasula et al., 1996). Ambas líneas fueron mantenidas en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino (GIBKO, California, USA) al 10%, L-glutamina 1 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (Cambrex) (**medio completo**). Se cultivaron en frascos de 75 cm² tratados (Nunc, Thermo scientific EEUU) dentro de un incubador a 37 °C y 5% de CO₂.

Las células Jurkat que sobreexpresan Bcl-2 y Bcl-xL fueron cedidas a nuestro laboratorio amablemente por el Dr. Jacint Boix (Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Universidad de Lleida, España). Se trata de células transfectadas con los vectores de expresión pCDNA3/Bcl-xL, pCDNA3/Bcl-2 o pCDNA3 (Boix et al., 1998), en las que la expresión de ambas proteínas se encuentra bajo el control del promotor viral CMV. Dados los bajos porcentajes de expresión de ambas proteínas en las líneas mencionadas se realizó un clonaje por dilución límite con el objetivo de seleccionar aquellos clones cuyos niveles de expresión fueran mayores. Para llevar a cabo el clonaje de los tres tipos celulares se realizaron diferentes diluciones seriadas, de cada uno de ellos, en placas de 96 pocillos hasta la obtención de cultivos con 1 o 0,5 célula / pocillo. El crecimiento y mantenimiento de los clones se realizó en medio completo RPMI 1640, suplementado con geneticina (G418, Gibco, California, USA) a una concentración final de 1mg/ml como antibiótico de selección.

Las células se mantuvieron en frascos de cultivo 75 cm² tratados (Nunc, Thermo scientific EEUU), en un incubador a 37 °C y 5% de CO₂. El screening de los clones positivos se realizó mediante western blot utilizando anticuerpos específicos contra Bcl-2 o Bcl-xL según el clon a analizar.

Los linfocitos procedentes de donantes sanos fueron aislados mediante centrifugación de sangre total (recogida en tubos con citrato/EDTA) en gradiente de Ficoll-Histopaque (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Las células mononucleares se descartaron permitiendo su adhesión en frascos de cultivo 75 cm² tratados (Nunc, Thermo scientific EEUU) para lo cual se incubaron durante 1 hora a 37°C y 5% de CO₂. Determinaciones realizadas en nuestro laboratorio han demostrado que con este método de separación la pureza del cultivo es de aproximadamente un 95%. Las células T en reposo se cultivaron un máximo de 48 h en medio RPMI 1640 completo en un incubador a 37°C y 5% de CO₂.

Las muestras de sangre de pacientes con linfomas/leucemias T fueron manipuladas del mismo modo que los linfocitos T en reposo, de forma que, se trataron y analizaron en las 24 o 48 h posteriores a la extracción sanguínea. Estas muestras fueron aportadas amablemente por el Hospital Virgen de las Nieves de Granada.

3. Reactivos y anticuerpos

Las sondas fluorescentes HE (hidroetidio), DCFH-DA (2,7' - Diclorofluoresceína diacetato) y mBcl (monoclorobimano), el inhibidor LY-294002, los quimioterápicos nocodazol, cicloheximida y doxorubicina, el detergente digitonina, los antioxidantes N-Acetil-cisteína (NAC) y Glutatión reducido etil éster permeable (GSH-MEE) y el anticuerpo anti-β-actina fueron comprados a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Los inhibidores de MEK (PD-98059), JNK (SP-600125) y p38-MAPK (SKF-86002), así como

el anticuerpo anti-Bak (Ab-1/TC-1) fueron obtenidos de Calbiochem (Darmstadt, Germany).

El ligando de muerte TRAIL fue cedido por el Dr. Abelardo López-Rivas (CABIMER, Sevilla) y la Ciclosporina A por el Doctor Juan Luis Santos (Unidad de pediatría del Hospital Virgen de las Nieves, Granada). El anticuerpo monoclonal anti-caspasa-8 fue obtenido de Cell Diagnostica (Munster, Germany), mientras que los anticuerpos monoclonales anti-caspasa-9 y anti-PARP fueron comprados a R&D Systems (Minneapolis, MN) y BD Biosciences (San Jose, CA), respectivamente. El anticuerpo policlonal de conejo anti-caspasa-3 fue de Stressgen (Ann Arbor, MI). Los anticuerpos monoclonales anti-Bcl_xL y anti-Bcl-2 se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) y Dako (Glostrup, Denmark), respectivamente. El catión DIOC6(3) (3,3'-Dihexiloxacarbocianina Iodide) fue obtenido de Molecular probes (Life Technologies, EU ,Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). El antioxidante Mn(III)TMPyP se compró en Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). El anticuerpo secundario, Alexa Fluor-488 anti-IgG murino se obtuvo de Molecular Probes (Invitrogen). Finalmente, el yoduro de propidio se obtuvo de los laboratorios Intron Biotechnology (South Korea) y la sonda fluorescente monoclorobimano (mBcl) se obtuvo de Sigma.

4. Análisis de la activación de Bak.

Las células Jurkat fueron cultivadas en placas de 24 pocillos a una concentración de 250.000 cels/ml/pocillo, durante 6, 8 o 24 h. Tanto los controles sin tratar como las células tratadas con B100S 50µg/ml, fueron lavadas en PBS y fijadas a RT en paraformaldehído al 0,25% durante 5 min.

Tras 3 lavados en 2ml de PBS cada muestra fue incubada, durante 30 min a RT y en oscuridad, con un anticuerpo anti-Bak, que reconoce el extremo N-terminal de esta proteína solo expuesto en su estado activo, utilizando FBS al 1% como bloqueante y digitonina a una concentración de 100µg/ml como agente permeabilizante. Posteriormente, se realizaron dos lavados en PBS y se incubó con un anticuerpo secundario Alexa Fluor-488 anti-IgG murino (Molecular Probes, Invitrogen) durante 30 min en hielo, agitación y oscuridad. Finalmente, las células fueron lavadas de nuevo y resuspendidas en 250µl de PBS para ser adquiridas en un citómetro BD FACScan o BD FACSCanto II (Becton Dickinson, San Jose, CA). La fluorescencia se midió en el canal FL2 y el análisis de la población en sub-G1 se realizó con el programa Cell Quest (BD Biosciences, San Jose, CA) o BD FACSDiva™ (Becton Dickinson, San Jose, CA), respectivamente.

5. Determinación del número de células apoptóticas.

Las células Jurkat/linfocitos T primarios fueron cultivados en placas de 24 pocillos a una concentración de 250.000 cels/ml/pocillo, en las que recibieron distintos tratamientos. El porcentaje de células apoptóticas se llevó a cabo en base a la tinción con ioduro de propidio, de acuerdo con el protocolo descrito por (Gong et al., 1994). Brevemente, las células fueron lavadas con 2ml de tampón fosfato salino (PBS) para posteriormente fijarse, durante 5 min en una solución con 100µl de PBS y etanol al 70% frío. Tras lavar el exceso de etanol, con 4ml de PBS, las células fueron resuspendidas en una solución con 250µl de buffer de extracción de ADN a la que se adicionaron 250µl de PBS. Después de una incubación de 10 min a 37°C, se realizó un lavado y se resuspendió en la solución de tinción (200µl PBS + RNAasa 100µg/ml + 2µl de IP 1mg/ml).

Se llevó a cabo una incubación de 30 min en completa oscuridad a 37°C tras la cual se adquirieron las células directamente en un citómetro BD FACScan o BD FACSCanto II (Becton Dickinson, San Jose, CA). La fluorescencia se midió en el canal FL2 y el análisis de la población en sub-G1 se realizó con el programa Cell Quest (BD Biosciences, San Jose, CA) o BD FACSDiva™ (Becton Dickinson, San Jose, CA) en función del tipo de citómetro utilizado.

6. Inmunodetección de proteínas mediante western blot.

Las células control y tratadas durante 8h con B100S (50 µg/ml) fueron lavadas en PBS y lisadas en soluciones de distinta composición en función de la localización de la proteína a detectar.

Para la detección de proteínas citosólicas, las células se incubaron durante 30 min en hielo con 100 µl de buffer de lisis (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl y NP-40 al 1%). Los sobrenadantes citosólicos se separaron por centrifugación durante 10 min a 13000g y se les añadió tampón de carga.

Para el análisis de proteínas localizadas en el núcleo, como PARP, se lisaron las membranas celulares mediante congelación y descongelación de las células resuspendidas en PBS/RIPA buffer, se añadió tampón de carga y se procedió a la sonicación para obtener extractos totales.

En todos los casos las proteínas se cuantificaron por el método Bradford (Sigma) antes de añadir el tampón de carga, buffer Laemmli compuesto por Tris 2 M pH 6.8, urea 6 M, B-mercaptoetanol 6%, azul de bromofenol 0.003% y SDS al 3%.

Las proteínas se separaron en geles de SDS-poliacrilamida (Bio-Rad) al 7.5%, 10% ó 12%, en función del tamaño de la proteína a detectar, en el sistema Mini Protean (Bio-Rad) durante 80 min a 140 voltios. Una vez separadas las proteínas por tamaño se transfirieron desde el gel a una membrana de PVDF (Millipore) por transferencia semiseca empleando el sistema Trans-Blot SD (Bio-Rad) durante 50 min a 50 mA.

La membrana se bloqueó con una solución de PBS / 0.1% Tween 20 (PBSt) con 5% de leche en polvo durante 1 hora a temperatura ambiente, tras lo cual se lavó con PBSt antes de incubar durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C con el anticuerpo frente a la proteína a detectar, diluido en PBSt con 1% de leche. Tras la incubación, se lavó la membrana 5 minutos tres veces con PBSt y finalmente se incubó durante otra hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (frente a Ig de ratón o de conejo según el caso) marcado con peroxidasa de rábano (HRP), preparado en solución de bloqueo.

Tras otros tres lavados de 5 minutos con PBSt, la membrana se reveló por quimioluminiscencia empleando el reactivo ECL (Amersham Biosciences), quedando la señal recogida en un equipo de captura y análisis digital de imagen Fujifilm LAS-4000 y analizadas con el programa Multi-Gauge.

7. Determinación de la producción de anión superóxido y la caída de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).

Para la determinación de los niveles de O_2^- y $\Delta\Psi_m$ se utilizó una doble tinción con HE y DIOC₆. La sonda fluorescente hidroetidio/dihidroetidina (HE), tras penetrar al interior de la célula, reside en el citoplasma emitiendo fluorescencia azul (en condiciones no oxidantes), mientras que en presencia de O_2^- se oxida rápidamente a etidio intercalándose en el ADN y emitiendo fluorescencia roja (E+). Para la excitación de la misma se utilizó un láser de argón de 488nm y un filtro de pico de emisión de 590nm fue utilizado para su detección. El hidroetidio puede ser oxidado por otras ROS celulares tales como el peróxido de hidrógeno, HOCl o ONOO⁻. No obstante, y dado que dicha oxidación es mucho más lenta que la llevada a cabo por el anión superóxido, cuando la adquisición se lleva a cabo a tiempos cortos esta sonda proporciona una fluorescencia específicamente producida por dicho anión.

La determinación del potencial de membrana mitocondrial se llevó a cabo con el catión lipofílico 3,3'-Dihexiloxacarbocianina iodide (DIOC6(3)) para el que la célula es completamente permeable.

Este catión se incorpora a la mitocondria en función del estado energético de la misma emitiendo fluorescencia verde (483-488nm). Un total de 250.000 células fueron incubadas durante 20 min en oscuridad a 37°C y 5% de CO₂ en 250 µl de medio de cultivo RPMI, sin FBS, conteniendo HE (2µM) y DIOC6(3) (10nM). Posteriormente las muestras fueron adquiridas en un citómetro BD FACSCanto II (Becton Dickinson, San Jose, CA) utilizando los canales FL-1 y FL-2 respectivamente.

Los correspondientes análisis cuantitativos se realizaron con el software BD FACSDiva™(Becton Dickinson, San Jose, CA). En el caso de que se utilizasen antioxidantes, los pre-tratamientos con los mismos siempre fueron de 1h, la NAC se utilizó a una concentración final de 10µM, el GSH a 25mM y la porfirina de manganeso Mn(III)TMPyP se usó a una concentración final de 50 µg/ml.

8. Determinación de la producción de peróxido de hidrógeno.

Los niveles de H₂O₂ fueron determinados utilizando 2,7' - Diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA) Sigma-Aldrich (St.Louis, MO). El diacetato de diclorofluoresceína penetra en la célula donde es hidrolizado a diclorofluoresceína que queda atrapada en el interior celular, gracias a su baja permeabilidad, donde es oxidada, principalmente por peróxido de hidrógeno, emitiendo fluorescencia en verde. Un total de 250.000 células fueron sembradas en placas de 24 pocillos con el EPS B100S e incubadas durante 30 minutos con DCFH-DA (10µM) , en oscuridad y a 37°C.

Posteriormente las muestras fueron lavadas dos veces con 2ml de PBS y resuspendidas en 250µl de este buffer salino para ser adquiridas en un citómetro de flujo FACScan y analizadas con el software Cell Quest (BD Biosciences, San Jose, CA). La excitación se llevo a cabo a 504nm y la fluorescencia se midió en FL-2 (529nm).

9. Cambios en el contenido intracelular de glutatión (GSH_i)

Las células Jurkat fueron cultivadas en placas de 24 pocillos a una concentración de 250.000 cels/ml/pocillo, durante 0, 2, 4, 6, 8 o 24 h. Tanto los controles sin tratar como las células tratadas con B100S 50µg/ml fueron lavadas en PBS y teñidas, durante 15 min, con monoclorobimano 10µM (mBCL) (Life Technologies, EU, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). Esta sonda no emite fluorescencia hasta que se conjuga con tioles de bajo peso molecular intracelulares como el GSH o la N-acetilcisteína.

Los aductos formados por la unión del mBCL al GSH emiten fluorescencia a una longitud de onda de 490nm, tras ser excitados a 394 nm, por lo que la adquisición se llevó a cabo con un filtro de 440/40 tras la excitación de las muestras con un laser ultravioleta (UV) de 405nm, en un sorter BD FACSAria™(Becton Dickinson, San Jose, CA). Los correspondientes análisis se realizaron con el software BD FACSDiva™(Becton Dickinson).

10. Micro-array de genoma completo.

El array se llevó a cabo con las líneas celulares Jurkat (leukemia T) y PA-1 (teratocarcinoma ovárico humano), sin tratar o tratadas con el EPS B100S a una dosis de 50µg/ml.

Se realizaron triplicados de cada una de las condiciones y 4h o 6h después del tratamiento se recogieron las muestras, junto a sus respectivos controles, para ser sometidas a un análisis de expresión de genoma completo en una plataforma de microarray de alto rendimiento (High resolution C scanner (Agilent Technologies, EEUU). El ARNm fue aislado utilizando RNeasy Mini Kit /Qiagen, Spain) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. La calidad del ARN aislado fue determinada con un NanoDrop (Thermo, Spain) y con un Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Spain). Solo se procesaron aquellas muestras que presentaban una ratio A260/A280 entre 1,8 y 2,1, y cuya ratio 28S/18S estuviese entre 1,5 y 2. La preparación de las muestras y la hibridación del Micoarray en la plataforma High resolution C scanner (Agilent Technologies, EEUU) fueron llevados a cabo por el grupo de citogenética y biología molecular del Banco Andaluz de Células Madre. Los datos fueron procesados, normalizados y corregidos con el software High Resolution Microarray Scanner Scan Control 8.5.1 (Agilent Technologies, EEUU).

Para la identificación de los cambios más significativos en la expresión génica, los datos obtenidos del microarray fueron filtrados tomando logaritmos en base 2 de todas las ratios tratamiento con B100S/ausencia de tratamiento. Para considerar que un gen presentaba diferencias de expresión (tratamiento vs ausencia de tratamiento) se estableció que la ratio debía de ser superior a 2 para los genes upregulados cuya expresión se incrementase e inferior a 2 para aquellos downregulados en los que disminuyese la expresión, y el p-valor debía de ser inferior a 0,05. El análisis de vías celulares se llevo a cabo con la herramienta GeneSpring pathways analysis, que permite agrupar aquellos genes con cambios en su expresión dentro de vías celulares concretas mediante un análisis de enriquecimiento funcional. Se tomó como backgorund una lista de 13.500 genes cuya expresión variaba entre la línea de células Jurkat con cualquier p-valor y índice de regulación.

VI. RESULTADOS

Datos previos demostraron que el EPS B100S era capaz de inducir apoptosis en diversas líneas celulares tumorales del linaje hematopoyético siendo especialmente activo sobre las líneas leucémicas T CEM-6, MOLT-4 y Jurkat. Así mismo, pudimos observar que no resultaba tóxico para los linfocitos de sangre periférica extraída de pacientes sanos. Teniendo en cuenta estos datos decidimos determinar cuál era la principal vía de inducción de apoptosis utilizada por este EPS, así como ,caracterizar los componentes de la misma.

1. Caracterización de la vía utilizada por el EPS B100S para inducir apoptosis en células Jurkat.

La cinética de activación de caspasas inducida por B100S en células Jurkat determinó que en primer lugar se producía la activación de la caspasa-9, a las 4 h de tratamiento, seguida por las caspasas -8 y -3 cuyos cortes se podían detectar, mediante inmunoblot, 6 horas después de adicionar el EPS B100S en el cultivo (Ruiz-Ruiz et al., 2011). Para determinar cual era la vía de inducción de apoptosis utilizada por el exopolisacárido B100S, decidimos analizar una serie de eventos mitocondriales característicos de la vía intrínseca.

1.1. B100S provoca la activación de la proteína pro-apoptótica Bak en células Jurkat.

Dado que la activación y formación de poros en la MME llevada a cabo por los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl2, Bax y Bak, es un evento crucial en la vía intrínseca de inducción de apoptosis (Dewson and Kluck, 2009; Dewson et al., 2009; Leshchiner et al., 2013) , decidimos determinar el estado de activación de las mismas.

Dado que nuestras células Jurkat carecen de Bax (Ruiz-Magana et al., 2012) estudiamos la activación de la proteína pro-apoptótica Bak. Para ello, se realizó una cinética de activación mediante citometría de flujo, utilizando un anticuerpo anti-Bak que se une al extremo N-terminal de dicha proteína, cuando los cambios conformacionales que sufre esta, durante su activación, muestran el mencionado epítipo no accesible en la forma inactiva (Griffiths et al., 1999; Nechushtan et al., 1999).

La cinética, representada en la figura 1, indica que se produce una activación temprana de Bak a las 6 horas de tratamiento. No obstante, y dado que esta proteína participa en las fases iniciales del proceso apoptótico mitocondrial, a medida que avanza el tratamiento sus niveles de activación descienden hasta regresar a un estado basal a las 24h, cuando se detectan los mayores porcentajes de apoptosis. Es probable que al haber finalizado la fase de demolición celular ya no se pueda detectar la fluorescencia debida al anticuerpo a las 24 h de tratamiento.

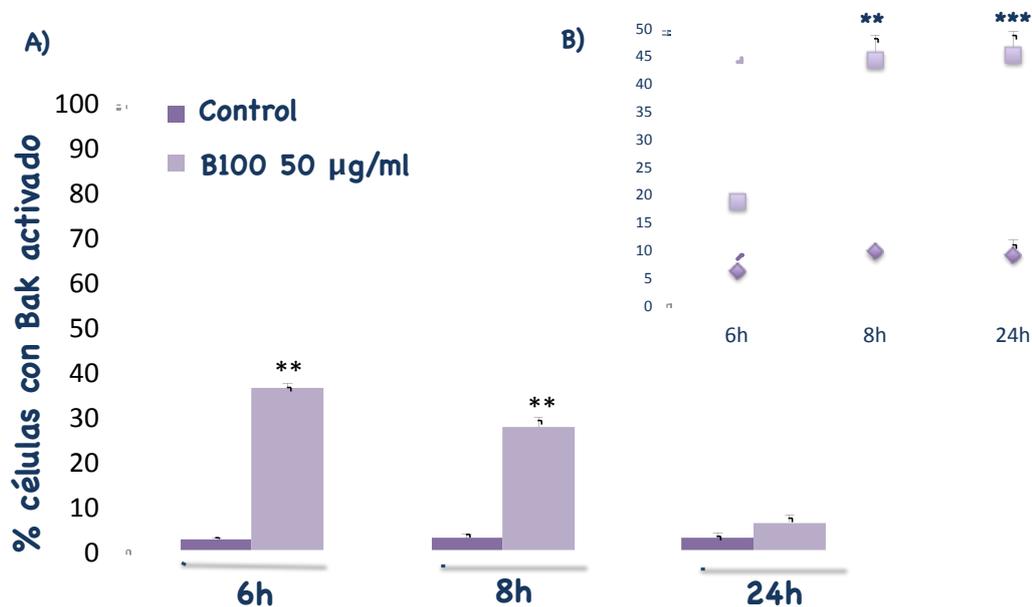


Figura 1. Cinética de activación de Bak y apoptosis en respuesta al tratamiento con B100S. A) Las células Jurkat fueron tratadas con el EPS B100S a la dosis 50µg/ml y a los tiempos indicados (6h, 8h y 24h), se determinó, mediante citometría de flujo, el porcentaje de células que presentaban activación de Bak. B) Determinación del número de células apoptóticas tras el tratamiento con el EPS B100S a una concentración de 50µg/ml durante los tiempos indicados. Se muestran las medias correspondientes a 4 experimentos independientes, las barras de error muestran la SD de los mismos y los asteriscos hacen referencia a los valores obtenidos tras el cálculo de la t de Student al comparar las células tratadas respecto a los controles sin tratar (*p< 0,05; ** p< 0,005 y *** p< 0,001).

1.2. La sobreexpresión de las proteínas anti-apoptóticas, Bcl-2 y Bcl-xL protege a las células Jurkat de la apoptosis inducida por B100S.

La sobreexpresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL protege frente a la apoptosis desencadenada por numerosos estímulos en diferentes sistemas experimentales (Panaretakis et al., 2002). La función principal de ambas proteínas es impedir el desarrollo del proceso apoptogénico, a través de la vía intrínseca, obstaculizando la permeabilización de la MME llevada a cabo por Bax y Bak. Para avanzar en el estudio de la participación de la vía mitocondrial en la inducción de apoptosis llevada a cabo por B100S sobre células Jurkat, se sobreexpresaron los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2: Bcl-2 y Bcl-xL.

Para ello, se utilizaron células Jurkat transfectadas con el vector de expresión pCDNA3 vacío (control) o portando el cDNA del gen Bcl-2 o Bcl-xL (Boix et al., 1998), comprobándose los niveles de expresión de cada una de estas proteínas en las líneas correspondientes mediante western blot (figura 2). La sobreexpresión de Bcl-2 y Bcl-xL en la población global de células transfectadas no fue muy elevada (figura 2A), por lo que ambos tipos de células fueron sometidos a un proceso de clonación por dilución límite con el objeto de obtener poblaciones celulares con una alta expresión de dichas proteínas antiapoptóticas (figura 2 B y C).

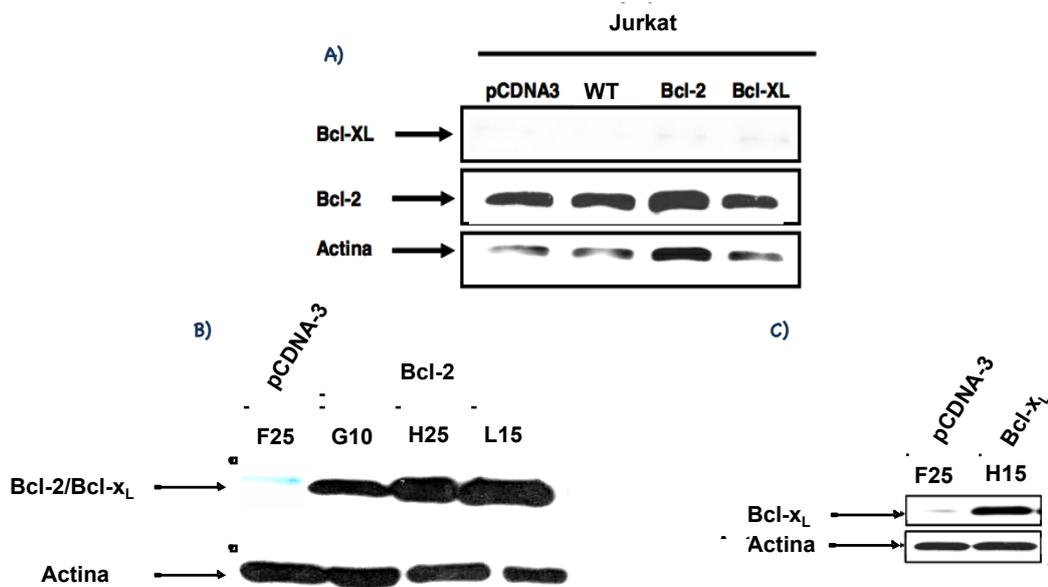


Figura 2. Determinación de los niveles de expresión de Bcl-2 o Bcl-xL en células Jurkat sobreexpresando dichas proteínas. A) Determinación de los niveles de expresión de Bcl-2 y Bcl-xL en células Jurkat, transfectadas con vectores de expresión portando el cDNA de estas proteínas, mediante Western- blot. A) Niveles de expresión previos al subclonaje por dilución límite. Se comparan los niveles de expresión de sendas proteínas con respecto a la línea parental JHM1 (no transfectadas). Las células control (pCDNA), transfectadas con el vector vacío (primer carril), o con los vectores de expresión pCDNA3Bcl-2 (tercer carril) y pCDNA3/Bcl-xL (cuarto carril); B y C) Niveles de expresión tras el subclonaje. Las células control (pCDNA), transfectadas con el vector vacío, nos muestran los niveles basales de expresión de estas proteínas en células Jurkat (primer carril en ambas figuras). Los niveles de β -actina se muestran como control de carga.

Una vez obtenidos los diferentes clones celulares, estos fueron sometidos a un tratamiento de 24h con diferentes dosis del EPS B100S, cuyos resultados se muestran en la figura 3.

Tal y como se puede observar, la sobreexpresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL protege a las células Jurkat de la apoptosis inducida por el EPS B100S a todas las dosis. Además, dicha protección se correlaciona directamente con los niveles de expresión de ambas proteínas, de forma que, cuanto mayor es la expresión de Bcl-2 o Bcl-xL en las líneas, mayor es la protección que estas experimentan. Así, la línea control no transfectada (pCDNA-3) es la que mayores porcentajes de apoptosis presenta, mientras que las líneas Bcl-2 (H25 y L15) y Bcl-xL (H15), con niveles de expresión muy elevados, muestran una completa inhibición del proceso apoptótico, con porcentajes de apoptosis, en ocasiones, incluso inferiores a los obtenidos en la línea control sin tratar.

Sin embargo, el clon G10, en el que se detecta un nivel de expresión intermedio de Bcl-2, presenta un porcentaje de apoptosis intermedio entre el obtenido en las células control (pCDNA-3) y los clones H25, L15 y H15.

Se utilizó doxorubicina como control positivo ya que se trata de una droga genotóxica que induce apoptosis por la vía mitocondrial y, por tanto, estos clones deberían de estar protegidos frente a la acción de la misma (Kaufmann and Earnshaw, 2000).

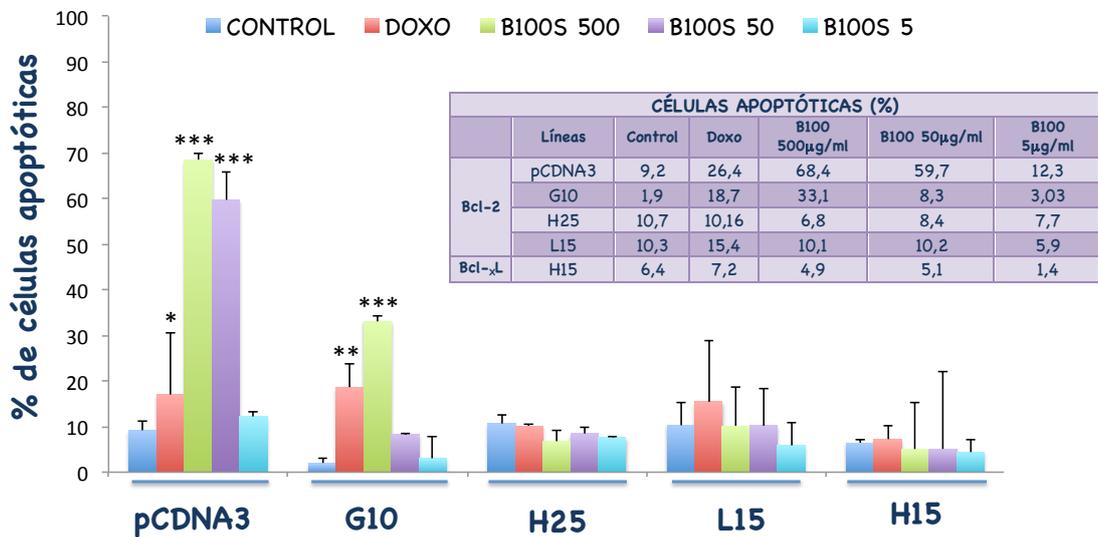


Figura 3. La sobreexpresión de Bcl-2 o Bcl-xL protege a las células Jurkat de la apoptosis inducida por B100S. Las células Jurkat transfectadas con el vector vacío (pCDNA3), el vector pCDNA3 portando cDNA de Bcl-2 (G10, H25 y L15) o de Bcl-xL (H15) fueron tratadas durante 24h con las dosis de 500µg/ml, 50µg/ml y 5µg/ml del EPS B100S (indicadas en la leyenda) o con Doxorubicina (500ng/ml). El porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante tinción con yoduro de propídeo (sub-G1) en un citómetro de flujo. Las medias corresponden, al menos, a 3 experimentos independientes, las barras de error muestran la SD de los mismos y los asteriscos hacen referencia a los valores obtenidos tras el cálculo de la t de Student al comparar las células tratadas respecto a los controles sin tratar (*p< 0,05; ** p< 0,005 y *** p< 0,001). También se muestra en la tabla los datos correspondientes a los porcentajes medios de apoptosis en forma de tabla. Los niveles de expresión de ambas proteínas anti-apoptóticas se confirmaron, mediante inmunoblot, en el momento en el que se realizaron los experimentos de apoptosis.

Con el propósito de determinar cuáles eran los umbrales de expresión de ambas proteínas a los que se producía la mencionada protección utilizamos células con niveles de expresión intermedios y bajos de Bcl-2 y Bcl-xL.

También quisimos comprobar si se producía activación de caspasas iniciadoras, como la caspasa-8, y efectoras, como la caspasa-3 en las líneas Bcl-2 (L15) y Bcl-xL (H15) y establecer una comparación con respecto a las células control no tratadas (pCDNA3) y el clon D25, que expresa niveles bajos de Bcl-2 (figura 4, western encuadrado). Para ello, sometimos a las diferentes líneas a un tratamiento de 8 horas con la dosis intermedia del EPS B100S (50µg/ml), pudiendo comprobar que solo se producía corte de las mencionadas caspasas y degradación de PARP en el control transfectado con el vector vacío y en el clon Bcl-2 D25 (figura 4).

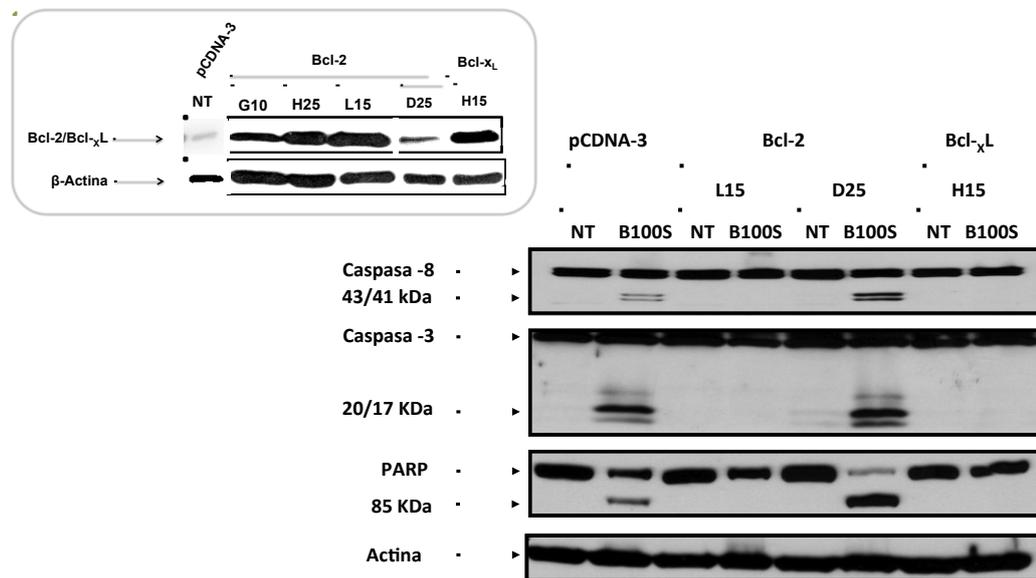


Figura 4. La sobreexpresión de Bcl-2 o Bcl-xL bloquea la activación de caspasas iniciadoras y efectoras inducida por B100S en células Jurkat. Las células Jurkat transfectadas con el vector vacío (pCDNA3), el vector pCDNA3 portando el cDNA Bcl-2 (D25 y L15) y Bcl-xL (H15) o de Bcl-xL (H15) fueron tratadas durante 8h con las dosis de 50µg/ml del EPS B100S. Se obtuvieron extractos citosólicos que fueron estudiados por western blot para la detección del corte de las caspasas-8 y -3 o de la proteína nuclear PARP (diana de la caspasa-3) utilizando anticuerpos específicos para cada una de ellas. Las bandas observadas corresponden a los fragmentos resultantes del procesamiento de estas proteínas: caspasa-3 (20 y 17 kDa), caspasa-8 (43 y 41 kDa) y PARP (85 kDa). También se muestran los niveles de expresión de Bcl-2 (26 kDa) y Bcl-xL (30 kDa) de cada una de las líneas en el western blot encuadrado en un recuadro negro. Como control de carga se utilizó β-actina.

Dada la gran importancia que tiene la activación de Bak en la inducción de apoptosis por la vía intrínseca, decidimos determinar si B100S era capaz de activar a esta proteína pro-apoptótica, incluso cuando se sobreexpresaban las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL.

En la figura 5 se puede comprobar como tras el tratamiento con B100S se produce activación de Bak en la línea control (pCDNA3) pero esta no tiene lugar, o es muy débil, en las líneas que sobreexpresan las proteínas anti-apoptóticas indicadas.

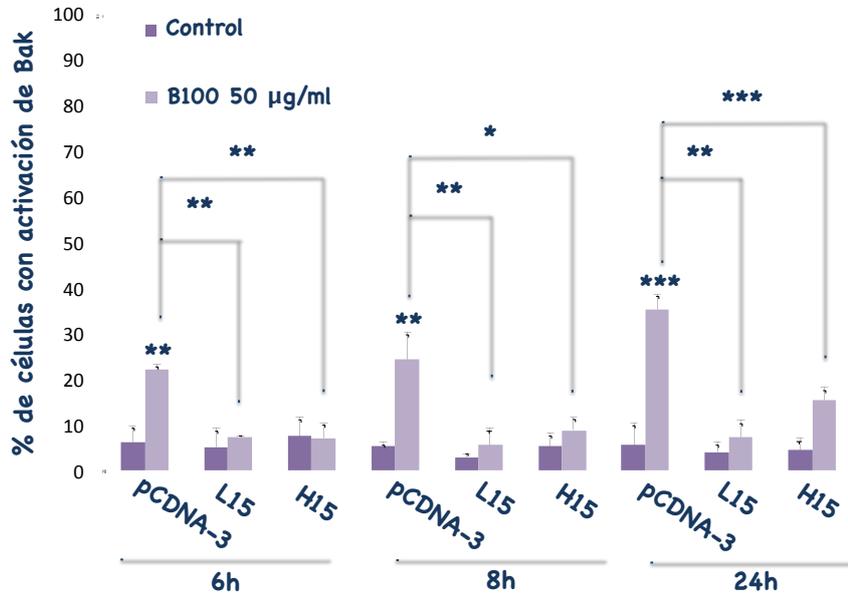


Figura 5. La sobreexpresión de Bcl-2 o Bcl-xL bloquea la activación de Bak inducida por B100S en células Jurkat. Las células Jurkat transfectadas con el vector vacío (pCDNA3), el vector pCDNA3 portando el cDNA Bcl-2 (L15) o Bcl-xL (H15) fueron tratadas durante 8h con las dosis de 50µg/ml del EPS B100S. El porcentaje de células con activación de Bak se determinó, mediante citometría de flujo, utilizando un anticuerpo frente a esta proteína esta activa. Se muestran las medias correspondientes a 3 experimentos independientes. Las barras de error muestran la SD de los mismos y los asteriscos hacen referencia a los valores obtenidos tras el cálculo de la t de Student al comparar las células tratadas respecto a los controles sin tratar (*p< 0,05; ** p< 0,005 y *** p< 0,001).

1.3. La ausencia de caspasa-9 protege a las células Jurkat de la apoptosis inducida por B100S.

Dado que el corte de la caspasa iniciadora -8 puede ser llevado a cabo por diversas caspasas efectoras y teniendo en cuenta que la activación de la caspasa-9 es un evento crucial en el vía intrínseca de inducción de apoptosis, decidimos estudiar el posible efecto del EPS B100S sobre una línea de células Jurkat que carecía de la mencionada caspasa (clon denominado Jurkat w/o C₉). Como control positivo se utilizó la misma línea de células reconstituida, mediante electroporación, con un vector que portaba el cDNA de la pro-caspasa-9 unido a una cola Flag en su

extremo N-terminal (clon Jurkat C₉) (ver materiales y métodos) y las células Jurkat JHM1.

Las tres líneas, Jurkat, w/o C₉, Jurkat C₉ y Jurkat fueron tratadas con la dosis indicadas de EPS B100S, comprobando que el proceso apoptogénico inducido por este exopolisacárido estaba totalmente inhibido en ausencia de caspasa-9 (Figura 6). La línea jurkat C₉, en la que se había reconstituido la expresión de dicha caspasa, demostró tener una sensibilidad intermedia a la apoptosis, inducida por este EPS, al ser comparada con la línea deficiente y con las Jurkat utilizadas de referencia por nuestro grupo. Estos datos demuestran la gran importancia que tiene la activación de la caspasa-9 en el proceso apoptogénico disparado por el EPS B100S en células Jurkat.

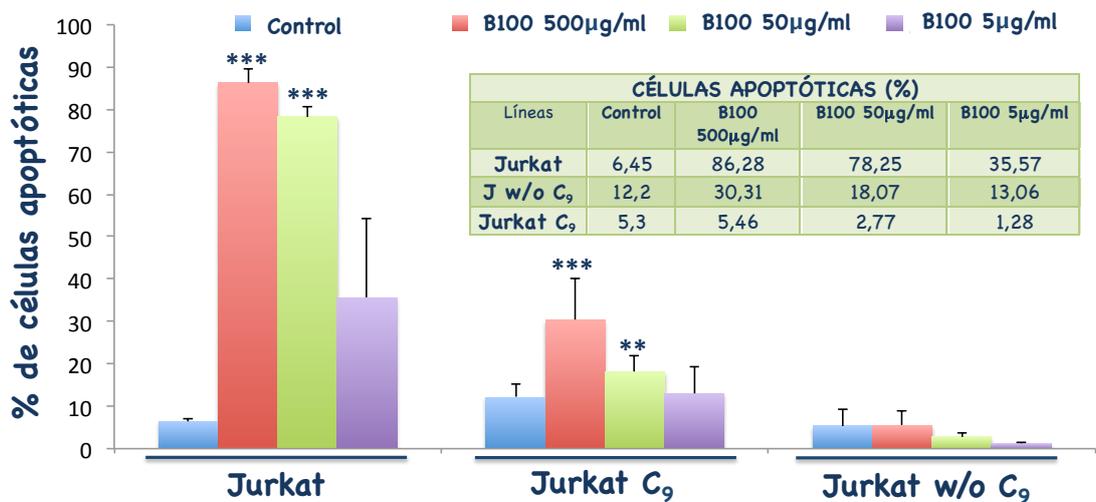


Figura 6. La ausencia de caspasa-9 bloquea la apoptosis inducida por B100S en células Jurkat.

Las células Jurkat deficientes en caspasa 9 (Jurkat, w/o C₉), las reconstituidas con el cDNA de la pro-caspasa-9 y las utilizadas como referencia por nuestro laboratorio fueron tratadas con las dosis indicadas de EPS B100S durante 24h, tras las cuales se determinó el porcentaje de células apoptóticas mediante tinción con yoduro de propídeo (sub-G1), utilizando un citómetro de flujo. Los resultados corresponden a las medias de 2 experimentos independientes, las barras de error muestran la SD de los mismos y los asteriscos hacen referencia a los valores obtenidos tras el cálculo de la t de Student al comparar las células tratadas respecto a los controles sin tratar (*p< 0,05; ** p< 0,005 y *** p< 0,001). También se muestran los datos numéricos correspondientes a los porcentajes medios de apoptosis en forma de tabla

1.4. El EPS B100S provoca la caída del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y producción de especies reactivas del oxígeno.

La permeabilización de la MME perturba la integridad de las membranas mitocondriales, desencadenando una caída del $\Delta\Psi_m$, producción de ROS y liberación al citosol de factores pro-apoptóticos del espacio intermembrana (revisado por (Heath-Engel and Shore, 2006)). Por otro lado, se ha descrito que las ROS actúan como mediadores bioquímicos del proceso apoptótico y numerosas drogas inducen apoptosis en distintos sistemas, al menos parcialmente, a través de la producción de las mismas, especialmente O_2^- y H_2O_2 (Cai et al., 2008; Circu and Aw, 2010; Sinha et al., 2013).

Dado que, tanto la disipación del potencial $\Delta\Psi_m$ como la producción de ROS son eventos estrechamente ligados a la apoptosis que tiene lugar a través de la vía mitocondrial, decidimos estudiar la dinámica de ambos acontecimientos en el proceso apoptogénico desencadenado por B100S en células Jurkat. Para la determinación del $\Delta\Psi_m$ se utilizó DIOC₆ un catión lipofílico fluorescente que se incorpora a la mitocondria en función del estado energético de la misma, mientras que la producción de O_2^- se llevó a cabo con la sonda fluorescente dihidroetidina (HE) que tras ser oxidada por el anión superóxido emite fluorescencia roja. Por tanto, los descensos en el $\Delta\Psi_m$ se observarán como una caída de la fluorescencia verde debida al DIOC₆ y la producción de ROS como un aumento de la fluorescencia roja.

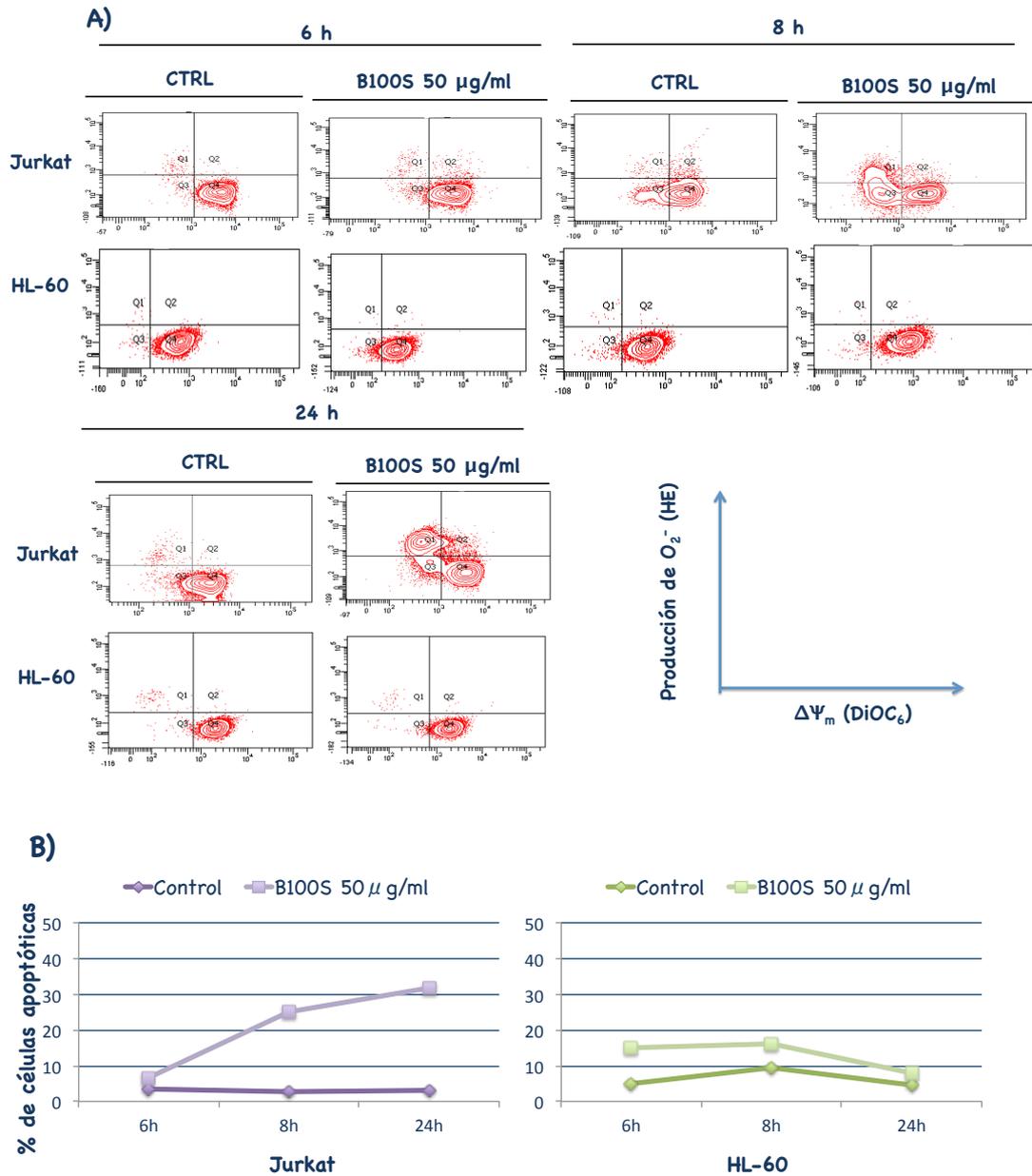


Figura 7. El EPS B100S induce caída del potencial $\Delta\Psi_m$, producción de ROS y apoptosis en células Jurkat pero no en células HL-60. Las líneas tumorales Jurkat y HL-60 fueron tratadas con una dosis intermedia del EPS B100S (50 μ g/ml) durante los tiempos indicados, tras los cuales se evaluó la producción de O₂⁻, la caída del $\Delta\Psi_m$ y el porcentaje de células apoptóticas. La producción de O₂⁻ se determinó utilizando una sonda fluorescente específica (HE), para detectar la caída del $\Delta\Psi_m$ se utilizó el catión lipofílico (DiOC₆) y el porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante tinción con yoduro de propidio (sub-G1). La detección de cada uno de estos parámetros se llevo a cabo en un citómetro de flujo, tal y como se indica en el apartado materiales y métodos. En la figura A se muestra una cinética representativa de varios experimentos, los paneles superiores corresponden a la línea de células tumorales Jurkat, mientras que, los paneles inferiores corresponden a la línea HL-60. B) Porcentaje de células apoptóticas correspondiente a la cinética representativa de la figura A, ambas determinaciones se realizaron en paralelo.

En la **figura 7** se muestran los resultados correspondientes a la cinética de producción de especies reactivas del oxígeno, caída del $\Delta\Psi_m$ (**7A**) y apoptosis (**7B**) desencadenada por el EPS B100S en células T leucémicas (Jurkat) y en la línea de leucemia promielocítica HL-60. Tal y como se puede ver, B100S induce una despolarización de la membrana mitocondrial, en células Jurkat, a las 8h de tratamiento. Esta despolarización parece preceder a la producción de O_2^- , dado que 8 horas después de adicionar el exopolisacárido, la caída de $\Delta\Psi_m$ es superior a la producción de anión super-óxido. Sin embargo, ninguno de estos eventos puede ser detectado en la línea HL-60 puesto que el EPS B100S induce una apoptosis muy leve en la misma. Por tanto, estos datos parecen indicar que la producción de ROS y la caída del $\Delta\Psi_m$ son eventos importantes y específicos de la inducción de apoptosis llevada a cabo por este polímero.

2. Implicación de los cambios mitocondriales producidos por el EPS B100S en la inducción de apoptosis en células Jurkat.

2.1. Caracterización de la producción de ROS en la apoptosis inducida por el EPS B100S en células Jurkat.

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) pueden producirse como consecuencia del proceso apoptótico, pueden colaborar en la ejecución del mismo y también desencadenar apoptosis en respuesta a diversas drogas quimioterapéuticas. Por tanto, determinar la cinética de producción de ROS y la importancia relativa de estos, en el proceso apoptogénico dirigido por el exopolisacárido B100S, es importante para caracterizar los mecanismos utilizados por este EPS.

Tal y como ya se indicó, la producción de O_2^- en nuestro sistema se detectaba con posterioridad a la caída del $\Delta\Psi_m$, observándose niveles altos en las etapas finales del proceso apoptótico, cuando los porcentajes de apoptosis eran máximos, a las 24 horas de tratamiento (figura 7). No obstante, en las etapas iniciales del proceso apoptótico la célula conserva su capacidad antioxidante y dado que el anión superóxido tiene una vida media muy corta, y suele ser rápidamente dismutado a peróxido de hidrógeno (Freeman and Crapo, 1982), decidimos estudiar la producción de H_2O_2 tras el tratamiento con B100S. La cinética de producción de H_2O_2 en células Jurkat demuestra que las especies reactivas del oxígeno comienzan a producirse al inicio del tratamiento, en etapas extremadamente tempranas del mismo (figura 8 A). Por tanto, parece que el EPS B100S dirige una acumulación de peróxido de hidrógeno casi inmediata, resultado de la dismutación del anión superóxido. Los niveles de H_2O_2 descienden, por debajo de los encontrados en las células sin tratar, a las 8 horas de tratamiento, momento en el que se comienza a detectar una producción de O_2^- que pasa de un 1,3% (6 h) a un 8,9%. (figura 7 y 8 B).

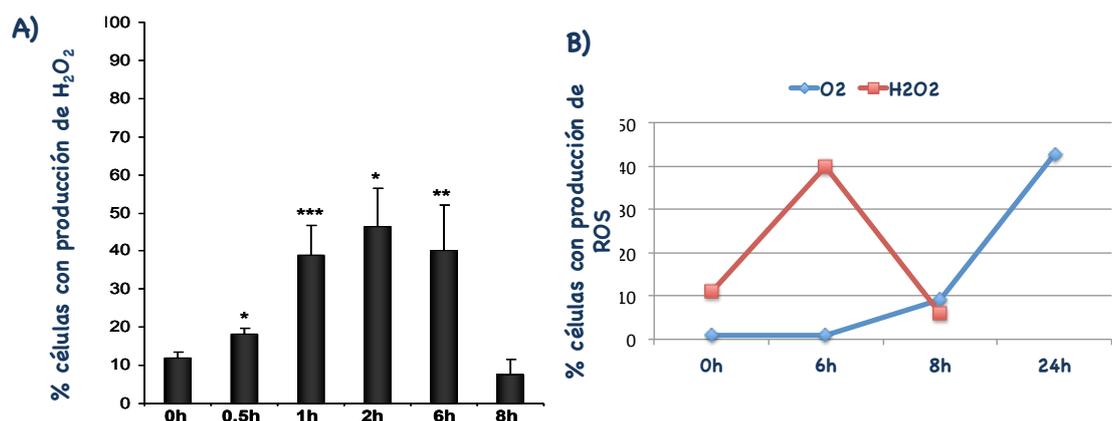


Figura 8. Cinética de la producción de H_2O_2 inducida por el EPS B100S en células Jurkat. Las células fueron tratadas a los tiempos indicados con una dosis intermedia del EPS B100S (50 μ g/ml). La producción de H_2O_2 se llevó a cabo, mediante citometría de flujo, utilizando la sonda fluorescente DCFH-DA, tal y como se describió en los materiales y métodos. El gráfico representa el porcentaje de células con una elevada producción de peróxido de hidrógeno. Los resultados corresponden a las medias de 3 experimentos independientes, las barras de error muestran la SD de los mismos y los asteriscos hacen referencia a los valores obtenidos tras el cálculo de la t de Student al comparar las células tratadas respecto a los controles sin tratar (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ y *** $p < 0,001$). B) Cinética de producción de DCFH-DA y O_2^- en células Jurkat.

2.2. El EPS B100S provoca depleción de los niveles intracelulares de glutatión (GSH).

La depleción del GSH intracelular es un fenómeno común durante la apoptosis, marcando la progresión de este proceso (Franco et al., 2007; Franco et al., 2009; Ortega et al., 2011). Además, el balance GSH/GSSG ofrece una buena medida del estrés oxidativo celular (Krebs and Gascoyne, 1968; Rebrin and Sohal, 2004). Por tanto, estudiamos la evolución del GSH_i durante la apoptosis inducida por B100S en células Jurkat (figura 9). La variación de los niveles de GSH_i se determinó utilizando una sonda, conocida como monoclorobimano (mBCl), que forma aductos con el GSH intracelular. Así, las células con niveles reducidos de este tiol presentarán una menor fluorescencia que aquellas cuyos niveles de GSH no se hayan deplecionado.

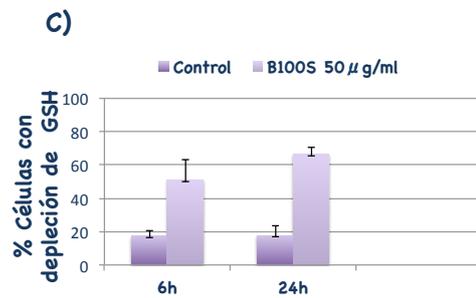
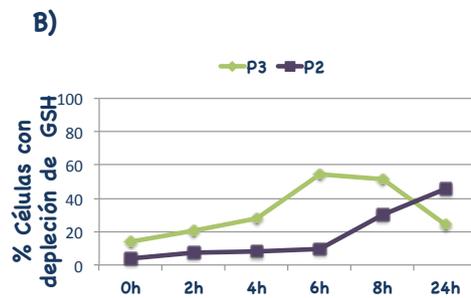
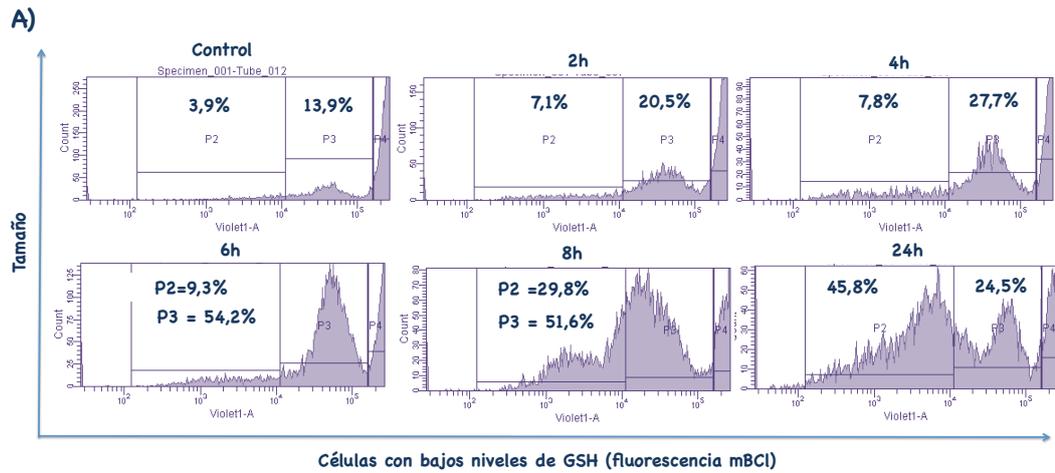


Figura 9. Cambios en los niveles de GSH intracelulares (GSH_i) durante la apoptosis inducida por el EPS B100S en células jurkat. Las células fueron tratadas a los tiempos indicados con una dosis media del EPS B100S ($50\mu\text{g/ml}$). La caída del GSH_i total fue determinada mediante la sonda fluorescente monoclorobimano (mBCL), tal y como se describe en el apartado materiales y métodos. A) Citometría representativa de 2 experimentos independientes. B) Cuantificación de la cinética mostrada en la figura A. C) Determinación del número de células con niveles bajos de GSH_i (P2+P3) a las 6 y 24h de tratamiento con B100S. Los resultados corresponden a las medias de 2 experimentos independientes, las barras de error muestran la SD de los mismos.

En el panel 9 A se muestra la citometría de la caída del GSH_i con el tiempo. A medida que avanza el tratamiento con B100S se observan 3 poblaciones, que a las 6h ya están claramente definidas. Las células con niveles óptimos de GSH_i constituyen la población denominada P4, aquellas células en las que el GSH_i comienza a caer conforman la población P3 y, por último, la población P2 estaría formada por células con depleción severa (figura 9 A). La población P4 sufre un descenso progresivo a lo largo del tratamiento cayendo por debajo del 30% cuando este toca a su fin.

No obstante, la población P3, con niveles intermedios de este tiol, crece en las etapas iniciales del proceso apoptogénico, hasta alcanzar un porcentaje máximo (54,2%) a las 6h de tratamiento, dando lugar a la población P2 a partir de este momento (figura 9 A, B y C). P2 comienza a crecer a las 6h de alcanzando su porcentaje máximo (45,8%) a las 24h de tratamiento, cuando la población P3 ya ha descendido significativamente (figura 9 B). Por tanto, el exopolisacárido B100S produce una caída progresiva de los niveles de GSH_i que, además, correlaciona con la cinética de ROS.

2.3. El antioxidante N-Acetil-Cisteína protege parcialmente a las células Jurkat de la apoptosis inducida por el EPS B100S.

La N-Acetil-Cisteína (NAC) es un derivado del aminoácido cisteína que contiene azufre y actúa como precursor en la síntesis de GSH. La NAC penetra al interior celular mediante transporte directo, donde será deacetilada para servir como fuente de cisteína y depurador de ROS (Kowaltowski et al., 1998).

La producción de GSH tiene lugar en dos pasos, el enzima γ -glutamylcistein sintetasa cataliza la unión de L-glutamato y cisteína para formar un dipéptido sobre el que actúa entonces el enzima GSH sintetasa catalizando la adición de glicina. Dado que la primera, de estas dos reacciones es la que va a limitar la síntesis de glutatión celular, la NAC proporcionará cisteína suficiente como para que la síntesis de este tiol no se detenga y pueda eliminar los peróxidos producidos por el EPS B100S en células Jurkat.

Para determinar si la producción ROS es crítica en la inducción de apoptosis por el polímero B100S pre-tratamos las células Jurkat con NAC 10 μ M durante 1h, antes de añadir el EPS B100S a una concentración de 50 μ g/ml.

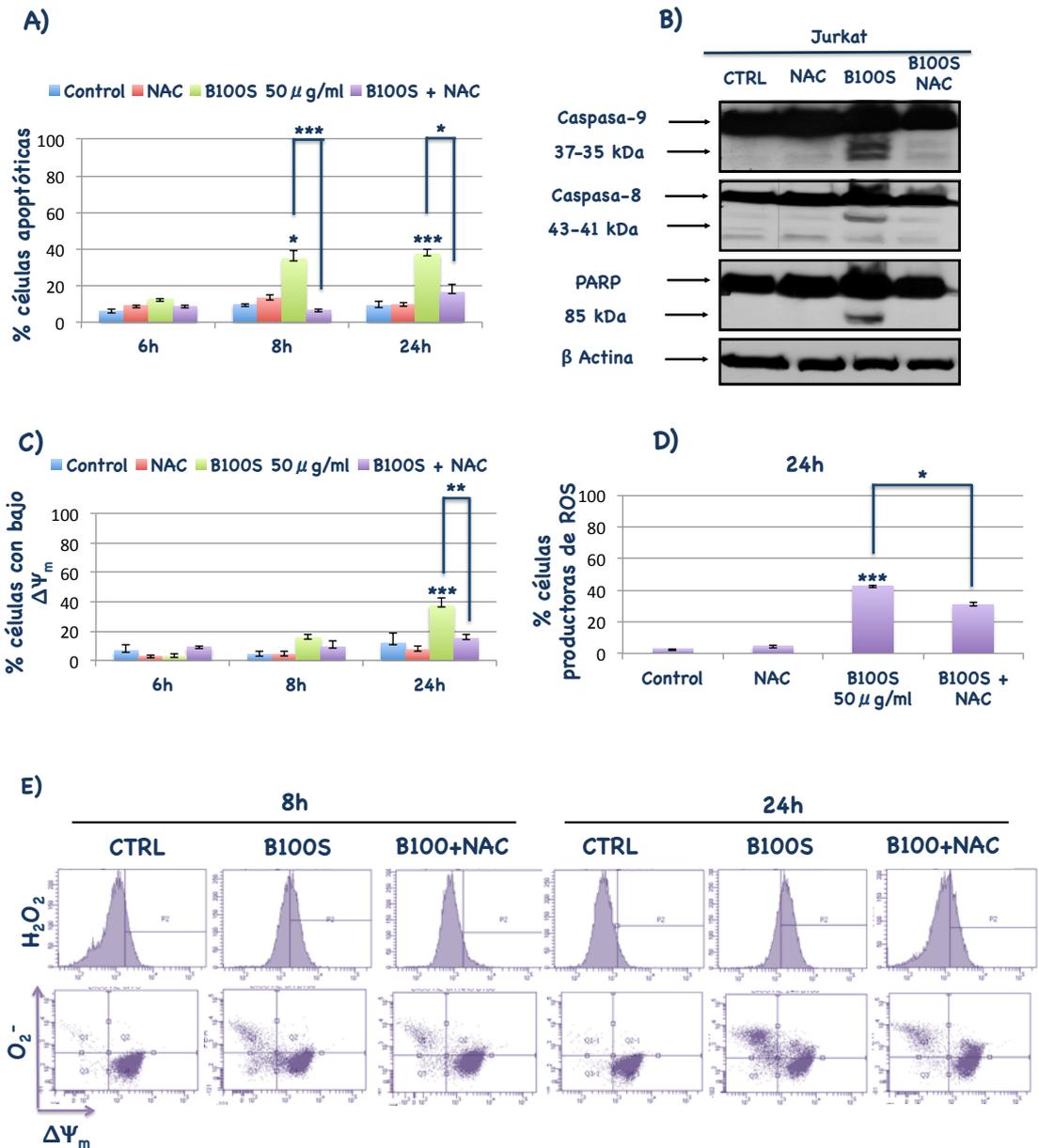


Figura 10. Efectos del antioxidante NAC sobre el proceso apoptogénico desencadenado por el EPS B100S en células Jurkat. Las células fueron pre-tratadas durante 1h con NAC (10μM) y posteriormente tratadas, a los tiempos indicados, con el EPS B100S (50μg/ml). A) Porcentaje de células apoptóticas en P/A de NAC; B) Inmunoblot de los lisados obtenidos a las 8h de tratamiento que fueron sometidos a western blot para la detección del corte de las caspasas-9 y -8 o de la proteína nuclear PARP (diana de la caspasa-3) utilizando anticuerpos específicos para cada una de ellas. Las bandas observadas corresponden a los fragmentos resultantes del procesamiento de estas proteínas: caspasa-9 (37 y 35 kDa), caspasa-8 (43 y 41 kDa) y PARP (85 kDa). C y D) Disipación del potencial de membrana mitocondrial y producción de O₂⁻, tras el tratamiento con B100S, en P/A de NAC. E) Citometría representativa de 4 experimentos independientes. El porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante tinción con ioduro de propidio (sub-G1), la producción de O₂⁻ y la caída del ΔΨ_m se detectaron utilizando las sondas específicas HE y DiOC₆, respectivamente., mientras que la producción de H₂O₂ se determinó con DCFH-DA. Las barras de error muestran la SD de 3 experimentos independientes y los asteriscos hacen referencia a los valores obtenidos tras el cálculo de la t de Student al comparar las muestras indicadas (*p < 0,05; ** p < 0,005 y *** p < 0,001).

El antioxidante NAC protege completamente de la apoptosis (figura 10 A), corte de caspasas iniciadoras (caspasa-9 y caspasa-8) y degradación de PARP (figura 11 B) a tiempos cortos. Sin embargo, a las 24 horas de tratamiento se observa producción de O_2^- , aunque esta es significativamente menor que en las células tratadas solo con B100S. No obstante, la NAC si logra proteger de la apoptosis y caída del $\Delta\Psi_m$ a tiempos largos (figura 10 A, C, D y E) Además, el pretratamiento con NAC logra inhibir completamente la producción de H_2O_2 a las 8h, sin embargo, su acción parece verse superada a las 24 horas de tratamiento donde la inhibición, de nuevo, es parcial. No obstante, parece que este antioxidante si logra proteger, muy significativamente, a las células Jurkat de la caída del potencial de membrana a tiempos largos (figura 10 C y E).

Para descartar que el efecto de la NAC sobre la caída del potencial $\Delta\Psi_m$ observado se debiese al propio antioxidante y no al incremento que este produce en los niveles de GSH, pre-tratamos las células Jurkat durante 1h con GSH (25mM) permeable antes de adicionar el EPS B100S. Observamos que el glutatión protege a las células Jurkat de la caída del potencial de membrana mitocondrial pero no de la producción de anión superóxido (figura 11). La protección que confiere el GSH frente a la producción de H_2O_2 y la apoptosis es similar a la ejercida por la NAC (datos no mostrados). En conclusión el aumento de los niveles de GSH intracelulares no logra inhibir completamente la producción de peróxido de hidrógeno y anión superóxido por B100S en células Jurkat, a pesar de la protección casi completa, observada en la caída del potencial $\Delta\Psi_m$ y en la muerte por apoptosis.

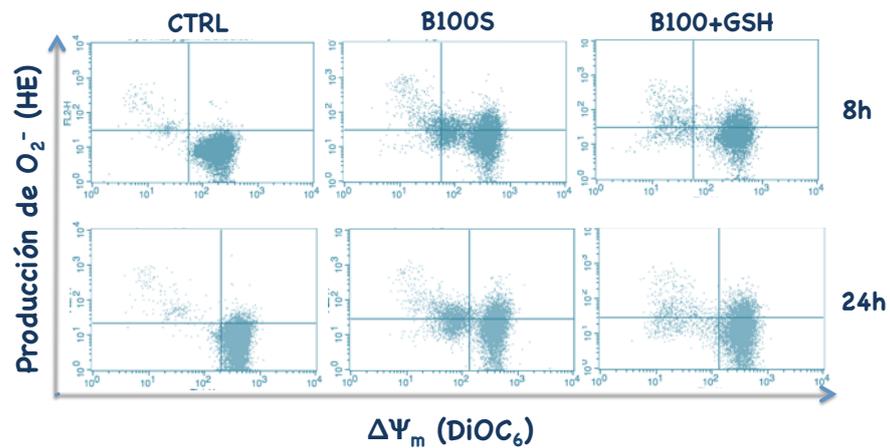


Figura 11. Efectos del glutatión sobre la producción de ROS desencadenada por el EPS B100S en células Jurkat. Las células fueron pre-tratadas durante 1h con GSH (25mM) y posteriormente incubadas, a los tiempos indicados, con el EPS B100S (50µg/ml) para ser teñidas con HE y DiOC6 y analizadas en un citómetro de flujo. Se muestra una citometría representativa de 2 experimentos independientes..

2.4. EL antioxidante porfirina de manganeso protege completamente a las células Jurkat de la apoptosis inducida por el EPS B100S.

Dado que el antioxidante NAC, de naturaleza tiólica, inhibe la apoptosis pero no observamos una inhibición completa de la producción de ROS, decidimos utilizar otro tipo de antioxidante que inhibiese la producción de estos para así poder confirmar su papel en la muerte celular inducida por el EPS B100S en células Jurkat.

Las metaloporfirinas, tales como las porfirinas de manganeso Mn(III)TMPyP y MnTBAP, son antioxidantes catalíticos no específicos que actúan como miméticos de la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa, catalizando la descomposición de los peroxinitritos (ONOO⁻) y actuando como depletores de peróxidos lipídicos (Day et al., 1997; Dolphin et al., 1971; Hunt et al., 1997).

La determinación del efecto de la porfirina de manganeso Mn(III)TMPyP sobre la apoptosis, desencadenada por B100S en células Jurkat, se determinó a diferentes tiempos utilizando una dosis intermedia (50µg/ml) de este EPS sobre la línea tratada previamente, durante 1h, con dicha metaloporfirina a una concentración de 250µM.

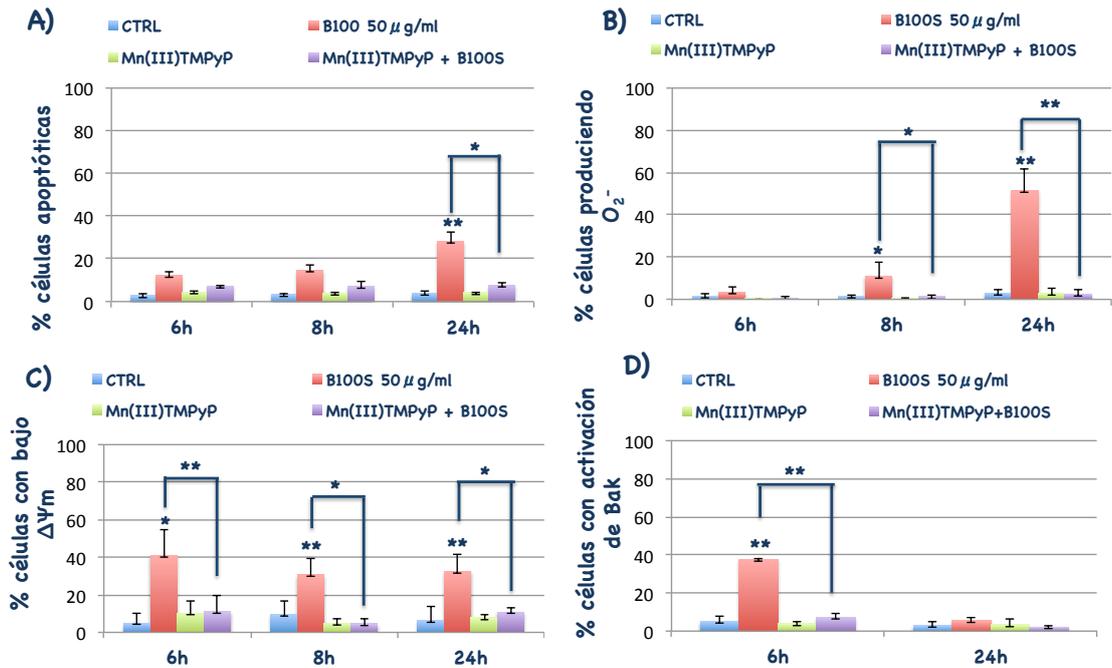


Figura 12. Efectos del antioxidante Mn(III)TMPyP sobre el proceso apoptogénico desencadenado por el EPS B100S en células Jurkat. Las células fueron pre-incubadas con Mn(III)TMPyP (50µg/ml) y posteriormente tratadas, a los tiempos indicados, con el EPS B100S (50µg/ml). A) Porcentaje de células apoptóticas en P/A de NAC; B) Porcentaje de células con elevada producción de O₂⁻; C) Células con descenso en su potencial de membrana mitocondrial y D) Células en las que se detecta activación de Bak, tras el tratamiento con B100S, en P/A de Mn(III)TMPyP. Las barras de error muestran la SD de, al menos, 3 experimentos independientes y los asteriscos hacen referencia a los valores obtenidos tras el cálculo de la t de Student al comparar las muestras indicadas (*p < 0,05; ** p < 0,005 y *** p < 0,001). El porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante tinción con IP (sub-G1), la producción de O₂⁻ y la caída del ΔΨ_m se detectaron utilizando las sondas específicas HE y DiOC₆, respectivamente. Mientras que la activación de Bak se llevó a cabo utilizando un anticuerpo específico. Todas las determinaciones se realizaron por citometría de flujo.

La porfirina de manganeso Mn(III)TMPyP protege a las células Jurkat de la apoptosis (figura 12 A), producción de ROS (figura 12 B), caída del potencial de membrana (figura 12 C) y de la activación de Bak (figura 12 D) tanto a tiempos cortos o como a las 24h de tratamiento.

2.5. Efecto de la sobreexpresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL sobre la producción de ROS inducida por el exopolisacárido B100S.

Bcl-2 no solo protege de la apoptosis obstaculizando la liberación mitocondrial de citocromo c, sino que, además, reduce la formación de ROS (Esposti et al., 1999) y previene la peroxidación lipídica derivada de dicha producción (Esposti et al., 1999; Hockenbery et al., 1993). Por otro lado, tanto Bcl-2 como Bcl-xL inhiben la apertura del poro mitocondrial de permeabilidad transitoria (Marzo et al., 1998; McCommis and Baines, 2012).

Teniendo en cuenta estos datos, decimos determinar cual era el efecto de la sobreexpresión de ambas proteínas anti-apoptóticas sobre el estrés oxidativo provocado por el EPS B100S en células Jurkat.

En primer lugar medimos la producción de peróxido de hidrógeno en respuesta al tratamiento con B100S (50µg/ml), comprobando que solo se producía H₂O₂ en la línea control pCDNA3 (transfectada con el vector vacío) pero esta no tenía lugar en los clones que sobreexpresan Bcl-2 o Bcl-xL a ninguno de los tiempos estudiados (8 y 24h) (figura 13).

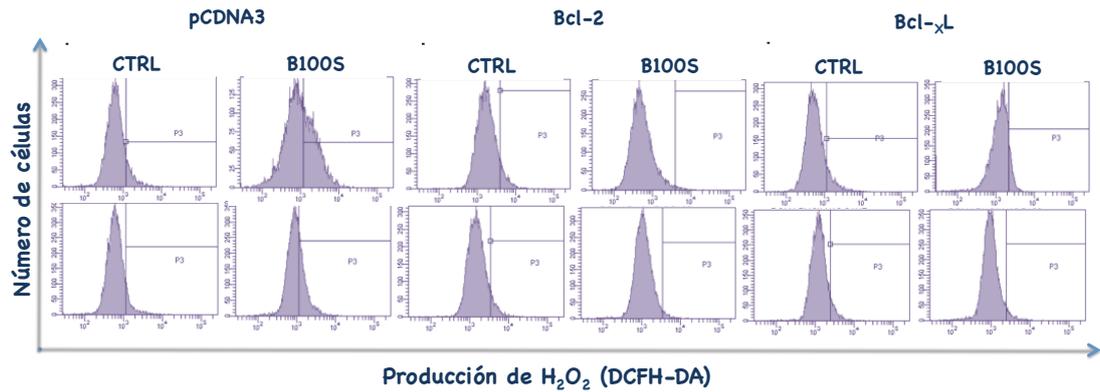


Figura 13. La sobreexpresión de *Bcl-2* o *Bcl-xL* bloquea la producción de H_2O_2 inducida por el EPS B100S en células *Jurkat*. Citometría representativa de dos experimentos independientes. Las células *Jurkat* transfectadas con el vector vacío (pCDNA3), el vector pCDNA3 portando cDNA de *Bcl-2* (L15) o de *Bcl-xL* (H15) fueron tratadas durante 8h (panel superior) o 24h (panel inferior) con el EPS B100S (50 μ g/ml) tras las cuales se evaluó, por citometría de flujo, la producción de H_2O_2 utilizando la sonda específica DCFH-DA.

Los resultados obtenidos al medir la producción de O_2^- y la caída del $\Delta\Psi_m$ fueron similares a los observados con el peróxido de hidrógeno (figura 15). La sobreexpresión de ambas proteínas anti-apoptóticas protege a las células *Jurkat* de ambos eventos a las 8h y 24h de tratamiento con B100S (50 μ g/ml).

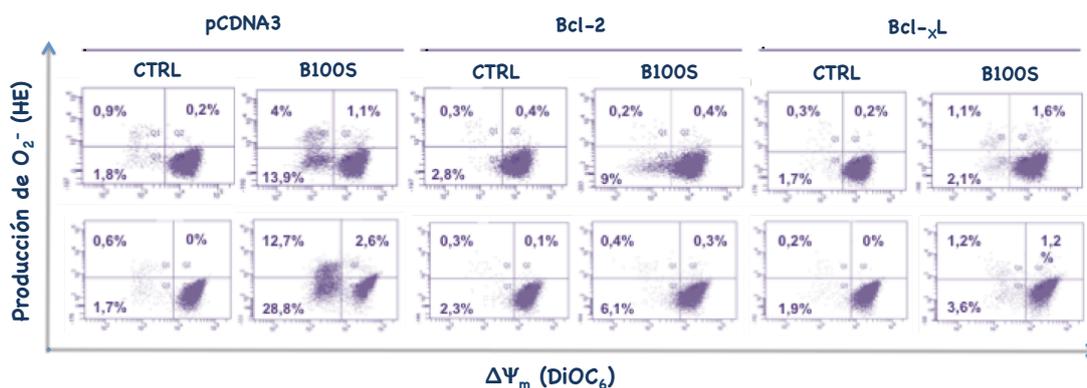
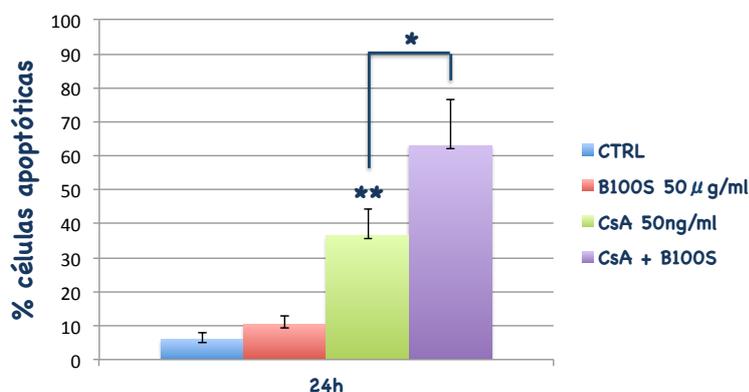


Figura 14. La sobreexpresión de Bcl-2 o Bcl-xL inhibe la caída del potencial $\Delta\Psi_m$ y la producción de O_2^- inducida por el EPS B100S en células Jurkat. Citometría representativa de, al menos, 3 experimentos independientes. Las células Jurkat transfectadas con el vector vacío (pCDNA3), el vector pCDNA3 portando cDNA de Bcl-2 (L15) o de Bcl-xL (H15) fueron tratadas durante 8h (panel superior) o 24h (panel inferior) con el EPS B100S (50 μ g/ml) tras las cuales se evaluó, por citometría de flujo, la producción de O_2^- y la caída del potencial de membrana mitocondrial utilizando las sondas específicas HE y DiOC6.

2.6. El poro mitocondrial de permeabilidad transitoria no está implicado en la inducción de apoptosis llevada a cabo por el EPS B100S sobre células Jurkat .

Teniendo en cuenta que la producción de ROS y el descenso en los niveles de GSH intracelular favorecen la apertura del poro mitocondrial de permeabilidad transitoria (MPTPC), los miembros pro- y anti-apoptóticos de la familia Bcl2 regulan el estado del mismo y dado que este despolariza la MME e induce apoptosis (Beatrice et al., 1984; Hagenbuchner et al., 2012; Kowaltowski et al., 1998; McCommis and Baines, 2012; Zorov et al., 2000) decidimos estudiar la posible implicación del mismo en el proceso apoptogénico desencadenado por B100S en células Jurkat. Para ello utilizamos Ciclosporina A ya que es el mayor desensibilizador del MPTPC y el mejor caracterizado. Este inmunosupresor fomenta el cierre del MPTPC actuando sobre la ciclofilina D, el único componente del poro mitocondrial de permeabilidad transitoria sobre el que no existe ninguna discrepancia (Giorgio et al., 2010).

Por tanto, se realizó un pre-tratamiento de 1h con CsA (50ng/ml) antes de añadir el EPS B100S (50µg/ml) y evaluamos el porcentaje de células apoptóticas, mediante tinción con IP, tras 24 horas de incubación con el exopolisacárido. En presencia de este inhibidor el número de células que presentaban tinción con IP era superior al observado en las muestras tratadas con el EPS en ausencia de CsA (figura 15). La inhibición del MPTPC potencia, por tanto, la apoptosis iniciada por el EPS B100S células Jurkat lo que sugiere que este exopolisacárido no actúa a través del poro mitocondrial de permeabilidad transitoria.



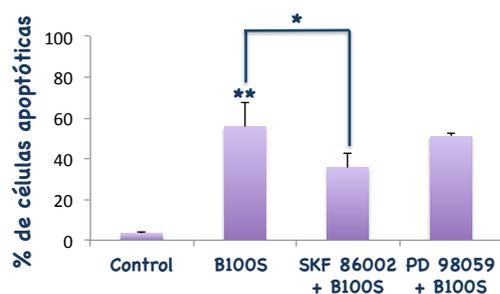
CÉLULAS APOPTÓTICAS (%)			
Control	B100S 50µg/ml	CsA 50ng/ml	CsA + B100S
5,94	10,32	36,62	63,06

Figura 15. El MPTPC no participa en la apoptosis inducida por B100S sobre células Jurkat. Las células Jurkat fueron pre-incubadas con CsA (50ng/ml) durante 1h, posteriormente se adicionó el EPS B100S (50µg/ml) en P/A de CsA. El porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante tinción con IP (sub-G1) en un citómetro de flujo. Las medias corresponden a 3 experimentos independientes, las barras de error muestran la SD de los mismos y los asteriscos hacen referencia a los valores obtenidos tras el cálculo de la t de Student al comparar las células tratadas respecto a los controles sin tratar (*p< 0,05; ** p< 0,005 y *** p< 0,001). También se muestran los datos numéricos correspondientes a los porcentajes medios de apoptosis en forma de tabla.

3. Inducción de apoptosis como respuesta al tratamiento combinado de B100S con otros quimioterapéuticos.

3.1. Efecto de los inhibidores de MAPK sobre la apoptosis inducida por B100S en células Jurkat.

Tal y como se describió en la introducción la familia de las MAPK se activa en respuesta a numerosos estímulos extracelulares e intracelulares, entre los que se incluyen las ROS, ofreciendo una amplia gama de respuestas que van desde la proliferación a la inducción de apoptosis, pasando por el estímulo de la producción de ROS (revisado por (Wada and Penninger, 2004)). Para determinar la posible implicación de estas cinasas se utilizaron inhibidores de las principales rutas controladas por estas proteínas. Así, las células Jurkat fueron pre-tratadas, durante 1h con el inhibidor de MEK PD-980559 impidiendo la señalización vía ERK, el inhibidor de p38MAPK SKF-86002 o el inhibidor de JNK SP-600125, para posteriormente tratar dichas células con el EPS B100S (50µg/ml) durante 24 horas y determinar el efecto de los pre-tratamientos sobre la apoptosis inducida por B100S.



CÉLULAS APOPTÓTICAS (%)					
Control	B100S 50µg/ml	SKF-86002 + B100S	SP-9859 + B100S	SKF-86002	SP-9859
3,495	55,655	35,65	50,95	5,78	8,88

durante 24h. El porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante tinción con ioduro de propídio (sub-G1) en un citómetro de flujo FACScan. Las medias corresponden a 3 experimentos independientes, las barras de error muestran la SD de los mismos y los asteriscos hacen referencia a los valores obtenidos tras el cálculo de la t de Student al comparar las células tratadas respecto a los controles sin tratar (*p< 0,05; ** p< 0,005 y *** p< 0,001). También se muestran los datos numéricos correspondientes a los porcentajes medios de apoptosis en forma de tabla.

Figura 16. Efecto de los principales inhibidores de MAPK sobre la apoptosis inducida por B100S sobre células Jurkat. Las células Jurkat fueron pre-incubadas con SKF-86002, PD-98059 o SP-600125 durante 1h y posteriormente se trataron con el EPS B100S (50µg/ml) en P/A de cada uno de estos inhibidores

El análisis de los porcentajes de apoptosis (figura 16 y 17) indica que el único inhibidor con un efecto estadísticamente significativo sobre la apoptosis inducida por B100S en células Jurkat es SKF-86002, indicando que la cinasa p38MAPK esta implicada, al menos parcialmente, en el proceso apoptogénico dirigido por este exopolisacárido.. La inhibición de MEK no parece ejercer ningún tipo de efecto sobre la apoptosis inducida por B100S y dado que el inhibidor de JNK, SP-600125, indujo apoptosis por sí solo no pudimos valorar su participación . Cuando se comparan los porcentajes de apoptosis obtenidos a las 12 y las 24 horas (figura 17) se observa claramente que el inhibidor SKF-86002 protege a las células Jurkat antes de las 12h de tratamiento del tratamiento con B100S (datos no mostrados).

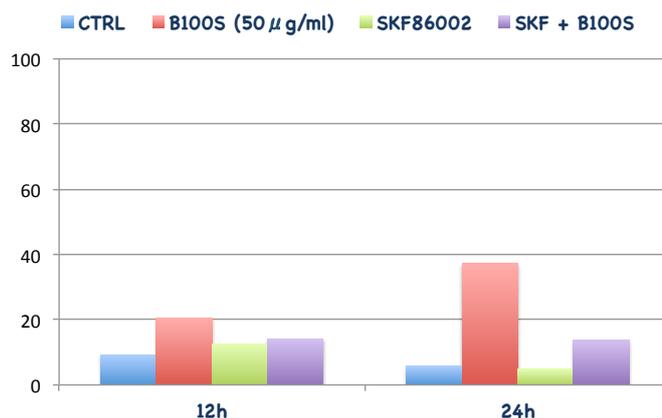


Figura 17. Efecto del inhibidor SKF-86002 sobre la apoptosis en células jurkat a las 12 y 24 horas de tratamiento con B100S. Las células jurkat fueron pre-tratadas con SKF-86002, durante 1h. Posteriormente, se adicionó el EPS B100S (50µg/ml) en P/A del inhibidor, para determinar,

mediante tinción con yoduro de propidio (sub-G1) en un citómetro de flujo FACScan, el porcentaje de células apoptóticas a las 12 y 24 horas de tratamiento..

3.2. Efecto de la inhibición de la vía PI3K sobre la apoptosis inducida por B100S en células Jurkat.

La vía PI3K-PKB/AKT se encuentra sobreactivada en numerosos tipos de cáncer contribuyendo al crecimiento y desarrollo de los mismos mediante respuestas de tipo anti-apoptótico y proliferativo (revisado por (Engelman, 2009; Rodon et al., 2013)). Teniendo en cuenta esta circunstancia, y que muchas veces los tratamientos combinados de diferentes quimioterápicos mejoran la eficiencia anti-tumoral de los mismos, decidimos utilizar un inhibidor de la cinasa PI3K, LY-299002, para determinar si este era capaz de potenciar la acción de nuestro polímero sulfatado.

Comenzamos tratando las células Jurkat durante 24h con el EPS B100S a una concentración de 50µg/ml, sin embargo, la inducción de apoptosis con esa dosis resultó tan elevada que no podíamos observar el efecto del inhibidor LY-299002 (datos no mostrados). Para determinar si se producía potenciación de la muerte al inhibir la cinasa PI3K, se decidió bajar la concentración de polímero adicionando B100S a 20µg/ml tras un pre-tratamiento de 1h con LY-299002.

Los porcentajes de apoptosis en células Jurkat, tras 24 h de tratamiento, se muestran en la [figura 18](#). Tal y como se puede observar, la inhibición de la vía PI3K potencia significativamente el efecto del EPS B100S.

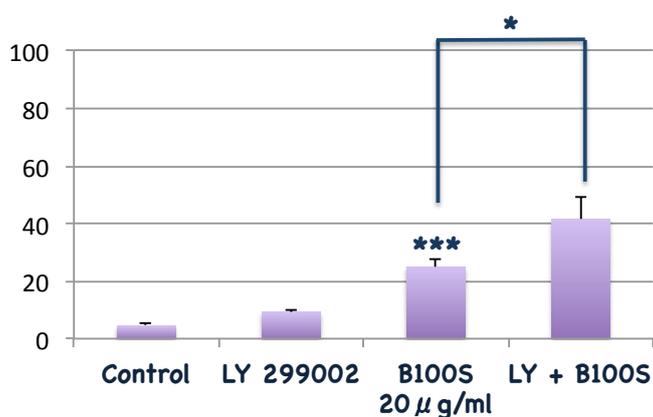


Figura 18. El inhibidor, LY-299002, potencia la apoptosis inducida por el EPS B100S en células Jurkat. Las células Jurkat fueron pre-tratadas con LY-299002 (10µM) , durante 1h. Posteriormente, se añadió el EPS B100S (20µg/ml) en presencia/ausencia del inhibidor para, 24h después, determinar, mediante tinción con yoduro de propídido (sub-G1) en un citómetro de

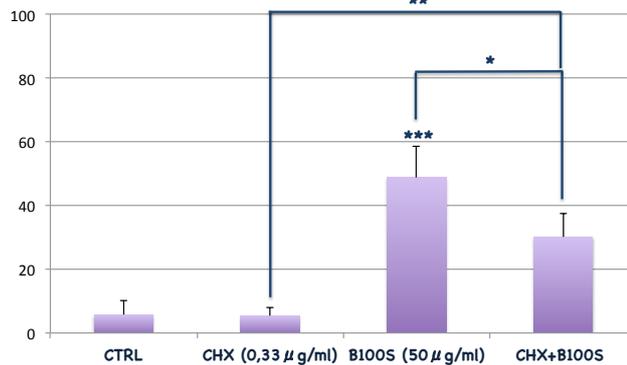
flujo, el porcentaje de células apoptóticas. Las medias corresponden a 3 experimentos independientes, las barras de error muestran la SD de los mismos y los asteriscos hacen referencia a los valores obtenidos tras el cálculo de la t de Student al comparar las células tratadas respecto a los controles sin tratar (*p< 0,05; ** p< 0,005 y *** p< 0,001).

3.3. Efecto de la inhibición de la síntesis proteica sobre la apoptosis inducida por B100S en células Jurkat.

Para determinar si la acción del EPS B100S depende de la expresión constitutiva o inducida de ciertas proteínas en la línea leucémica Jurkat se utilizó cicloheximida (CHX) para inhibir de la síntesis proteica. Por otro lado, se ha determinado que la CHX puede reducir el efecto citotóxico de determinados tratamientos, como radiación X o derivados del nitrógeno, en células hematopoyéticas normales, al tiempo que sensibiliza frente a los mismos a las células tumorales (Solary et al., 1993; Weichselbaum et al., 1991; Weissberg et al., 1978).

Debido a la toxicidad observada con CHX a la dosis de 1µg/ml las células fueron incubadas durante 24h con el EPS B100S (50µg/ml) en presencia de 0,33 µg/ml de CHX, observando una reducción del 20% en el número de células apoptóticas (figura 19), sugiriendo que la apoptosis llevada a cabo por el EPS B100S requiere la síntesis de algunas proteínas celulares.

Figura 19. Efecto del inhibidor cicloheximida sobre la apoptosis inducida por B100S en células Jurkat a las 24 horas de tratamiento con B100S. Las células Jurkat fueron pre-tratadas con cicloheximida (CHX) a una concentración de 0,33µg/ml, durante 1h. Posteriormente, se adicionó el EPS B100S (50µg/ml) en P/A del



inhibidor y se mantuvo el cultivo durante 24h, para determinar, mediante tinción con ioduro de propídío (sub-G1) en un citómetro de flujo FACScan, el porcentaje de células apoptóticas. Las medias corresponden a 3 experimentos independientes, las barras de error muestran la SD de los mismos y los asteriscos hacen referencia a los valores obtenidos tras el cálculo de la t de Student al comparar las células tratadas respecto a los controles sin tratar (*p< 0,05; ** p< 0,005 y *** p< 0,001).

3.4. Efecto de la combinación de B100S con otros quimioterapéuticos sobre la apoptosis inducida en células leucémicas.

También se utilizaron otras drogas anti-tumorales, que inducen apoptosis a través de la vía intrínseca y extrínseca, en combinación con B100S dado que, muchas veces, la combinación de varios fármacos puede potenciar sus efectos sin resultar tóxicos para las células normales. Por tanto, realizamos un tratamiento combinado de B100S (50µg/ml) con las siguientes drogas: TRAIL (100ng/ml), Doxorubicina (100ng/ml), Etopósido (100µM) y Nocodazol (400ng/ml) sin observar aumento o disminución en el porcentaje de células apoptóticas en ninguno de los casos (datos no mostrados).

Para descartar que la ausencia de efecto se debiese a la línea de células Jurkat, de alta sensibilidad al EPS B100S, con la que estábamos trabajando comprobamos si estas combinaciones sensibilizaban frente a la apoptosis inducida por B100S a una línea, moderadamente sensible al tratamiento con este EPS, HL-60, y a la línea HPB-ALL, completamente resistente a la apoptosis inducida por este polisacárido.

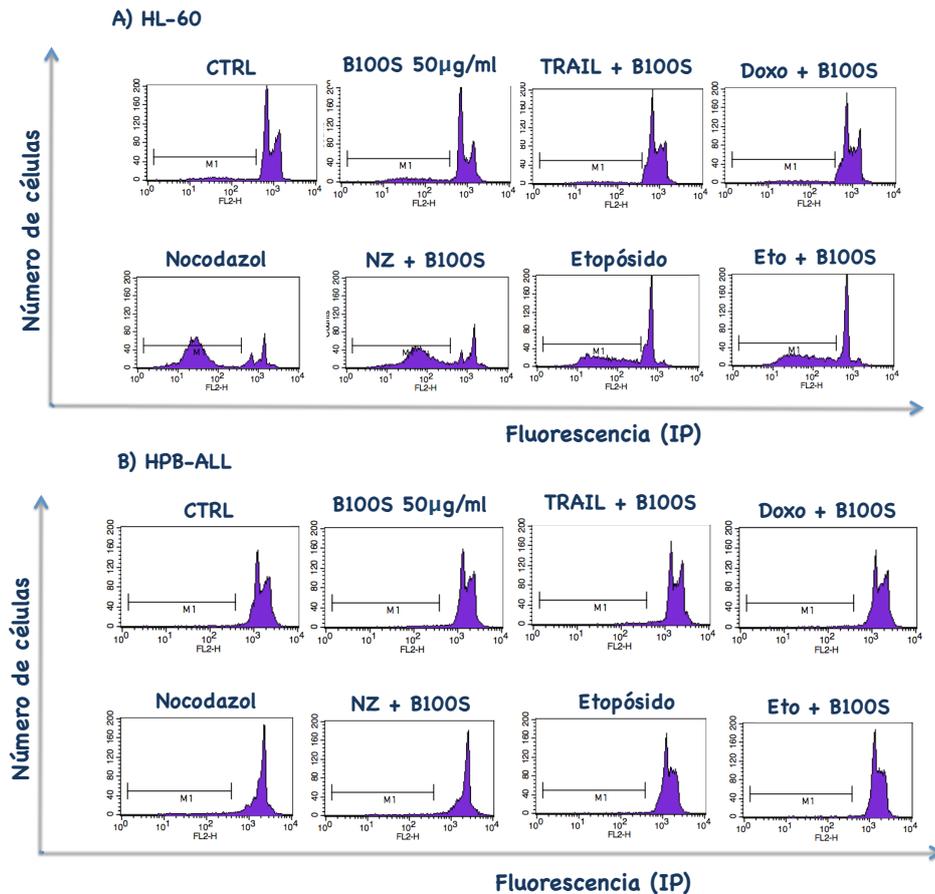


Figura 20. La combinación de B100S con otros quimioterapéuticos no tiene efecto sobre la apoptosis inducida en las líneas HL-60 y HPB-ALL. A) La línea leucémica promielocítica HL-60 fue pre-tratada, durante 1h, con: TRAIL (100ng/ml), doxorubicina (100ng/ml), cicloheximida (CHX, 0,33µg/ml) (panel superior), nocodazol (400ng/ml) o etopósido (100ng/ml) (panel inferior) en P/A del EPS B100S (50µg/ml). B) La línea de leucémica linfoblástica aguda HPB-ALL fue pre-tratada con los mismos inhibidores, en las mismas condiciones y en P/A del EPS B100S (50µg/ml). Tras 24h, en ambos casos, se determinó el porcentaje de células apoptóticas mediante tinción con IP en un citómetro de flujo.

Tal y como se puede observar en los paneles superiores de la [figura 20](#), ninguno de los tratamientos combinados sensibiliza a las líneas HL-60 y HPB-ALL a la apoptosis inducida por B100S. Tal y como se puede observar en la [figura 20 A](#), tanto el nocodazol como el etopósido inducen apoptosis per se en la línea HL-60. Dada la gran resistencia que caracteriza a las células HPB-ALL, el nocodazol en este caso tan solo es capaz de inducir un arresto del ciclo en G2.

Resultados muy similares fueron obtenidos al tratar las tres líneas (Jurkat, HL-60 y HPB-ALL) con dosis mas elevadas de B100S (500µg/ml) o mas bajas (5µg/ml) en presencia de estos agentes (datos no mostrados).

4. Efecto de tratamiento con B100S sobre linfocitos primarios.

4.1. Inducción de apoptosis por B100S en células leucémicas T y B primarias.

Tras haber determinado el efecto del EPS B100S sobre células Jurkat quisimos estudiar su capacidad para inducir apoptosis en células leucémicas T primarias, comparando dicho efecto con el ejercido en otro tipo de neoplasias de origen hematológico.

Para ello, las células aisladas de la sangre de pacientes con leucemia linfocítica crónica B (LLCB) ([figura 21 A](#)), leucemia linfoblástica T (LLT) ([figura 21 B](#)) y leucemia precursora T ([figura 21 C](#)) tratadas con elevadas dosis del EPS B100S durante 48h. Tal y como se puede observar en la [figura 21](#), la LLCB es resistente al tratamiento con este polímero, mientras que las leucemias de origen T presentan una mayor sensibilidad al tratamiento con B100S.

Las células de leucemia linfoblástica T demuestran una mayor sensibilidad respondiendo a dosis menores de este EPS si las comparamos con las células leucémicas T precursoras.

Así, en las primeras se registran porcentajes de apoptosis del 26% con dosis de 500µg/ml, mientras que, para obtener porcentajes de apoptosis similares en la leucemia T precursora se debía utilizar una dosis de 750 µg/ml. No obstante, el mayor número de células apoptóticas que se consiguió registrar fue de un 35% en la leucemia precursora T con una dosis de 1500 µg/ml del EPS B100S, dosis que fue capaz de inducir hasta un 83% de apoptosis en las células jurkat que se trataron en paralelo (datos no mostrados).

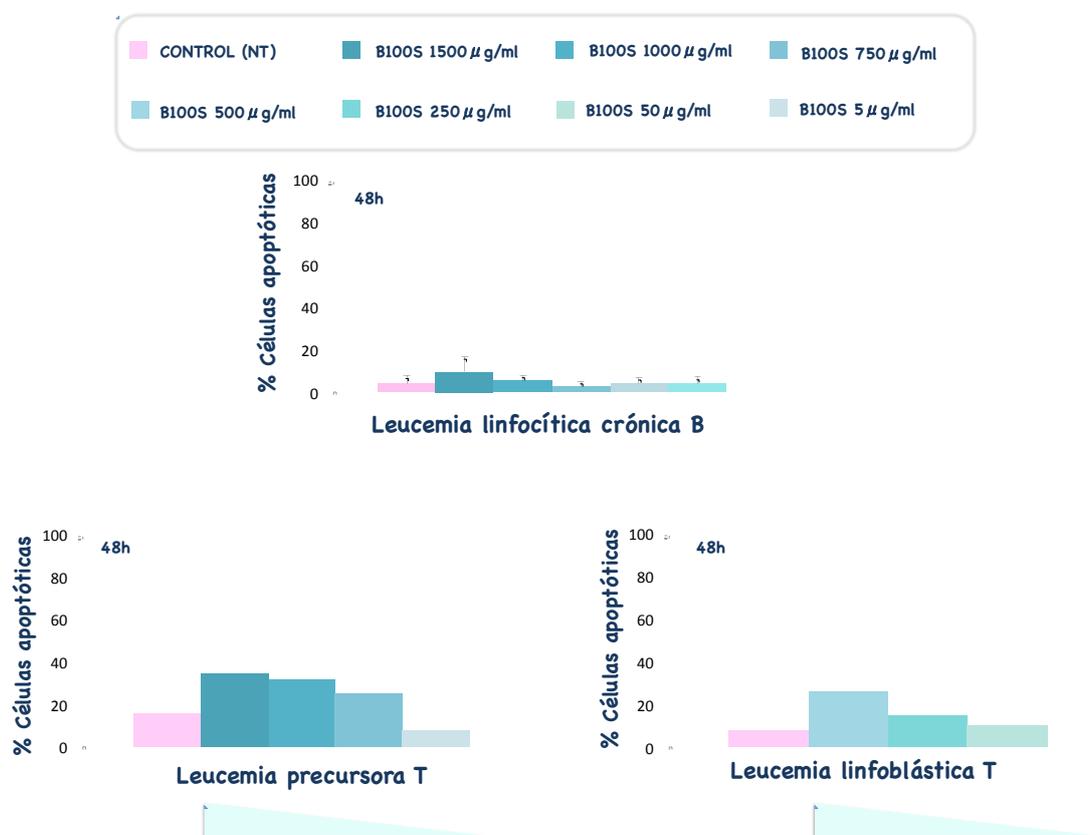


Figura 21. Efecto del EPS B100S sobre leucemias primarias B y T. A) Los linfocitos de sangre periférica se obtuvieron a partir de las muestras sanguíneas de pacientes. Tras su aislamiento, de los PBLs las células fueron aisladas y sometidas a un tratamiento de 48 horas con el EPS B100S a las dosis de: 1500, 1000, 750, 500, 250, 50 o 5 µg/ml. Posteriormente se determinó el porcentaje de células apoptóticas mediante tinción con yoduro de propídeo (SubG1) en un citómetro de flujo. En el caso de la leucemia linfocítica crónica B, los experimentos fueron realizados con las células de un solo paciente, se muestra el porcentaje de células apoptóticas a las 48h de tratamiento y las medias corresponden a 3 experimentos independientes y las barras de error muestran la SD de los mismos.

4.2. Determinación de la toxicidad del EPS B100S a dosis altas sobre linfocitos de sangre periférica de donantes sanos.

Para determinar la posible toxicidad del B100S a tiempos largos y concentraciones elevadas sobre linfocitos periféricos normales, estos fueron aislados de tres donantes sanos no emparentados y se sometieron a un tratamiento de 48 h y a las dosis indicadas. Los resultados mostrados en la figura 22, indican que ninguna de las dosis ensayadas induce apoptosis a las 24h (datos no mostrados) y tampoco a las 48h.

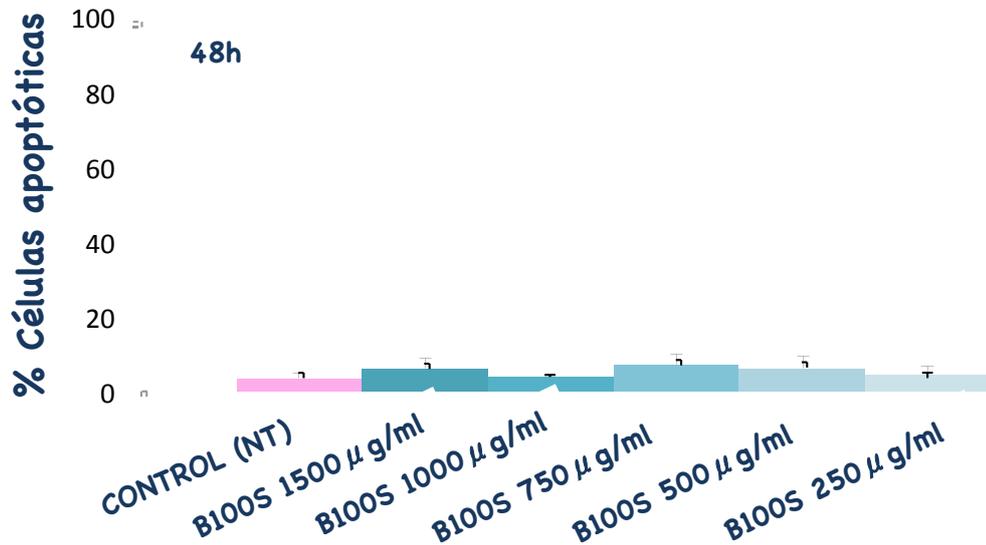


Figura 22. El EPS B100s no produce apoptosis en linfocitos de sangre periférica de individuos.

A) Los linfocitos de sangre periférica aislados a partir de los PBLs de tres donantes sanos no emparentados fueron tratados, durante 48h con las siguientes dosis de EPS B100S: 1500, 1000, 750, 500, 250, 50 o 5 µg/ml. Posteriormente se determinó el porcentaje de células apoptóticas mediante tinción con IP (SubG1) en un citómetro de flujo. A) Porcentaje de células apoptóticas a las 24h de tratamiento; y B) Porcentaje de células apoptóticas a las 48h de tratamiento. Las medias corresponden a 3 experimentos independientes y las barras de error muestran la SD de los mismos.

5. Regulación génica durante la apoptosis inducida por B100S en células Jurkat.

Para determinar que genes se regulaban durante la apoptosis inducida por el EPS B100S en células Jurkat realizamos un análisis de expresión de genoma completo en una plataforma de microarray de alto rendimiento. Dicho array se llevó a cabo sobre células Jurkat y células PA1 (teratocarcinoma ovárico humano) tratadas durante 4 y 6 horas con el EPS B100S a una concentración de 50µg/ml. Las células PA-1 se utilizaron como control positivo como control negativo dado que estas son resistentes a la inducción de apoptosis por B100S (datos no mostrados). Solo se tuvieron en cuenta para los análisis aquellos genes con un cambio en sus niveles de expresión (índice de regulación, IR) superior o igual a 2 y su p-valor inferior a 0,05.

Encontramos que en células Jurkat, a las 4h de tratamiento, se regulaban un total de 84 genes, mientras que la regulación génica a las 6h de tratamiento con B100S fue superior, contando un total de 587 genes. En cuanto a los genes que se regulan en ambas líneas (Jurkat y PA-1) diferencialmente encontramos que se modificaba la expresión de 2 genes a las 4h y 37 genes a las 6h de tratamiento.

En la [figura 23](#) se muestran los genes cuya expresión cae a las 6h de tratamiento en células Jurkat y que, al mismo tiempo, se sobreexpresan en células PA1. En la [tabla 1](#) se muestran los genes cuya expresión aumenta en células Jurkat y disminuye en células PA1.

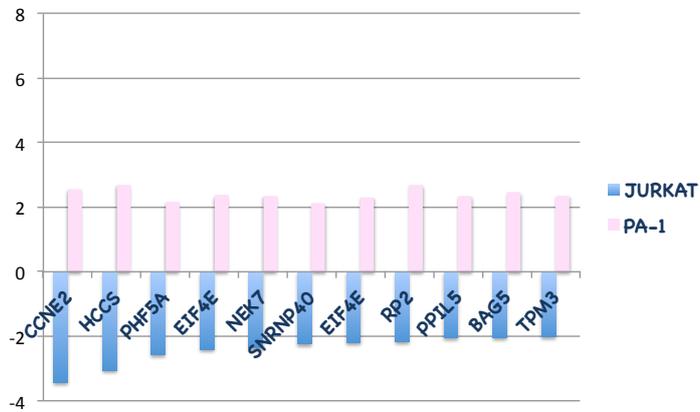


Figura 23. Genes cuya expresión descende en células Jurkat al tiempo que aumenta en células PA-1. Las células Jurkat y PA-1 fueron tratadas durante 6h con el EPS B100S, se extrajo el ARNm y se analizó la expresión génica de cada línea en una plataforma de micro-array de alto rendimiento. Los resultados, expresados como la relación entre células tratadas y la expresión en células control se representan en forma de barras. Se incluyen solo los genes con cambios significativos (relación ≥ 2) y un p-valor inferior a 0,05.

Símbolo del gen regulado	Incremento expresión en Jurkat (Nº de veces)	Descenso expresión en PA-1 (Nº de veces)	Nombre del gen
JUN	8	3	Jun oncogene
C3AR1	5	2	Complement component 3a receptor 1
IRX4	4	3	Iroquois homeobox 4
LCE1D	4	5	Late cornified envelope 1D
SMARCC2	4	5	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 2
ZSCAN10	4	4	Zinc finger and SCAN domain containing 10
TPSG1	3	4	tryptase gamma 1
GRIN1	3	5	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1
GALR3	3	4	Galanin receptor 3
KLK3	3	8	Kallikrein-related peptidase 3
COX6A2	3	3	Cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 2
NPAS3	3	5	Neuronal PAS domain protein 3
PARP10	3	5	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 10
NDOR1	3	6	NADPH dependent diflavin oxidoreductase 1
FHIT	3	4	Fragile histidine triad gene
AGAP3	3	3	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 3
ADAMTS7	3	3	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 7
EBF4	3	5	Early B-cell factor 4
GIPR	3	3	Gastric inhibitory polypeptide receptor
RTN3	3	3	Reticulon 3
RAVER1	3	4	Ribonucleoprotein, PTB-binding 1
CYB5R3	3	4	Cytochrome b5 reductase 3
TNXB	3	4	Tenascin XB
PARD6G	3	2	par-6 partitioning defective 6 homolog gamma (C. elegans)
GP9	3	3	Glycoprotein IX (platelet)
NKX1-2	3	2	NK1 homeobox 2
ALDOA	3	4	Aldolase A, fructose-bisphosphate
JAK1	2	-2	Janus kinase 1
SNX26	2	3	Sorting nexin 26
EP300	2	2	E1A binding protein p300
MMP17	2	2	Matrix metallopeptidase 17 (membrane-inserted)
FCRLB	2	4	
GRIN2D	2	4	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2D
MYPEP	2	4	Fc receptor-like B
MYH14	2	2	Myosin, heavy chain 14
CACNA1E	2	3	Calcium channel, voltage-dependent, R type, alpha 1E subunit
EN2	2	6	Engrailed homeobox 2

Tabla 1. Genes cuya expresión aumenta en células Jurkat al tiempo que desciende en células PA-1. Las células Jurkat y PA-1 fueron tratadas durante 6h con el EPS B100S, se extrajo el ARNm y se analizó la expresión génica de cada línea en una plataforma de micro-array de alto rendimiento. Los resultados, expresados como la relación entre células tratadas y la expresión en células control se representan en forma de barras. Se incluyen solo los genes con cambios significativos (relación ≥ 2) y un p-valor inferior a 0,05.

También se analizaron aquellos genes cuya regulación comenzaba, exclusivamente en células Jurkat, a las 4h y continuaba 6h después de haber añadido el EPS B100S. De manera especial se diferenciaron aquellos cuya expresión a las 6h de tratamiento descendía respecto a las 4h al menos 0,5 veces (regulación génica temprana), aquellos cuya expresión aumentaba 0,5 veces y aquellos cuya regulación se mantenía entre las 4h y las 6h de tratamiento (figura 24).

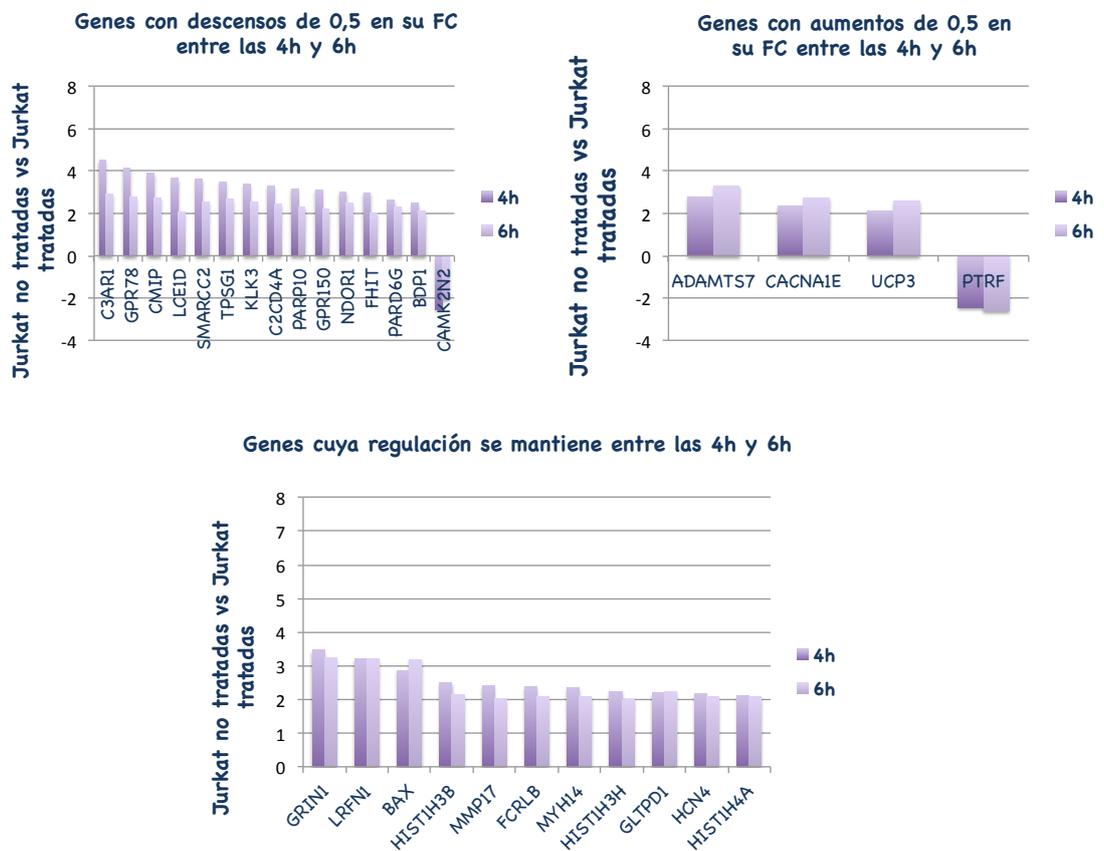


Figura 24. Genes cuya expresión se regula a las 4 y 6 horas en células Jurkat. Las células Jurkat fueron tratadas durante 6h con el EPS B100S, se extrajo el ARNm y se analizó la expresión génica en una plataforma de micro-array de alto rendimiento. Los resultados, expresados como la relación entre células tratadas y la expresión en células control, se representan en forma de barras. Se incluyen solo los genes con cambios significativos (relación ≥ 2) y un p-valor inferior a 0,05.

Por último, en las tablas 2 y 3 se representan los procesos biológicos en los que están implicados aquellos genes regulados (con expresión diferencial ≥ 2 y p-valor inferior a 0,05) en células Jurkat pero no en cé, a las 4h y 6h de tratamiento con el EPS B100S.

Vía de señalización	Nº de genes	p-valor
Sphingosine 1-phosphate (S1P) pathway	2	0.026878303
Signaling events mediated by HDAC Class I	2	0.012435565
Intrinsic Pathway for Apoptosis	1	0.038694
Signaling events mediated by HDAC Class III	1	0.04758349
Intrinsic Pathway	1	0.022941789
RNA Polymerase I Transcription	1	0.04092395
ccr3 signaling in eosinophils	1	0.04314884
intrinsic prothrombin activation pathway	1	0.029723402
ccr3 signaling in eosinophils	1	0.04314884
intrinsic prothrombin activation pathway	1	0.029723402
regulation of bad phosphorylation	1	0.034218885
Glucose uptake	1	0.038694
hypoxia and p53 in the cardiovascular system	1	0.036458984
hypoxia and p53 in the cardiovascular system	1	0.036458984
pkc-catalyzed phosphorylation of inhibitory phosphoprotein of myosin phosphatase	1	0.027467994
rac1 cell motility signaling pathway	1	0.038694
role of mitochondria in apoptotic signaling	1	0.034218885
alk in cardiac myocytes	1	0.034218885
Glucose + ATP => glucose-6-phosphate + ADP	1	0.034218885
Glucose and ATP react to form glucose-6-phosphate and ADP	1	0.034218885
apoptotic signaling in response to dna damage	1	0.027467994
rho cell motility signaling pathway	1	0.022941789
regulation of cell cycle progression by plk3	1	0.02520746
rna polymerase iii transcription	1	0.018394988
RNA Polymerase I Transcription Termination	1	0.0069372826
Activation, translocation and oligomerization of BAX	1	0.0046301

Tabla 2. Rutas celulares reguladas en células Jurkat a las 4h de tratamiento. Las células Jurkat fueron tratadas durante 4h con el EPS B100S, se extrajo el ARNm y se analizó la expresión génica de cada línea en una plataforma de micro-array de alto rendimiento. Para el análisis solo se tuvieron en cuenta aquellos genes cuya relación entre su expresión en células Jurkat tratadas y en células Jurkat control fuese ≥ 2 y tuviesen un p-valor inferior a 0,05. El análisis de vías celulares se llevo a cabo con la herramienta GeneSpring pathways analysis, que permite agrupar aquellos genes con cambios en su expresión dentro de vías celulares concretas mediante un análisis de enriquecimiento funcional. Se tomó como background una lista de 13.500 genes cuya expresión variaba entre la línea de células Jurkat con cualquier p-valor y FC.

Vía de señalización	Nº de genes	p-valor
TNF receptor signaling pathway	12	0.0010153578
IL1-mediated signaling events	11	1,73E+03
BMP receptor signaling	9	0.004595964
Class I PI3K signaling events	8	0.024715453
p38 MAPK signaling pathway	8	0.006197441
Regulation of p38-alpha and p38-beta	8	0.0027850787
Expand Interactions	7	0.0018589715
IL12-mediated signaling events	6	0.0013754105
TCR signaling in naïve CD4+ T cells	6	0.012049343
Class I PI3K signaling events mediated by Akt	5	0.0046295323
Glucose + ATP => glucose-6-phosphate + ADP	5	0.03148707
Glucose and ATP react to form glucose-6-phosphate and ADP	5	0.03148707
Glucose uptake	5	0.039794065
IL2-mediated signaling events	5	0.007996957
Signaling mediated by p38-alpha and p38-beta	5	0.001358621
TCR signaling in naïve CD8+ T cells	5	0.016573664
Aurora A signaling	4	0.013386351
Signaling by Aurora kinases	4	0.033930402
Signaling events mediated by HDAC Class I	4	0.048632145
Signaling events regulated by Ret tyrosine kinase	4	0.007832628
Canonical NF-kappaB pathway	3	0.0030760965
IL2 signaling events mediated by PI3K	3	0.02564136
IL23-mediated signaling events	3	0.04411494
LPA receptor mediated events	3	0.049533524
Base Excision Repair/ Base-Excision Repair, AP Site Formation	2	0.0442234
Base-free sugar-phosphate removal via the single-nucleotide replacement pathway	2	0.011626376
Calcium signaling in the CD4+ TCR pathway	2	0.039794065
ccr3 signaling in eosinophils	2	0.04882553
Cleavage of the damaged pyrimidine	2	0.005028618
control of skeletal myogenesis by hdac and calcium/calmodulin-dependent kinase (camk)	2	0.03554578
Cyclin E associated events during G1/S transition	2	0.0033945297
Depyrimidination	2	0.005028618
Formation of Cyclin E:Cdk2 complexes	2	0.0010441688
hypoxia-inducible factor in the cardiovascular system	2	0.02762671
Insulin receptor mediated signaling	2	0.04882553
IRS-mediated signalling	2	0.0442234
Membrane Trafficking	2	0.03554578
pdgf signaling pathway	2	0.04882553
PDGFR-alpha signaling pathway	2	0.03148707
PI3K Cascade	2	0.014353782
rac1 cell motility signaling pathway	2	0.039794065
regulation of bad phosphorylation	2	0.03148707

Tabla 3. Rutas celulares reguladas en células Jurkat a las 4h de tratamiento. Las células Jurkat fueron tratadas durante 6h con el EPS B100S, se extrajo el ARNm y se analizó la expresión génica de cada línea en una plataforma de micro-array de alto rendimiento. Para el análisis solo se tuvieron en cuenta aquellos genes cuya relación entre su expresión en células Jurkat tratadas y en células Jurkat control fuese ≥ 2 y tuviesen un p-valor inferior a 0,05. El análisis de vías celulares se llevo a cabo con la herramienta GeneSpring pathways analysis, que permite agrupar aquellos genes con cambios en su expresión dentro de vías celulares concretas mediante un análisis de enriquecimiento funcional. Se tomó como background una lista de 13.500 genes cuya expresión variaba entre la línea de células Jurkat con cualquier p-valor y FC.

VII. DISCUSIÓN

La mayoría de los EPS que muestran actividades biológicas comparten la presencia de grupos sulfatos en su composición. De hecho, parece que la presencia de los mismos realiza una gran contribución al potencial biológico de los EPSs (Wu and Chen, 2006). En este sentido, el exopolisacárido B100, producido por *Halomonas maura*, en su forma sulfatada es capaz de inducir apoptosis selectiva en células leucémicas T sin que las células T normales se vean afectadas por su acción.

Las leucemias de células T constituyen uno de los grupos de leucemias más agresivas y de peor pronóstico por lo que el desarrollo de nuevas sustancias con una potencial aplicación en la terapia dirigida a este tipo de tumores es de vital importancia (Seibel, 2008).

En este trabajo hemos determinado que el EPS B100S induce muerte por apoptosis en células Jurkat mediante la producción de elevadas cantidades de ROS y la pérdida del $\Delta\Psi_m$. Además, hemos podido comprobar cómo las células que sobreexpresan las moléculas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-xl no solo están protegidas frente a la apoptosis inducida por este EPS sino también frente a los fenómenos de producción de ROS, caída del potencial de membrana mitocondrial y activación de Bak. Sin embargo, el antioxidante NAC no es capaz de inhibir completamente dicha apoptosis y la CsA (inhibidor del MPTPC) la potencia.

Durante la apoptosis, las proteínas Bcl-2 y Bcl-xL controlan la permeabilidad mitocondrial interaccionando con los miembros proapoptóticos de su familia de forma que, uniéndose a los mismos, logran inhibir su acción y por tanto la liberación de factores proapoptóticos de dicho orgánulo (Adams y Cory, 2002; Hengartner, 2000; Martineau y Green, 2001). En este trabajo hemos demostrado que, además de registrarse una activación temprana de Bak en respuesta al tratamiento con B100S, la sobreexpresión de Bcl-2 y Bcl-xL es suficiente para proteger a las células Jurkat de la apoptosis y la activación de este miembro anti-apoptótico. Además, los niveles de expresión de ambas proteínas se

correlacionan de forma directa con dicha protección, así, niveles elevados de expresión de Bcl-2 y Bcl-xL bloquean la muerte inducida por B100 S, mientras que, niveles intermedios conducen a una inhibición parcial y niveles bajos no son suficientes para producir dicha inhibición. Estos datos demuestran que la principal vía de inducción de apoptosis utilizada por el EPS B100S es la vía mitocondrial.

La permeabilización de la MME permite la salida al citoplasma de factores proapoptóticos como el citocromo c que, junto con Apaf-1 y la caspasa -9, forman el apoptosoma, estructura en la que se activa dicha caspasa capaz de cortar a la caspasa efectora-3, que lleva a cabo el desmantelamiento celular (Luo et al, 1998). La activación de la caspasa-3 supone un punto de unión entre la vía extrínseca y la intrínseca de inducción de apoptosis ya que ésta puede llevar a la activación de la caspasa-8. Los datos sobre la activación de caspasas -9, -3 y -8 indican que ésta solo se produce en los clones control (pCDNA-3 y Bcl-2 D25) pero no en aquellos que sobreexpresan Bcl-2 y Bcl-xL (Bcl-2 L15 y Bcl-xL H15). Si el EPS B100S indujese apoptosis a través de la vía de los receptores de muerte, se observaría corte de la caspasa-8 también en los clones ya que en este caso dicha caspasa se activaría a nivel del DISC, donde estas proteínas anti-apoptóticas no actúan. Por tanto, estos datos corroboran nuestra hipótesis inicial basada en la cinética de activación de caspasas estudiada previamente por nuestro grupo (Ruiz-Ruiz et al., 2011), que mostraba una activación inicial de la caspasa-9 a las 4 h de tratamiento con B100 S, seguida por una activación de las caspasas-3 y -8 a las 6 h.

Tras la permeabilización de la MME se producen tres acontecimientos clave en la vía mitocondrial de apoptosis: la liberación de factores proapoptóticos, el desacoplamiento de la cadena de transporte electrónico y la producción de especies reactivas del oxígeno. Los dos primeros eventos desencadenan el último, al tiempo que la producción de ROS puede provocar la liberación de factores de la mitocondria y el desacoplamiento de la ETC. En nuestro sistema observamos primero una permeabilización

de la MME, dado que la activación de Bak a las 6 horas es elevada, seguida de una despolarización de la MME (caída del $\Delta\Psi_m$) a las 8h de tratamiento con B100S.

Mientras que la permeabilización de la MME es un evento temprano y crucial en la apoptosis vía mitocondria, la disipación del $\Delta\Psi_m$ puede tener lugar antes, durante o ser consecuencia de dicha permeabilización y la interrupción del transporte electrónico (revisado por (Green and Reed, 1998)). B100S logra activar a la caspasa-9 a las 4h de tratamiento y la activación de la caspasa-3 tiene lugar en torno a las 6h. Si tenemos en cuenta, además, que la activación de Bak tiene lugar antes de las 6h de tratamiento, esto sugiere que en nuestro sistema la permeabilización de la MME precede a la disipación del $\Delta\Psi_m$, y, seguramente, las caspasas efectoras contribuyen a esta mediante una retroalimentación positiva, ya que la activación de la caspasa-3 se produce antes de que caiga el $\Delta\Psi_m$ a las 8h. De acuerdo con estos datos, Ricci y cols describen la actuación de la caspasa-3 como amplificador de la caída del potencial de membrana (Ricci et al., 2004).

A pesar de que algunos autores postulan que la pérdida de $\Delta\Psi_m$ se produce en dos etapas (Marzo et al., 2001), nosotros no observamos una despolarización parcial temprana. Por otro lado, la activación de caspasas es imprescindible para que tenga lugar dicha despolarización y el proceso apoptogénico culmine con éxito, dado que su inhibición específica bloquea la apoptosis iniciada por B100S (Ruiz-Ruiz et al., 2011). Además, el antioxidante NAC, a las 24h de tratamiento, protege completamente de la caída del potencial de membrana mitocondrial y casi completamente de la apoptosis desencadenada por este EPS. Esto sugiere que en nuestro sistema la pérdida de $\Delta\Psi_m$ puede no ser esencial para el proceso apoptótico y producirse como consecuencia del mismo, contribuyendo a este como un mecanismo de retroalimentación positiva.

Esta secuencia de eventos ya ha sido descrita previamente en otros sistemas apoptóticos que avalan, por tanto, nuestros resultados (Ly et al., 2003; Ricci et al., 2004). Por último, destacar que las pruebas realizadas con Anexina-V (datos no mostrados) evidencian que B100S induce apoptosis sin que tenga lugar, en ningún momento, un redireccionamiento de este proceso hacia la necrosis. Dado que la pérdida temprana total del $\Delta\Psi_m$ provocaría una muerte por necrosis, al no existir niveles suficientes de ATP que permitiesen mantener la actividad del proceso apoptogénico, es lógico que se observe una caída del $\Delta\Psi_m$ en etapas avanzadas de la muerte celular inducida por B100S (Bossy-Wetzell et al., 1998; Eguchi et al., 1997) (Green and Reed, 1998).

Por otro lado, la permeabilización de la MEE provoca una elevación de producción de ROS (Ricci et al., 2008). Al liberarse factores pro-apoptóticos como el citocromo c, que forma parte del complejo citocromo oxidasa, se produce un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y un transporte reverso de electrones (Basova et al., 2007; Kushnareva et al., 2002), al que contribuyen también los daños causados por las propias ROS. Además, al abandonar la mitocondria, tanto AIF como el citocromo c dejan de ejercer su labor antioxidante (Huttemann et al., 2011; Joza et al., 2001; Norberg et al., 2010). Finalmente, al ser la ETC una diana de las caspasas efectoras (Ricci et al., 2004), su activación contribuye a dañar aún más la ETC ya de por sí muy debilitada. Por ello, determinamos la producción de ROS en respuesta al tratamiento con B100S, realizando una cinética de producción de O_2^- y H_2O_2 , las dos ROS más dañinas para los sistemas biológicos. De acuerdo con aquellos estudios que determinan que la producción de ROS puede dirigir una caída del $\Delta\Psi_m$ y la activación de caspasas (Jabs, 1999; Jing et al., 1999) nosotros observamos una producción inmediata de H_2O_2 que comienza media hora después de adicionar B100S y continua hasta las 8h, momento, en el que comienza a detectarse, por primera vez, una elevación del anión superóxido que acompaña al proceso apoptótico hasta su finalización.

Las células pueden responder al aumento de las concentraciones endógenas/exógenas de ROS elevando su propia producción de los mismos (Zorov et al., 2000), principalmente a través del poro mitocondrial de permeabilidad transitoria (Zorov et al., 2000). Junto con Bax y Bak, en la MME, el principal responsable de la permeabilización mitocondrial es la apertura del MPTPC en la MMI (Bernardes et al., 1994; Bernardi et al., 1994). Ya que el polímero B100S induce una elevada y temprana producción de ROS y estos, junto con la caída de GSH también observada, favorecen la apertura del MPTPC quien, a su vez, permite la liberación de factores pro-apoptóticos (Castilho et al., 1995; Scorrano et al., 2002), utilizamos CsA para favorecer el cierre del mismo (Giorgio et al., 2010), esperando observar un descenso en el porcentaje de células apoptóticas. A pesar de que la CsA ofrece protección frente a la apoptosis/necrosis/autofagia inducida por compuestos que elevan la producción de ROS en células tumorales y normales (Chen et al., 2013; Chen et al., 2012; Larochette et al., 1999; Liu et al., 2013; Walter et al., 1998; Zunino and Storms, 2006) nosotros hemos comprobado que este inmunosupresor potencia la apoptosis desencadenada por el exopolisacárido B100S en células Jurkat. Por tanto, nuestros resultados están en la línea de trabajos previos en los que se describe la inducción de apoptosis ejercida por la CsA en células leucémicas quimioresistentes (Bustamante et al., 2004; Ito et al., 1998), y la sensibilización que esta ejerce frente a la apoptosis inducida por drogas anticancerígenas, como el Resveratrol o el arsenito, en células derivadas de pacientes con leucemias linfoblásticas agudas de células T y B (ALL) (Zunino and Storms, 2006). No obstante, desconocemos el mecanismo exacto a través del cual la CsA está potenciando la acción de nuestro compuesto.

En este sentido se ha descrito que este inmunosupresor potencia la acción de algunos quimioterapéuticos sobre células leucémicas, impidiendo la salida de estos compuestos a través del sistema MRP (Multidrug resistance proteins) (Crompton, 1999; Lautier et al., 1996; List et al., 2001; Vander Heiden and Thompson, 1999) y también se ha determinado que podría colaborar con otros componentes celulares como las fosfolipasas mitocondriales para ejercer tales efectos (Broekemeier and Pfeiffer, 1995). En cualquier caso y dado que la CsA no es capaz de inhibir la apoptosis desencadenada por B100S en células Jurkat, a pesar de bloquear la apertura del MPTPC, podemos afirmar que el EPS B100S no induce apoptosis a través de este poro.

Otros estudios indican que al inhibir la apertura del MPTPC con CsA la señalización apoptótica sufre un redireccionamiento hacia procesos de tipo necrótico (Raymond et al., 2003). Sin embargo, nosotros no hemos observado un aumento del porcentaje de células necróticas tras la adición de este inmunosupresor (datos no mostrados). Por otro lado, se han descrito algunas drogas quimioterapéuticas selectivas capaces de inducir apoptosis vía ROS, a través de los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl2, sin activación del MPTPC, tales como los mitocanos (Prochazka et al., 2010). Dado que B100S induce una producción casi instantánea de ROS que dirige una activación temprana de Bak, pensamos que es más probable que las proteínas de esta familia sean los mediadores bioquímicos situados por debajo de los ROS, en la cascada apoptogénica desencadenada por B100S. Esta posibilidad vendría apoyada por el hecho de que la CsA puede potenciar la apoptosis induciendo la fosforilación de Bcl-2 y facilitando la salida del citocromo c mediante la modificación de las crestas mitocondriales (Scorrano et al., 2002; Yamaguchi et al., 2008). No obstante, la CsA, aunque no directamente, también podría descender la actividad del encima mitocondrial glutatión transferasa contribuyendo al estrés oxidativo iniciado por B100S (Ulziikhishig et al., 2010).

La caída de los niveles de GSH es un fenómeno común durante la apoptosis (Beaver and Waring, 1995; Franco and Cidlowski, 2006; Ghibelli et al., 1998; Hammond et al., 2004) y dado que este es uno de los principales antioxidantes intracelulares dicha depleción generalmente se ha considerado un efecto colateral de la producción de ROS y NOS (Calvino et al., 2014; Gopal et al., 2014; Halestrap et al., 1998; Morales et al., 1998; Park et al., 2014; Tan et al., 1998; You and Park, 2014). Aunque la producción de ROS ha sido estudiada en profundidad, los resultados de estos estudios muchas veces han resultado contradictorios. Por ejemplo, algunos de ellos determinan que el peróxido de hidrógeno es fundamental para la inducción de apoptosis, vía Fas, en células linfoides (Devadas et al., 2003; Kohno et al., 1996; Perez-Cruz et al., 2003; Reinehr et al., 2005; Sato et al., 2004), mientras que otros otorgan a esta ROS una función inhibitoria dentro de la misma vía apoptótica (Aronis et al., 2003; Borutaite and Brown, 2001; Kim et al., 2005). En los últimos años se ha venido a demostrar que la generación de ROS y la depleción de los niveles de GSH pueden ser eventos independientes (Franco and Cidlowski, 2006; Franco et al., 2007). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que, B100S no induce apoptosis facilitando la salida de GSH intracelular como sucede en otros sistemas (Beaver and Waring, 1995; Ghibelli et al., 1995; Ghibelli et al., 1998; Hammond et al., 2004; He et al., 2003; Sato et al., 2004; Ueda et al., 1998; van den Dobbelsteen et al., 1996) sino que esta se relaciona con la producción de especies reactivas del oxígeno. Hemos observado una estrecha correlación entre la producción de H_2O_2 y O_2^- y la depleción de GSH tras el tratamiento con B100S en células Jurkat. Así, a las 2h de tratamiento observamos un pico de producción de peróxido de hidrógeno, momento en el que aparece una población con niveles deplecionados de este tiol (p3). Dicha población sigue aumentando hasta hacerse máxima a las 6 horas de tratamiento, cuando comenzamos a ver un descenso en la detección de este peróxido.

Nosotros interpretamos que, hasta ese momento, el sistema GSH es capaz de funcionar y evitar los daños causados por el H_2O_2 , y es por ello que no detectamos apoptosis y caída del potencial de membrana mitocondrial en las etapas iniciales. Sin embargo, a las 8 horas de tratamiento, la población con GSH_i deplecionado (p3) da lugar a una segunda población cuyos niveles de GSH son mínimos (p2). Dado que en esta población las defensas antioxidantes están fuertemente dañadas, su potencial de membrana cae y la producción de H_2O_2 también lo hace, al no poder ser dismutado el O_2^- , seguramente por la saturación del sistema SOD. Por todo ello, a las 8h de tratamiento se detecta un aumento de la producción de ROS y una caída del $\Delta\Psi_m$. Dado que la población con niveles mínimos de GSH_i sigue creciendo (a costa del descenso de p3, con niveles simplemente deplecionados) el número de células con su sistema redox peligrosamente dañado experimenta un importante aumento que se refleja en una espectacular producción de O_2^- , la primera ROS en producirse en los sistemas biológicos, que va acompañada de un descenso en el potencial $\Delta\Psi_m$ debido a los graves daños que esta inflige a nivel mitocondrial, lo que redundará, a su vez, en el aumento aún mayor de la producción de O_2^- y, finalmente, esta termina conduciendo a las células hacia la muerte celular, tal y como demuestran los porcentajes de apoptosis registrados a las 24h, tal y como sucede en otros sistemas apoptóticos (Carmody and Cotter, 2001; Chandra et al., 2000; Perl et al., 2002). A la luz de nuestros datos, se hace evidente que la pérdida de este tiol intracelular juega un importante papel en el proceso apoptótico que aquí se describe, dado que la utilización de GSH permeable y NAC disminuyen de forma significativa los porcentajes de apoptosis, la activación de caspasas, especialmente a tiempos cortos, y la caída del potencial de membrana mitocondrial. La protección frente a la apoptosis, vía extrínseca/intrínseca, que ofrecen los antioxidantes de naturaleza tiólica ha sido ampliamente demostrada (Cossarizza et al., 1995; Franco et al., 2007; Liu et al., 2001), e incluso se ha asociado en ocasiones tal efecto al aumento de los tioles intracelulares y no a la protección que estos ofrecen frente a las ROS (Deas et al., 1997). ;

No obstante, nosotros observamos que este tipo de antioxidantes protegen casi totalmente a las células Jurkat de la apoptosis inducida por B100S a tiempos largos. Además, en el caso de la NAC, dicha protección es completa solo cuando este antioxidante es capaz de eliminar la totalidad del H_2O_2 producida (8h), sin embargo, cuando dicha eliminación es tan solo parcial la protección tampoco es completa, tal y como sucede a las 24 horas de tratamiento. Estos datos evidencian que en el caso del EPS B100S dichos antioxidantes solo protegen de la apoptosis aliviando el estrés oxidativo. En relación con esto, se observa también que tanto la NAC como la adición de GSH protegen especialmente de la caída del potencial de membrana observada a tiempos largos. Esto se hace especialmente evidente cuando se evalúan los efectos del GSH. En este caso, se puede observar cómo este tiol protege de la caída del potencial de membrana mitocondrial a las 24 de tratamiento, pero no consigue reducir apenas la producción de O_2^- ni tampoco la apoptosis. Dado que a las 8h de tratamiento ambos antioxidantes consiguen inhibir completamente la producción de H_2O_2 , la caída del potencial de membrana mitocondrial y la apoptosis, pero no la producción de O_2^- , pensamos que su efecto sobre la disipación del $\Delta\Psi_m$ y la apoptosis se centran en el aumento de los niveles de GSH, y por ende en el de la defensa redox, que experimenta la población con niveles mínimos de GSH_i (p2). Por tanto, nuestros resultados sugieren, en contra de lo que otros grupos de investigación han publicado (Franco et al., 2007), que la producción de ROS precede a la caída de GSH y que son estos, y no este tiol, los que modulan la apoptosis inducida por B100S en células Jurkat. No podemos descartar, sin embargo, que la depleción de GSH pueda realizar una contribución que puede ir más allá de su papel antioxidante, o ser incluso necesaria para la progresión del proceso apoptótico en células linfoides, despolarizando la membrana mitocondrial y favoreciendo la activación de caspasas y endonucleasas, tal cual han descrito previamente otros autores (Bortner and Cidlowski, 2002, 2004; Franco et al., 2007).

Continuando con la línea de estos experimentos, también se utilizó un antioxidante catalítico macrocíclico, ya que este tipo de antioxidantes (sales y metaloporfirinas) son capaces de bloquear el estrés oxidativo *in vitro* e *in vivo* (Day, 2004). El pre-tratamiento con Mn(III)TMPyP protege a las células Jurkat de la apoptosis, activación de Bak, generación de ROS y caída del $\Delta\Psi_m$, indicando que la producción de ROS se encuentra por encima de la permeabilización de la MME y de la disipación del $\Delta\Psi_m$ en la cascada apoptótica desencadenada por B100S. A la luz de estos datos podemos afirmar con bastante certeza que el EPS B100S induce apoptosis en células a través de la producción de especies reactivas del oxígeno.

No obstante, todos los eventos mitocondriales anteriormente mencionados quedan completamente bloqueados al sobreexpresar las proteínas pro-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL. Es una evidencia bien establecida que la sobre-expresión de Bcl-2 protege frente a la caída del $\Delta\Psi_m$ inducida por diversos estímulos como la ceramida, TNF, Fas o la activación de p53 (Hennet et al., 1993; Li et al., 1999; Scaffidi et al., 1998; Zamzami et al., 1995a; Zamzami et al., 1995b). Sin embargo, esta protección siempre se ha asociado a su interacción con los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 o a la modulación que, junto a Bcl-xL, este ejerce sobre la apertura del MPTPC o VDAC (Marzo et al., 1998; McCommis and Baines, 2012; Reed, 1997). Independientemente de estos efectos directos parece que Bcl-2 bloquea la disipación del $\Delta\Psi_m$ inhibiendo la producción de radicales libres y detoxificando las ROS (Hockenbery et al., 1993; Kane et al., 1993).

Por tanto, Bcl-2 podría estar bloqueando los eventos relacionados con la apoptosis inducida por B100S en células Jurkat a dos niveles:

- Inhibiendo la producción de peróxido de hidrógeno, casi inmediata, tras la adición de B100S y la de O_2^- y detoxificando ambos radicales libres, tal y como demuestran la ausencia de los mismos a las 8 y 24 horas en los clones pero no en las células control pCDNA3. De esta forma, Bcl-2 y Bcl-xL impedirían la caída del potencial de membrana mitocondrial posterior a la generación de ROS.
- Interaccionando directamente con Bak impidiendo que forme canales que despolaricen la MME y liberen factores pro-apoptóticos, tal y como se puede observar en los resultados.

Al reducir los daños infligidos por la producción de ROS y contrarrestar el efecto de las proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2, Bcl-xL y Bcl-2 logran impedir la liberación de factores pro-apoptóticos y, por tanto, la activación de caspasas.

Por último, así como existen diversos trabajos que describen el efecto antioxidante de la proteína Bcl-2, no hemos encontrado ningún trabajo previo en el que se adscriba tal propiedad a la proteína anti-apoptótica Bcl-xL, constituyendo este un fenómeno especialmente importante que ha de caracterizarse.

Abordamos también la posibilidad de que B100S estuviese reduciendo la señalización que tiene lugar a través de la vía PI3K, normalmente sobre-activada en leucemias linfoblásticas agudas (Lonetti et al., 2013). Para ello utilizamos un inhibidor de esta cinasa (LY-194002), observando una suma de efectos con una concentración intermedia del EPS B100S (datos no mostrados), al reducir la concentración de polímero pudimos determinar que dicho inhibidor sensibilizaba frente a la apoptosis iniciada por B100S.

Dado que AKT fomenta respuestas de tipo proliferativo inhibiendo factores de transcripción de la familia FOXO, encargados de mediar eventos apoptóticos y arresto celular (Engelman, 2009; Rodon et al., 2013), es lógico que el bloqueo de la ruta PI3K favorezca la apoptosis desencadenada por B100S. Estos resultados indican que B100S no utiliza la ruta PI3K como sucede en el caso de otros EPS producidos por bacterias, algas y hongos que ejercen sus efectos inmunomoduladores mediante esta y otras vías de señalización (Byeon et al., 2009; Leung et al., 2006), a pesar de que si parece modularla a nivel transcripcional tal y como se deduce de los resultados obtenidos en el microarray.

También estudiamos el efecto que podría tener la inhibición de las MAPK, JNK, p38-MAPK y ERK porque se ha descrito que estas cinasas son activadas por diferentes receptores que reconocen productos bacterianos (Dong et al., 2002), al tiempo que muchos EPS modifican las respuestas biológicas mediante las vías de señalización controladas por ellas (Byeon et al., 2009; Leung et al., 2006). Además K-Ras, H-Ras y N-Ras, así como otros proto-oncogenes de esta vía están mutados en el 30% -20% de las leucemias linfoblásticas agudas y mieloides, respectivamente, resultando en la activación constitutiva de la vía ERK1/2, esto hace pensar que la inhibición de MEK podría aumentar el porcentaje de células apoptóticas como respuesta al tratamiento combinado con B100S. Sin embargo, a pesar de que el uso de estos inhibidores potencia la apoptosis en LLAs tratadas con distintos quimioterapéuticos (Jarvis et al., 1998; Plataniias, 2003), nosotros no observamos ningún efecto estadísticamente significativo.

El hecho de que el tratamiento con el inhibidor de p38-MAPK SKF-86002 reduce parcialmente pero significativamente la apoptosis desencadenada por B100S en células Jurkat, indica que la vía de señalización controlada por esta cinasa puede participar en el proceso apoptótico desencadenado por este polímero; o bien, que señales reguladas por esta vía ponen en marcha mecanismos que inhiben o reducen la apoptosis inducida por B100S.

No obstante, los datos de expresión génica indican que 8 genes implicados en esta ruta de señalización sufren cambios en su expresión.

Uno de los principales problemas de la quimioterapia es el desarrollo de resistencias frente al tratamiento. Dentro de los compuestos anti-tumorales los agentes intercalantes, como la doxorubicina, son muy comunes. Atendiendo a que se ha descrito previamente que determinados EPS sulfatados, como el producido por el hongo *Phellinus linteus*, son capaces de sensibilizar células de cáncer de próstata resistentes al tratamiento con doxorubicina (Collins et al., 2006), decidimos realizar un tratamiento combinado de B100S y este anti-tumoral en células Jurkat. La concentración de doxorubicina fue reducida hasta no observar apoptosis en solitario, con el objetivo de poder determinar el efecto de la combinación de ambos compuestos. No obstante, y a pesar de los hallazgos de otros grupos de investigación que utilizaron compuestos naturales inductores de apoptosis vía ROS en células T leucémicas (Efferth et al., 2007), nosotros no observamos que el tratamiento combinado de B100S y doxorubicina potenciase la apoptosis. Quizá la utilización de concentraciones más altas de este genotóxico lograsen un efecto sinérgico o potenciador, dado que Collins y cols determinaron que tan solo la combinación de dosis elevadas de su EPS y doxorubicina (1µg/ml) potenciaban el efecto pro-apoptótico de este agente intercalante (Collins et al., 2006). No obstante, los modelos celulares son muy diferentes, y por tanto, difícil de extrapolar los resultados obtenidos en cáncer de próstata con los obtenidos en leucemias T.

A pesar de que en los últimos años se han realizado ciertas mejoras en el tratamiento de leucemias linfoblásticas agudas T (T-ALL) la supervivencia sin recaídas en los cinco años posteriores al tratamiento quimioterapéutico sigue, de momento, estrechamente ligada a la edad de los pacientes.

Por tanto, es más que necesario desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que mejoren la supervivencia de estos pacientes y que al mismo tiempo permitan que se produzcan remisiones en el caso de recaídas posteriores al alotrasplante de progenitores hematopoyéticos (Schmitz et al., 2014). Dadas las características de los exopolisacáridos sulfatados y la potente acción anti-tumoral del EPS B100S consideramos que el tratamiento de leucemias T primarias con B100S *in vitro* sería una buena aproximación, previa a su uso en modelos murinos, a su posible utilización clínica. Nuestros resultados indican que B100S es capaz de inducir una apoptosis dosis-dependiente en leucemias T primarias, pero no en las células procedentes de un paciente con leucemia linfocítica crónica B.

Nuestro grupo había demostrado previamente que B100S no inducía muerte celular en linfocitos normales de sangre periférica (Girish Srivastava, datos no publicados). Sin embargo, las elevadas dosis empleadas en el tratamiento de las células leucémicas B y T primarias, y la extensión del tiempo de incubación desde las 24 hasta las 48h, nos llevaron a explorar la posible citotoxicidad de esas concentraciones en linfocitos de sangre periférica de tres donantes sanos no emparentados. No hemos observado ningún tipo de toxicidad a ninguna de las dosis ni tiempos estudiados. La ausencia de toxicidad, por tanto, estaría directamente relacionada con el hecho de que las células tumorales sean más sensibles a la acción de las ROS debido a su mayor estrés oxidativo intrínseco (Benhar et al., 2002) que las células periféricas normales.

Dado que el tratamiento combinado de B100S con cicloheximida potenciaba la apoptosis en células Jurkat decidimos realizar un microarray de expresión del genoma completo con el objetivo de averiguar que vías celulares o genes se estaban regulando durante la apoptosis inducida por este EPS en células Jurkat a nivel de RNAm.

Atendiendo a la regulación génica temprana, es decir, la que tiene lugar antes de las 4h de tratamiento, observamos que una de las rutas que se modulan es la controlada por la fosfatasa S1-P (Sphingosine 1-phosphate). Esta vía está relacionada con el estrés en el retículo endoplasmático y la progresión de leucemias linfocíticas crónicas B. Nosotros observamos un descenso en los niveles de expresión del gen XBP-1 (X-Box-Binding Protein 1), cuya inhibición se relaciona con la inducción de apoptosis en este tipo de leucemias y con descensos en la progresión de las mismas (Tang et al., 2014). Además de S1-P, también observamos regulación de genes relacionados con la muerte celular a través de la vía de la ceramida, tales como GPR65 (G protein-coupled receptor 65) y CERK (ceramide kinase)(Bianchini et al., 2006). También se detectó un aumento de la proteína GRLF1 (glucocorticoid receptor DNA binding factor 1), que comienza a las 4h de tratamiento y se incrementa a las 6h, lo cual es relevante ya que los glucocorticoides tienen un papel fundamental en la apoptosis de células T (Kong et al., 2002) y es llamativo que B100S regule esta vía en una etapa tan temprana.

Los genes relacionados con el metabolismo de la glucosa y de los enzimas glicolíticos, tales como la hexokinasa II o la piruvato cinasa, y de enzimas relacionados con la producción de ATP (ATPase class V type 10B) se encuentran regulados a las 4h y 6h. Dicha regulación estaría relacionada con la adaptación metabólica, controlada por JNK, a procesos apoptóticos inducidos por ROS, vía ATM, en células tumorales (Dixit et al., 2014). En concordancia con estos resultados, observamos también que a las 4h de tratamiento comienzan a activarse genes de respuesta a daño en el ADN que se incrementan a las 6h.

Dado que *i)* la generación de sitios abásicos (AP) en el ADN es uno de los principales daños causados por los ROS, especialmente en el ADN mitocondrial, *ii)* se ha descrito que tanto las DSBs como los sitios AP generados por las ROS en el ADNmt dirigen procesos apoptóticos (Ricci et al., 2008) y *iii)* que observamos que la producción de ROS es casi inmediata tras la adición de B100S, consideramos que posiblemente este tipo de respuestas estén relacionadas con la apoptosis y el estrés oxidativo inducidos por este exopolisacárido en células Jurkat.

Por otro lado, la familia de factores de transcripción a la que pertenece MEF2D (sobre-expresado a las 4h de tratamiento) juega un importante papel en la apoptosis inducida en linfocitos T (Gregoire and Yang, 2005). Nosotros observamos una sobre-expresión de este FT y una regulación negativa de la proteína SNP3 (SUMO1/sentrin/SMT3 specific peptidase 3) a las 4h de tratamiento, además de cambios relacionados con la señalización realizada por inhibidores de histonas deacetilasa a las 6h de tratamiento. Esto es concordante con las observaciones de que los inhibidores de histonas deacetilasa, como HDAC4, inducen la sumorilación del factor de transcripción MEF2D favoreciendo la apoptosis en linfocitos T, al tiempo que esta es inhibida por proteínas como SNP3 (Gregoire and Yang, 2005).

En cuanto a las proteínas directamente relacionadas con la apoptosis vía mitocondria encontramos una regulación creciente de la proteína pro-apoptótica Bax. Trabajos relativamente recientes demuestran que cuando Bax es añadido junto con el transportador de nucleótidos de adenina (ANT) en membranas lipídicas artificiales ambos forman un canal (Brenner et al., 2000) que permeabiliza la MME y disipa el $\Delta\Psi_m$ transitoriamente (Kroemer and Reed, 2000). Dado que las células Jurkat utilizadas en nuestros experimentos no expresaban Bax en niveles detectables, inicialmente pensamos que Bak estaba sustituyendo la acción de Bax (Wei et al., 2001).

Sin embargo, el array de expresión llevado a cabo tras el tratamiento de estas células con B100S, muestra un aumento de la expresión de esta proteína pro-apoptótica ya a las 4h, que se eleva aún más a las 6h. Por tanto, es posible que Bax también este contribuyendo, aunque con cierto retraso con respecto a Bak, en el proceso apoptogénico iniciado por B100S.

En relación al estrés oxidativo mitocondrial y el estrés en el retículo endoplasmático encontramos cambios en algunos genes que codifican proteínas implicadas en el ensamblaje de los centros ISCs (Iron-Sulfur clusters) dentro de proteínas Fe-S, tales como Ndor1 y anamorsina. Ambas, proteínas están implicadas en las respuestas frente al estrés oxidativo, en la regulación de la muerte celular programada y son imprescindibles para la viabilidad celular (Shibayama et al., 2004; Soler et al., 2011; Vernis et al., 2009). Ndor1 recibe electrones del NADH para transferirlos desde su dominio FAD al dominio FMN que los cederá a la anarmosina (Banci et al., 2013) formando así un complejo imprescindible para el ensamblaje de la maquinaria ISC, del radical tirosil férrico de la nucleótido reductasa, para la ETC y la fosforilación oxidativa (Banci et al., 2013).

El gen de la citocromo b5 reductasa, regulado positivamente, codifica una flavoproteína que cataliza múltiples reacciones de reducción de un solo electrón. Diversos trabajos la han implicado en la producción de picos de anión superóxido acelerando la apoptosis en algunos tipos celulares como las neuronas granulares cerebelares (Samhan-Arias et al., 2009; Samhan-Arias et al., 2012). No obstante, dicha producción es dependiente del NADH. De acuerdo con estos indicios encontramos que la peroxiredoxina 3 mitocondrial está regulada negativamente a las 6h de tratamiento.

Dado que este enzima protege a las células tumorales de la apoptosis inducida por diferentes drogas anti-tumorales y H₂O₂ (Samhan-Arias and Gutierrez-Merino, 2014), descensos en sus niveles de expresión dejan desprotegida a la célula frente a la producción incrementada de ROS detectada desde el comienzo del tratamiento, haciéndola más vulnerable a los daños causados por estos. Además, se ha determinado que cuando PRDX3 se oxida dirige apoptosis dependiente de Bax y Bak (Cox et al., 2008). Por tanto, estos datos parecen sugerir que la regulación génica provocada por el tratamiento con B100S favorece la producción de ROS y disminuye las defensas intracelulares frente a estos.

El exceso de ROS detectado puede, además, afectar a los ácidos grasos poli-insaturados (PUFAS), componentes esenciales de las membranas celulares. La regulación negativa del gen de la palmitoil-tioesterasa-1 (PPT1) a las 6h de tratamiento favorecería la susceptibilidad al estrés oxidativo, contribuyendo al proceso apoptogénico (Kim et al., 2010; Sarkar et al., 2013). Dado que este enzima está relacionado con el estrés en el retículo endoplasmático (Tardy et al., 2009; Wei et al., 2008) buscamos otros genes relacionados con este cuya regulación génica se estuviese modulando encontrando que *i*) la expresión de BAG5 (Bcl-2 associated athanogene 5) se regula diferencialmente en células Jurkat y PA1, esta proteína protege de la apoptosis desencadenada tras la inducción de estrés en el RE, a través de la supresión de la actividad de la vía PERK-eIF2-ATF4 y el aumento de la de la vía IRE1-Xbp1 impidiendo así, el despliegue masivo de proteínas conocido como UPR (unfolding protein response)(Bruchmann et al., 2013; Schroder and Kaufman, 2005), *ii*) observamos un descenso en la expresión del gen DNAJB9, que codifica la proteína ERDJ4 (Microvascular Endothelial Differentiation Gene 1 Protein) y que junto con el descenso progresivo del *iii*) *gen ISCA1* favorecerían la acumulación de proteínas desplegadas en el retículo (van Galen et al., 2014) (Kurisu et al., 2003).

También hemos identificado la regulación diferencial, en células Jurkat y PA-1, del recientemente descubierto gen SLC26A1 (Solute Carrier Family 26; SAT-1), un transportador crítico para la homeostasis del sulfato y el oxalato. Este tipo de transportadores, al igual que el GSH, están implicados en la detoxificación de xenobióticos, y se ha indicado que la entrada de grupos sulfato a través de SAT-1 es imprescindible para las reacciones de sulfonación y su ausencia disminuye los niveles de GSH en un intento celular porque este cede sus grupos sulfato para tal efecto (Markovich, 2012).

Es posible, por tanto, que dicho transportador este implicado en la apoptosis inducida por B100S en células Jurkat dado que esta es dependiente de su contenido en grupos sulfato.

En relación con el metabolismo oxidativo, detectamos aumentos en la expresión de ARNm del gen UCP3 y de un ORF similar a la subunidad II de la citocromo c oxidasa. UCP3 es una proteína que desacopla la fosforilación oxidativa, sensibiliza a la apoptosis y modula la expresión de genes relacionados con el metabolismo oxidativo sensibilizando a la mitocondria frente al estrés oxidativo (Camara et al., 2009; Dejean et al., 2004). Otros genes relacionados con este metabolismo y sobreexpresados en células Jurkat a las 6h tratamiento con B100S son: COX6A2, UNG, peroxiredoxina 3 (PRDX3), el citocromo B5, la subunidad mitocondrial F1 de la ATP sintetasa, o DLAT.

El análisis global de los datos obtenidos al estudiar la regulación génica inducida por B100S en células Jurkat sugiere que este polímero provoca daños en la mitocondria, especialmente en la cadena de transporte electrónico, y posiblemente dirige estrés en el retículo endoplasmático. Esto se traduce en respuestas reguladoras de las vías metabólicas y de señalización celular relacionadas con el estrés oxidativo, la UPR, y los daños al ADN y el ciclo celular.

De acuerdo a todo lo anterior, en este trabajo se describe por primera vez un EPS capaz de inducir apoptosis específicamente en células leucémicas T sin resultar tóxico para los linfocitos normales a través de una compleja regulación génica que afecta a los mecanismos moleculares relacionados con la apoptosis desencadenada por la vía mitocondrial. La gran acción que el EPS B100S presenta sobre la línea de células Jurkat así como sobre células leucémicas primarias, sugieren que el EPS B100S podría ser de interés clínico, solo o en combinación con otros quimioterapéuticos que permitieran reducir las dosis, y por tanto disminuir los posibles efectos de toxicidad indeseada.

Por tanto, y a pesar de que la etapa futura inmediata requiere la demostración de su eficacia y ausencia o baja toxicidad en modelos murinos, los resultados preliminares aquí resumidos son alentadores de cara a una posible aplicación clínica dentro del arsenal de agentes antitumorales.

VIII. CONCLUSIONES

1.- El exopolisacárido bacteriano B100S induce apoptosis, dependiente de caspasas, en células T leucémicas a través de la vía intrínseca o mitocondrial, sin resultar tóxico para los linfocitos de sangre periférica de donantes sanos. La inducción de apoptosis está restringida a este linaje celular, observándose tanto en líneas tumorales (Jurkat) como en células leucémicas T primarias.

2.- La producción de especies reactivas del oxígeno es la principal responsable de la inducción de apoptosis llevada a cabo por el EPS B100S, de manera que la inhibición de las mismas, pero no de la caída de GSH, protege a las células Jurkat de la citotoxicidad que sobre ellas ejerce el exopolisacárido B100S.

3.- Los inhibidores del poro mitocondrial de permeabilidad transitoria, de las vías de señalización controladas por PI3K, p38-MAPK y de la síntesis proteica modulan la apoptosis inducida por el EPS B100S sobre células leucémicas T, lo que indica la participación de estas vías en los mecanismos de inducción de apoptosis mediada por B100S.

4.- El exopolisacárido B100S produce una estricta regulación de un conjunto de genes en células T Jurkat cuya modulación es completamente compatible con la inducción de daño en la mitocondria, especialmente en la cadena de transporte electrónico, y posiblemente dirige estrés en el retículo endoplasmático. Esto se traduce en respuestas reguladoras de las vías metabólicas y de señalización celulares relacionadas con el estrés oxidativo, el daño al ADN y el ciclo celular.

IX. REFERENCIAS

Abate, C., Patel, L., Rauscher, F.J., 3rd, and Curran, T. (1990). Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science* 249, 1157-1161.

Abe, J., and Berk, B.C. (1999). Fyn and JAK2 mediate Ras activation by reactive oxygen species. *The Journal of biological chemistry* 274, 21003-21010.

Aggarwal, B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature reviews Immunology* 3, 745-756.

Alladina, S.J., Song, J.H., Davidge, S.T., Hao, C., and Easton, A.S. (2005). TRAIL-induced apoptosis in human vascular endothelium is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt through the short form of cellular FLIP and Bcl-2. *Journal of vascular research* 42, 337-347.

Anton, J., Meseguer, I., and Rodriguez-Valera, F. (1988). Production of an Extracellular Polysaccharide by *Haloferax mediterranei*. *Applied and environmental microbiology* 54, 2381-2386.

Aon, M.A., Cortassa, S., Marban, E., and O'Rourke, B. (2003). Synchronized whole cell oscillations in mitochondrial metabolism triggered by a local release of reactive oxygen species in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 278, 44735-44744.

Arena, A., Gugliandolo, C., Stassi, G., Pavone, B., Iannello, D., Bisignano, G., and Maugeri, T.L. (2009). An exopolysaccharide produced by *Geobacillus thermodenitrificans* strain B3-72: antiviral activity on immunocompetent cells. *Immunology letters* 123, 132-137.

Arena, A., Maugeri, T.L., Pavone, B., Iannello, D., Gugliandolo, C., and Bisignano, G. (2006). Antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis*. *International immunopharmacology* 6, 8-13.

Armstrong, J.S., Steinauer, K.K., Hornung, B., Irish, J.M., Lecane, P., Birrell, G.W., Peehl, D.M., and Knox, S.J. (2002). Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. *Cell death and differentiation* 9, 252-263.

Aronis, A., Melendez, J.A., Golan, O., Shilo, S., Dicter, N., and Tirosh, O. (2003). Potentiation of Fas-mediated apoptosis by attenuated production of mitochondria-derived reactive oxygen species. *Cell death and differentiation* 10, 335-344.

Arrigo, A.P. (1999). Gene expression and the thiol redox state. *Free radical biology & medicine* 27, 936-944.

Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nature reviews Cancer* 2, 420-430.

Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C.J., McLauchlan, H., Klevvernic, I., Arthur, J.S., Alessi, D.R., and Cohen, P. (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *The Biochemical journal* 408, 297-315.

Baines, C.P. (2009). The molecular composition of the mitochondrial permeability transition pore. *Journal of molecular and cellular cardiology* 46, 850-857.

Balendiran, G.K., Dabur, R., and Fraser, D. (2004). The role of glutathione in cancer. *Cell biochemistry and function* 22, 343-352.

Banci, L., Bertini, I., Calderone, V., Ciofi-Baffoni, S., Giachetti, A., Jaiswal, D., Mikolajczyk, M., Piccioli, M., and Winkelmann, J. (2013). Molecular view of an electron transfer process essential for iron-sulfur protein biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 7136-7141.

Banner, D.W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H.J., Broger, C., Loetscher, H., and Lesslauer, W. (1993). Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 73, 431-445.

Basova, L.V., Kurnikov, I.V., Wang, L., Ritov, V.B., Belikova, N.A., Vlasova, II, Pacheco, A.A., Winnica, D.E., Peterson, J., Bayir, H., *et al.* (2007). Cardiolipin switch in mitochondria: shutting off the reduction of cytochrome c and turning on the peroxidase activity. *Biochemistry* 46, 3423-3434.

Beatrice, M.C., Stiers, D.L., and Pfeiffer, D.R. (1984). The role of glutathione in the retention of Ca²⁺ by liver mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 259, 1279-1287.

Beaver, J.P., and Waring, P. (1995). A decrease in intracellular glutathione concentration precedes the onset of apoptosis in murine thymocytes. *European journal of cell biology* 68, 47-54.

Beckman, J.S., and Crow, J.P. (1993). Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. *Biochemical Society transactions* 21, 330-334.

Benhar, M., Engelberg, D., and Levitzki, A. (2002). ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. *EMBO reports* 3, 420-425.

Bernardes, C.F., Meyer-Fernandes, J.R., Basseres, D.S., Castilho, R.F., and Vercesi, A.E. (1994). Ca⁽²⁺⁾-dependent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS). *Biochimica et biophysica acta* 1188, 93-100.

Bernardi, P., Broekemeier, K.M., and Pfeiffer, D.R. (1994). Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 26, 509-517.

Bianchini, R., Nocentini, G., Krausz, L.T., Fettucciari, K., Coaccioli, S., Ronchetti, S., and Riccardi, C. (2006). Modulation of pro- and antiapoptotic molecules in double-positive (CD4+CD8+) thymocytes following dexamethasone treatment. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 319, 887-897.

Boatright, K.M., Renatus, M., Scott, F.L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I.M., Ricci, J.E., Edris, W.A., Sutherlin, D.P., Green, D.R., *et al.* (2003). A unified model for apical caspase activation. *Molecular cell* 11, 529-541.

Bodmer, J.L., Schneider, P., and Tschopp, J. (2002). The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends in biochemical sciences* 27, 19-26.

Boix, J., Fibla, J., Yuste, V., Piulats, J.M., Llecha, N., and Comella, J.X. (1998). Serum deprivation and protein synthesis inhibition induce two different apoptotic processes in N18 neuroblastoma cells. *Experimental cell research* 238, 422-429.

Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V., and Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803-815.

Bortner, C.D., and Cidlowski, J.A. (2002). Apoptotic volume decrease and the incredible shrinking cell. *Cell death and differentiation* 9, 1307-1310.

Bortner, C.D., and Cidlowski, J.A. (2004). The role of apoptotic volume decrease and ionic homeostasis in the activation and repression of apoptosis. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 448, 313-318.

Borutaite, V., and Brown, G.C. (2001). Caspases are reversibly inactivated by hydrogen peroxide. *FEBS letters* 500, 114-118.

Bossy-Wetzel, E., Newmeyer, D.D., and Green, D.R. (1998). Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific

caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *The EMBO journal* *17*, 37-49.

Brady, N.R., Elmore, S.P., van Beek, J.J., Krab, K., Courtoy, P.J., Hue, L., and Westerhoff, H.V. (2004). Coordinated behavior of mitochondria in both space and time: a reactive oxygen species-activated wave of mitochondrial depolarization. *Biophysical journal* *87*, 2022-2034.

Brenner, C., Cadiou, H., Vieira, H.L., Zamzami, N., Marzo, I., Xie, Z., Leber, B., Andrews, D., Duclohier, H., Reed, J.C., *et al.* (2000). Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene* *19*, 329-336.

Broekemeier, K.M., and Pfeiffer, D.R. (1995). Inhibition of the mitochondrial permeability transition by cyclosporin A during long time frame experiments: relationship between pore opening and the activity of mitochondrial phospholipases. *Biochemistry* *34*, 16440-16449.

Bruchmann, A., Roller, C., Walther, T.V., Schafer, G., Lehmusvaara, S., Visakorpi, T., Klocker, H., Cato, A.C., and Maddalo, D. (2013). Bcl-2 associated athanogene 5 (Bag5) is overexpressed in prostate cancer and inhibits ER-stress induced apoptosis. *BMC cancer* *13*, 96.

Buschmann, T., Potapova, O., Bar-Shira, A., Ivanov, V.N., Fuchs, S.Y., Henderson, S., Fried, V.A., Minamoto, T., Alarcon-Vargas, D., Pincus, M.R., *et al.* (2001). Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress. *Molecular and cellular biology* *21*, 2743-2754.

Bustamante, J., Caldas Lopes, E., Garcia, M., Di Libero, E., Alvarez, E., and Hajos, S.E. (2004). Disruption of mitochondrial membrane potential during apoptosis induced by PSC 833 and CsA in multidrug-resistant lymphoid leukemia. *Toxicology and applied pharmacology* *199*, 44-51.

Byeon, S.E., Lee, J., Lee, E., Lee, S.Y., Hong, E.K., Kim, Y.E., and Cho, J.Y. (2009). Functional activation of macrophages, monocytes and splenic lymphocytes by polysaccharide fraction from *Tricholoma matsutake*. *Archives of pharmacal research* 32, 1565-1572.

Cai, Y.J., Lu, J.J., Zhu, H., Xie, H., Huang, M., Lin, L.P., Zhang, X.W., and Ding, J. (2008). Salvicine triggers DNA double-strand breaks and apoptosis by GSH-depletion-driven H₂O₂ generation and topoisomerase II inhibition. *Free radical biology & medicine* 45, 627-635.

Calvino, E., Estan, M.C., Sanchez-Martin, C., Brea, R., de Blas, E., Boyano-Adanez Mdel, C., Rial, E., and Aller, P. (2014). Regulation of death induction and chemosensitizing action of 3-bromopyruvate in myeloid leukemia cells: energy depletion, oxidative stress, and protein kinase activity modulation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 348, 324-335.

Camara, Y., Mampel, T., Armengol, J., Villarroya, F., and Dejean, L. (2009). UCP3 expression in liver modulates gene expression and oxidative metabolism in response to fatty acids, and sensitizes mitochondria to permeability transition. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 24, 243-252.

Cargnello, M., and Roux, P.P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 75, 50-83.

Carmody, R.J., and Cotter, T.G. (2001). Signalling apoptosis: a radical approach. *Redox report : communications in free radical research* 6, 77-90.

Castilho, R.F., Kowaltowski, A.J., Meinicke, A., Bechara, E.J.H., and Vercesi, A.E. (1995). Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by

Ca²⁺ ions is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine* 18, 479-486.

Cazanave, S., Berson, A., Haouzi, D., Vadrot, N., Fau, D., Grodet, A., Letteron, P., Feldmann, G., El-Benna, J., Fromenty, B., *et al.* (2007). High hepatic glutathione stores alleviate Fas-induced apoptosis in mice. *Journal of hepatology* 46, 858-868.

Cerning, J. (1990). Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS microbiology letters* 87, 113-130.

Chakravarthi, S., Jessop, C.E., and Bulleid, N.J. (2006). The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO reports* 7, 271-275.

Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews* 59, 527-605.

Chandra, J., Samali, A., and Orrenius, S. (2000). Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free radical biology & medicine* 29, 323-333.

Chauhan, D., Li, G., Hideshima, T., Podar, K., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Munshi, N., Kharbanda, S., and Anderson, K.C. (2003). JNK-dependent release of mitochondrial protein, Smac, during apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 17593-17596.

Chen, B., Xu, M., Zhang, H., Wang, J.X., Zheng, P., Gong, L., Wu, G.J., and Dai, T. (2013). Cisplatin-induced non-apoptotic death of pancreatic cancer cells requires mitochondrial cyclophilin-D-p53 signaling. *Biochemical and biophysical research communications* 437, 526-531.

Chen, J., Delannoy, M., Odwin, S., He, P., Trush, M.A., and Yager, J.D. (2003). Enhanced mitochondrial gene transcript, ATP, bcl-2 protein levels, and altered glutathione distribution in ethinyl estradiol-treated cultured female rat hepatocytes. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 75, 271-278.

Chen, W., Feng, L., Nie, H., and Zheng, X. (2012). Andrographolide induces autophagic cell death in human liver cancer cells through cyclophilin D-mediated mitochondrial permeability transition pore. *Carcinogenesis* 33, 2190-2198.

Cheng, W.H., Zheng, X., Quimby, F.R., Roneker, C.A., and Lei, X.G. (2003). Low levels of glutathione peroxidase 1 activity in selenium-deficient mouse liver affect c-Jun N-terminal kinase activation and p53 phosphorylation on Ser-15 in pro-oxidant-induced apoptosis. *The Biochemical journal* 370, 927-934.

Christensen, B.E. (1989). The role of extracellular polysaccharides in biofilms. *J Biotechnol* 10, 181-202.

Circu, M.L., and Aw, T.Y. (2008). Glutathione and apoptosis. *Free radical research* 42, 689-706.

Circu, M.L., and Aw, T.Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free radical biology & medicine* 48, 749-762.

Clarkson, P.M., and Thompson, H.S. (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *The American journal of clinical nutrition* 72, 637S-646S.

Clayton, D.A. (1984). Transcription of the mammalian mitochondrial genome. *Annual review of biochemistry* 53, 573-594.

Clem, R.J., Fechheimer, M., and Miller, L.K. (1991). Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* 254, 1388-1390.

Clementi, F. (1997). Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Critical reviews in biotechnology* 17, 327-361.

Colecchia, D., Strambi, A., Sanzone, S., Iavarone, C., Rossi, M., Dall'Armi, C., Piccioni, F., Verrotti di Pianella, A., and Chiariello, M. (2012). MAPK15/ERK8 stimulates autophagy by interacting with LC3 and GABARAP proteins. *Autophagy* 8, 1724-1740.

Collins, L., Zhu, T., Guo, J., Xiao, Z.J., and Chen, C.Y. (2006). *Phellinus linteus* sensitises apoptosis induced by doxorubicin in prostate cancer. *British journal of cancer* 95, 282-288.

Conrad, A., Suutari, M.K., Keinänen, M.M., Cadoret, A., Faure, P., Mansuy-Huault, L., and Block, J.C. (2003). Fatty acids of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs. *Lipids* 38, 1093-1105.

Cortassa, S., Aon, M.A., Winslow, R.L., and O'Rourke, B. (2004). A mitochondrial oscillator dependent on reactive oxygen species. *Biophysical journal* 87, 2060-2073.

Cory, S., Huang, D.C., and Adams, J.M. (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22, 8590-8607.

Cossarizza, A., Franceschi, C., Monti, D., Salvioli, S., Bellesia, E., Rivabene, R., Biondo, L., Rainaldi, G., Tinari, A., and Malorni, W. (1995). Protective effect of N-acetylcysteine in tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in U937 cells: the role of mitochondria. *Experimental cell research* 220, 232-240.

Cox, A.G., Brown, K.K., Arner, E.S., and Hampton, M.B. (2008). The thioredoxin reductase inhibitor auranofin triggers apoptosis through a Bax/Bak-dependent process that involves peroxiredoxin 3 oxidation. *Biochemical pharmacology* 76, 1097-1109.

Croft, M. (2009). The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nature reviews Immunology* 9, 271-285.

Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *The Biochemical journal* 341 (Pt 2), 233-249.

Cully, M., You, H., Levine, A.J., and Mak, T.W. (2006). Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nature reviews Cancer* 6, 184-192.

D'Alessio, M., Cerella, C., Amici, C., Pesce, C., Coppola, S., Fanelli, C., De Nicola, M., Cristofanon, S., Clavarino, G., Bergamaschi, A., *et al.* (2004). Glutathione depletion up-regulates Bcl-2 in BSO-resistant cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18, 1609-1611.

Day, B.J. (2004). Catalytic antioxidants: a radical approach to new therapeutics. *Drug discovery today* 9, 557-566.

Day, B.J., Fridovich, I., and Crapo, J.D. (1997). Manganic porphyrins possess catalase activity and protect endothelial cells against hydrogen peroxide-mediated injury. *Archives of biochemistry and biophysics* 347, 256-262.

De Philippis, R., Faraloni, C., Sili, C., and Vincenzini, M. (2005). Populations of exopolysaccharide-producing cyanobacteria and diatoms in the mucilaginous benthic aggregates of the Tyrrhenian Sea (Tuscan Archipelago). *The Science of the total environment* 353, 360-368.

De Vuyst, L., and Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 23, 153-177.

Deas, O., Dumont, C., Mollereau, B., Metivier, D., Pasquier, C., Bernard-Pomier, G., Hirsch, F., Charpentier, B., and Senik, A. (1997). Thiol-mediated inhibition of FAS and CD2 apoptotic signaling in activated human peripheral T cells. *International immunology* 9, 117-125.

Dejean, L., Camara, Y., Sibille, B., Solanes, G., and Villarroya, F. (2004). Uncoupling protein-3 sensitizes cells to mitochondrial-dependent stimulus of apoptosis. *Journal of cellular physiology* 201, 294-304.

Deschesnes, R.G., Huot, J., Valerie, K., and Landry, J. (2001). Involvement of p38 in apoptosis-associated membrane blebbing and nuclear condensation. *Molecular biology of the cell* 12, 1569-1582.

Devadas, S., Hinshaw, J.A., Zaritskaya, L., and Williams, M.S. (2003). Fas-stimulated generation of reactive oxygen species or exogenous oxidative stress sensitize cells to Fas-mediated apoptosis. *Free radical biology & medicine* 35, 648-661.

Dewson, G., and Kluck, R.M. (2009). Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *Journal of cell science* 122, 2801-2808.

Dewson, G., Kratina, T., Czabotar, P., Day, C.L., Adams, J.M., and Kluck, R.M. (2009). Bak activation for apoptosis involves oligomerization of dimers via their alpha6 helices. *Molecular cell* 36, 696-703.

Dhanasekaran, D.N., and Reddy, E.P. (2008). JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 27, 6245-6251.

Dixit, D., Ghildiyal, R., Anto, N.P., and Sen, E. (2014). Chaetocin-induced ROS-mediated apoptosis involves ATM-YAP1 axis and JNK-dependent inhibition of glucose metabolism. *Cell death & disease* 5, e1212.

Dolphin, D., Forman, A., Borg, D.C., Fajer, J., and Felton, R.H. (1971). Compounds I of catalase and horse radish peroxidase: pi-cation radicals.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 68, 614-618.

Dong, C., Davis, R.J., and Flavell, R.A. (2002). MAP kinases in the immune response. Annual review of immunology 20, 55-72.

Dubrez, L., Berthelet, J., and Glorian, V. (2013). IAP proteins as targets for drug development in oncology. OncoTargets and therapy 9, 1285-1304.

Edlund, S., Bu, S., Schuster, N., Aspenstrom, P., Heuchel, R., Heldin, N.E., ten Dijke, P., Heldin, C.H., and Landstrom, M. (2003). Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta)-induced apoptosis of prostate cancer cells involves Smad7-dependent activation of p38 by TGF-beta-activated kinase 1 and mitogen-activated protein kinase kinase 3. Molecular biology of the cell 14, 529-544.

Efferth, T., Giaisi, M., Merling, A., Krammer, P.H., and Li-Weber, M. (2007). Artesunate induces ROS-mediated apoptosis in doxorubicin-resistant T leukemia cells. PloS one 2, e693.

Eguchi, Y., Shimizu, S., and Tsujimoto, Y. (1997). Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. Cancer research 57, 1835-1840.

Engelman, J.A. (2009). Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. Nature reviews Cancer 9, 550-562.

Esposti, M.D., Hatzinisiriou, I., McLennan, H., and Ralph, S. (1999). Bcl-2 and mitochondrial oxygen radicals. New approaches with reactive oxygen species-sensitive probes. The Journal of biological chemistry 274, 29831-29837.

Evans, C., Gallagher, I., Atkey, P., and Wood, D. (1991). Localisation of degradative enzymes in white-rot decay of lignocellulose. Biodegradation 2, 93-106.

Fadeel, B., Xue, D., and Kagan, V. (2010). Programmed cell clearance: molecular regulation of the elimination of apoptotic cell corpses and its role in the resolution of inflammation. *Biochemical and biophysical research communications* 396, 7-10.

Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., and Henson, P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148, 2207-2216.

Flemming, H.C., and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews Microbiology* 8, 623-633.

Forte, M., and Bernardi, P. (2005). Genetic dissection of the permeability transition pore. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 37, 121-128.

Franco, R., and Cidlowski, J.A. (2006). SLCO/OATP-like transport of glutathione in FasL-induced apoptosis: glutathione efflux is coupled to an organic anion exchange and is necessary for the progression of the execution phase of apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 281, 29542-29557.

Franco, R., Panayiotidis, M.I., and Cidlowski, J.A. (2007). Glutathione depletion is necessary for apoptosis in lymphoid cells independent of reactive oxygen species formation. *The Journal of biological chemistry* 282, 30452-30465.

Franco, R., Sanchez-Olea, R., Reyes-Reyes, E.M., and Panayiotidis, M.I. (2009). Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: manage a trois. *Mutation research* 674, 3-22.

Frand, A.R., and Kaiser, C.A. (2000). Two pairs of conserved cysteines are required for the oxidative activity of Ero1p in protein disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Molecular biology of the cell* 11, 2833-2843.

Freeman, B.A., and Crapo, J.D. (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 47, 412-426.

Freitas, F., Alves, V.D., and Reis, M.A. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in biotechnology* 29, 388-398.

Friesen, C., Kiess, Y., and Debatin, K.M. (2004). A critical role of glutathione in determining apoptosis sensitivity and resistance in leukemia cells. *Cell death and differentiation* 11 Suppl 1, S73-85.

Fuchs, S.Y., Adler, V., Pincus, M.R., and Ronai, Z. (1998). MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 10541-10546.

Garcia-Ruiz, C., Colell, A., Mari, M., Morales, A., and Fernandez-Checa, J.C. (1997). Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *The Journal of biological chemistry* 272, 11369-11377.

Geddie, J.L., and Sutherland, I.W. (1993). Uptake of metals by bacterial polysaccharides. *Journal of Applied Bacteriology* 74, 467-472.

Geesy, G.G. (1982). Microbial exopolymers: ecological and economic considerations. *ASM News* 48, 9-14.

Ghibelli, L., Coppola, S., Rotilio, G., Lafavia, E., Maresca, V., and Ciriolo, M.R. (1995). Non-oxidative loss of glutathione in apoptosis via GSH extrusion. *Biochemical and biophysical research communications* 216, 313-320.

Ghibelli, L., Fanelli, C., Rotilio, G., Lafavia, E., Coppola, S., Colussi, C., Civitareale, P., and Ciriolo, M.R. (1998). Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. *FASEB journal : official publication of*

the Federation of American Societies for Experimental Biology 12, 479-486.

Giorgio, V., Soriano, M.E., Basso, E., Bisetto, E., Lippe, G., Forte, M.A., and Bernardi, P. (2010). Cyclophilin D in mitochondrial pathophysiology. *Biochimica et biophysica acta* 1797, 1113-1118.

Gjermansen, M., Nilsson, M., Yang, L., and Tolker-Nielsen, T. (2010). Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms: genetic elements and molecular mechanisms. *Molecular microbiology* 75, 815-826.

Gjermansen, M., Ragas, P., Sternberg, C., Molin, S., and Tolker-Nielsen, T. (2005). Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environmental microbiology* 7, 894-906.

Gong, J., Traganos, F., and Darzynkiewicz, Z. (1994). A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Analytical biochemistry* 218, 314-319.

Gopal, P.K., Paul, M., and Paul, S. (2014). Curcumin induces caspase mediated apoptosis in JURKAT cells by disrupting the redox balance. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 15, 93-100.

Green, D.R., and Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.

Gregoire, S., and Yang, X.J. (2005). Association with class IIa histone deacetylases upregulates the sumoylation of MEF2 transcription factors. *Molecular and cellular biology* 25, 2273-2287.

Griffiths, G.J., Dubrez, L., Morgan, C.P., Jones, N.A., Whitehouse, J., Corfe, B.M., Dive, C., and Hickman, J.A. (1999). Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *The Journal of cell biology* 144, 903-914.

Gruss, H.J., and Dower, S.K. (1995). Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* 85, 3378-3404.

Guo, J., Zhu, T., Collins, L., Xiao, Z.X., Kim, S.H., and Chen, C.Y. (2007). Modulation of lung cancer growth arrest and apoptosis by *Phellinus linteus*. *Molecular carcinogenesis* 46, 144-154.

Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Sluss, H.K., Derijard, B., and Davis, R.J. (1996). Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *The EMBO journal* 15, 2760-2770.

Gyrd-Hansen, M., Darding, M., Miasari, M., Santoro, M.M., Zender, L., Xue, W., Tenev, T., da Fonseca, P.C., Zvelebil, M., Bujnicki, J.M., *et al.* (2008). IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-kappaB as well as cell survival and oncogenesis. *Nature cell biology* 10, 1309-1317.

Hagenbuchner, J., Kuznetsov, A., Hermann, M., Hausott, B., Obexer, P., and Ausserlechner, M.J. (2012). FOXO3-induced reactive oxygen species are regulated by BCL2L11 (Bim) and SESN3. *Journal of cell science* 125, 1191-1203.

Halestrap, A.P., Kerr, P.M., Javadov, S., and Woodfield, K.Y. (1998). Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochimica et biophysica acta* 1366, 79-94.

Hammond, C.L., Madejczyk, M.S., and Ballatori, N. (2004). Activation of plasma membrane reduced glutathione transport in death receptor apoptosis of HepG2 cells. *Toxicology and applied pharmacology* 195, 12-22.

Harju, T., Kaarteenaho-Wiik, R., Sirvio, R., Paakko, P., Crapo, J.D., Oury, T.D., Soini, Y., and Kinnula, V.L. (2004). Manganese superoxide dismutase is

increased in the airways of smokers' lungs. *The European respiratory journal* 24, 765-771.

He, Y.Y., Huang, J.L., Ramirez, D.C., and Chignell, C.F. (2003). Role of reduced glutathione efflux in apoptosis of immortalized human keratinocytes induced by UVA. *The Journal of biological chemistry* 278, 8058-8064.

Heath-Engel, H.M., and Shore, G.C. (2006). Mitochondrial membrane dynamics, cristae remodelling and apoptosis. *Biochimica et biophysica acta* 1763, 549-560.

Hennet, T., Bertoni, G., Richter, C., and Peterhans, E. (1993). Expression of BCL-2 protein enhances the survival of mouse fibrosarcoma cells in tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity. *Cancer research* 53, 1456-1460.

Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Millman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75, 241-251.

Horikoshi, K. (1995). Discovering novel bacteria with an eye to biotechnological applications. *Current Opinion in Biotechnology* 6, 292-297.

Horikoshi, K., and Grant, W.D. (1998). *Extremophiles - Microbial Life in Extreme Environments*. Wiley-Liss: New York

Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E., and Swanson, P.E. (2009). Cell death. *The New England journal of medicine* 361, 1570-1583.

Hu, S., Vincenz, C., Ni, J., Gentz, R., and Dixit, V.M. (1997). I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 272, 17255-17257.

Hunt, J.A., Lee, J., and Groves, J.T. (1997). Amphiphilic peroxyxynitrite decomposition catalysts in liposomal assemblies. *Chemistry & biology* 4, 845-858.

Huttemann, M., Pecina, P., Rainbolt, M., Sanderson, T.H., Kagan, V.E., Samavati, L., Doan, J.W., and Lee, I. (2011). The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis. *Mitochondrion* 11, 369-381.

Hwang, H.S., Lee, S.H., Baek, Y.M., Kim, S.W., Jeong, Y.K., and Yun, J.W. (2008). Production of extracellular polysaccharides by submerged mycelial culture of *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus* and their insulinotropic properties. *Applied microbiology and biotechnology* 78, 419-429.

Ito, C., Ribeiro, R.C., Behm, F.G., Raimondi, S.C., Pui, C.H., and Campana, D. (1998). Cyclosporin A induces apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* 91, 1001-1007.

Jabs, T. (1999). Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochemical pharmacology* 57, 231-245.

Jarvis, W.D., Fornari, F.A., Jr., Tombes, R.M., Erukulla, R.K., Bittman, R., Schwartz, G.K., Dent, P., and Grant, S. (1998). Evidence for involvement of mitogen-activated protein kinase, rather than stress-activated protein kinase, in potentiation of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine-induced apoptosis by interruption of protein kinase C signaling. *Molecular pharmacology* 54, 844-856.

Jessop, C.E., and Bulleid, N.J. (2004). Glutathione directly reduces an oxidoreductase in the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 279, 55341-55347.

Jing, Y., Dai, J., Chalmers-Redman, R.M., Tatton, W.G., and Waxman, S. (1999). Arsenic trioxide selectively induces acute promyelocytic leukemia cell apoptosis via a hydrogen peroxide-dependent pathway. *Blood* 94, 2102-2111.

Johnson, G.L., and Nakamura, K. (2007). The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochimica et biophysica acta* 1773, 1341-1348.

Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.Y., Ravagnan, L., *et al.* (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410, 549-554.

Kane, D.J., Sarafian, T.A., Anton, R., Hahn, H., Gralla, E.B., Valentine, J.S., Ord, T., and Bredesen, D.E. (1993). Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 262, 1274-1277.

Kannenberg, E.L., and Brewin, N.J. (1994). Host-plant invasion by *Rhizobium*: the role of cell-surface components. *Trends in microbiology* 2, 277-283.

Kaufmann, S.H., and Earnshaw, W.C. (2000). Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental cell research* 256, 42-49.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26, 239-257.

Kharbanda, S., Saxena, S., Yoshida, K., Pandey, P., Kaneki, M., Wang, Q., Cheng, K., Chen, Y.N., Campbell, A., Sudha, T., *et al.* (2000). Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. *The Journal of biological chemistry* 275, 322-327.

Kim, H., Kim, Y.N., Kim, H., and Kim, C.W. (2005). Oxidative stress attenuates Fas-mediated apoptosis in Jurkat T cell line through Bfl-1 induction. *Oncogene* 24, 1252-1261.

Kim, S.J., Zhang, Z., Saha, A., Sarkar, C., Zhao, Z., Xu, Y., and Mukherjee, A.B. (2010). Omega-3 and omega-6 fatty acids suppress ER- and oxidative stress in cultured neurons and neuronal progenitor cells from mice lacking PPT1. *Neuroscience letters* 479, 292-296.

Kinnula, V.L., and Crapo, J.D. (2004). Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free radical biology & medicine* 36, 718-744.

Kirkman, H.N., Rolfo, M., Ferraris, A.M., and Gaetani, G.F. (1999). Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *The Journal of biological chemistry* 274, 13908-13914.

Kohno, T., Yamada, Y., Hata, T., Mori, H., Yamamura, M., Tomonaga, M., Urata, Y., Goto, S., and Kondo, T. (1996). Relation of oxidative stress and glutathione synthesis to CD95(Fas/APO-1)-mediated apoptosis of adult T cell leukemia cells. *J Immunol* 156, 4722-4728.

Kong, F.K., Chen, C.L., and Cooper, M.D. (2002). Reversible disruption of thymic function by steroid treatment. *J Immunol* 168, 6500-6505.

Koo, H., Xiao, J., Klein, M.I., and Jeon, J.G. (2010). Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. *Journal of bacteriology* 192, 3024-3032.

Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., and Hultgren, S.J. (2013). Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 3, a010306.

Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., and Vercesi, A.E. (2001). Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS letters* 495, 12-15.

Kowaltowski, A.J., Netto, L.E., and Vercesi, A.E. (1998). The thiol-specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition. Evidence for the participation of reactive oxygen species in this mechanism. *The Journal of biological chemistry* 273, 12766-12769.

Krebs, H.A., and Gascoyne, T. (1968). The redox state of the nicotinamide-adenine dinucleotides in rat liver homogenates. *The Biochemical journal* 108, 513-520.

Kretz-Remy, C., and Arrigo, A.P. (2002). Gene expression and thiol redox state. *Methods in enzymology* 348, 200-215.

Kroemer, G., and Reed, J.C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nature medicine* 6, 513-519.

Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P.H., and Kirchhoff, S. (2001). Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *The Journal of biological chemistry* 276, 20633-20640.

Kurisu, J., Honma, A., Miyajima, H., Kondo, S., Okumura, M., and Imaizumi, K. (2003). MDG1/ERdj4, an ER-resident DnaJ family member, suppresses cell death induced by ER stress. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 8, 189-202.

Kushnareva, Y., Murphy, A.N., and Andreyev, A. (2002). Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *The Biochemical journal* 368, 545-553.

Kwon, M.J., and Nam, T.J. (2007). A polysaccharide of the marine alga *Capsosiphon fulvescens* induces apoptosis in AGS gastric cancer cells via

an IGF-IR-mediated PI3K/Akt pathway. *Cell biology international* 31, 768-775.

Larochette, N., Decaudin, D., Jacotot, E., Brenner, C., Marzo, I., Susin, S.A., Zamzami, N., Xie, Z., Reed, J., and Kroemer, G. (1999). Arsenite induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *Experimental cell research* 249, 413-421.

Lautier, D., Canitrot, Y., Deeley, R.G., and Cole, S.P. (1996). Multidrug resistance mediated by the multidrug resistance protein (MRP) gene. *Biochemical pharmacology* 52, 967-977.

Lei, K., and Davis, R.J. (2003). JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 2432-2437.

Lei, K., Nimnual, A., Zong, W.X., Kennedy, N.J., Flavell, R.A., Thompson, C.B., Bar-Sagi, D., and Davis, R.J. (2002). The Bax subfamily of Bcl2-related proteins is essential for apoptotic signal transduction by c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Molecular and cellular biology* 22, 4929-4942.

Leshchiner, E.S., Braun, C.R., Bird, G.H., and Walensky, L.D. (2013). Direct activation of full-length proapoptotic BAK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, E986-995.

Leung, M.Y., Liu, C., Koon, J.C., and Fung, K.P. (2006). Polysaccharide biological response modifiers. *Immunology letters* 105, 101-114.

Ley, R., Ewings, K.E., Hadfield, K., and Cook, S.J. (2005). Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK. *Cell death and differentiation* 12, 1008-1014.

Li, P.F., Dietz, R., and von Harsdorf, R. (1999). p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces

cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2. *The EMBO journal* 18, 6027-6036.

Lilly, V.G., Wilson, H.A., and Leach, J.G. (1958). Bacterial polysaccharides. II. Laboratory-scale production of polysaccharides by species of *Xanthomonas*. *Applied microbiology* 6, 105-108.

Lin, M.H., Yang, Y.L., Chen, Y.P., Hua, K.F., Lu, C.P., Sheu, F., Lin, G.H., Tsay, S.S., Liang, S.M., and Wu, S.H. (2011). A novel exopolysaccharide from the biofilm of *Thermus aquaticus* YT-1 induces the immune response through Toll-like receptor 2. *The Journal of biological chemistry* 286, 17736-17745.

Lindberg, B. (1990). Components of bacterial polysaccharides. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* 48, 279-318.

List, A.F., Kopecky, K.J., Willman, C.L., Head, D.R., Persons, D.L., Slovak, M.L., Dorr, R., Karanes, C., Hynes, H.E., Doroshow, J.H., *et al.* (2001). Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 98, 3212-3220.

Liu, J., Shen, H.M., and Ong, C.N. (2001). Role of intracellular thiol depletion, mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in *Salvia miltiorrhiza*-induced apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Life sciences* 69, 1833-1850.

Liu, L., Cavanaugh, J.E., Wang, Y., Sakagami, H., Mao, Z., and Xia, Z. (2003). ERK5 activation of MEF2-mediated gene expression plays a critical role in BDNF-promoted survival of developing but not mature cortical neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 8532-8537.

Liu, Y., Fiskum, G., and Schubert, D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of neurochemistry* 80, 780-787.

Liu, Z.G., Ni, S.Y., Chen, G.M., Cai, J., Guo, Z.H., Chang, P., and Li, Y.S. (2013). Histones-mediated lymphocyte apoptosis during sepsis is dependent on p38 phosphorylation and mitochondrial permeability transition. *PloS one* 8, e77131.

Llamas, I., Bejar, V., Martinez-Checa, F., Martinez-Canovas, M.J., Molina, I., and Quesada, E. (2011). *Halomonas stenophila* sp. nov., a halophilic bacterium that produces sulphate exopolysaccharides with biological activity. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 61, 2508-2514.

Llamas, I., Mata, J.A., Tallon, R., Bressollier, P., Urdaci, M.C., Quesada, E., and Bejar, V. (2010). Characterization of the exopolysaccharide produced by *Salipiger mucosus* A3, a halophilic species belonging to the Alphaproteobacteria, isolated on the Spanish Mediterranean seaboard. *Marine drugs* 8, 2240-2251.

Lomonosova, E., and Chinnadurai, G. (2008). BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* 27 *Suppl* 1, S2-19.

Lonetti, A., Antunes, I.L., Chiarini, F., Orsini, E., Buontempo, F., Ricci, F., Tazzari, P.L., Pagliaro, P., Melchionda, F., Pession, A., *et al.* (2013). Activity of the pan-class I phosphoinositide 3-kinase inhibitor NVP-BKM120 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*.

Lung, M.Y., and Huang, W.Z. (2011). Production, purification and tumor necrosis factor- α (TNF- α) release capability of exopolysaccharide from *Laetiporus sulphureus* (Bulliard: Fries) Bondartsev & Singer in submerged cultures. *Process Biochemistry* 46, 433-439.

Ly, J.D., Grubb, D.R., and Lawen, A. (2003). The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 8, 115-128.

Madash, M., Antonsson, B., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., and Hajnoczky, G. (2002). Rapid kinetics of tBid-induced cytochrome c and Smac/DIABLO release and mitochondrial depolarization. *The Journal of biological chemistry* 277, 5651-5659.

Mah, T.F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G.C., Stewart, P.S., and O'Toole, G.A. (2003). A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 426, 306-310.

Marani, M., Tenev, T., Hancock, D., Downward, J., and Lemoine, N.R. (2002). Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis. *Molecular and cellular biology* 22, 3577-3589.

Markovic, J., Borrás, C., Ortega, A., Sastre, J., Vina, J., and Pallardo, F.V. (2007). Glutathione is recruited into the nucleus in early phases of cell proliferation. *The Journal of biological chemistry* 282, 20416-20424.

Markovich, D. (2012). Slc13a1 and Slc26a1 KO models reveal physiological roles of anion transporters. *Physiology (Bethesda)* 27, 7-14.

Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S.A., Beutner, G., Brdiczka, D., Remy, R., Xie, Z.H., Reed, J.C., and Kroemer, G. (1998). The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *The Journal of experimental medicine* 187, 1261-1271.

Marzo, I., Perez-Galan, P., Giraldo, P., Rubio-Felix, D., Anel, A., and Naval, J. (2001). Cladribine induces apoptosis in human leukaemia cells by caspase-dependent and -independent pathways acting on mitochondria. *The Biochemical journal* 359, 537-546.

Mata, J.A., Bejar, V., Bressollier, P., Tallon, R., Urdaci, M.C., Quesada, E., and Llamas, I. (2008). Characterization of exopolysaccharides produced by

three moderately halophilic bacteria belonging to the family Alteromonadaceae. *Journal of applied microbiology* 105, 521-528.

Matou, S., Collic-Jouault, S., Galy-Fauroux, I., Ratiskol, J., Siquin, C., Guezennec, J., Fischer, A.M., and Helley, D. (2005). Effect of an oversulfated exopolysaccharide on angiogenesis induced by fibroblast growth factor-2 or vascular endothelial growth factor in vitro. *Biochemical pharmacology* 69, 751-759.

McCommis, K.S., and Baines, C.P. (2012). The role of VDAC in cell death: friend or foe? *Biochimica et biophysica acta* 1818, 1444-1450.

Meister, A., and Anderson, M.E. (1983). Glutathione. *Annual review of biochemistry* 52, 711-760.

Meister, A., and Tate, S.S. (1976). Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Annual review of biochemistry* 45, 559-604.

Miranda, C.C., Dekker, R.F., Serpeloni, J.M., Fonseca, E.A., Colus, I.M., and Barbosa, A.M. (2008). Anticlastogenic activity exhibited by botryosphaeran, a new exopolysaccharide produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. *International journal of biological macromolecules* 42, 172-177.

Mitchell, P. (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 41, 445-502.

Mitchell, P. (1972). Chemiosmotic coupling in energy transduction: a logical development of biochemical knowledge. *Journal of bioenergetics* 3, 5-24.

Moldoveanu, T., Follis, A.V., Kriwacki, R.W., and Green, D.R. (2014). Many players in BCL-2 family affairs. *Trends in biochemical sciences* 39, 101-111.

Molina, I.J., Ruiz-Ruiz, C., Quesada, E., and Béjar, V. (2012). Biomedical Applications of Exopolysaccharides Produced by Microorganisms Isolated from Extreme Environments. In *Extremophiles : life under extreme conditions* (John Wiley & Sons, Inc.), pp. 357-366.

Morales, A., Miranda, M., Sanchez-Reyes, A., Biete, A., and Fernandez-Checa, J.C. (1998). Oxidative damage of mitochondrial and nuclear DNA induced by ionizing radiation in human hepatoblastoma cells. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 42, 191-203.

Moskowitz, S.M., Foster, J.M., Emerson, J., and Burns, J.L. (2004). Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *Journal of clinical microbiology* 42, 1915-1922.

Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., *et al.* (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* 85, 817-827.

Nakamura, H., Nakamura, K., and Yodoi, J. (1997). Redox regulation of cellular activation. *Annual review of immunology* 15, 351-369.

Natarajan, S.K., and Becker, D.F. (2012). Role of apoptosis-inducing factor, proline dehydrogenase, and NADPH oxidase in apoptosis and oxidative stress. *Cell health and cytoskeleton* 2012, 11-27.

Nechushtan, A., Smith, C.L., Hsu, Y.T., and Youle, R.J. (1999). Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *The EMBO journal* 18, 2330-2341.

Nichols, C.A., Guezennec, J., and Bowman, J.P. (2005). Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the southern ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents: a review. *Mar Biotechnol (NY)* 7, 253-271.

Nicolaus, B., Kambourova, M., and Oner, E.T. (2010). Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology. *Environmental technology* 31, 1145-1158.

Nicolaus, B., Schiano Moriello, V., Lama, L., Poli, A., and Gambacorta, A. (2004). Polysaccharides from extremophilic microorganisms. *Origins of life and evolution of the biosphere : the journal of the International Society for the Study of the Origin of Life* 34, 159-169.

Nishino, T., and Nagumo, T. (1992). Anticoagulant and antithrombin activities of oversulfated fucans. *Carbohydrate research* 229, 355-362.

Norberg, E., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (2010). Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochemical and biophysical research communications* 396, 95-100.

Oberoi-Khanuja, T.K., Murali, A., and Rajalingam, K. (2013). IAPs on the move: role of inhibitors of apoptosis proteins in cell migration. *Cell death & disease* 4, e784.

Ortega, A.L., Mena, S., and Estrela, J.M. (2011). Glutathione in cancer cell death. *Cancers* 3, 1285-1310.

Panaretakis, T., Pokrovskaja, K., Shoshan, M.C., and Grander, D. (2002). Activation of Bak, Bax, and BH3-only proteins in the apoptotic response to doxorubicin. *The Journal of biological chemistry* 277, 44317-44326.

Pardo, J., Perez-Galan, P., Gamen, S., Marzo, I., Monleon, I., Kaspar, A.A., Susin, S.A., Kroemer, G., Krensky, A.M., Naval, J., *et al.* (2001). A role of the

mitochondrial apoptosis-inducing factor in granulysin-induced apoptosis. *J Immunol* 167, 1222-1229.

Park, E., Yu, K.H., Kim do, K., Kim, S., Sapkota, K., Kim, S.J., Kim, C.S., and Chun, H.S. (2014). Protective effects of N-acetylcysteine against monosodium glutamate-induced astrocytic cell death. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 67, 1-9.

Park, J.M., Greten, F.R., Li, Z.W., and Karin, M. (2002). Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition. *Science* 297, 2048-2051.

Park, J.W., Yoon, J.Y., Kim, Y.J., Kyung, S.Y., Lee, S.P., Jeong, S.H., and Moon, C. (2010). Extracellular signal-regulated kinase (ERK) inhibition attenuates cigarette smoke extract (CSE) induced-death inducing signaling complex (DISC) formation in human lung fibroblasts (MRC-5) cells. *The Journal of toxicological sciences* 35, 33-39.

Parmentier, M., Hirani, N., Rahman, I., Donaldson, K., MacNee, W., and Antonicelli, F. (2000). Regulation of lipopolysaccharide-mediated interleukin-1beta release by N-acetylcysteine in THP-1 cells. *The European respiratory journal* 16, 933-939.

Parolis, H., Parolis, L.A., Boan, I.F., Rodriguez-Valera, F., Widmalm, G., Manca, M.C., Jansson, P.E., and Sutherland, I.W. (1996). The structure of the exopolysaccharide produced by the halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei* strain R4 (ATCC 33500). *Carbohydrate research* 295, 147-156.

Perez-Cruz, I., Carcamo, J.M., and Golde, D.W. (2003). Vitamin C inhibits FAS-induced apoptosis in monocytes and U937 cells. *Blood* 102, 336-343.

Perl, A., Gergely, P., Jr., Puskas, F., and Banki, K. (2002). Metabolic switches of T-cell activation and apoptosis. *Antioxidants & redox signaling* 4, 427-443.

Platanias, L.C. (2003). Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood* 101, 4667-4679.

Porras, A., Zuluaga, S., Black, E., Valladares, A., Alvarez, A.M., Ambrosino, C., Benito, M., and Nebreda, A.R. (2004). P38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli. *Molecular biology of the cell* 15, 922-933.

Prochazka, L., Dong, L.F., Valis, K., Freeman, R., Ralph, S.J., Turanek, J., and Neuzil, J. (2010). alpha-Tocopheryl succinate causes mitochondrial permeabilization by preferential formation of Bak channels. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 15, 782-794.

Puthalakath, H., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., King, S.M., and Strasser, A. (1999). The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Molecular cell* 3, 287-296.

Puthalakath, H., and Strasser, A. (2002). Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell death and differentiation* 9, 505-512.

Quesada, E., Béjar, V., and Calvo, C. (1993). Exopolysaccharide production by *Volcaniella eurihalina*. *Experientia* 49, 1037-1041.

Quesada, E., Béjar, V., Ferrer, M.R., Calvo, C., Lllamas, I., Martínez-Checa, F., Arias, S., Ruiz-García, C., Páez, R., Martínez-Cánovas, M.J., *et al.* (2004). Moderately halophilic exopolysaccharide-producing bacteria. In *Halophilic Microorganisms*. A Ventosa, ed Berlin: Springer-Verlag.

Radic, N., and Injac, R. (2009). Sulphur Tuft Culinary-Medicinal Mushroom, *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill (Aphylophoromycetideae): Bioactive Compounds and Pharmaceutical Effects (Review). *11*, 103-116.

Raguenes, G.H., Peres, A., Ruimy, R., Pignet, P., Christen, R., Loaec, M., Rougeaux, H., Barbier, G., and Guezennec, J.G. (1997). *Alteromonas infernus* sp. nov., a new polysaccharide-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Journal of applied microbiology* *82*, 422-430.

Rasola, A., and Bernardi, P. (2007). The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* *12*, 815-833.

Raymond, M.A., Mollica, L., Vigneault, N., Desormeaux, A., Chan, J.S., Filep, J.G., and Hebert, M.J. (2003). Blockade of the apoptotic machinery by cyclosporin A redirects cell death toward necrosis in arterial endothelial cells: regulation by reactive oxygen species and cathepsin D. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *17*, 515-517.

Rebrin, I., and Sohal, R.S. (2004). Comparison of thiol redox state of mitochondria and homogenates of various tissues between two strains of mice with different longevities. *Experimental gerontology* *39*, 1513-1519.

Reed, J.C. (1997). Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* *387*, 773-776.

Reed, J.C. (1998). Bcl-2 family proteins. *Oncogene* *17*, 3225-3236.

Reed, J.C. (1999). Dysregulation of apoptosis in cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *17*, 2941-2953.

Reinehr, R., Becker, S., Eberle, A., Grether-Beck, S., and Haussinger, D. (2005). Involvement of NADPH oxidase isoforms and Src family kinases in CD95-dependent hepatocyte apoptosis. *The Journal of biological chemistry* *280*, 27179-27194.

Renault, T.T., and Chipuk, J.E. (2014). Death upon a kiss: mitochondrial outer membrane composition and organelle communication govern sensitivity to BAK/BAX-dependent apoptosis. *Chemistry & biology* *21*, 114-123.

Repasky, G.A., Chenette, E.J., and Der, C.J. (2004). Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends in cell biology* *14*, 639-647.

Ricci, C., Pastukh, V., Leonard, J., Turrens, J., Wilson, G., Schaffer, D., and Schaffer, S.W. (2008). Mitochondrial DNA damage triggers mitochondrial-superoxide generation and apoptosis. *American journal of physiology Cell physiology* *294*, C413-422.

Ricci, J.E., Munoz-Pinedo, C., Fitzgerald, P., Bailly-Maitre, B., Perkins, G.A., Yadava, N., Scheffler, I.E., Ellisman, M.H., and Green, D.R. (2004). Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell* *117*, 773-786.

Rodon, J., Dienstmann, R., Serra, V., and Tabernero, J. (2013). Development of PI3K inhibitors: lessons learned from early clinical trials. *Nature reviews Clinical oncology* *10*, 143-153.

Rodrigues, M.L., Nimrichter, L., Cordero, R.J., and Casadevall, A. (2011). Fungal polysaccharides: biological activity beyond the usual structural properties. *Frontiers in microbiology* *2*, 171.

Rostovtseva, T.K., Tan, W., and Colombini, M. (2005). On the role of VDAC in apoptosis: fact and fiction. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 37, 129-142.

Ruiz-Magana, M.J., Rodriguez-Vargas, J.M., Morales, J.C., Saldivia, M.A., Schulze-Osthoff, K., and Ruiz-Ruiz, C. (2012). The DNA methyltransferase inhibitors zebularine and decitabine induce mitochondria-mediated apoptosis and DNA damage in p53 mutant leukemic T cells. *International journal of cancer Journal international du cancer* 130, 1195-1207.

Ruiz-Ruiz, C., Srivastava, G.K., Carranza, D., Mata, J.A., Llamas, I., Santamaria, M., Quesada, E., and Molina, I.J. (2011). An exopolysaccharide produced by the novel halophilic bacterium *Halomonas stenophila* strain B100 selectively induces apoptosis in human T leukaemia cells. *Applied microbiology and biotechnology* 89, 345-355.

S., C.J., Chevolut, L., Helley, D., Ratiskol, J., Bros, A., Siquin, C., Roger, O., and Fischer, A.M. (2001). Characterization, chemical modifications and in vitro anticoagulant properties of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas infernus*. *Biochimica et biophysica acta* 1528, 141-151.

Salvesen, G.S., and Duckett, C.S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature reviews Molecular cell biology* 3, 401-410.

Samhan-Arias, A.K., and Gutierrez-Merino, C. (2014). Purified NADH-Cytochrome b Reductase Is a Novel Superoxide Anion Source Inhibited by Apocynin: Sensitivity to nitric oxide and peroxyxynitrite. *Free radical biology & medicine*.

Samraj, A.K., Sohn, D., Schulze-Osthoff, K., and Schmitz, I. (2007). Loss of caspase-9 reveals its essential role for caspase-2 activation and mitochondrial membrane depolarization. *Molecular biology of the cell* 18, 84-93.

Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-1101.

Sarkar, C., Chandra, G., Peng, S., Zhang, Z., Liu, A., and Mukherjee, A.B. (2013). Neuroprotection and lifespan extension in Ppt1(-/-) mice by NtBuHA: therapeutic implications for INCL. *Nature neuroscience* 16, 1608-1617.

Sarkar, D., Su, Z.Z., Lebedeva, I.V., Sauane, M., Gopalkrishnan, R.V., Valerie, K., Dent, P., and Fisher, P.B. (2002). mda-7 (IL-24) Mediates selective apoptosis in human melanoma cells by inducing the coordinated overexpression of the GADD family of genes by means of p38 MAPK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 10054-10059.

Sato, T., Machida, T., Takahashi, S., Iyama, S., Sato, Y., Kuribayashi, K., Takada, K., Oku, T., Kawano, Y., Okamoto, T., *et al.* (2004). Fas-mediated apoptosome formation is dependent on reactive oxygen species derived from mitochondrial permeability transition in Jurkat cells. *J Immunol* 173, 285-296.

Sauer, K., Cullen, M.C., Rickard, A.H., Zeef, L.A., Davies, D.G., and Gilbert, P. (2004). Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *Journal of bacteriology* 186, 7312-7326.

Saurin, A.T., Martin, J.L., Heads, R.J., Foley, C., Mockridge, J.W., Wright, M.J., Wang, Y., and Marber, M.S. (2000). The role of differential activation of p38-mitogen-activated protein kinase in preconditioned ventricular myocytes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14, 2237-2246.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The EMBO journal* *17*, 1675-1687.

Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1999). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* *274*, 1541-1548.

Scaife, J.F. (1966). The effect of lethal doses of x-irradiation on the enzymatic activity of mitochondrial cytochrome c. *Canadian journal of biochemistry* *44*, 433-448.

Schafer, F.Q., and Buettner, G.R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free radical biology & medicine* *30*, 1191-1212.

Schmitz, N., Wu, H.S., and Glass, B. (2014). Allogeneic transplantation in T-cell lymphomas. *Seminars in hematology* *51*, 67-72.

Schroder, M., and Kaufman, R.J. (2005). ER stress and the unfolded protein response. *Mutation research* *569*, 29-63.

Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S.A., Mannella, C.A., and Korsmeyer, S.J. (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Developmental cell* *2*, 55-67.

Seibel, N.L. (2008). Treatment of acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: peaks and pitfalls. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*, 374-380.

Shaulian, E., and Karin, M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* *20*, 2390-2400.

Shaulian, E., and Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature cell biology* *4*, E131-136.

She, Q.B., Ma, W.Y., and Dong, Z. (2002). Role of MAP kinases in UVB-induced phosphorylation of p53 at serine 20. *Oncogene* 21, 1580-1589.

Shibayama, H., Takai, E., Matsumura, I., Kouno, M., Morii, E., Kitamura, Y., Takeda, J., and Kanakura, Y. (2004). Identification of a cytokine-induced antiapoptotic molecule anamorsin essential for definitive hematopoiesis. *The Journal of experimental medicine* 199, 581-592.

Shih, I.L. (2010). Microbial exo-polysaccharides for biomedical applications. *Mini reviews in medicinal chemistry* 10, 1345-1355.

Shimizu, S., Ide, T., Yanagida, T., and Tsujimoto, Y. (2000). Electrophysiological Study of a Novel Large Pore Formed by Bax and the Voltage-dependent Anion Channel That Is Permeable to Cytochrome c. *Journal of Biological Chemistry* 275, 12321-12325.

Simseka, S., and Campanellac, O.H. (2009). Chemical and rheological properties of bacterial succinoglycan with distinct structural characteristics. *Carbohydr Polym* 76, 320-324.

Sinha, K., Das, J., Pal, P.B., and Sil, P.C. (2013). Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Archives of toxicology* 87, 1157-1180.

Sliva, D., Jedinak, A., Kawasaki, J., Harvey, K., and Slivova, V. (2008). *Phellinus linteus* suppresses growth, angiogenesis and invasive behaviour of breast cancer cells through the inhibition of AKT signalling. *British journal of cancer* 98, 1348-1356.

Soderdahl, T., Enoksson, M., Lundberg, M., Holmgren, A., Ottersen, O.P., Orrenius, S., Bolcsfoldi, G., and Cotgreave, I.A. (2003). Visualization of the compartmentalization of glutathione and protein-glutathione mixed disulfides in cultured cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17, 124-126.

Soga, M., Matsuzawa, A., and Ichijo, H. (2012). Oxidative Stress-Induced Diseases via the ASK1 Signaling Pathway. *International journal of cell biology* 2012, 439587.

Solary, E., Bertrand, R., Kohn, K.W., and Pommier, Y. (1993). Differential induction of apoptosis in undifferentiated and differentiated HL-60 cells by DNA topoisomerase I and II inhibitors. *Blood* 81, 1359-1368.

Soler, N., Delagoutte, E., Miron, S., Facca, C., Baille, D., d'Autreaux, B., Craescu, G., Frapart, Y.M., Mansuy, D., Baldacci, G., *et al.* (2011). Interaction between the reductase Tah18 and highly conserved Fe-S containing Dre2 C-terminus is essential for yeast viability. *Molecular microbiology* 82, 54-67.

Squadrito, G.L., and Pryor, W.A. (1998). Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free radical biology & medicine* 25, 392-403.

Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Molecular cell* 1, 949-957.

Srinivasula, S.M., Fernandes-Alnemri, T., Zangrilli, J., Robertson, N., Armstrong, R.C., Wang, L., Trapani, J.A., Tomaselli, K.J., Litwack, G., and Alnemri, E.S. (1996). The Ced-3/interleukin 1beta converting enzyme-like homolog Mch6 and the lamin-cleaving enzyme Mch2alpha are substrates for the apoptotic mediator CPP32. *The Journal of biological chemistry* 271, 27099-27106.

Srivastava, R.K., Mi, Q.S., Hardwick, J.M., and Longo, D.L. (1999). Deletion of the loop region of Bcl-2 completely blocks paclitaxel-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 3775-3780.

Stennicke, H.R., and Salvesen, G.S. (1998). Properties of the caspases. *Biochimica et biophysica acta* 1387, 17-31.

Stout, R.D., Ferguson, K.P., Li, Y.N., and Lambe, D.W., Jr. (1992). Staphylococcal exopolysaccharides inhibit lymphocyte proliferative responses by activation of monocyte prostaglandin production. *Infection and immunity* 60, 922-927.

Suh, D.H., Kim, M.K., Kim, H.S., Chung, H.H., and Song, Y.S. (2013). Mitochondrial permeability transition pore as a selective target for anti-cancer therapy. *Frontiers in oncology* 3, 41.

Sui, X., Kong, N., Ye, L., Han, W., Zhou, J., Zhang, Q., He, C., and Pan, H. (2014). p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer letters* 344, 174-179.

Sun, L., Xiao, L., Nie, J., Liu, F.Y., Ling, G.H., Zhu, X.J., Tang, W.B., Chen, W.C., Xia, Y.C., Zhan, M., *et al.* (2010). p66Shc mediates high-glucose and angiotensin II-induced oxidative stress renal tubular injury via mitochondrial-dependent apoptotic pathway. *American journal of physiology Renal physiology* 299, F1014-1025.

Sutherland, I. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147, 3-9.

Sutherland, I.W. (1972). Bacterial exopolysaccharides. *Advances in microbial physiology* 8, 143-213.

Sutherland, I.W. (1989). Bacterial exopolysaccharides--their nature and production. *Antibiotics and chemotherapy* 42, 50-55.

Sutherland, I.W. (1990). *Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Sutherland, I.W. (1994). Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. *Biotechnology advances* 12, 393-448.

Sutherland, I.W. (1998). Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends in biotechnology* 16, 41-46.

Szabo, I., De Pinto, V., and Zoratti, M. (1993). The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. II. The electrophysiological properties of VDAC are compatible with those of the mitochondrial megachannel. *FEBS letters* 330, 206-210.

Szabo, I., and Zoratti, M. (1993). The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. I. Binary structure and voltage dependence of the pore. *FEBS letters* 330, 201-205.

Tan, S., Sagara, Y., Liu, Y., Maher, P., and Schubert, D. (1998). The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *The Journal of cell biology* 141, 1423-1432.

Tanaka, N., Kamanaka, M., Enslin, H., Dong, C., Wysk, M., Davis, R.J., and Flavell, R.A. (2002). Differential involvement of p38 mitogen-activated protein kinase kinases MKK3 and MKK6 in T-cell apoptosis. *EMBO reports* 3, 785-791.

Tang, C.H., Ranatunga, S., Kriss, C.L., Cubitt, C.L., Tao, J., Pinilla-Ibarz, J.A., Del Valle, J.R., and Hu, C.C. (2014). Inhibition of ER stress-associated IRE-1/XBP-1 pathway reduces leukemic cell survival. *The Journal of clinical investigation*.

Tao, Y., Zhang, L., and Cheung, P.C. (2006). Physicochemical properties and antitumor activities of water-soluble native and sulfated hyperbranched mushroom polysaccharides. *Carbohydrate research* 341, 2261-2269.

Tardy, C., Sabourdy, F., Garcia, V., Jalanko, A., Therville, N., Levade, T., and Andrieu-Abadie, N. (2009). Palmitoyl protein thioesterase 1 modulates

tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Biochimica et biophysica acta* 1793, 1250-1258.

Tartaglia, L.A., Pennica, D., and Goeddel, D.V. (1993). Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *The Journal of biological chemistry* 268, 18542-18548.

Taylor, R.C., Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 231-241.

Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meinel, E., Neipel, F., Mattmann, C., Burns, K., Bodmer, J.L., Schroter, M., *et al.* (1997). Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386, 517-521.

Tormos, C., Javier Chaves, F., Garcia, M.J., Garrido, F., Jover, R., O'Connor, J.E., Iradi, A., Oltra, A., Oliva, M.R., and Saez, G.T. (2004). Role of glutathione in the induction of apoptosis and c-fos and c-jun mRNAs by oxidative stress in tumor cells. *Cancer letters* 208, 103-113.

Tournier, C., Hess, P., Yang, D.D., Xu, J., Turner, T.K., Nimmual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S.N., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2000). Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288, 870-874.

Traverso, N., Ricciarelli, R., Nitti, M., Marengo, B., Furfaro, A.L., Pronzato, M.A., Marinari, U.M., and Domenicotti, C. (2013). Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013, 972913.

Tretter, L., and Adam-Vizi, V. (2004). Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *The*

Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 24, 7771-7778.

Ueda, S., Nakamura, H., Masutani, H., Sasada, T., Yonehara, S., Takabayashi, A., Yamaoka, Y., and Yodoi, J. (1998). Redox regulation of caspase-3(-like) protease activity: regulatory roles of thioredoxin and cytochrome c. *J Immunol* 161, 6689-6695.

Ulziikhishig, E., Lee, K.K., Hossain, Q.S., Higa, Y., Imaizumi, N., and Aniya, Y. (2010). Inhibition of mitochondrial membrane bound-glutathione transferase by mitochondrial permeability transition inhibitors including cyclosporin A. *Life sciences* 86, 726-732.

Usatyuk, P.V., Parinandi, N.L., and Natarajan, V. (2006). Redox regulation of 4-hydroxy-2-nonenal-mediated endothelial barrier dysfunction by focal adhesion, adherens, and tight junction proteins. *The Journal of biological chemistry* 281, 35554-35566.

USP (2006). United States Pharmacopeial Convention, Inc. *Farmacopea de los estados Unidos de América* 29, *Formulario Nacional* 24. Edición en español. Philadelphia, USA., 3050-3058.

Valladares, A., Alvarez, A.M., Ventura, J.J., Roncero, C., Benito, M., and Porras, A. (2000). p38 mitogen-activated protein kinase mediates tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in rat fetal brown adipocytes. *Endocrinology* 141, 4383-4395.

van den Dobbelsteen, D.J., Nobel, C.S., Schlegel, J., Cotgreave, I.A., Orrenius, S., and Slater, A.F. (1996). Rapid and specific efflux of reduced glutathione during apoptosis induced by anti-Fas/APO-1 antibody. *The Journal of biological chemistry* 271, 15420-15427.

van Galen, P., Kreso, A., Mbong, N., Kent, D.G., Fitzmaurice, T., Chambers, J.E., Xie, S., Laurenti, E., Hermans, K., Eppert, K., *et al.* (2014). The unfolded

protein response governs integrity of the haematopoietic stem-cell pool during stress. *Nature*.

Vander Heiden, M.G., and Thompson, C.B. (1999). Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nature cell biology* *1*, E209-216.

Velasco, C.R., Baud'huin, M., Siquin, C., Maillason, M., Heymann, D., Collic-Jouault, S., and Padrines, M. (2011). Effects of a sulfated exopolysaccharide produced by *Altermonas infernus* on bone biology. *Glycobiology* *21*, 781-795.

Vernis, L., Facca, C., Delagoutte, E., Soler, N., Chanet, R., Guiard, B., Faye, G., and Baldacci, G. (2009). A newly identified essential complex, Dre2-Tah18, controls mitochondria integrity and cell death after oxidative stress in yeast. *PloS one* *4*, e4376.

Voehringer, D.W., McConkey, D.J., McDonnell, T.J., Brisbay, S., and Meyn, R.E. (1998). Bcl-2 expression causes redistribution of glutathione to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 2956-2960.

Volinsky, R., and Kinnunen, P.K. (2013). Oxidized phosphatidylcholines in membrane-level cellular signaling: from biophysics to physiology and molecular pathology. *The FEBS journal* *280*, 2806-2816.

Vucic, D., Dixit, V.M., and Wertz, I.E. (2011). Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nature reviews Molecular cell biology* *12*, 439-452.

Wada, T., and Penninger, J.M. (2004). Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* *23*, 2838-2849.

Walter, D.H., Haendeler, J., Galle, J., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (1998). Cyclosporin A inhibits apoptosis of human endothelial cells by preventing release of cytochrome C from mitochondria. *Circulation* 98, 1153-1157.

Wang, X., and Cederbaum, A.I. (2006). S-adenosyl-L-methionine attenuates hepatotoxicity induced by agonistic Jo2 Fas antibody following CYP2E1 induction in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 317, 44-52.

Wang, X.T., Pei, D.S., Xu, J., Guan, Q.H., Sun, Y.F., Liu, X.M., and Zhang, G.Y. (2007). Opposing effects of Bad phosphorylation at two distinct sites by Akt1 and JNK1/2 on ischemic brain injury. *Cellular signalling* 19, 1844-1856.

Wei, H., Kim, S.J., Zhang, Z., Tsai, P.C., Wisniewski, K.E., and Mukherjee, A.B. (2008). ER and oxidative stresses are common mediators of apoptosis in both neurodegenerative and non-neurodegenerative lysosomal storage disorders and are alleviated by chemical chaperones. *Human molecular genetics* 17, 469-477.

Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727-730.

Weichselbaum, R.R., Hallahan, D.E., Sukhatme, V., Dritschilo, A., Sherman, M.L., and Kufe, D.W. (1991). Biological consequences of gene regulation after ionizing radiation exposure. *Journal of the National Cancer Institute* 83, 480-484.

Weissberg, J.B., Herion, J.C., Walker, R.I., and Palmer, J.G. (1978). Effect of cycloheximide on the bone marrow toxicity of nitrogen mustard. *Cancer research* 38, 1523-1527.

Weon-Taek, S., KAHNG, G.-G., NAM, S.-H., CHOI, S.-D., SUH, H.-H., KIM, S.-W., and PARK, Y.-H. (1999). Isolation and characterization of a novel exopolysaccharide-producing *Paenibacillus* sp. . Korean Society for Applied Microbiology C Seoul, COREE, REPUBLIQUE DE

9, 820-825.

Whitfield, C., and Valvano, M.A. (1993). Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in gram-negative bacteria. *Advances in microbial physiology* 35, 135-246.

Whitfield, J., Neame, S.J., Paquet, L., Bernard, O., and Ham, J. (2001). Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron* 29, 629-643.

Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.C., and eds (1999). *Microbial Extracellular Polymeric Substances*. Berlin: Springer-Verlag.

Wolf, B.B., and Green, D.R. (1999). Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *The Journal of biological chemistry* 274, 20049-20052.

Wolfaardt, G.M., Lawrence, J.R., Robarts, R.D., and Caldwell, D.E. (1995). Bioaccumulation of the Herbicide Diclofop in Extracellular Polymers and Its Utilization by a Biofilm Community during Starvation. *Applied and environmental microbiology* 61, 152-158.

Wu, X.Z., and Chen, D. (2006). Effects of sulfated polysaccharides on tumour biology. *The West Indian medical journal* 55, 270-273.

Wyllie, A.H., Kerr, J.F., and Currie, A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *International review of cytology* 68, 251-306.

Yamaguchi, R., Lartigue, L., Perkins, G., Scott, R.T., Dixit, A., Kushnareva, Y., Kuwana, T., Ellisman, M.H., and Newmeyer, D.D. (2008). Opa1-mediated

cristae opening is Bax/Bak and BH3 dependent, required for apoptosis, and independent of Bak oligomerization. *Molecular cell* 31, 557-569.

Yamamoto, K., Ichijo, H., and Korsmeyer, S.J. (1999). BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Molecular and cellular biology* 19, 8469-8478.

You, B.R., and Park, W.H. (2014). Suberoylanilide hydroxamic acid-induced HeLa cell death is closely correlated with oxidative stress and thioredoxin 1 levels. *International journal of oncology* 44, 1745-1755.

Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S.A., Petit, P.X., Mignotte, B., and Kroemer, G. (1995a). Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *The Journal of experimental medicine* 182, 367-377.

Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssiere, J.L., Petit, P.X., and Kroemer, G. (1995b). Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *The Journal of experimental medicine* 181, 1661-1672.

Zhang, J., Gao, J.X., Salojin, K., Shao, Q., Grattan, M., Meagher, C., Laird, D.W., and Delovitch, T.L. (2000). Regulation of fas ligand expression during activation-induced cell death in T cells by p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH2-terminal kinase. *The Journal of experimental medicine* 191, 1017-1030.

Zhang, X.Q., Bishop, P.L., and Kupferle, M.J. (1998). Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Water Sci Technol* 37, 345-348.

Zhu, T., Guo, J., Collins, L., Kelly, J., Xiao, Z.J., Kim, S.H., and Chen, C.Y. (2007). Phellinus linteus activates different pathways to induce apoptosis in prostate cancer cells. *British journal of cancer* 96, 583-590.

Zhuang, S., Demirs, J.T., and Kochevar, I.E. (2000). p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. *The Journal of biological chemistry* 275, 25939-25948.

Zimmermann, A.K., Loucks, F.A., Schroeder, E.K., Bouchard, R.J., Tyler, K.L., and Linseman, D.A. (2007). Glutathione binding to the Bcl-2 homology-3 domain groove: a molecular basis for Bcl-2 antioxidant function at mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 282, 29296-29304.

Zorov, D.B., Filburn, C.R., Klotz, L.O., Zweier, J.L., and Sollott, S.J. (2000). Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *The Journal of experimental medicine* 192, 1001-1014.

Zou, H., Li, Y., Liu, X., and Wang, X. (1999). An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *The Journal of biological chemistry* 274, 11549-11556.

Zunino, S.J., and Storms, D.H. (2006). Resveratrol-induced apoptosis is enhanced in acute lymphoblastic leukemia cells by modulation of the mitochondrial permeability transition pore. *Cancer letters* 240, 123-134.

X. PUBLICACIONES