

Universidad de Granada
Departamento de Fisiología
Instituto de Nutrición y Tecnología de
los Alimentos “José Mataix Verdú”



**Modulación por las distintas
fuentes grasas de la dieta (aceites
de oliva, girasol y pescado) de la
apoptosis inducida por la
Adriamicina: papel de la
mitocondria.**

Purificación Gutiérrez Ríos
Granada, 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Purificación Gutiérrez Ríos
D.L.: GR. 1791-2009
ISBN: 978-84-692-1318-6

Modulación por las distintas fuentes grasas de la dieta (aceites de oliva, girasol y pescado) de la apoptosis inducida por la Adriamicina: papel de la mitocondria.

Memoria que presenta la Lda. Dña. Purificación Gutiérrez Ríos para aspirar al grado de Doctora en Farmacia

**Dña. Purificación Gutiérrez
Ríos aspirante al grado de
Doctora en Farmacia**

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada bajo las direcciones de:

**Dr. D. José
Mataix Verdú**

**Dr. D. Jesús Francisco
Rodriguez Huertas**

D. José Mataix Verdú, Catedrático del Departamento Fisiología de la Universidad de Granada.

D. Jesús Rodríguez Huertas, Profesor Titular de Fisiología del Departamento de la Universidad de Granada.

Certifican que Dña. Purificación Gutiérrez Ríos, Licenciada en Farmacia, ha realizado bajo nuestra dirección y en el Departamento de Fisiología (Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos) de la Universidad de Granada el presente trabajo de investigación, titulado: “Modulación por las distintas fuentes grasas de la dieta (aceites de oliva, girasol y pescado) en la apoptosis inducida por la Adriamicina: papel de la mitocondria” que ha sido objeto de su Tesis Doctoral, reuniendo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctora.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente en Granada, a de Diciembre de 2008.

El director,

El director,

**Fdo. D. José
Mataix Verdú**

**Fdo. D. Jesús Francisco
Rodríguez Huertas**

*“Nuestra recompensa se encuentra
en el esfuerzo y no en el resultado.
Un esfuerzo total es una victoria completa”.*
Mahatma Gandhi

El trabajo de investigación recogido en esta Memoria de Tesis Doctoral se engloba en el marco de un Proyecto de Investigación PB98-1297 (CICYT). La aspirante al grado de Doctora en Farmacia ha sido becaria del programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia, MEC, Madrid, España.

Con el objetivo de acceder a la mención de “**Doctorado Inernacional**” parte de esta tesis está en castellano y parte en inglés.

En lengua inglesa se pueden encontrar:

- Resumen de la tesis
- Conclusiones

In order to be awarded with the **International Doctorate** accreditation, the condition has to be met that parts of the doctoral thesis, at least the summary and conclusions, are written in English. According to these criteria, the following parts are in English language:

- Summary of the thesis
- Conclusions

PUBLICACIONES DE LA ASPIRANTE AL GRADO DE DOCTORA:

- Quiles JL, Ochoa JJ, Battino M, **Gutierrez-Rios P**, Nepomuceno EA, Frías ML, Huertas JR, Mataix J. “Life-long supplementation with a low dosage of coenzyme Q10 in the rat: effects on antioxidant status and DNA damage”. **Biofactors**. 2005; 25(1-4):73-86.
- Ferraris S, Clark S, Garelli E, Davidzon G, Moore SA, Kardon RH, Bienstock RJ, Longley MJ, Mancuso M, **Gutiérrez Ríos P**, Hirano M, Copeland WC, DiMauro S. “Progressive external ophthalmoplegia and vision and hearing loss in a patient with mutations in POLG2 and OPA1”. **Arch Neurol**. 2008 Jan;65(1):125-31.

COMUNICACIONES PRESENTADAS EN CONGRESOS NACIONALES

- Gutiérrez- Ríos P, Huertas JR, Ochoa JJ, Quiles JL, López-Frías M y Mataix J. “Marcadores plasmáticos clínicos, grasa de la dieta y Envejecimiento” (Comunicación Oral). **Nutr Clin y Diet Hosp**. 2007; 27(2): 69. V Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nutrición Básica y Aplicada (SENBA). Abril 2007, Bilbao, País Vasco.

COMUNICACIONES PRESENTADAS EN CONGRESOS INTERNACIONALES

- Barranco Y, **Gutiérrez- Ríos P**, Arguelles V, Soliani T, De la Plata J, Gallo MA y Huertas JR. “Lymphocyte DNA damage before and after a submaximal exercise: well-trained against recreational cyclists. XXX FIMS World Congress of Sportts Medicine. November, 2008.

Agradecimientos

Terminado este trabajo de Tesis Doctoral no puedo decir eso de “parece que fue ayer...”. El camino ha sido largo y suficientemente duro como para curtirme en el mismo. Sin embargo, si ha habido algo realmente bueno han sido las personas que he encontrado a cada paso, de las que he tenido el privilegio de aprender tanto. Gracias a todas ellas hoy estoy aquí. Por esta razón, este trocito de tesis les pertenece; “va por vosotros”...

A D. José Mataix Verdú, que en paz descanse, por su maestría, entrega profesional y personal, y gran aportación al campo de la nutrición.

A D. José Mataix Verdú por darme la oportunidad de trabajar, aprender y formarme. Por su apoyo y confianza, y por el trato recibido, siempre cercano y afectuoso.

A Emilio Martínez de Victoria por su delicadeza como Director y como persona, y por su gran sencillez. A Mariano Mañas y M^a Dolores Yago, siempre tan auténticos. A los tres, gracias de corazón.

A Ángel Gil por su seriedad, elegancia y “saber estar”.

A mis queridas Susi y Josune, por enseñarme tanto, estar tan cerquita, siempre atentas y disponibles, sois un tesoro.

A mis también muy queridas Albita, Yolanda, Nama´a, MD, M^a Cruz, Dolo y Chiqui por ser así de especiales. Gracias chicas por vuestra generosidad y gran corazón.

En general a todos mis compañeros (Yahira, Carola, Belén, María, Erika, Luz, Ignacio, Jesús María, Elena, M^a Ángeles, Cristina, Carolina, Javi, Sergio...) e investigadores del INYTA que haceis que el Instituto tenga ese componente humano.

A Miguel Moreno Prieto y María López-Jurado, antiguo y nueva directores del Departamento de Fisiología por vuestra buena disposición.

A todos los profesores y miembros del departamento de Fisiología, especialmente a Magdalena por su “buen hacer” conmigo, a Miguel y Toñi por esas clases en las que tanto disfruté.

A las compis de Bioquímica Laura, Natalia, M^a José y Pili, siempre dispuestas a colaborar. Pili, gracias por tu compañía en tierras lejanas.

A José García Medina por su excelente labor con los becarios en el Vicerrectorado de Investigación.

A mis compañeros de la Asociación de Becarios-Precarios (ASI-Granada). Gracias por ese foro, asambleas, jornadas... y esos momentos tan divertidos.

Al personal del Servicio de Animales de la Universidad, en especial a M^a José Chicano porque su amabilidad y simpatía me hicieron más fácil la tarea.

A “mis ratitas” junto a las que pasé los primeros dos años; por la nobleza con la que dieron su vida a la ciencia.

A Rafael por sus sabios consejos y a Enrique por estar en todo momento.

A Juan por enviarme “esa brújula” en el momento más oportuno y a Salva porque su ayuda fue también muy oportuna.

A Angela Tate, gracias Angie por tu ayuda con las traducciones y por esas clases de inglés tan motivadoras.

A la Universidad de Columbia, especialmente a Salvatore DiMauro por aceptarme en su laboratorio haciendo posible que mi estancia en “la Columbia” fuera una experiencia inolvidable. A Michio Hirano y Catarina Quinzii quienes confiaron en mis ganas de trabajar y aprender (gracias Catarina por tu empatía y darme el “empujoncito”). A Ali Naini, mil gracias Ali, por enseñarme con tanta bondad, maestría y paciencia (tu Dios y mi Dios nos echaron una mano). A la colonia de españoles que me acogieron desde el primer día como una más, haciéndome sentir como “en casa” (Bea, Sandra, Ángeles, Estela, Alex, Belén) y en general, a todos los compañeros que tanto me ayudaron (Orhan, Iris, Pablo, Marcia...). Y como no, a Luís Carlos, a ti Luís, por tenderme tu mano al otro lado del charco con tanta generosidad, seriedad y compañerismo. Por animarme y ayudarme a dar “mis primeros pasos” superando el Miedo a lo desconocido, y sobretodo, por alegrarte con mis progresos. A todos vosotros porque estando tan lejos habeis estado tan cerca cuando lo he necesitado.

Al Ministerio de Educación y Ciencia por concederme la beca-contrato FPU que me ha dado la permanencia todos estos años.

A mis amigos por sus continuas muestras de cariño.

A mi familia, quienes celebran conmigo los momentos más dulces y acuden (sin ser llamados) en los “menos buenos”. A ellos sin duda, les debo el estar hoy aquí, especialmente a mis padres y hermano. A mi hermano quien me enseña lo bueno de compartir. A mi padre por educarme en el esfuerzo y la constancia como principio básico. Por su comprensión, apoyo y orientarme en momentos de confusión. A mi madre por sus continuos cuidados, por estar a mi lado y sufrir mis caidas como sólo una madre es capaz, ayudándome a levantarme y seguir siempre adelante.

*...con todo mi cariño,
para todos vosotros...*

ABREVIATURAS

8-OHdG: 8-hydroxydeoxyguanosina	DISC: complejo de señalización e inducción de muerte (death inducing signaling complex)
ADNmt: ADN mitocondrial	DOX: doxorubicina
ADNn: ADN nuclear	DSC: differential scanning calorimetry
ADP: adenina difosfato	EDTA: ácido etilen-diamino-tetraacético
ADR: adriamicina	ER: retículo endoplasmático
AG: ácido graso	ERO: especies reactivas del oxígeno
AGM: ácido graso monoinsaturado	ESR: cociente de sedimentación de eritrocitos (erythrocyte sedimentation rate)
AGS: ácido graso saturado	FAD: flavina adenina dinucleótido
AIF: factor inductor de apoptosis (Apoptosis Inducing Factor)	FADD: dominio de muerte asociado a fas
ANT: translocador nucleótido de adenina	GCs: cromatografía gaseosa (gas chromatography)
Apaf-1: proteína activadora de apoptosis factor-1	GPx: glutatión peroxidasa
AQ: adriamicina semiquinona	GSH: glutatión reducido
ARNr: ARN ribosómico	H₂O₂: peróxido de hidrógeno
ARNt: ARN de transferencia	HEPES: N-(2-hidroxietil)piperacina-N'-(1-ácido etanofulfónico)
ATP: adenosina trifosfato	HER: 1-hidroxietil radical
BH: dominio de homología de las proteínas de la familia de Bcl-2 (Bcl-2 Homology)	HPLC: cromatografía líquida (high performance liquid chromatography)
CAT: catalasa	IAPs: proteínas inhibidoras de apoptosis
CER: ceramida	IL: interleukina
CL: cardiolipina	MAO: mono-amino-oxidasa
CoQ: coenzima Q	MDA: malondialdehído
COX: citocromo oxidasa	MME: membrana mitocondrial externa
CTE: cadena de transporte de electrones	MMI: membrana mitocondrial interna
CyP-D: cliclofilina D	
DD: dominio de muerte	
DED: dominio efector de muerte	

MPT: transición de la permeabilidad mitocondrial

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleótido

NADH-CoQ: nicotinamida adenina dinucleótido ubiquinona oxidoreductasa

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintasa

O₂^{·-}: radical superóxido

OH: radical hidroxilo

PCD: muerte celular programada

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

XL-PCR: long PCR

PEO1: oftalmoplegia externa progresiva (progressive external ophthalmoplegia)

POLG: polimerasa γ

PPE: eritrodisestesia palmo-plantar

PTPm: poro de transición de permeabilidad mitocondrial

RIP: proteína que interacciona con el dominio de muerte del receptor fas

RMN: resonancia magnético nuclear

ROO[·]: radicales lipoperoxilo

ROS: especies reactivas del oxígeno

SDH: succinato deshidrogenasa

SDS: dodecil sulfato sódico

SH: grupo sulfhidrilo

SOD: superóxido dismutasa

SOD: superóxido dismutasa

TBARS: sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico

TCA: ciclo del ácido tricarbóxico

TEMED: NNNN-tetrametiletildiamina

TNF- α : factor de necrosis tumoral α

TRADD: dominio de muerte asociado a receptor TNF

TRAIL: tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

VDAC: canal aniónico voltaje dependiente

XOR: xantina óxido reductasa

z-VAD: inhibidor de caspasas

$\Delta\psi$: potencial de membrana mitocondria

EPA: Ácido eicosapentaenoico

DHA: Ácido docosahexaenoico

MUFA: Ácidos grasos monoinsaturados

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados

PUFA n-3: Ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3

PUFA n-6: Ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-6

QH*: Radical semiquinona

QH₂: Coenzima Q reducido

TXA₂: Tromboxano A₂

TXA₃: Tromboxano A₃

UI: Índice de Instauración

XL-PCR: Long PCR

ÍNDICE

CAPÍTULO I.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	1
CAPÍTULO II.- ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	7
1.- <u>LA MITOCONDRIA</u>	
1.1.- Características generales	9
1.2.- Genética mitocondrial	11
1.3.- Bioenergética mitocondrial	13
1.4.- Biogénesis mitocondrial y especies reactivas derivadas del oxígeno	20
1.5.- Función mitocondrial y grasa de la dieta	20
2.- <u>ESTRÉS OXIDATIVO DE ORIGEN MITOCONDRIAL</u>	
2.1.- Fuente Mitocondrial de Especies Reactivas derivadas del Oxígeno	22
2.2.- Sistema de Defensa Antioxidante	23
2.2.1.- Generalidades	24
2.2.2.- Mecanismos de defensa antioxidante	24
2.2.2.1.- Mecanismos de defensa primarios	24
a) Superóxido dismutasa	24
b) Catalasa	26
c) Glutation peroxidasa	27
2.2.2.2.- Mecanismos de defensa secundarios	28
a) Glutation	28
b) Vitamina E	29
c) Vitamina C	30
d) Coenzima Q	31
e) Polifenoles	32
f) Ácido Úrico	33
g) Otros antioxidantes	33
2.2.2.3.- Mecanismos de defensa terciarios	33
2.3.- Daños mitocondriales y celulares producidos por los radicales	34

libres	
2.4.- Implicaciones fisiológicas y patológicas de los radicales libres	40
3.- <u>CLASIFICACIÓN DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA</u>	
3.1.- Introducción	44
3.2.- Clasificación de la Muerte Celular Programada	45
4.- <u>MOLÉCULAS MODULADORAS DE LA MUERTE CELULAR</u>	
4.1.-Familia Bcl-2	47
4.2.- Vías de Señalización Apoptótica	52
4.2.1.- Vía de receptores y ligandos de muerte	52
4.2.2.- Vía Mitocondrial	53
4.3.- t-Bid: Relación entre la vía extrínseca y la mitocondria	56
5.- <u>ESTRÉS OXIDATIVO Y APOPTOSIS</u>	58
6.- <u>ADRIAMICINA</u>	
6.1.- Introducción	60
6.2.- Efectos de la Adriamicina en la mitocondria	62
6.2.1.- Afinidad a los lípidos	62
6.2.2.- Inducción de Radicales Libres en mitocondria	64
6.2.3.- Desórdenes de Membrana	65
6.2.4.- Peroxidación Lipídica	66
6.2.5.-Inhibición de Enzimas de la Cadena de Transporte de Electrones	67
6.2.6.- Inducción de la Apoptosis	68
CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODOS	71
1.- <u>MATERIAL</u>	
1.1.- Productos Químicos Utilizados	73
1.2.- Aparatos de Uso General	73
1.3.- Animales	74
2.- <u>MÉTODOS</u>	

2.1.- Dietas	75
2.2.- Diseño Experimental	78
2.3.- Sacrificio de los Animales y Obtención de Órganos	80
2.4.-Procesamiento de los Órganos y Obtención de las Distintas Fracciones Subcelulares	81
2.5.- Determinaciones en Plasma	83
2.5.1.- Determinación de colesterol total plasmático	84
2.5.2.- Determinación de triglicéridos plasmáticos	85
2.5.3.- Determinación de creatín quinasa plasmática	85
2.6.- Determinaciones en Mitocondrias de Hígado	85
2.6.1.- Determinación cuantitativa de proteínas en mitocondrias hepáticas	85
2.6.2.-Determinación de Sustancias Reactivas del Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) en mitocondrias hepáticas	86
2.6.3.- Cuantificación del nivel de hidroperóxidos en mitocondrias hepáticas	87
2.6.4.- Swelling Mitocondrial	87
2.6.5.- Medida del Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\psi$)	88
2.6.6.- Medida de la Actividad y Cantidad de la ATP sintasa (Complejo V)	88
2.6.7.- Perfil Lipídico de membranas mitocondriales	89
2.6.8.-Extracción y determinación de Retinol, Ubiquinonas y Vitamina E por HPLC en mitocondria	90
2.6.9.-Microscopía electrónica de mitocondrias aisladas	91
2.7. Determinaciones en Tejido Hepático	93
2.7.1.- Extracción de ADN para estudio de deleciones	93
2.7.2.- Determinación de la concentración de ADN	94
2.7.3.- XL-PCR	94
2.7.4.- Western Blot	95
2.8.- Tratamiento estadístico de los resultados	97
CAPÍTULO IV.- RESULTADOS	99

1.- <u>PESO DE LOS ANIMALES Y PESO DEL HÍGADO AL SACRIFICIO</u>	
1.1.- Peso de las ratas al sacrificio	101
1.2.- Peso del hígado de las ratas al sacrificio	102
2.- <u>BIOQUÍMICA PLASMÁTICA</u>	
2.1.- Contenido en colesterol plasmático	103
2.2.- Contenido en triglicéridos plasmáticos	104
2.3.- Actividad Creatín Quinasa plasmática	105
3.- <u>VALORES DE PROTEÍNA MITOCONDRIAL EN HÍGADO</u>	106
4.-<u>PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN MEMBRANA MITOCONDRIAL HEPÁTICA</u>	
4.1.- Contenido en ácidos grasos saturados en membrana mitocondrial hepática	107
4.2.- Contenido en ácidos grasos monoinsaturados en membrana mitocondrial hepática	108
4.3.- Contenido en ácidos grasos diinsaturados en membrana mitocondrial hepática	108
4.4.- Contenido en ácidos grasos poliinsaturados en membrana mitocondrial hepática	108
4.5.- Índice AGMI/AGPI en membrana mitocondrial hepática	109
4.6.- Índice de Insaturación en membrana mitocondrial hepática	109
4.7.- Índice de Peroxidación en membrana mitocondrial hepática	109
4.8.- Índice oleico/linoleico en membrana mitocondrial hepática	109
4.9.- Relación n6/n3 en membrana mitocondrial hepática	109
5.-<u>PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN MEMBRANA MITOCONDRIAL HEPÁTICA</u>	
5.1.- Hidroperóxidos en mitocondrias hepáticas	111
5.2.-Sustancias Reactivas del Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) en mitocondrias hepáticas	112
6.- <u>ANTIOXIDANTES DE MEMBRANA MITOCONDRIAL HEPÁTICA</u>	
6.1.- α - tocoferol en mitocondrias de hígado	113
6.2.-Coenzima Q en mitocondrias de hígado	115

6.2.1.- Coenzima Q ₉ en mitocondrias de hígado	115
6.2.2.- Coenzima Q ₁₀ en mitocondrias de hígado	116
6.2.3.-Coenzima Q ₉ +Q ₁₀ en mitocondrias de hígado	117
7.- <u>DELECCIONES DEL ADN MITOCONDRIAL EN TEJIDO HEPÁTICO</u>	
7.1.- Deleciones múltiples del ADNmt en tejido hepático	119
7.2.- Número de deleciones del ADNmt en tejido hepático	120
7.3.- Contenido de ADNmt en tejido hepático	120
8.- <u>COMPLEJO V DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES EN MITOCONDRIA DE HÍGADO</u>	
8.1.- Cantidad de ATP sintasa en hígado	122
8.2.- Actividad ATP sintasa en hígado	122
9.- <u>MORFOLOGÍA MITOCONDRIAL</u>	
9.1.- Aspecto general de mitocondrias de hígado	124
9.2.- Área de mitocondrias de hígado	125
9.3.- Densidad media de mitocondrias de hígado	126
9.4.- Circularidad de mitocondrias de hígado	127
10.- <u>POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL Y SWELLING MITOCONDRIAL EN TEJIDO HEPÁTICO</u>	
10.1.- Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\psi$) en hígado	129
10.2.- Swelling en mitocondrias hepáticas	130
11.- <u>MARCADORES DE APOPTOSIS EN TEJIDO HEPÁTICO</u>	
11.1. Bcl-2 en hígado	131
11.2.- Apaf-1 en hígado	132
11.3.- Caspasa-3 en hígado	132
CAPÍTULO V.- DISCUSIÓN	135
1.- <u>INTRODUCCIÓN</u>	137
2.- <u>ESTUDIO DE LA ADAPTACIÓN DE LOS ANIMALES AL MODELO EXPERIMENTAL: ADAPTACIÓN DE LOS FOSFOLÍPIDOS DE MEMBRANA MITOCONDRIAL AL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LA DIETA</u>	140

<u>3.- EFECTO DE LA GRASA DE LA DIETA Y LA DOSIS DE ADRIAMICINA SOBRE EL PESO DE LOS ANIMALES Y SOBRE EL PESO DEL HÍGADO</u>	142
3.1.- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre el peso de los animales	142
3.2.- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre el peso del hígado	143
<u>4.- EFECTO DE LA GRASA DE LA DIETA Y LA DOSIS DE ADRIAMICINA SOBRE PARÁMETROS DE BIOQUÍMICA PLASMÁTICA</u>	143
4.1.- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre el contenido de colesterol y triglicéridos totales en plasma	143
4.2.- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre los niveles de creatín quinasa en plasma.	144
<u>5.- EFECTO DE LA GRASA DE LA DIETA Y DOSIS DE ADRIAMICINA SOBRE PROTEINAS MITOCONDRIALES DE HÍGADO</u>	145
<u>6.- EFECTO DE LA GRASA DE LA DIETA SOBRE LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL DE HÍGADO</u>	146
6.1.- Efecto de la grasa de la dieta sobre la fracción de ácidos grasos saturados (AGS) en membrana mitocondrial hepática	146
6.2.- Efecto de la grasa de la dieta sobre la fracción de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) en membrana mitocondrial hepática	147
6.3.- Efecto de la grasa de la dieta sobre la fracción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en membrana mitocondrial hepática	148
6.4.-Efecto de la grasa de la dieta sobre la relación ácidos grasos monoinsaturados/ácidos grasos poliinsaturados (AGMI/AGPI) en membrana mitocondrial hepática	149
6.5.- Efecto de la grasa de la dieta sobre el índice de insaturación e índice de peroxidación en membrana mitocondrial hepática	150

<u>7.- EFECTO DE LA GRASA DE LA DIETA Y LA DOSIS DE ADRIAMICINA SOBRE PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN MEMBRANA MITOCONDRIAL DE HÍGADO: HIDROPERÓXIDOS Y TBARS</u>	150
<u>8.- EFECTO DE LA GRASA DE LA DIETA Y LA DOSIS DE ADRIAMICINA SOBRE EL CONTENIDO MITOCONDRIAL EN MOLÉCULAS ANTIOXIDANTES EN HÍGADO: α-TOCOFEROL Y COENZIMA Q</u>	154
8.1- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre el contenido mitocondrial en α -tocoferol en hígado.	154
8.2- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre el contenido mitocondrial de coenzima Q en hígado.	158
<u>9.- EFECTO DE LA GRASA DE LA DIETA Y LA DOSIS DE ADRIAMICINA SOBRE EL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL Y SWELLING MITOCONDRIAL EN HÍGADO</u>	161
9.1.- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre el potencial de membrana mitocondrial en tejido hepático	161
9.2.- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre el swelling mitocondrial en tejido hepático	164
<u>10.- EFECTO DE LA GRASA DE LA DIETA Y LA DOSIS DE ADRIAMICINA SOBRE LA MORFOLOGÍA MITOCONDRIAL EN HÍGADO</u>	166
10.1.- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre el área de mitocondrias de hígado	167
10.2.- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre la circularidad mitocondrial de hígado	168
<u>11.- EFECTO DE LA GRASA DE LA DIETA Y LA DOSIS DE</u>	169

<u>ADRIAMICINA SOBRE MARCADORES DE APOPTOSIS EN HÍGADO</u>	
11.1.- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre los niveles de Bcl-2 en tejido hepático	170
11.2.- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre los niveles de Apaf-1 en hígado	171
11.3.- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre los niveles de caspasa-3 en tejido hepático	172
<u>12.- EFECTO DE LA GRASA DE LA DIETA Y LA DOSIS DE ADRIAMICINA SOBRE EL ADN MITOCONDRIAL Y EL COMPLEJO V DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES EN HIGADO</u>	173
12.1.- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre el ADN mitocondrial en tejido hepático	173
12.2.- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre el complejo V de la cadena de transporte de electrones en hígado	176
CAPÍTULO VI.- CONCLUSIONES	197
CAPÍTULO VII.- BIBLIOGRAFÍA	183
CAPÍTULO VIII.- SUMMARY	247
CAPÍTULO IX.- CONCLUSIONS	253

CAPÍTULO I.-JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

CAPÍTULO I.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La existencia de un equilibrio entre la división y la muerte celular es de vital importancia para el desarrollo y mantenimiento de los organismos multicelulares. Desórdenes en ambos procesos tienen consecuencias patológicas y pueden conducir a una embriogénesis errónea, enfermedades neurodegenerativas, o desarrollo de cáncer. Por esta razón, el equilibrio entre la vida y la muerte está rigurosamente controlado y los elementos defectuosos son eliminados con eficacia por un proceso llamado “muerte celular programada” (PCD) (Danial NN y colbs 2004). La apoptosis es un tipo de muerte celular programada inherente y controlado que requiere de una familia de cisteínproteasas, conocidas como caspasas, cuya función es ejecutar el destino de la célula de una manera programada, conduciendo a cambios morfológicos típicos (Degterev A., 2003).

Actualmente se considera a las mitocondrias como organelas intracelulares centrales implicadas en mediar en la mayoría de las rutas apoptóticas en células mamíferas (Newmeyer DD y colbs., 2003; Kroemer G, 2003; Ravagnan L y colbs. 2002; Zamzami N y colbs., 2001; Green DR y colbs., 2004; Sorice M y colbs., 2004). En concreto, las mitocondrias se encuentran involucradas mediante la vía intrínseca de muerte celular, la cual se puede iniciar por una variedad de estímulos incluyendo radiación UV, radiación γ , calor, daños del ADN, acciones de algunas oncoproteínas y genes supresores del tumor, factores virales, y la mayoría de los agentes quimioterápicos (Kroemer G, 2003).

La doxorubicina es una antraciclina aminoglucósido, aislada por primera vez de cultivos de *Streptomyces peucetius*, y muestra un amplio espectro de actividad antitumoral en tumores sólidos y leucemias. Aunque la acción antitumoral de la adriamicina puede ser mediada por un amplio rango de mecanismos, la producción de radicales libres se considera una de las principales causas de toxicidad. La mayoría de los estudios sobre los efectos tóxicos de la adriamicina apuntan a la membrana mitocondrial, como el blanco principal de la toxicidad celular. Morfológicamente este efecto se manifiesta en el hinchamiento (swelling) y la lisis mitocondrial consecuencia factores tales como la reducción del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) y la

formación del poro de transición de permeabilidad (*Albano E y colbs., 1988; Sakurai K y colbs., 2000*).

A través de la dieta y más concretamente de la grasa dietética se puede influir sobre el estado oxidativo celular. Es conocido que el tipo de composición en ácidos grasos de la dieta determina en mayor o menor grado la composición en ácidos grasos de las membranas, o lo que es lo mismo, su nivel de insaturación, y por lo tanto, su distinta vulnerabilidad a la peroxidación lipídica. En función de lo argumentado, dietas con grasas menos insaturadas, concretamente aceite de oliva, no sólo pueden condicionar un estado oxidativo menor de base, sino tamponar posibles efectos de estrés oxidativo por causas diversas, al determinar una membrana menos insaturada (*Huertas y colbs., 1991; Mataix y colbs., 1998; Quiles y colbs., 1999c; Ochoa y colbs., 2000*).

En este trabajo se ha planteado la comparación entre aceite de oliva virgen, girasol y pescado debido a las diferencias en el perfil lipídico, además de por ser fuentes grasas mayoritariamente utilizadas en la sociedad. El interés del aceite de oliva virgen reside por un lado, en las propiedades terapéuticas que se atribuyen a los ácidos grasos monoinsaturados, y por otro, a su alto contenido en sustancias antioxidantes (vitamina E, CoQ y polifenoles) que pueden contribuir a una menor susceptibilidad a la oxidación en los sujetos que lo consumen habitualmente. En los últimos 15 años nuestro grupo de investigación ha estado trabajando en los efectos del aceite de oliva virgen rico en antioxidantes en relación a la toxicidad de la adriamicina en ratas. Varios aspectos del metabolismo, principalmente aquellos relacionados con la composición mitocondrial, función y generación de radicales libres han sido estudiados en relación a la adriamicina y a la ingesta de aceite de oliva virgen y otros tipos de fuentes grasas.

El presente estudio es novedoso además de lo destacado en los párrafos anteriores, porque aborda aspectos tóxicos de la doxorubicina a nivel del tejido hepático. El hígado es un órgano mitótico, es decir, con capacidad de regeneración. Funcionalmente es la central metabólica del organismo, la doxorubicina es metabolizada en el mismo. Además de los efectos clínicos derivados de la administración de adriamicina, en un estudio llevado a cabo por *Zeidan y colaboradores (Zeidan y colbs., 2002)*, se observó hepatotoxicidad a nivel subcelular incluyendo

mitocondrias polimórficas, vacuolas citoplasmáticas y acumulaciones lipídicas. La formación de radicales libres es el mecanismo propuesto en la hepatotoxicidad inducida por la doxorubicina (*Gokcimen A y colbs., 2007*).

Los efectos adversos de la doxorubicina se ha demostrado que se correlacionan con la dosis total de droga administrada a los pacientes (*Lefrak y colbs., 1973; Cortes y colbs., 1975; Von Hoff y colbs., 1979*). En nuestro estudio usamos dos dosis diferentes de DOX; 2.5 mg/kg/día y 10 mg/kg/día durante los dos días previos al sacrificio. La dosis de 10 mg/kg/día fue elegida en base a 1) estudios anteriores de nuestro grupo de investigación, en los que comprobamos que el día del sacrificio no había una esencial mortalidad inducida por la toxicidad de la ADR y 2) cuando se convierte a una dosis equivalente en humanos, ésta es similar a la dosis de quimioterápico utilizada clínica (*Carter SK., 1975; Freireich EJ y colbs., 1966*). La dosis 2.5 mg/kg/día se usó para probar el efecto de dosis menores y la respuesta mitocondrial asociada (en concreto del sistema antioxidante).

El **objetivo principal** de este trabajo consiste en comprobar si las mitocondrias de tejido hepático enriquecidas de forma fisiológica a través de la grasa dietética en ácido oleico son menos susceptibles a la peroxidación lipídica y, por tanto, más resistentes al proceso apoptótico inducido por la doxorubicina, que aquellas enriquecidas con ácidos grasos poliinsaturados. Por otro lado, ensayamos la respuesta hepática ante dosis diferentes de adriamicina, en concreto, frente a una dosis de 2.5 mg/kg/día o frente a otra de 10 mg/kg/día. Para analizar lo expuesto anteriormente tratamos de encontrar marcadores fiables del proceso de apoptosis celular como puedan ser variaciones del potencial de membrana ($\Delta\psi$), swelling mitocondrial, o diversas proteínas apoptóticas (caspasa-3, Apaf-1, y Bcl-2) bajo una influencia nutricional específica.

Para ello se parte de doce grupos de ratas alimentados hasta los 3 meses de edad con una dieta semisintética en la que varía la fuente grasa: aceite de oliva, girasol y pescado, pretendiendo de esta forma que se generen membranas, en el primer caso más ricas en ácido oleico, en el segundo linoleico y en el tercero ricas en EPA y DHA. También se incluyó un grupo control al que se le suministró pienso comercial. La

adriamicina se administro a dosis de 2.5 mg/kg/día y 10 mg/Kg/día respectivamente dos días antes del sacrificio.

Con este modelo experimental, el objetivo general se ha abordado mediante los siguientes objetivos específicos:

- Estudio del grado de adaptación de los ácidos grasos fosfolipídicos de las membranas mitocondriales hepáticas a las diferentes fuentes grasas de la dieta.
- Valoración del grado de estrés oxidativo alcanzado en el modelo experimental propuesto en relación a la intervención nutricional y las diferentes dosis de adriamicina en hígado. En concreto, estudiar aspectos relacionados con la peroxidación lipídica y con el daño oxidativo al ADN mitocondrial (deleciones).
- Análisis del efecto de la dosis de adriamicina y de la dieta desde un punto de vista de posibles modificaciones en el sistema de defensa antioxidante de bajo peso molecular (coenzima Q y α -tocoferol) en hígado.
- Comprobación del efecto de la dosis de adriamicina y de la dieta sobre la morfología mitocondrial hepática.
- Estudio del efecto de la dosis de adriamicina y la dieta sobre el potencial de membrana mitocondrial, swelling mitocondrial y proteínas apoptóticas.

***CAPÍTULO II.-ANTECEDENTES
BIBLIOGRÁFICOS***

CAPÍTULO II: ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1. LA MITOCONDRIA

1.1- Características Generales

La mitocondria, cuyo nombre proviene del griego mito (hilo) y chondros (cartílago), es una organela citoplasmática con un origen ciertamente peculiar. Todas sus características estructurales y funcionales evidencian que en la génesis de la célula eucariota, una bacteria fue fagocitada por un microorganismo de mayor tamaño con el fin de aprovecharse de la energía, en forma de ATP, que ésta fabricaba mientras la célula anfitriona dotaba a su huésped de materias primas y protección. La simbiosis perfecta entre estos dos organismos primitivos supone uno de los pasos más importantes de la evolución (*Emelyanov VV, 2003*). A lo largo del tiempo, estas bacterias fagocitadas fueron asumiendo tareas cada vez más relevantes dentro del funcionamiento interno de esta célula primitiva hasta convertirse en lo que hoy conocemos como mitocondria.

Las mitocondrias dependiendo del órgano y de la distribución intracelular presentan una variedad de formas y tamaños pero generalmente son de 1-2 μm de longitud y de 0.25-0.5 μm de diámetro. Esta forma además es dinámica, produciéndose fenómenos de fisión y fusión apreciables con técnicas de microscopía confocal (*Karbowski y colbs., 2003; Nisoli y colbs., 2004*).

La mitocondria presenta una estructura con dos compartimentos bien definidos, matriz y espacio intermembranal, delimitados por dos membranas, interna y externa, con características morfológicas y funcionales bien diferentes (**figura 1**). En la matriz se localizan varias copias del genoma circular mitocondrial (herencia de su pasado procariota), ribosomas, más parecidos a los de las bacterias que a los de las células eucariotas, y numerosos complejos multienzimáticos necesarios tanto para las funciones energéticas, como para la expresión y la replicación de genes (*Gray, M.W. y colbs., 1999*). El espacio intermembranal tiene un menor contenido proteico, en él se localizan las enzimas que median el tránsito de sustancias entre la matriz mitocondrial y el citosol. Del mismo modo, sus membranas presentan también diferencias significativas. La membrana externa, a diferencia de la interna y debido a la presencia de la proteína porina (*DePierre, J.W. y colbs., 1977*) conocida en la actualidad como canal aniónico

dependiente de voltaje (VDAC), es permeable, en condiciones fisiológicas, al paso de iones y de metabolitos con pesos moleculares inferiores a 6000 Daltons. Además posee enzimas que transforman los sustratos lipídicos en formas que posteriormente son metabolizables en la matriz (*Remmen y Richardson, 2001*). La membrana interna, caracterizada morfológicamente por presentar unas invaginaciones denominadas crestas, presenta multitud de complejos enzimáticos (los componentes de la cadena transportadora de electrones, la ATP sintasa) y proteínas que regulan el paso de metabolitos (como el transportador de nucleótidos de adenina), resultando especialmente impermeable a iones. La cardiolipina es el fosfolípido más abundante, sólo se encuentra en esta membrana y es necesaria para el correcto funcionamiento y estructura de la mitocondria (*Sastre y cols., 1999*) y está implicada en la supervivencia celular (*McMillin y Dowhan, 2002*). Además posee fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina (*Remmen y Richardson, 2001*). La composición en ácidos grasos del total de lípidos mitocondriales es similar a la que se encuentra en la célula en conjunto, si bien como regla general, se puede afirmar que las cadenas de ácidos grasos insaturados son superiores en mitocondria en comparación con el resto de fracciones celulares (*Daum, G. y cols. 1986*).

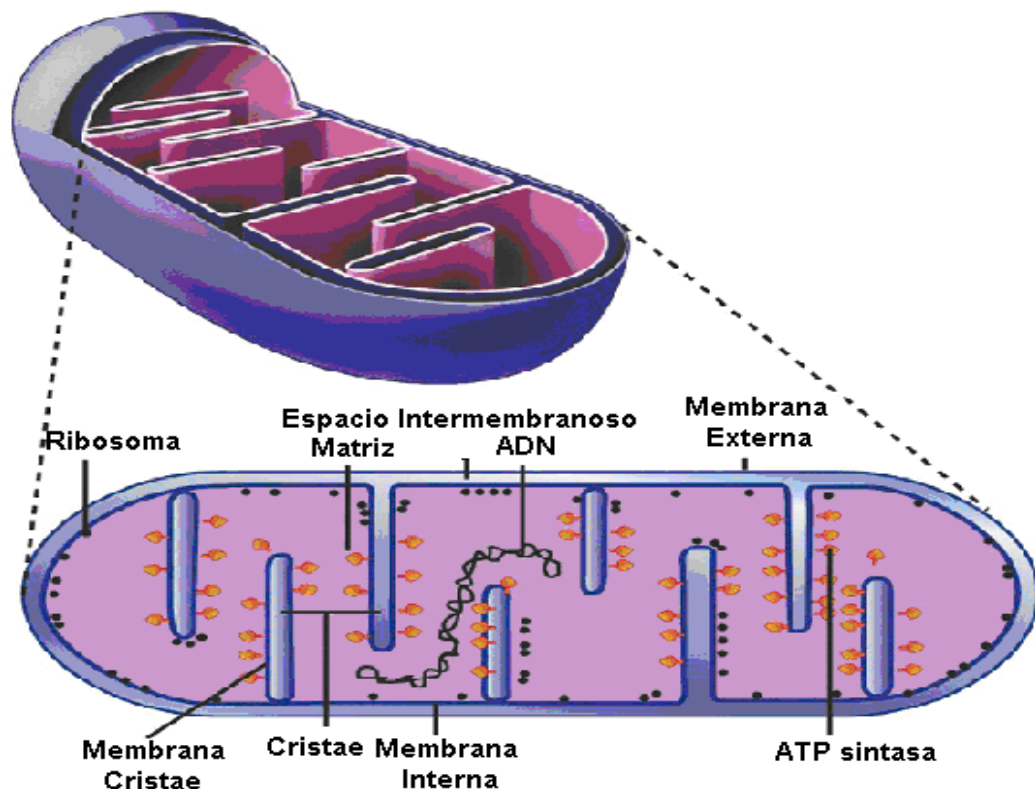


Figura 1: Estructura mitocondrial

Su función principal es la síntesis de ATP a través del transporte electrónico y la fosforilación oxidativa conjuntamente con la oxidación del acetyl-CoA por el ciclo del ácido tricarboxílico y el catabolismo de ácidos grasos por la β -oxidación, parte de reacciones de biosíntesis de pirimidinas y de grupos hemo, así como la transcripción, la traducción, y la replicación del ADNmt que también tienen lugar fuera de la mitocondria. Además de la producción de energía, las mitocondrias son también la principal fuente intracelular y el blanco inmediato de las especies reactivas del oxígeno (EROs), que se generan continuamente como consecuencia de la oxidación procedente del O_2 en la respiración mitocondrial. Otra función importante de la mitocondria es modular en determinadas circunstancias la iniciación y ejecución de la apoptosis desempeñando un papel clave en la determinación de la vida y la muerte celular (*Lee & Wei, 2000*).

En mamíferos, cada célula contiene entre varios centenares a más de mil mitocondrias. El tamaño, la forma, y la abundancia de este microorgánulo varía dramáticamente entre diversos tipos de células y pueden cambiar bajo diversas situaciones energéticas, fisiológicas y/o ambientales. La abundancia de mitocondrias en una célula, determinada por la biogénesis y la división (*Attardi & Schatz, 1988*), es controlada por la activación de los factores específicos de la transcripción y vías de señalización (*Attardi & Schatz, 1988; Moyes & Hood, 2003*).

1.2- Genética Mitocondrial

Las mitocondrias se distinguen de otras organelas celulares de mamíferos porque poseen su propio material genético, ADNmt, y son capaces de sintetizar un conjunto pequeño pero vital de proteínas.

El ADNmt de rata wistar (*rattus norvegicus*) es una molécula pequeña, circular, de doble cadena y de 16.3 KB de longitud (**figura 2**). Contiene 37 genes, que codifican: 2 ARNs ribosomales (ARNr), 22 de transferencia RNAs (ARNt), y 13 polipéptidos. Los 13 polipéptidos codificados por el ADNmt son componentes de la cadena respiratoria y de la fosforilación oxidativa e incluyen 7 subunidades del complejo I (nicotinamida adenina dinucleótido ubiquinona oxidoreductasa [NADH-CoQ]), 1 subunidad del complejo III (citocromo c oxidoreductasa de CoQ), 3 subunidades del complejo IV (citocromo c oxidasa), y 2 subunidades del complejo V (ATP sintasa).

Estos 4 complejos también contienen aproximadamente 75 subunidades codificadas por el ADN nuclear que son importados del citoplasma a la mitocondria.

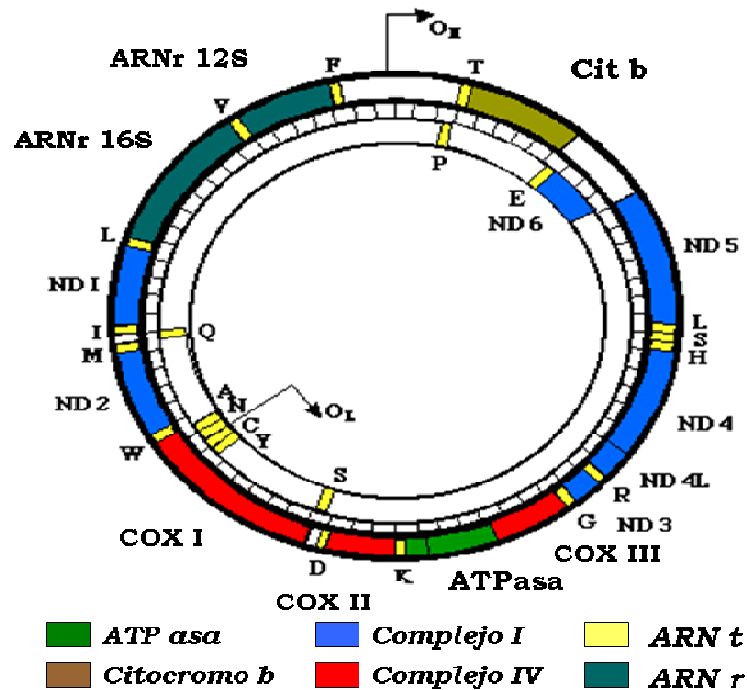


Figura 2: Representación esquemática del genoma mitocondrial

La genética del ADNmt presenta una serie de características que la diferencian de la del ADN nuclear:

- *Herencia Materna:* El ADNmt se hereda exclusivamente por vía materna, ya que todas las mitocondrias son aportadas por el oocito. Por lo tanto, la mayoría de las mutaciones puntuales del ADNmt maternal se heredan.
- *Heteroplasmia y efecto umbral:* A diferencia de los genes nucleares, en los que cada uno consiste en un alelo materno y uno paterno, son centenares o millones de copias del ADNmt las que contiene cada célula. Así, cuando hay una mutación perjudicial, tanto ADNmt normales como transformados pueden coexistir dentro del mismo tejido, condición conocida como heteroplasmia. La situación de individuos sanos, cuando todos los ADNmts son idénticos, se llama homoplasmia. Las mutaciones no perjudiciales del ADNmt (polimorfismos

neutrales) son homoplásmicas, mientras que las mutaciones patógenas están generalmente, aunque no siempre, en forma heteroplásmica. Un número mínimo de ADNmt transformado debe estar presente antes de la disfunción del tejido y de que las manifestaciones clínicas lleguen a ser evidentes (efecto umbral). Los tejidos con alto requerimiento para el metabolismo energético oxidativo, tal como músculo esquelético, corazón, y cerebro, tienen umbrales relativamente bajos y son particularmente vulnerables a las mutaciones del ADNmt. Los niveles relativamente bajos de ADNmt transformados pueden afectar a la capacidad respiratoria de estos tejidos, y los altos niveles pueden ser devastadores. Por lo tanto, no es sorprendente que la mayoría de los desórdenes del ADNmt sean encefalomiopatías, que afectan sobre todo el cerebro y el músculo.

- *Segregación Mitótica:* En la división celular, la proporción de ADNmt mutado en células hijas puede variar debido al fenómeno de la segregación mitótica. Cuando el umbral patógeno para un tejido en particular es excedido, el fenotipo puede cambiar. Así, en un paciente que sea heteroplásmico para una mutación patógena, el fenotipo clínico puede cambiar durante el curso del tiempo.

1.3- Bioenergética Mitocondrial

En condiciones aeróbicas, la fosforilación oxidativa acoplada a la transferencia electrónica a través de la cadena de transporte de electrones (CTE) es responsable de la producción del 90-95% del ATP que genera la célula (*Skulachev, 1999*). La CTE tiene como misión oxidar los equivalentes reductores (NADH Y FADH₂) generados en la glucólisis y la β -oxidación, que proviene de la oxidación de los principios inmediatos. El flujo de electrones generado se canaliza en reacciones redox con los diferentes complejos multienzimáticos de la CTE, con el oxígeno molecular como aceptor final. La reducción del oxígeno es el paso final que se realiza por la citocromo oxidasa, acompañado del aporte de protones proveniente del bombeo que se establece en diferentes puntos de la CTE. La energía que se produce en estas reacciones genera un potencial eléctrico y un gradiente de pH a través de la membrana interna. La energía libre de estos procesos se utiliza para bombear los protones desde un lado a otro de la

membrana en tres lugares específicos de la cadena, y el gradiente electrónico resultante se utiliza para sintetizar ATP mediante el complejo V o ATP sintasa. Durante este proceso el ADP es fosforilado a ATP (**figura 4 y 5**) (Mitchell, 1961; 1966).

La CTE está compuesta por cinco complejos enzimáticos y dos moléculas que actúan como nexo de unión o lanzadera (coenzima Q o ubiquinona y citocromo c) (Saraste, 1999)

- *Complejo I (NADH ubiquinona (CoQ) oxidoreductasa)*: es el complejo más voluminoso de la CTE con un tamaño aproximado de 900 kDa. El complejo I cataliza la transferencia de electrones desde el NADH a la ubiquinona ligado a la translocación de protones (Friedrich y cols., 1995). En mamíferos el complejo I contiene 42 o 43 subunidades diferentes (25 polipéptidos, de los cuales 7 están codificados por el ADNmt) en una estequiometría no del todo establecida, un flavín mononucleótido, siete u ocho centros Fe-S diferentes de naturaleza no hémica, lípidos unidos covalentemente fundamentales para su actividad catalítica y tres moléculas de quinol (Walter, 1995; Saraste, 1999). A través de técnicas de microscopía electrónica de partículas simples se ha revelado que el complejo I se dispone en una estructura en L con dos dominios grandes separados por un collar fino. Un brazo de la estructura se encuentra inmerso en la membrana mitocondrial, mientras que el otro penetra dentro de la matriz (Schulte y cols., 1994; Guenebaut y cols., 1998; Saraste, 1999). El brazo periférico, que incluye un mononucleótido de flavina y al menos 4 centros Fe-S, forma la fracción NADH deshidrogenasa. El brazo unido a la membrana contiene las siete subunidades codificadas por el ADNmt, uno o dos centros Fe-S, y constituye la fracción ubiquinona oxidoreductasa (Hofhaus y cols., 1991; Schulte y cols., 1994). Funcionalmente, un déficit o bloqueo a nivel del complejo I (con rotenona, por ejemplo) impide la oxidación del NADH, mientras que la oxidación del FADH₂ generado en la reacción de la succinato deshidrogenasa, no se ve afectada porque está mediado por el complejo II.
- *Complejo II (succinato ubiquinona oxidoreductasa)*: es un componente del ciclo de Krebs y participa en la CTE transfiriendo electrones desde el succinato al “pool” de ubiquinona. No transloca protones al espacio intermembrana y, por

tanto, tan sólo suministra electrones a la CTE (*Saraste 1999*). Contiene cuatro polipéptidos y es el único que no posee subunidades codificadas por el ADNmt. Estructuralmente se puede dividir en dos fracciones: una soluble formada por la succinato deshidrogenasa (SDH) y otra que sirve como anclaje a la membrana. La SDH a su vez, está formada por dos subunidades: una subunidad flavoproteica (70 kDa), que contiene el sitio de unión al succinato y otra subunidad compuesta por tres centros Fe-S (30 kDa). La SDH se une a la membrana interna mediante dos polipéptidos (15 y 13 kDa) que contiene un grupo hemo (citocromo b 558); estas dos proteínas son necesarias para la unión con la ubiquinona (*Ackrell y cols., 1992; Saraste, 1999*). De forma similar al complejo I, un déficit o bloqueo del complejo II (con malonato, por ejemplo) se caracteriza por una disminución de la oxidación de los sustratos dependientes de $FADH_2$, como el succinato, y una oxidación normal de los que dependen del NADH, como malato, glutamato o aspartato.

- *Complejo III (ubiquinol citocromo c oxidorreductasa)*: transfiere electrones desde el ubiquinol hasta el citocromo c. Esta reacción de oxidación-reducción va acoplada a la generación de un gradiente de protones a través de la membrana interna por un mecanismo conocido como el “ciclo Q” (*Trumpower, 1990*). Así, el ubiquinol, un compuesto liposoluble con gran difusión lateral en la membrana, acopla la reacción de oxidación-reducción a la protonación y desprotonación. Estas dos reacciones están topológicamente organizadas, de tal manera que la oxidación del ubiquinol conduce al transporte activo de protones a través de la membrana interna (*Saraste, 1999*). Esto requiere dos sitios activos, uno para la oxidación del ubiquinol y liberación de protones en la superficie externa de la membrana interna (Q_o), y otro para la reducción de la ubiquinona acoplada a la captura de protones desde el lado interno o matricial de la membrana interna (Q_i). Este mecanismo requiere que los electrones sean transferidos desde el sitio Q_o al sitio Q_i (*Saraste 1999*). Estructuralmente, el complejo III de mamíferos contiene 11 subunidades, pero solamente tres de ellas llevan centros redox los cuales son usados en la conservación de la energía: Estas tres subunidades tienen sus correspondientes homólogos en bacterias (*Saraste 1999*). Las subunidades claves son: el citocromo b, que está codificado

por el ADNmt (*Anderson y cols 1981*) y que tiene 8 hélices transmembranas y dos grupos hemo entre la hélice β y γ ; una proteína Fe-S anclada a la membrana con un centro tipo Rieske ($\text{Fe}_2\text{-S}_2$); y un citocromo c_1 anclado a la membrana (*Saraste 1999*). La función del resto de subunidades no se conoce (*Adams y Turnbull, 1996*) aunque algunos experimentos realizados en levaduras indican que desempeñan un papel en el ensamblaje del complejo y posiblemente en la regulación de su actividad, mientras otros experimentos apuntan a que podrían estar implicadas en la importación de proteínas (*Braun y Schmitz, 1995*), sugiriendo una multifuncionalidad del complejo III. Por tanto, el sitio Q_o es localizado entre la proteína Fe-S y el citocromo b, cercano a la cara externa de la membrana interna, y el sitio Q_1 junto al citocromo b, en la cara matricial de la membrana interna (*Saraste 1999*). Los dos grupos hemo del citocromo b tienen diferentes potenciales redox, localizándose el sitio Q_o cerca del grupo hemo con bajo potencial y el sitio Q_1 cerca del grupo hemo con alto potencial. Esta propiedad es aprovechada para generar parte de la fuerza protón-motriz con el paso de electrones a través de los sitios Q_o y Q_1 . En conjunto, este mecanismo conduce a la traslocación neta de dos protones por cada electrón transferido al citocromo c (*Saraste 1999*). Un bloqueo a nivel del complejo III altera la utilización de sustratos dependientes de NADH y FADH_2 .

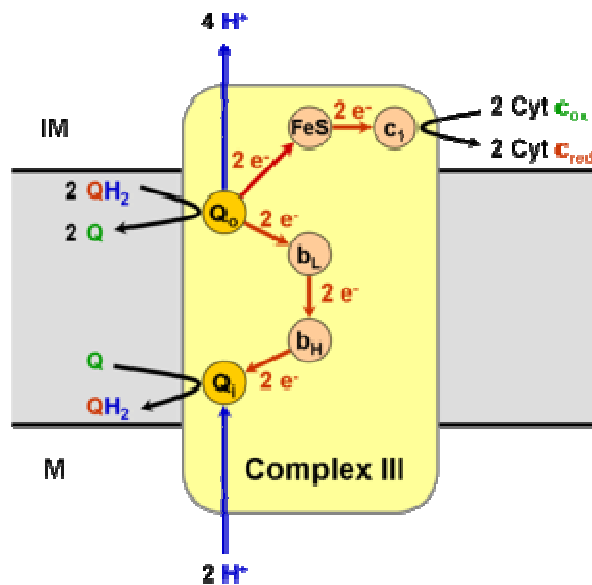


Figura 3: Ciclo Q

- *Complejo IV (citocromo c oxidasa o COX)*: cataliza la transferencia de cuatro electrones desde el citocromo c hasta el oxígeno molecular. Su sustrato, el citocromo c, es una hemoproteína soluble en agua que dona electrones en el lado citoplasmático de la membrana interna. Estos electrones son transferidos al sitio activo, el cual contiene hierro y cobre que son usados para reducir el O₂ a dos moléculas de agua, en un ciclo que incluye varios intermediarios (*Saraste 1999*). Los protones necesarios para esta reacción son obtenidos de la matriz mitocondrial a través de dos canales. Estos mismos canales son utilizados para bombear un protón por cada electrón que atraviesa la membrana (*Saraste 1999*). Estructuralmente, la citocromo oxidasa contiene 13 subunidades. Las tres mayores (I, II, III), codificadas por el ADNmt, están asociadas al grupo prostético y realizan las funciones catalíticas y de bombeo de protones. Las otras diez subunidades más pequeñas rodean a las anteriores y están codificadas por el ADN nuclear. La estructura tridimensional de la COX (*Tsukihara y cols, 1995, Iwatta y cols, 1995*) ha permitido establecer sus características básicas y la localización precisa de los lugares de unión a metales. La transferencia de electrones de este complejo se inicia con la unión del citocromo c a la subunidad II en la parte externa de la membrana. Esta subunidad contiene el centro de cobre bimetalico (CuA). Los electrones pasan desde el citocromo c al CuA, luego al hemo a, y de allí al centro binuclear hemo a₃-CuB, desde donde pasan finalmente al oxígeno. El hemo a, hemo a₃ y el CuB se encuentran ligados a la subunidad I por seis histidinas. La subunidad III no contiene centro redox y parece desempeñar un papel importante en el ensamblaje del complejo IV (*Saraste 1999*). Un bloqueo a nivel del complejo IV (por ejemplo, con cianuro) tienen un efecto paralizante de toda la CTE. Además, el óxido nítrico (NO*) parece tener un papel regulador de este complejo tanto en situaciones fisiológicas como fisiopatológicas.

Complejo V (F₀-F₁-ATP sintasa): es una enzima funcionalmente reversible ya que a partir de ADP y Pi puede sintetizar ATP utilizando el gradiente protónico generado en el espacio intermembrana interna o puede hidrolizar ATP para bombear protones en contra de un gradiente electroquímico. Contiene 16 proteínas diferentes (dos codificadas por ADNmt), con un peso molecular

superior a los 500 kDa. Está formada por dos fracciones, F_0 y F_1 , unidas por un pedúnculo formado por dos estructuras paralelas (Saraste 1999). La fracción F_0 está unida a la membrana y actúa como un canal de protones. La fracción F_1 , que penetra en la matriz, es la porción catalítica de la enzima y está formada por cinco subunidades diferentes (α , β , γ , δ , ϵ) en una estequiometría 3:3:1:1:1 (Saraste 1999). Las subunidades α y β son homólogas y ambas unen nucleótidos, aunque sólo la β tiene actividad catalítica. Por tanto, hay tres sitios activos dentro de la fracción catalítica, y acorde al mecanismo de intercambio y fijación de Boyer (1993 y 1997) cada sitio pasaría por un ciclo de tres estados diferentes (“abierto”, “relajado” y “cerrado”, que corresponden a un estado vacío, un estado con ADP y Pi unido y a un estado con ATP unido respectivamente). En un momento dado los tres sitios están en diferentes estados. Se ha demostrado que la formación de ATP no requiere energía una vez que el sustrato ha sido separado de la solución acuosa, sino que la energía se requiere para la unión del sustrato y liberación del ATP (Boyer, 1993; Boyer, 1997; Saraste, 1999). En apoyo del mecanismo propuesto por Boyer (1997), se ha descrito una asimetría intrínseca de la enzima que sugiere que la enzima opera por medio de una catálisis rotacional. Sin embargo, aun quedan cuestiones por resolver sobre el funcionamiento de este mecanismo (Saraste 1999).

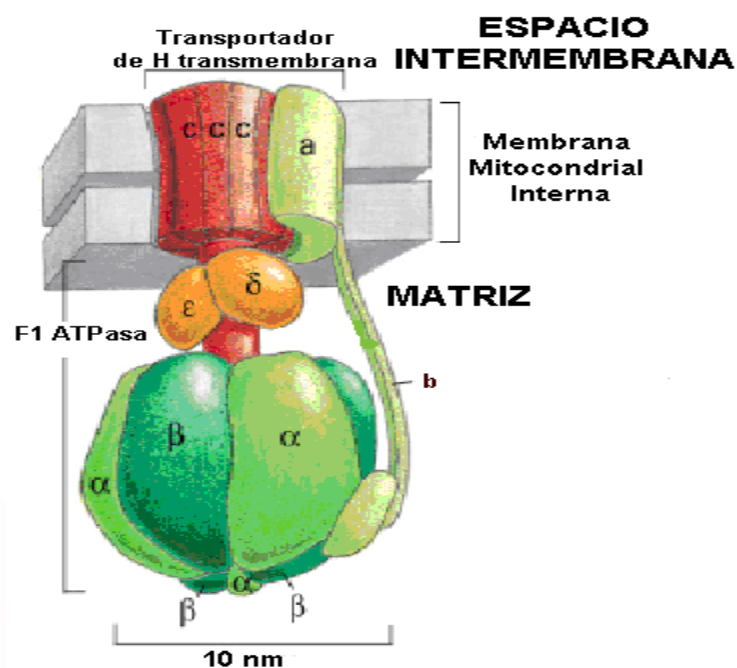


Figura 4: Complejo V Cadena de Transporte de Electrones

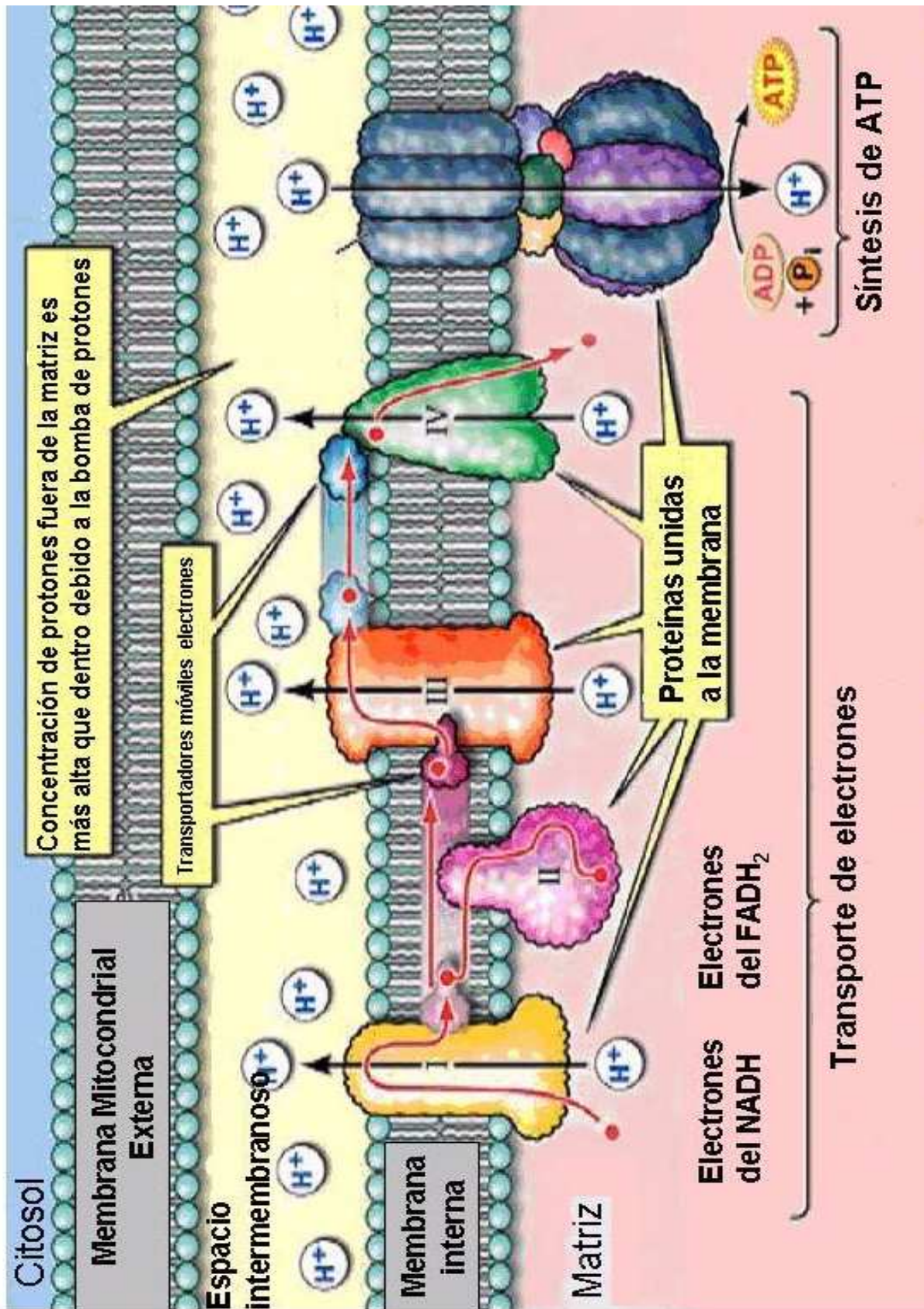


Figura 5: Cadena de transporte de electrones

1.4- Biogénesis Mitocondrial y Especies Reactivas Derivadas del Oxígeno

La mitocondria es la principal fuente suministradora de energía en células de mamíferos. Cuando se produce una deficiencia en la función respiratoria mitocondrial, bien por envejecimiento o bien por exposición excesiva a un estrés ambiental, las mitocondrias se activan para proporcionar la energía necesaria con el fin de reparar y eliminar el daño de componentes celulares. De este modo, algunas señales (como por ejemplo, H_2O_2) son transmitidas al núcleo, por las cuales la célula puede parar el crecimiento e inducir la proliferación mitocondrial y la amplificación del ADNmt siendo el objetivo producir mitocondrias más funcionales. Después de que el daño sea reparado o eliminado con eficacia, la célula puede volver a entrar en el ciclo celular reasumiendo un crecimiento normal. Sin embargo, si el daño persiste demasiado tiempo o si es demasiado severo para ser reparado, las mitocondrias podrían detectar e integrar el estrés extracelular o extra-mitocondrial y generar señales que conducirían a la célula a un proceso irreversible de muerte celular (*Hsin-Chen Lee & Yau-Huei Wei, 2005*). Mientras que el papel de la mitocondria en la generación de ATP por el metabolismo aerobio ha sido establecido desde hace más de medio siglo, su implicación en la apoptosis ha sido reconocida hace menos de 15 años. El papel de la biogénesis mitocondrial y del mantenimiento del ADNmt en la determinación de la vida o la muerte de células mamíferas bajo estrés oxidativo ha ido tomando relevancia en estos últimos años. La elucidación de los cambios en el número y la función de la mitocondria y del ADNmt dentro del proceso de respuesta al estrés para sobrevivir o morir debe ser de gran importancia para una mejor comprensión de la función mitocondrial en células mamíferas (*Hsin-Chen Lee & Yau-Huei Wei, 2005*).

1.5- Función Mitocondrial y Grasa de la Dieta

El tipo de grasa de la dieta condiciona de manera importante numerosos parámetros bioquímicos así como la funcionalidad de la membrana mitocondrial (*Mataix, J. y cols. 1998; Quiles, JL. y cols. 1999a*). La importancia del tipo de ácidos grasos de la dieta reside en el hecho de que la membrana mitocondrial (y en general todas las membranas biológicas) es capaz de adaptar la composición de los ácidos

grasos de sus fosfolípidos a la grasa ingerida de forma mayoritaria (*Huertas, JR. y cols. 1991a; Quiles, JL. y cols. 1999b; Ochoa-Herrera, JJ. y cols. 2001*). Es un hecho conocido y ampliamente demostrado, que la composición en ácidos grasos de la dieta determina en mayor o menor grado la composición en ácidos grasos de las membranas, o lo que es igual, su nivel de insaturación y, por tanto, su distinta vulnerabilidad a la peroxidación lipídica y todo lo que ella traiga consigo. De este modo, si un individuo ingiere grasa saturada de forma mayoritaria, sus membranas serán más ricas en ácidos grasos saturados que las de otro individuo cuya fuente grasa mayoritaria sea insaturada.

Por otro lado, han sido descritos de forma contundente cómo se producen adaptaciones del sistema de transporte electrónico mitocondrial en relación al tipo de grasa de la dieta, con mayor o menor repercusión sobre los diversos complejos del sistema (*Huertas, JR. y cols. 1991b; Quiles, JL. y cols. 2001; Battino, M. y cols. 2002a*).

Además, el estrés oxidativo está relacionado con la composición lipídica de las membranas biológicas, de modo que una fuente grasa poliinsaturada (aceite de girasol, por ejemplo) generará membranas más susceptibles al daño oxidativo que una fuente saturada (grasa animal) o monoinsaturada (aceite de oliva), lo cual ha sido ampliamente demostrado en numerosas situaciones fisiológicas y patológicas y empleando numerosos modelos animales y humanos (*Quiles, JL. y cols. 1999c; Ramírez-Tortosa, MC. y cols. 1999; Battino, M. y cols. 2002b; Ochoa-Herrera, JJ. y cols. 2002; Quiles, JL. y cols. 2002a*).

Por tanto, el tipo de grasa de la dieta va a condicionar la funcionalidad y la estructura mitocondriales así como la susceptibilidad de las mismas a ser dañadas oxidativamente. La longitud de la cadena de propagación de la peroxidación lipídica en membranas celulares depende de múltiples factores entre los que se encuentran la proporción *lípidos: proteína* existente en la membrana (a mayor cantidad de proteína, mayor probabilidad de reacción de un radical con ella), y la presencia de *antioxidantes* (*Halliwell, B., Chirico, S. 1993*). Por otra parte, la duración y velocidad de la cadena de peroxidación, dependen directamente de la *insaturación lipídica*; los ácidos grasos más comúnmente encontrados en membranas celulares, linoleico (C18:2), araquidónico (C20:4) y docosahexaenoico (C22:6), son potenciales dianas del ataque por radicales libres, lo que indica su mayor susceptibilidad conforme aumenta el número de dobles enlaces, por lo que ácidos grasos monoinsaturados (AGM) como el oleico (C18:1) son relativamente resistentes al deterioro por ERO y los ácidos grasos saturados (AGS) sólo

son oxidables bajo condiciones extremas (Cheeseman, KH. 1993). Los resultados obtenidos están de acuerdo con las argumentaciones expuestas anteriormente, y en este sentido, es evidente que el ciclo de propagación de la peroxidación lipídica en las membranas, aumenta según lo hace el grado de insaturación lipídica, estando limitada por la mayor o menor disponibilidad de dichos lípidos. De hecho, en estudios realizados *in vitro*, se ha demostrado que por cada ácido graso monoinsaturado que se peroxida, lo hacen 40 diinsaturados, 80 triinsaturados y 160 tetrainsaturados (Sevanian, A., Hochstein, P. 1985). Así pues, al ser mayor la peroxidación en sistemas altamente insaturados, contribuye de forma significativa a las reacciones de propagación y multiplicación de los radicales libres en la peroxidación global de la membrana.

Además, los peróxidos formados como producto de la peroxidación lipídica, podrían continuar a lo largo de diversas vías metabólicas hasta la formación de peróxidos cíclicos, lo que requiere que estas reacciones se realicen sobre ácidos grasos que contengan dos o más dobles enlaces que permitan la ciclación. En el caso del ácido oleico, esta reacción no se puede producir ya que se requiere como se ha dicho, un número mínimo de dos uniones insaturadas. Una vez más, el menor o mayor daño oxidativo que provoque la generación de radicales libres va a depender de dos factores directamente relacionados con la dieta:

- El grado de insaturación de las membranas, especialmente la mitocondrial, que como ya se ha indicado repetidamente, está influenciado por la distinta insaturación de los ácidos grasos alimentarios;
- La capacidad antioxidativa celular, que a su vez también depende del aporte de componentes antioxidantes alimentarios.

2. ESTRÉS OXIDATIVO DE ORIGEN MITOCONDRIAL

2.1- Fuente Mitocondrial de Especies Reactivas Derivadas del Oxígeno

El *estrés oxidativo* es definido como un desequilibrio que favorece la producción de ROS frente a las defensas antioxidantes. La mayoría de los ROS son productos de la respiración mitocondrial. Aproximadamente entre un 1-2% del oxígeno molecular consumido durante la respiración mitocondrial se convierte en radical superóxido. La reducción monovalente del oxígeno molecular produce un intermedio relativamente

estable, el anión superóxido (O_2^-), que se puede catalogar como el precursor de la mayoría de los ROS. Esta reacción es termodinámicamente favorable para la mayoría de las oxidoreductasas mitocondriales (Turrens JF., 2003). La cadena de transporte electrónica mitocondrial contiene varios centros redox por los que pueden escaparse electrones siendo captados por el oxígeno molecular, sirviendo ésta como fuente primaria de la producción de superóxido en la mayoría de los tejidos (Andreyev AY y cols., 2005).

A pesar de la presencia de varios antioxidantes y de enzimas antioxidantes, las mitocondrias parecen ser la fuente intracelular más importante de ROS. Según una valoración, la concentración en estado de reposo del O_2^- en la matriz mitocondrial es aproximadamente de cinco a diez veces superior que en el citosol o en el espacio nuclear (Cadenas E y cols., 2000). La dismutación de los aniones superóxido por la superóxido dismutasa da lugar a la producción de H_2O_2 . La interacción subsecuente del H_2O_2 y del O_2^- en la reacción de Haber-Weiss, o la fisión del H_2O_2 dirigida por el Fe_2^+ o Cu_2^+ en la reacción de Fenton, puede generar el radical hidroxilo altamente reactivo y tóxico. Además de la cadena respiratoria, la monoamino oxidasa (MAO), una flavoproteína localizada en la membrana mitocondrial externa, es otra fuente mitocondrial importante de ROS, particularmente de H_2O_2 . La MAO cataliza la desaminación oxidativa de aminas aromáticas primarias junto con diaminas de larga cadena y aminas cíclicas terciarias, y es una fuente cuantitativa importante de H_2O_2 . Dado que el H_2O_2 atraviesa fácilmente la membrana mitocondrial, la MAO puede contribuir a un aumento en las concentraciones de ROS dentro de la matriz y del citosol mitocondrial.

2.2- Sistema de Defensa Antioxidante

2.2.1.- Generalidades

Cantidades pequeñas de especies reactivas de oxígeno (ROS), como radicales hidroxilo (HO^\cdot), aniones superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), son generados constantemente en organismos aerobios en respuesta a estímulos externos e internos (Lee Y y cols., 1998). Los niveles bajos de ROS pueden ser imprescindibles en un gran número de procesos, incluyendo la señalización celular (Schulze-Osthoff K y cols., 1997) – modulando el equilibrio entre la proliferación y/o apoptosis celular

(Vogt M y cols., 1998) - , la inmunidad (Sun J y cols., 1998) y la defensa contra los microorganismos (Lee Y y cols., 1998). En cambio, las altas dosis y/o la pobre actuación de los mecanismos de defensa antioxidante dan lugar a una situación de estrés oxidativo, que podría originar daños metabólicos severos a las macromoléculas biológicas y malfuncionamiento de las mismas (Lledías F y cols., 1998).

La prevención de la peroxidación lipídica es un proceso esencial en todos los organismos aerobios, pues también los productos de la peroxidación pueden dañar al ADN. La peroxidación lipídica creciente y la disminución de la protección antioxidante ocurre con frecuencia (Tampo Y y cols., 1998): los epóxidos pueden reaccionar espontáneamente con los centros nucleofílicos celulares y unirse de modo covalente al ADN, ARN y proteínas. Tal reacción puede conducir a la citotoxicidad, alergia, mutagenicidad y/o carcinogenotoxicidad, al depender de las características del epóxido en cuestión. Por otra parte, los acontecimientos oxidativos pueden desempeñar un papel importante en el mecanismo de acción de los lípidos, y la oxidabilidad de los mismos puede contribuir a la sensibilidad celular ante determinadas drogas (Wagner B y cols., 1998).

Existe una amplia gama de defensas antioxidantes enzimáticas y no-enzimáticas, incluyendo la Superóxido Dismutasa (SOD), la Glutathion Peroxidasa (GPX), la Catalasa (CAT), el Glutathion (GSH), el β -Caroteno (vitamina A), el Ácido Ascórbico (vitamina C) y el α -tocoferol (vitamina E), etc (Mataix J y cols., 1998).

2.2.2.- Mecanismos de Defensa Antioxidante

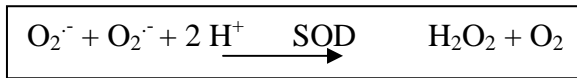
2.2.2.1. Mecanismos de Defensa Primarios

Los antioxidantes primarios previenen la formación de nuevas especies de radicales libres. Actúan detoxificando los radicales libres (o especies que pueden generarlos) convirtiéndolos en moléculas menos dañinas, o impidiendo su formación: SOD, glutathion peroxidasa y catalasa son los principales mecanismos de defensa primarios.

a) Superóxido Dismutasa

La Superóxido Dismutasa es una enzima que cataliza la dismutación del radical superóxido convirtiéndolo en peróxido de hidrógeno que a su vez puede ser eliminado

alternativamente por las actividades de la CAT o de la GPX. La SOD convierte el radical altamente reactivo del superóxido a H₂O₂ menos reactivo.



Han sido identificadas cuatro clases de SOD, conteniendo un Cu-Zn dinuclear, o los cofactores mononucleares del Fe, del Mn o del Ni (*Whittaker M y colb., 1998*). En células humanas, hay tres isoformas de SOD: Cu/Zn-SOD citosólica, Mn-SOD mitocondrial, y la SOD extracelular (EC-SOD) (*Majima H y colbs., 1998*).

- Mn-SOD mitocondrial

La importancia biológica de la Mn-SOD fue demostrada entre otras razones por las siguientes (*Majima H y colbs., 1998*):

- 1) la inactivación de los genes de la Mn-SOD en *E. coli* aumenta la frecuencia de mutaciones cuando está creciendo bajo condiciones aerobias.
- 2) La eliminación del gen en *Saccharomyces cerevisiae* aumenta su sensibilidad al oxígeno.
- 3) La carencia en la expresión en ratones knock-outs de la Mn-SOD da lugar a una cardiomiopatía.
- 4) El factor de necrosis tumoral (TNF) induce selectivamente la Mn-SOD, pero no el mRNA de la Cu/Zn-SOD, de la CAT o de la GPX en varios tejidos y cultivos celulares de ratón.
- 5) La transfección del ADNc de la Mn-SOD en cultivos celulares hizo a las células resistentes al paraquat, TNF e indujo citotoxicidad a la adriamicina, y transformación neoplásica inducida por la radiación.
- 6) La expresión de la Mn-SOD en ratones transgénicos protege contra la lesión pulmonar inducida por el oxígeno y la cardiotoxicidad inducida por la adriamicina.

Así, la expresión de la Mn-SOD es esencial para la supervivencia de la vida aerobia y el desarrollo de la resistencia celular a la toxicidad mediada por radicales del oxígeno.

- Cu/Zn- SOD citosólica

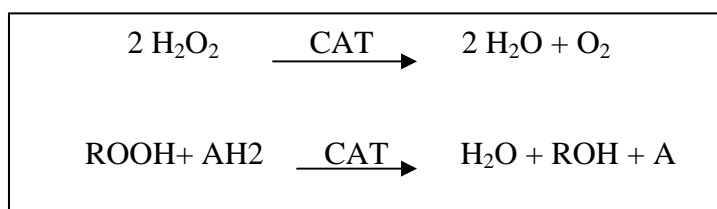
Estudios recientes en ratones knock-outs de la SOD han revelado que la Mn-SOD es esencial para la vida mientras que no lo es la Cu/Zn-SOD. Ratones Cu/Zn-SOD knock-outs se presentan como normales y exhiben diferencias frente al wildtype solamente después de una lesión traumática, mientras que los knock-outs de la Mn-SOD no sobreviven más allá de 3 semanas de edad (*Reaume A y cols., 1996*).

- SOD-EC Extracelular

La SOD-EC, no es inducida por su substrato u otros oxidantes (xantina oxidasa, hipoxantina, paraquat, pirogallol, α -nafto-flavona, hidroquinona, catecol, iones de Fe_2^+ , iones de Cu_2^+ , sulfoximina del butionina, dietilmaleato, t-butílhidroperóxido, cumeno hidroperóxido, selenita, citiolona y alta presión parcial de oxígeno) y su regulación en tejidos de mamíferos ocurre sobre todo de forma coordinada por citocinas, preferentemente como respuesta de células individuales a oxidantes (*Buschfort C y cols., 1997*).

b) Catalasa

La catalasa es una de las enzimas de mayor actividad conocidas. Es tan activa que no puede ser saturada por H_2O_2 a ninguna concentración (*Lledías F y cols., 1998*). La CAT reacciona con H_2O_2 para formar agua y oxígeno molecular; y con los donantes de H (metanol, etanol, ácido fórmico, fenol...) usando 1 mol de peróxido en una clásica actividad peroxidasa:

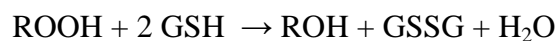


Aunque la CAT no es esencial para algunos tipos celulares en condiciones normales, ésta juega un papel importante en la adquisición de la tolerancia al estrés oxidativo como respuesta adaptativa de las células (*Hunt C y cols., 1998*). El aumento de

resistencia a la adriamicina de células enriquecidas en catalasa se atribuye a la capacidad de la catalasa en células de prevenir el consumo de O₂ inducido por el xenobiótico. Así, el H₂O₂ es capturado antes de que pueda escapar de la célula y convertido en O₂. De esta manera, la catalasa puede mantener la concentración de O₂ para repetidos círculos de reducciones químicas o para la interacción directa con el xenobiótico (*Speranza M y cols., 1993*).

c) *Glutation Peroxidasa*

La glutatión peroxidasa contiene selenio que es esencial para su actividad enzimática. Comparte sustrato con la catalasa, además puede reaccionar de modo efectivo con tejidos y otros hidroperóxidos orgánicos, catalizando la reducción de diferentes hidroperóxidos (ROOH y H₂O₂) usando glutatión reducido (GSH), contribuyendo a la protección de células mamíferas contra el daño oxidativo.



Hay por lo menos cinco isoenzimas de GPX encontradas en mamíferos. Aunque su expresión es ubicua, los niveles de cada isoforma varían dependiendo del tipo de tejido. La glutatión peroxidasa citosólica y mitocondrial (GPXc o GPX₁) reduce los hidroperóxidos de ácidos grasos y el H₂O₂ a expensas del glutatión. La GPX₄ se localiza en el citosol y en la fracción de membrana. La GPX₁ es predominante en eritrocitos, riñón, e hígado, y la GPX₄ se expresa altamente en células epiteliales y renales. La GPX₂ citosólica y la GPX₃ extracelulares son mal detectadas en la mayoría de los tejidos a excepción del aparato gastrointestinal y del riñón. Recientemente, un nuevo miembro, la GPX₅, expresada específicamente en el epidídimo de ratón, es selenio-independiente (*De Haan J y cols., 1998*).

Aunque la GPX comparte el sustrato H₂O₂ con la catalasa, solamente puede reaccionar con eficacia con lípidos y otros hidroperóxidos orgánicos. El ciclo redox del glutatión es una fuente importante de protección contra niveles bajos de estrés oxidativo, mientras que la CAT llega a ser más significativa en la protección contra el estrés oxidativo agudo (*Yan H y cols., 1997*). En células animales, y especialmente en eritrocitos humanos, durante mucho tiempo la GPX ha sido considerada la enzima

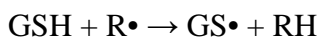
antioxidante principal para la desintoxicación del H_2O_2 , pues la catalasa tiene una afinidad mucho más baja por el H_2O_2 que la GPX (*Izawa S y cols., 1996*).

2.2.2.2.- Mecanismos de Defensa Secundarios

En general los antioxidantes secundarios son protectores no enzimáticos que intervienen cuando hay sobreproducción de especies reactivas y los sistemas enzimáticos están desbordados, previniendo así las reacciones en cadena. Entre los principales se encuentran: el glutatión, tocoferol, ac. ascórbico, coenzima Q, ac. úrico, bilirrubina, albúmina, polifenoles, etc.

a) Glutatión

El glutatión es un tripéptido constituido por los aminoácidos: glicina, cisteína y ácido glutámico. Es un antioxidante intracelular para lo cual usa el grupo tiol de la cisteína como agente reductor. El glutatión es altamente abundante en citosol (1-11 mM), núcleo (3-15 mM), y mitocondria (5-11 mM) y es el antioxidante soluble principal de estos compartimientos celulares (*Marsella, R., y cols., 2005*). La forma reducida del glutatión es GSH y la forma oxidada GSSG. Generalmente, la capacidad antioxidante de los compuestos tioles es debida al átomo de azufre que puede fácilmente adaptar la pérdida de un único electrón (*Karoui, H y cols., 1996*). Además la vida media del radical generado ($\text{GS}\cdot$), es mayor que la vida media de muchos otros radicales generados durante el estrés. La reacción del glutatión con el radical $\text{R}\cdot$ puede ser escrita como:



Estos radicales generados pueden dimerizarse y formar el producto no radicalario, glutatión oxidado (GSSG):



El glutatión oxidado GSSG se acumula dentro de las células y el cociente GSH/GSSG es una buena medida del estrés oxidativo del organismo (*Hwang, C., y*

colbs., 1992). Una concentración demasiado alta de glutatión oxidado GSSG puede dañar diferentes sistemas enzimáticos celulares.

El papel protector principal del glutatión contra el estrés oxidativo es debido a (*Marsella, R., y colb.*, 2005): (i) el glutatión es cofactor de varias enzimas antioxidantes, como por ejemplo, la glutatión peroxidasa (GPx); (ii) participa en el transporte ácido a través de la membrana plasmática; (iii) retira el radical hidroxilo, eliminando el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos por la acción catalítica de la glutatión peroxidasa; (iv) puede regenerar los antioxidantes más importantes, vitamina C y E de nuevo a sus formas activas; el glutatión puede reducir el radical tocoferol de la vitamina E directa, o indirectamente, vía la reducción del semidehidroascorbato a ascorbato. Además el GSH protege a las células contra la apoptosis (*Marsella, R., y colb.*, 2005). Puesto que el nivel de GSH es un importante factor en la protección contra la apoptosis, la eficacia de la apoptosis inducida por anticancerígenos requiere el agotamiento de GSH, facilitando así el tratamiento del tumor.

b) Vitamina-E (α -tocoferol)

Bajo el término de vitamina E se engloba un conjunto de 8 nutrientes liposolubles (*Bjorneboe y Bjorneboe*, 1990; *Papas*, 1993), de los que, el α -tocoferol predomina en muchas especies y es el de mayor actividad biológica. Su centro activo se haya relacionado con el grupo 6-OH, mientras que su cola fitilo es la responsable del transporte y de la retención dentro de las membranas biológicas (*McCay*, 1885). Ha sido sugerido que el cociente molar aproximado de vitamina E frente a AG poliinsaturados en la membrana es de 1:1000 (*Burton*, 1989; *Tappel*, 1962). La distribución de la vitamina E parece no ser homogénea, se haya asociada a las zonas más fluidas cerca de los AG poliinsaturados (*Gómez-Fernández y cols.* 1989).

Niki en 1987 sugirió que la vitamina E podía encargarse de la eliminación de radicales en zonas más externas de la membrana y el coenzima Q en la zona interior hidrofóbica.

Los tocoferoles actúan como antioxidantes biológicos (*Tappel*, 1962; *Murphy y Kehrer*, 1983; *Gutteridge y Halliwell*, 1994), constituyendo gran parte de la capacidad antioxidante liposoluble del plasma humano, de eritrocitos y en general de todas las fracciones (*Burton y cols.*, 1983). En consecuencia, una de las funciones biológicas

principales del tocoferol como antioxidante radica en su papel neutralizador de radicales libres. La velocidad de reacción de los radicales peroxilo están en el rango de 10^6 y 10^8 por mol/s, según las condiciones experimentales (*Simic, 1981*).

El tocoferol rompe la reacción en cadena de peroxidación lipídica debido a que los radicales peroxilo reaccionan con otros lípidos a una velocidad aproximada de 50 moles por segundo, mientras que con el tocoferol reaccionan a 10^4 a 10^5 veces más rápido. Es probable, en relación con la reversibilidad de la formación de radicales libres de tocoferol, que el donador de hidrógeno sea hidrosoluble y que el radical en cuestión se elimine de la membrana hacia el compartimento acuoso de la célula.

Aunque este radical es lo suficientemente estable como para que no continúe la cadena de eventos poeroxidativos, es retirado del ciclo y reciclado mediante la acción de dos posibles moléculas, el ácido ascórbico y el coenzima Q (*Littarru y Battino, 1994; Lenaz 1998*). La vitamina C interacciona con la vitamina E (*Franco y Jenkinson, 1986; Reddy y cols., 1982; Wefers y Sies, 1988*), por lo que el tocoferol debe estar presente en las membranas biológicas para que el ascorbato proteja frente a la lipoperoxidación. Los tioles también pueden reaccionar con los radicales tocoferoles para regenerarlos y de forma inversa los tocoferoles también pueden reparar los radicales tiol. *Burton y colaboradores en 1983*, demostraron que el GSH inhibía la peroxidación lipídica en microsomas purificados de hígado, observando que el GSH tiene un efecto global ahorrador de tocoferol (*Murphy y Kehrer, 1983; Viña y cols, 1993*).

Los tioles diferentes al GSH, como el dihidrolipoato, un ditiol liposoluble y potente reductor, inhiben la peroxidación microsomial (*Haenen Y Bast, 1983*) y ahorran tanto tocoferol como el GSH. Es posible que el GSH inhiba enzimáticamente la peroxidación de forma que necesite tocoferol pero no lo regenere; el GSH podría actuar a través de la GPX unida a la membrana, que reduce los hidroperóxidos fosfolipídicos (*Ursini y Bindoli, 1987*). En ausencia de GSH, los hidroperóxidos se acumulan rápidamente por reacciones en cadena e impidiendo que la peroxidasa quede sin sustrato (*Ursini y Bindoli, 1987; Viña y cols, 1993*).

c) Vitamina C

La vitamina C o ácido ascórbico, es un antioxidante perteneciente al grupo de los antioxidantes hidrosolubles. Presenta la capacidad de sufrir rápidamente dos

procesos oxidativos monovalentes consecutivamente con la formación del radical semidihidroascorbato como intermediario, radical relativamente no reactivo.

Este componente es capaz de interactuar directamente con O_2^- , OH^\cdot , oxígeno singlete, radicales centrados en el nitrógeno y en el sulfuro y radicales lipídicos (Stadman, R.E., 1991; Buettner, G.R. y Jurkiewicz, B.A., 1995), siendo, por ejemplo, más eficaz en la prevención de la oxidación por NO_2 , que la vitamina E (Sauberbich, H.E., 1994).

Además, la vitamina C colabora con la vitamina E en regenerar el α -tocoferol de radicales tocoferoxilo en membranas biológicas y lipoproteínas (Kojima, S., 2004; Carr, A., 1999).

La mayoría de los estudios *in vivo* demuestran una reducción de los marcadores de daño oxidativo del ADN, de lípidos y proteínas después de la suplementación con vitamina C. Incluso en presencia de hierro, la vitamina C reduce mayoritariamente el daño oxidativo, a pesar de su conocido efecto pro-oxidante *in vitro* (Podmore, I.D., 1998).

Recientes investigaciones indican la capacidad del ácido ascórbico para regular factores que influyen en la expresión génica, la apoptosis y otras funciones celulares (You, W.C., 2000). En muchas de ellas la vitamina C protege contra la muerte celular y una proporción importante de esta protección se ha ligado a su capacidad antioxidante.

d) Coenzima Q

Entre los antioxidantes conocidos, cobra especial importancia el CoQ (CoQ₁₀ en seres humanos), por ser el único antioxidante lipofílico sintetizado normalmente por el organismo (Appelkvist EL y colb., 1994). Su fuerte hidrofobicidad es debida a la larga cadena isoprenoide en la posición 6, que permite la inserción de la molécula en el bicapa fosfolipídica de la membrana.

La biosíntesis de CoQ es particularmente compleja (Andersson M y colb., 1994). El anillo de benzoquinona es sintetizado a partir del aminoácido esencial fenilalanina hasta el 4-hidroxibenzoato, mientras que la cadena isoprenoide es formada por una vía común a la biosíntesis del colesterol y del dolicol. La biosíntesis de CoQ requiere la ingestión dietética de varios cofactores. Es, por tanto, concebible que uno o más de estos factores puedan llegar a ser limitantes bajo condiciones fisiológicas o

patológicas (*Appelkvist EL y cols., 1994*), pudiendo así, retrasar la biosíntesis de la ubiquinona e inducir un estado de deficiencia de la misma.

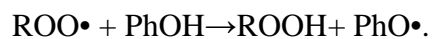
Además de su papel bioenergético, como componente de la cadena respiratoria mitocondrial, el CoQ es también un componente de la cadena redox mitocondrial (*Crane FL y cols., 1999*), cuya función, entre otras, es la de regular el exceso de poder reductor generado por la glicolisis cuando se disminuye la respiración mitocondrial (*Larm JA y cols., 1994; Morré DM y cols., 2000*).

Como antioxidante, la forma reducida del CoQ actúa directamente sobre el radical superóxido o indirectamente sobre los radicales lipídicos (*Beyer RE y cols., 1990; Ernster L y cols., 1995*); el ubiquinol también puede actuar junto con la vitamina E (α -tocoferol) regenerando la forma activa del radical tocoferoxilo (*Kagan V y cols., 1990, Ernster L y cols., 1992*).

La acción antioxidante del ubiquinol origina el radical semiubiquinona. Esta especie es convertida de nuevo a su forma antioxidante por la reducción, que ocurre a través de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, o mediante varias quinonas-reductasas presentes en diversas fracciones celulares (*Villalba JM y cols., 1995; Beyer RE y cols., 1996; Takahashi T y cols., 1995*).

e) Polifenoles

Los compuestos polifenólicos constituyen uno de los grupos mayoritarios comúnmente presentes y ubicuos en plantas y representan una parte importante de la dieta mediterránea (*RiceEvans, C.A., y cols., 1996; RiceEvans, C., 2001; Schroeter, H., 2001*). Éstos compuestos actúan como antioxidantes interfiriendo en la oxidación de lípidos y de otras moléculas por la cesión del átomo de hidrógeno a los radicales (*Schroeter, H., 2001*):



Los intermedios radicales fenoxilo son relativamente estables, no iniciando (propagando) demás reacciones radicalarias. Sin embargo, bajo ciertas condiciones, como por ejemplo una alta concentración de antioxidantes fenólicos, la presencia de metales redox-activos (Cu, Fe) y un alto pH, pueden comportarse como pro-oxidantes.

f) Ácido Úrico

El ácido úrico es el producto de la oxidación de la hipoxantina y la xantina a través de la xantina oxidasa y xantina deshidrogenasa (XO y XDH). En tejido humano, a causa de la carencia de urato-oxidasa, se acumula como producto final del metabolismo de las purinas. *In vitro* inhibe la generación de OH[·] dependiente de metales de transición, además es un potente inactivador del oxígeno singlete, y atrapa radicales peroxilo en fase acuosa, de modo más eficaz que el ácido ascórbico. El efecto antioxidante del ácido úrico *in vivo* depende directamente del nivel de alantoína, uno de los productos de su oxidación.

g) Otros antioxidantes

Al igual que el glutatión otros aminoácidos presentan una actividad antioxidante, como la **cisteína** y **cisteamina**, que pueden provocar la reducción de diversos compuestos orgánicos por medio de la donación de electrones desde los grupos sulfhidrilos o como la **taurina** que puede reaccionar con el ácido hipocloroso (Romero Alvira, D. y cols., 1992).

Existen otras moléculas como la **bilirrubina**, que reacciona con radicales peroxilo y la **glucosa**, la cual presenta una acción eliminadora del radical hidroxilo (Romero Alvira, D. y cols., 1992; Ramón, J.R., 1993).

2.2.2.3.-Mecanismos de Defensa Terciarios

En última instancia, los antioxidantes terciarios ejercen su defensa mediante la *reparación* de moléculas dañadas por los radicales libres antes de que su acumulación y/o presencia dé lugar a alteraciones en el metabolismo celular o incluso a la muerte celular. Así, el daño oxidativo a ácidos nucleicos es reparado por enzimas específicas (Cheeseman, K.H y Slater, T.F., 1993), como las ADN glicosilasas, las cuales pueden ser de dos tipos, unas capaces de hidrolizar enlaces N-glicosílicos entre una base dañada o inapropiada y la desoxirribosa del azúcar y otras que además de presentar la función anteriormente mencionada, presentan actividad β-liasa, eliminando las uniones azúcar-fósforo resultantes por β-eliminación (Ramotar, D., y Demple, B., 1993).

Las proteínas oxidadas son eliminadas por sistemas proteolíticos y los lípidos de membrana oxidados por peroxidasas, lipasas y aciltransferasas, como por ejemplo la fosfolipasa A₂, que se encarga de liberar los ácidos grasos oxidados de los fosfolípidos de membrana para que puedan actuar sobre ellos los sistemas antioxidantes correspondientes (*Cheeseman, K.H y Slater, T.F., 1993*), habiéndose observado que su actividad aumenta en la membrana interna mitocondrial y en otras membranas en respuesta a condiciones asociadas a un incremento de especies reactivas del oxígeno (*Malis, C.D. y colbs., 1990; Hatch, G.M. y colbs., 1993*)

2.3.- Daños Celulares y Mitocondriales producidos por los ROS

Los ROS generados en la mitocondria, o en otros compartimentos celulares, pueden causar daño a macromoléculas celulares, incluyendo ácidos nucleicos, fosfolípidos, y proteínas.

2.3.1.- Modificación Lipídica.

La oxidación de PUFAs se conoce como peroxidación lipídica, siendo especialmente importante la que ocurre a nivel de los contenidos en los fosfolípidos de las membranas celulares. Este fenómeno oxidativo es la expresión más conocida de la toxicidad de RL/ERO. El que los fosfolípidos sean componentes básicos de todas las membranas celulares, resalta la importancia del citado proceso oxidativo. Además este hecho explica, en gran medida, las alteraciones estructurales y funcionales en las que están implicados RL y ERO en numerosas enfermedades.

La cadena de reacciones de los RL consiste en tres etapas esenciales: Inicio, propagación y terminación. La propagación continúa hasta que dos RL se unen para terminar la cadena. Por tanto, un único evento de iniciación puede provocar la conversión de numerosas cadenas de PUFAs en hidroperóxidos lipídicos. Así, un único evento inicial que desencadene la peroxidación lipídica puede ser amplificado hasta que se agote la disponibilidad de O₂ y/o cadenas de PUFA no oxidadas. Por otra parte, la duración y la velocidad de la cadena de peroxidación depende directamente del grado de insaturación lipídica. Para una serie de ácidos grasos insaturados de uno a seis dobles enlaces, esta velocidad aumenta según la relación 0,025:1:2:4:6:8 (más de 300 veces del

primero al último: ácido oleico, linoleico, araquidónico, eicosapentaenoico, docosahexaenoico).

Por otro lado, las membranas biológicas en general son muy sensibles al estrés oxidativo debido a la presencia de dobles enlaces de tipo carbono-carbono en las colas lipídicas de los fosfolípidos que las componen (*Montine, T.J. y cols., 2002*). El daño oxidativo a los lípidos de la membrana se puede realizar de forma directa mediante su iniciación por ERO como los radicales hidroxilo o el anión superóxido, o bien de forma indirecta mediante algunos productos de la propia peroxidación lipídica como son ciertos aldehídos altamente reactivos que a su vez potencian el fenómeno (*Esterbauer, H y cols., 1991*). En cualquier caso y sea de un modo u otro, la oxidación de los lípidos de la membrana mitocondrial da lugar a la alteración de los mismos y a cambios en la fluidez de la misma, a variaciones en su relación con las proteínas adyacentes y como consecuencia de todo lo anterior a alteraciones en su función (*Halliwell, B. y Gutteridge, J.M., 1999*). Además en el caso concreto de la mitocondria, la cardiolipina es altamente insaturado y por consiguiente de elevada susceptibilidad a la oxidación, lo que sería perjudicial por hallarse implicada en la función de proteínas de la CTEmt tales como la COX o el transportador de nucleótidos de adenina (ANT) (*Paradies, G. y cols., 1998*).

2.3.2.- Daños en el ADN

Las alteraciones del ADN, como molécula portadora del material genético, merece una atención muy especial, siendo importante conocer las consecuencias de la interacción del ADN con el estrés oxidativo. Así, en patologías en las que el estrés oxidativo es elevado, tales como anemia de Fanconi, síndrome de Bloom, esclerodermia, cáncer, hipertensión arterial, envejecimiento, etc., se observa un mayor nivel de mutaciones, entrecruzamientos, roturas espontáneas de las cromátidas y pérdida de fragmentos cromosómicos (*Roche, E. y Romero-Alvira, D., 1996*).

Las alteraciones del ADN que más frecuentemente se observan en situaciones de estrés oxidativo son incremento en los niveles de fragmentación y modificaciones oxidativas en las bases púricas y pirimidínicas. Entre las modificaciones más frecuentes de las bases púricas, destaca la formación del 8-hidroxiguanina, con un alto efecto mutágeno y responsable de que durante la replicación se empareje con adenina en

lugar de con la citosina. Respecto a las bases pirimidínicas, se encuentran los glicoles de timina y citosina y los hidratos de pirimidina, los cuales dan lugar a la fragmentación ya que las bases afectadas no pueden emparejarse correctamente (Roche, E. y Romero-Alvira, D., 1996).

La mitocondria cuenta con genoma propio que es diferente en estructura y en organización al nuclear. Se trata de un número variable de copias idénticas de ADN de cadena doble y circular (hasta 10 copias), localizado en la matriz mitocondrial, próximo a determinadas zonas de la membrana mitocondrial interna (lugar de máxima generación de ERO). Su tamaño es pequeño (16,5 Kb) y codifica para 13 proteínas mitocondriales, 7 de las subunidades del complejo I, una proteína del complejo III, 3 del complejo IV, 2 del complejo V, 22 ARN de transferencia y 2 ARN ribosómicos (Lenaz, G., 1998; Cadenas, E. y Davies, K.J., 2000; Van Remmen, H. y Richardson, A., 2001).

El resto de proteínas que completan los complejos respiratorios se forman por expresión de los correspondientes ADN nucleares, emigrando desde los lugares de síntesis proteica citoplasmática a la mitocondria.

El daño oxidativo al ADN mitocondrial es más severo que el sufrido por el ADN nuclear, siendo las razones propuestas siguientes:

- El ADNmt se localiza muy cercano en los lugares a la membrana mitocondrial interna donde se generan las ERO.
- La mitocondria es el lugar de generación de la gran mayoría de las ERO.
- El ADNmt carece de histonas protectoras (Richter, C. y cols., 1998). También se ha postulado durante mucho tiempo que la mitocondria carecía de un sistema de reparación de ADN. En la actualidad se reconoce la existencia de sistema de reparación del ADNmt, aunque todavía es un gran desconocido, se sabe que es capaz de reparar el daño oxidativo (por ejemplo daño a bases y roturas de una sola cadena). Además se sabe que la vía de reparación de escisión de bases desempeña un papel predominante dentro del sistema de reparación del ADNmt (Bohr, V.A. y Anson, R.M., 1999).

Según muchos indicios, el daño oxidativo al ADNmt es más importante que el ejercido sobre lípidos y proteínas. Esto se debe a que el ADNmt dañado se puede propagar debido a la capacidad de división de mitocondrias y células, lo cual permite la amplificación de las consecuencias fisiológicas del daño. Además, el daño al ADNmt podría ser incluso más importante que el daño al ADN nuclear ya que todo el genoma

mitocondrial codifica genes que son expresados, mientras que el nuclear contiene una gran cantidad de secuencias no transcribibles (*Van Remmen, H. y Richardson, A., 2001*).

El estrés oxidativo puede afectar al ADNmt de diversas formas entre las cuales las más conocidas son la alteración oxidativa de bases, el aumento en el nivel de deleciones y la aparición de mutaciones puntuales.

El aumento en el porcentaje de deleciones se correlaciona directamente con la elevación del daño oxidativo. Además, también se ha establecido que las deleciones del ADNmt se dan especialmente en tejidos postmitóticos, como corazón, músculo esquelético y encéfalo, que además son tejidos altamente dependientes de la respiración aeróbica, lo cual sucede en numerosas especies incluyendo humano, mono, roedores y nematodos (*Yoneda, M. y colbs., 1995*).

Las mutaciones del ADNmt son la base de un número importante de patologías humanas, lo que ha abierto un nuevo y exitante campo en la investigación mitocondrial. El ADNmt tiene un tipo de transmisión maternal y además hay numerosas copias de la molécula en una célula (poliplasmia) existiendo la posibilidad de que una mutación experimente diferentes grados de heteroplasmia. Todo esto hace que para que una lesión se manifieste fenotípicamente es necesario que sobre el 80% del ADNmt de una célula deba estar mutado (*Lenaz, G., 1998; Michikawa, Y. y colbs., 1999*). Básicamente, las consecuencias fenotípicas de una mutación del ADNmt deben ser defectos en la maquinaria implicada en la fosforilación oxidativa de la mitocondria.

2.3.3.- Daños proteínicas

Aunque la oxidación a proteínas ha sido menos caracterizada, diferentes tipos de daño han sido puestos de manifiesto, incluyendo la oxidación de grupos sulfhidrilo, oxidaciones en residuos aminoácidos, reacciones con aldehídos, entrecruzamientos proteicos, fragmentación y/desnaturalización (*Stadtman, E.R. y colbs., 1991; Starke-Reed, P.E. y colbs., 1989*). La oxidación directa de aminoácidos, particularmente lisina, arginina, prolina, y residuos de treonina, promueve la formación de grupos carbonilo de las proteínas (*Beckman KB y colbs., 1998; Sohal RS, 2002*). La formación de un grupo carbonilo puede alterar dramáticamente la estructura terciaria o conformación de la misma, dando como resultado un mal plegamiento parcial o completo. El mal plegamiento aumenta la hidrofobicidad de la proteína, y le confiere una fuerte

propensión para que forme agregados potencialmente perjudiciales. Por tanto, la oxidación de proteínas conduce a la pérdida de sus funciones normales y aumento de la susceptibilidad a la degradación proteolítica.

Debido a la proximidad física entre proteínas y lípidos, el daño oxidativo a las proteínas mitocondriales como resultado directo al estrés oxidativo o bien como una consecuencia de la peroxidación lipídica puede dar lugar a entrecruzamiento, degradación y pérdida de función de las mismas. Numerosas proteínas de membrana como la ATPasa, el TNA, la COX, etc., son fácilmente inactivadas mediante estrés oxidativo. Además la oxidación de proteínas determina la apertura del poro de permeabilidad de transición, clave en el proceso de apoptosis. En resumen, la alteración de las proteínas de la CTEmt tiene como consecuencia directa una pérdida de funcionalidad mitocondrial e indirectamente un aumento de la producción de ERO (Lippe, G. y colbs., 1991; Forsmark-Andree, P. y colbs., 1997).

2.3.4.- Efectos de los ROS sobre la organización y función mitocondrial

La mitocondria no es sólo una fuente importante de generación de ROS en células aerobias, sino también es un blanco sensible para los efectos deletéreos de los radicales derivados del oxígeno. Uno de estos objetivos es el ADN mitocondrial (ADNmt), el cual codifica para 13 polipéptidos, 22 RNAs de transferencia (ARNt), y 2 ARNs ribosomales (ARNr), que son esenciales para el transporte electrónico y la generación de ATP (Anderson S, 1981). El ADNmt, por tanto, representa un blanco celular crítico para el daño oxidativo que podría conducir a una lesión irreversible para la función celular con pérdida del sistema de transporte electrónico, potencial de membrana mitocondrial, y generación de ATP. El ADNmt es especialmente susceptible al ataque de los ROS debido a su proximidad a la cadena de transporte electrónica, lugar principal en la producción de radicales libres, y a la carencia de histonas protectoras. Por ejemplo, los ROS generados mitocondrialmente pueden accionar la formación de la 8-hydroxydeoxyguanosina, una lesión que se presenta como resultado del daño oxidativo al ADN; el nivel de bases oxidativamente modificadas en el ADNmt es de 10-20 veces mayor que en el ADN nuclear. El daño oxidativo inducido por los ROS es probablemente una fuente importante en la inestabilidad genómica mitocondrial que conduce a la disfunción respiratoria.

La formación de ROS y el estímulo de peroxidación lipídica en mitocondria pueden conducir a la supresión del metabolismo mitocondrial. Los peróxidos lipídicos alteran funciones mitocondriales vitales, tales como la respiración y la fosforilación oxidativa, propiedades de barrera de la membrana interna, mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$), y capacidad tapón del Ca_2^+ mitocondrial (*Albano E y colbs., 1991; Bacon BR y colbs., 1993; Bacon BR y colbs., 1986; Masini A y colbs., 1989*). Los productos de la peroxidación lipídica mitocondrial pueden deteriorar la función de barrera de las membranas interaccionando directamente con proteínas y/o indirectamente con residuos lipídicos de membrana (*Chen JJ y colbs., 1995*).

El estrés oxidativo marcadamente sensibiliza a la mitocondria hacia la inducción del MPT (poro de transición mitocondrial); según ciertos datos experimentales, los ROS generados mitocondrialmente están implicados en la inducción del MPT (*Kowaltowski AJ y colbs., 1996*). La unidad básica del poro MPT es el complejo de la VDAC-ANT-CyP-d (canal aniónico voltaje dependiente-translocador del nucleótido de adenina-ciclofilina D) situado en los sitios de contacto entre la membrana interna y externa mitocondrial. El complejo VDAC-ANT atrae a otras proteínas, particularmente quinasas (e.g., hexoquinasa, quinasa del glicerol). Recientes estudios identificaron el ANT (translocador del nucleótido de adenina) como un blanco importante para los ROS inducido por anticancerígenos, tales como la doxorubicina y el trióxido de arsénico. En particular, ha sido demostrado que la toxicidad cardiaca inducida por la doxorubicina se correlaciona con la oxidación de grupos -SH en ANT y una disminución de la concentración de la proteína ANT, con la inhibición de la respiración mitocondrial y la probabilidad creciente de formación del poro de MPT. El papel de VDAC (canal aniónico voltaje dependiente) como blanco para los ROS está menos claro, aunque ha sido demostrado recientemente que el O_2^- modula la apertura del VDAC reconstituido en liposomas causantes de la liberación del citocromo *c* (*Madesh M y colb., 2001*). Por lo tanto, el estrés oxidativo contribuye al daño celular mediado mitocondrialmente. El MPT es un mecanismo causante de fallo mitocondrial, el cual puede conducir a la necrosis debido al agotamiento de ATP o a la apoptosis dependiente de caspasas si la inducción del MPT ocurre en una subpoblación de mitocondrias y las organelas restantes todavía pueden mantener el potencial de membrana mitocondrial y producir ATP.

2.4- Implicaciones fisiológicas y patológicas de los ROS

Los ROS están implicados en diversos procesos fisiológicos. Entre las funciones fisiológicas de los mismos destacamos las siguientes:

- (i) El estrés oxidativo está caracterizado por una producción masiva de ROS en un ambiente inflamatorio y desempeña un papel dominante en la defensa contra patógenos ambientales. En un ambiente inflamatorio, los neutrófilos y los macrófagos activados producen grandes cantidades de radicales superóxido y de otros ROS (*Keisari, Braun, y Flescher, 1983*).
- (ii) Varios tipos de células no-fagocíticas; fibroblastos, células vasculares del músculo liso, miocitos cardiacos, y células endoteliales son productoras de ROS por la NAD(P)H oxidasa que regula diversas cascadas de señalización intracelular (*Jones y otros., 1996; Thannickal y Fanburg, 1995*).
- (iii) La regulación del tono vascular por el GMPc es un caso especial. La enzima soluble guanilato ciclasa (GCs) es activada por el peróxido de hidrógeno y el radical NO• (*Ignarro & Kadowitz, 1985; Wolin, Burke-Wolin, & Mohazzab-H, 1999*).
- (iv) La homeostasis del oxígeno es preservada en organismos más evolucionados por una estrecha regulación de los glóbulos rojos de la sangre y de la ventilación respiratoria (*Acker y Xue, 1995*). Se ha propuesto que los cambios en la presión parcial del oxígeno son detectados de forma independiente por varias proteínas productoras de ROS entre las que se encuentra el citocromo *c*.
- (v) La adherencia de la célula desempeña un papel importante en la embriogénesis, crecimiento celular, diferenciación, reparación de heridas, y otros procesos y por lo tanto, los cambios en las características adhesivas de las células y los tejidos son firmemente redox regulados (*Albelda, Smith, y Ward, 1994; Frenette y Wagner, 1996*).
- (vi) Existen evidencias de que el estado redox intracelular también modula las funciones inmunológicas de los macrófagos (*Hamuro, Murata, Suzuki, Takatsuki, y Suga, 1999*).
- (vii) La Muerte Celular Programada (apoptosis) es necesaria para el desarrollo y la destrucción apropiada de las células que representan una amenaza para la

integridad del organismo. Este proceso se basa en el equilibrio entre el cese de señales positivas (esas necesitadas para la supervivencia continuada, como por ejemplo, factores de crecimiento neuronal, IL-2, etc.) y la integración de señales negativas (por ejemplo, niveles crecientes de oxidantes dentro de la célula, daño al ADN por oxidantes, o de otros efectos dañinos tales como irradiación, quimioterapeúticos, etc) (Hengartner, 2000).

- (viii) Inducción de la biogénesis mitocondrial La población mitocondrial es dinámica y muestra variaciones en el tamaño, el número y la masa en respuesta a diversas situaciones estresantes teniendo como principales inductores a los ROS.

Por otro lado, los ROS han sido implicados en varias situaciones patológicas como enfermedad cardiovascular, cáncer, desórdenes neurológicos, diabetes, isquemia/reperfusión, envejecimiento y otras enfermedades (Dalle- Donne y otros., 2006; Dhalla, Temsah, y Netticadan, 2000; Jenner, 2003; Sayre, Smith, y Perry, 2001).

a) Cáncer

El daño oxidativo directo inducido por los ROS al ADN representa una de las explicaciones más comunes propuestas para el cáncer. Ha sido propuesto que los radicales hidroxilo generados cerca del ADN por procesos mediados por hierro son los principales responsables de este daño. De hecho, los radicales hidroxilo generan múltiples productos mutágenos después de la oxidación del ADN, incluyendo purina, pirimidina, y productos de la oxidación de la deoxirribosa (M.S. Cooke y colbs., 2003; M.D. Evans y colbs., 2004; M. Dizdaroglu y colbs., 2002). Otros oxidantes reactivos como el peroxinitrito (ONOO⁻) y el ácido hipocloroso (HOCl), cuando están producidos en cantidades apreciables, pueden también inducir modificaciones oxidativas del ADN que pueden ser relevantes para el desarrollo del cáncer (C.L. Hawkins y colbs., 2002; Y. Kawai y colbs., 2004; P.T. Doulias y colbs., 2001).

Numerosas investigaciones apoyan que los ROS, aparte de inducir oxidaciones en el ADN, también pueden ejercer una amplia gama de efectos sobre la proliferación celular modulando las vías de señalización que influyen la transformación de las células. La comprensión de los mecanismos moleculares exactos subyacentes de estos efectos sigue siendo tema de estudio. Es probable que los niveles basales de diversos

ROS junto con el tipo de célula representen los determinantes para el destino de las células. Así pues, mientras que cierta concentración intracelular puede promover el desarrollo de cáncer aumentando la proliferación, angiogénesis, y suprimiendo la apoptosis, niveles levemente más altos pueden actuar fácilmente como agentes anticancerígenos, induciendo la detención del ciclo celular, el envejecimiento, y la muerte de la célula por apoptosis o necrosis. Estas hipótesis son apoyadas experimentalmente por ensayos de manipulación genética. Así, la eliminación genética de la CuZnSOD o la disminución de la actividad de la MnSODs en ratones condujo a índices crecientes en el desarrollo del cáncer en estos animales (*S. Elchuri y cols., 2005; H. Van Remmen y cols., 2003*). Estas enzimas son responsables de la rápida eliminación del anión superóxido y se localizan en citosol y mitocondria, respectivamente. Además, estudios con ratones knockout de peroxidasa, catalasa, y peroxirredoxinas condujeron también a índices crecientes de la formación de cáncer (*F.F. Chu y cols., 2004; K. Ishii y cols., 1996; C.A. Neumann y cols., 2003*). Todas estas enzimas reducen el H₂O₂ a H₂O usando diversos donantes electrónicos.

Estos resultados indican claramente que las concentraciones elevadas de ROS participan en el desarrollo del cáncer influenciando diversos procesos celulares, tales como inducción de mutaciones en el ADN, modulación de la expresión génica, proliferación creciente, e inhibición de la apoptosis.

b) Enfermedad Cardiovascular

El estrés oxidativo inducido por los ROS en miocitos cardiacos y vasculares ha sido ligado a lesiones cardiovasculares del tejido (*Dhalla y otros., 2000*). Sin importar la evidencia directa para un acoplamiento entre el estrés oxidativo y la enfermedad cardiovascular, el estrés oxidativo inducido por los ROS desempeña un importante papel en varias enfermedades cardiovasculares tales como la aterosclerosis, enfermedad cardíaca isquémica, hipertensión, cardiomiopatías, hipertrofia cardíaca y paro cardíaco congestivo (*Kukreja y Hess, 1992*). Las principales fuentes de estrés oxidativo involucradas en el sistema cardiovascular serían: (i) la enzima xantina oxidoreductasa (XOR), (ii) la NAD(P)H oxidasa (multisubunit membrane complexes), (iii) los NOS, (iv) los citocromos mitocondriales y (v) la hemoglobina (*Berry & Hare, 2004; Hare & Stamler, 2005*).

c) Artritis Reumatoide

La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune que causa la inflamación crónica de las articulaciones y del tejido que rodea las articulaciones con la infiltración de macrófagos y de linfocitos T activados (*Bauerova y Bezek, 1999*). La patogénesis de esta enfermedad se liga predominantemente a la formación de radicales libres en el sitio de la inflamación. La lesión oxidativa y el estado inflamatorio de varias enfermedades reumáticas fueron confirmadas por niveles crecientes de isoprostanos y prostaglandinas en suero y líquido sinovial comparados con los controles. Condiciones oxidativas en el tejido sinovial también se asocian a una incidencia más alta de mutaciones del p53 (*Firestein, Echeverri, Yeo, Zvaifler, & Green, 1997*).

d) Diabetes

El estrés oxidativo ha sido propuesto como una de las causas principales de las complicaciones diabéticas inducidas por la hiperglicemia. La hiperglicemia del organismo estimula la formación ROS mediante una variedad de fuentes. Estas fuentes incluyen la fosforilación oxidativa, la auto-oxidación de la glucosa, la oxidasa del NAD (P) H, la lipooxigenasa, monooxigenasas del citocromo P450, y la óxido nítrico sintasa (NOS).

e) Desórdenes Neurológicos

El SNC es particularmente vulnerable al daño oxidativo debido a su alta utilización de oxígeno, a su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados oxidables, y a la presencia de los metales redox-activos (Cu, Fe). El estrés oxidativo aumenta con la edad y por tanto, puede ser considerado como un importante factor causante de varias enfermedades neurodegenerativas típicas de individuos de mayor edad.

f) Envejecimiento

El proceso de envejecimiento se puede definir como un declive progresivo en las funciones fisiológicas de un organismo después de la fase reproductiva de la vida. La teoría de los radicales libres del envejecimiento fue introducida en 1956 por Denham Harman que propuso el concepto de que los radicales libres desempeñaban un papel importante en el proceso del envejecimiento (*Harman, 1956*); y se basa en el hecho que

los efectos deletéreos producidos al azar de los radicales libres durante el metabolismo aerobio causan daño al ADN, lípidos, y proteínas y son acumulados con el tiempo.

3.- CLASIFICACIÓN DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA

3.1.- Introducción

La existencia de un equilibrio entre la división y la muerte celular es de vital importancia para el desarrollo y mantenimiento de los organismos multicelulares. Desórdenes de ambos procesos tienen consecuencias patológicas y pueden conducir a una embriogénesis errónea, enfermedades neurodegenerativas, o desarrollo de cáncer. Por esta razón, el equilibrio entre la vida y la muerte está rigurosamente controlado y los elementos defectuosos pueden ser eliminados con eficacia por un proceso llamado “muerte celular programada” (PCD) (*Daniel NN y cols 2004*). En las últimas décadas, el concepto de PCD fue sinónimo de apoptosis, un proceso de muerte caracterizado por cambios morfológicos tales como contracción de la célula, condensación de la cromatina, y desintegración celular en fragmentos pequeños, “cuerpos apoptóticos” que pueden ser eliminados por fagocitosis (*Kerr JF y cols., 1972*). La cascada apoptótica puede iniciarse mediante dos vías diferentes, implicando la liberación del citocromo *c* de la mitocondria (vía mitocondrial), o la activación de los receptores de muerte en respuesta a la unión de un ligando (vía receptores de muerte) (*Ashkenazi A y cols. 1978; Hengartner MO., 2000*). Para la activación de cualquiera de estas vías, una familia específica de cisteín-proteasas, conocidas como caspasas, ejecutan el destino de la célula de una manera programada, conduciendo a cambios morfológicos típicos (*Degterev A., 2003*). Mientras que la apoptosis es un programa de muerte celular inherente y controlado, la contrapartida conceptual, la necrosis, es una manera más caótica de morir, que resulta de circunstancias externas a la célula, y es caracterizada por edema celular y rotura de la membrana plasmática, conduciendo a la liberación de los componentes celulares y a la respuesta inflamatoria del tejido (*Kerr JF y cols., 1972; Hirsch T y cols., 1997*). Estos últimos años, ha llegado a ser evidente que la dicotomía clásica entre apoptosis y necrosis es una simplificación de procesos altamente sofisticados que protegen al organismo contra células indeseadas y potencialmente dañinas. Aunque las caspasas pueden ser imprescindibles para la morfología apoptótica típica, el proceso de activación de caspasas no es el único determinante de la decisión de

la vida y la muerte en PCD (Blagosklonny MV., 2000; Kitanaka C y cols., 1999; Lockshin RA y cols., 2000; Sperandio S y cols., 2000; Wyllie AH y cols., 2001). Una de las primeras demostraciones claras de la PCD independiente de caspasas fue dado por Xiang y colaboradores., que demostraron que la inhibición de las actividades de las caspasas en una variedad de líneas celulares leucémicas no inhibía la muerte inducida por el Bax sino que solamente cambiaba la morfología apoptótica de las células que morían (Xiang J y cols., 1996).

Efectivamente, en los últimos años ha sido puesto de manifiesto que la PCD puede ocurrir en completa ausencia de caspasas, y ser otras proteasas no-caspasas las responsables de la ejecución de dicha muerte (Borner C y cols., 1999; Boya P y cols., 2003; Broker LE y cols., 2004; Foghsgaard L y cols., 2001; Guicciardi ME y cols., 2000; Kagedal K y cols., 2001; Stoka V y cols., 2001). Además, Cauwels y colaboradores han demostrado que la inhibición de las caspasas no aliviaba sino que exacerbaba la toxicidad inducida en ratones por el factor de necrosis tumoral (TNF), indicando que este tipo de muerte independiente de caspasas no se limita a modelos “in vitro” (Cauwels A y cols., 2003; Perfettini JL y cols., 2003). Existen varias formas de muerte celular independiente de caspasas que no pueden ser clasificadas fácilmente como “apoptosis” o “necrosis” y tipos alternativos de PCD han sido descritos (Blagosklonny MV., 2000; Kitanaka C y cols., 1999; Sperandio S y cols., 2000; Borner C y cols., 1999; Leist M y cols., 2001; Clarke PG y cols., 1990; King KL y cols., 1995). No ocurren solamente bajo circunstancias fisiológicas sino que pueden también ser inducidos por ejemplo por el TNF- α o por drogas quimioterápicas (Jäättelä., 2004).

3.2.- Clasificación de la muerte celular programada

Los diversos tipos de PCD tienen en común que son ejecutados por procesos celulares activos, esto es lo que los distingue de la necrosis accidental (Leist M y cols., 2001). Existen varios modelos de muerte celular programada independiente de caspasas:

Un modelo implica **Autofagia**, también llamada *muerte celular tipo II* para distinguirlo de *apoptosis o tipo I* (Clarke PG y cols., 1990; Schweichel JU y cols., 1973). Este proceso es caracterizado por el secuestro del citoplasma y las organelas en vesículas autofágicas y la posterior degradación por el propio sistema lisosomal celular

(autofagia significa en griego, digestión de uno mismo). Sirve para eliminar las proteínas y componentes de vida larga de las organelas y tiene una función importante en el remodelado celular debido a la diferenciación, al estrés, o al daño inducido por citocinas. Las células que experimentan excesiva autofagia se activan para morir de una manera no-apoptótica, es decir, sin la activación de caspasas (Gozuacik D y cols., 2004). La autofagia puede intervenir en la promoción y prevención del cáncer, y su papel puede ser alterado durante la progresión del tumor (Shintani T., 2004). La capacidad autofágica observada durante la carcinogénesis del animal de experimentación se ha demostrado disminuida, indicando que la interrupción del proceso autofágico puede contribuir al desarrollo del cáncer (Canuto RA y cols., 1993; Kisen GO y cols., 1993; Schwarze PE y cols., 1985). Sin embargo, las células cancerosas pueden necesitar autofagia para sobrevivir en condiciones de limitación de alimento y poco oxígeno y la autofagia puede proteger las células de cáncer contra la radiación ionizante eliminando los elementos dañados (Cuervo AM., 2004; Paglin S y cols., 2001). El papel exacto de la muerte celular por autofagia en mamíferos no es entendido completamente (Okada H y cols., 2004).

La **Paraptosis** ha sido caracterizada recientemente por la vacualización citoplasmática que comienza con el hinchamiento progresivo de las mitocondrias y del retículo endoplásmico (ER). No responde a inhibidores de caspasas ni implica la activación de las mismas, la formación de cuerpos apoptóticos, u otras características de la morfología apoptótica (Sperandio S y cols., 2000). Se ha descrito que la paraptosis está mediada por quinasas (Sperandio S y cols., 2004) y puede ser activada por el miembro TAJ/TROY de la familia de receptores TNF (Wang Y y cols., 2004). Hay, sin embargo, sólo algunos estudios sobre la paraptosis, y ellos no hacen una comparación con otros tipos de PCD tales como autofagia. Permanece, por tanto, por ser establecido si la autofagia y la paraptosis representan dos tipos independientes de PCD.

La **Catástrofe Mitótica** es otra vía de muerte celular, que no es típicamente apoptosis. Se produce por fallos en los sistemas de chequeo del ciclo celular (checkpoints), que detiene la mitosis antes o durante el proceso, permitiendo una segregación aberrante de los cromosomas, lo que determina la activación de una apoptosis defectuosa y muerte celular (King KL y cols., 1995). La catástrofe mitótica se puede accionar por agentes que estabilizan o desestabilizan microtúbulos y daño al ADN (Roninson IB y cols., 2001). Se ha publicado que la catástrofe mitótica está

acompañada por la permeabilización de la membrana y la activación mitocondrial de las caspasas (*Castedo M y colbs., 2004*), pero otros estudios han discutido que es fundamentalmente diferente de la apoptosis, pues la inhibición de caspasas o la sobreexpresión de Bcl-2 no puede prevenir de la mitosis catastrófica o del desarrollo de células gigantes multi-nucleadas (*Roninson IB y colbs., 2001, Lock RB y colbs., 1996*). Si la catástrofe mitótica representa completamente el tipo de PCD independiente de caspasas o no, sigue siendo por tanto cuestión de discusión.

A pesar de los numerosos modelos propuestos para categorizar PCD, las definiciones exclusivas son difíciles de hacer debido al solapamiento y la competición de las diferentes vías de señalización entre los diversos programas de muerte. Marcadores de muerte apoptóticos y necróticos pueden simultáneamente estar presentes en la misma célula después de la isquemia cerebral, indicando que más de un programa de muerte puede ser activado al mismo tiempo (*Unal-Cevik I y colbs., 2004*). Además, una célula puede cambiar hacia adelante y hacia atrás entre diversas vías según las indicaciones de muerte neuronal de la célula que exhibió elementos de la degeneración autofágica sobre la expresión oncogénica del Ras, mientras que tenía características de muerte apoptótica celular sobre el tratamiento con TNF- α (*Chi S y colbs., 1999*). Por lo tanto, se ha postulado que el fenotipo dominante de muerte celular es determinado por la velocidad relativa de los programas disponibles de muerte; aunque las características de varias vías de muerte pueden ser exhibidas, sólo el camino más rápido y más eficaz es generalmente evidente (*Bursch W., 2001*).

4.- MOLÉCULAS MODULADORAS DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA

4.1- Familia Bcl-2

El gen del Bcl-2 fue el primero en ser identificado. Se encuentra localizado en el límite cromosómico t (14:18) de células B linfoides (*Tsujimoto y colbs., 1984; Cleary y colbs., 1986*) y se descubrió que actuaba como una nueva clase de oncogenes que funcionan para prevenir la apoptosis en lugar de promover directamente la proliferación celular (*Hockenbery y colbs., 1990; Korsmeyer, 1992; McDonnell y colbs., 1993; Vaux y colbs., 1988*). El Bcl-2 es el fundador de una gran familia de reguladores de la

apoptosis que favorecen la supervivencia celular o facilitan la muerte de la misma. Los miembros que favorecen la supervivencia son proteínas multidominios que contienen BH1, BH2 y BH3 (A1/Bfl-1), BH2 y BH4 (Bcl-xES), y éstos son más similares al Bcl-2 que tienen 4 dominios BH (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, Brag-1, Boo/Diva, Bcl-B/Bcl-2L-10) (Cleary y colbs., 1986; Boise y colbs., 1993; Choi y colbs., 1995; Das y colbs., 1996; Gibson y colbs., 1996; Inohara y colbs., 1998a; Ke y colbs., 2001; Kozopas y colbs., 1993; Lin y colbs., 1993; Schmitt y colbs., 2004; Song y colbs., 1999; Zhang y colbs., 2001).

Según su estructura y función bioquímica, los miembros que promueven la apoptosis pueden ser divididos en 2 subgrupos: proteínas multidominio integradas por los dominios 1 a 3 de BH (Bax, Bak, Bok/Mtd, Bcl-rambo), BH2 y BH3 (Bcl-gL) o BH4 y BH3 (Bcl-xS) (Boise colbs., 1993; Chittenden colbs., 1995a; Farrow colbs., 1995; Guo colbs., 2001; Hsu colbs., 1997a; Inohara colbs., 1998b; Kataoka colbs., 2001; Kiefer colbs., 1995; Oltvai colbs., 1993) y BH3, proteínas formadas por 1 o 2 dominios BH3 (Bad, Bid, Bik/Nbk/Blk, Bim/Bod, Hrk/Dp5, Bnip1, Bnip3, Nix, Puma/Bbc3, Noxa, Bcl-gS, Mcl-1s, Map1, Bmf, Spike and ApoL6) (Guo colbs., 2001; Bae colbs., 2000; Bingle colbs., 2000; Boyd colbs., 1994; 1995; Chen y colbs., , 1999; Han colbs., 1996; 2001; Hegde colbs., 1998; Hsu colbs., 1998; Imaizumi colbs., 1999; Inohara colbs., 1997; Matsushima colbs., 1998; Nakano and Vousden, 2001; O'Connor colbs., 1998; Oda colbs., 2000; Puthalakath colbs., 2001; Tan colbs., 2001; Wang colbs., 1996; Yang colbs., 1995; Yasuda colbs., 1999; Yu colbs., 2001; Liu colbs., 2005). Además, en los dominios BH, algunas proteínas contienen un dominio de formación del poro y un dominio transmembrana en la extremidad del grupo carboxilo terminal (Adams y Cory, 2001; Chao y Korsmeyer, 1998; Reed, 1997; 1998; Vander Heiden y Thompson, 1999; Zamzami colbs., 1998; Cory y Adams, 2002).

Varios homólogos del Bcl-2 funcionan, al menos en parte, a través de interacciones proteína-proteína, formando una red dinámica compleja de homo- y de heterooligómeros, dependiendo del ambiente celular y de su localización subcelular. Experimentos de mutagénesis han sugerido que el potencial de dimerización de las proteínas Bcl-2 está profundamente influenciado por la combinación específica de los dominios BH (Chittenden colbs., 1995b; Kelekar y Thompson, 1998; Yin colbs., 1994). Así, la elucidación de la estructura en tres dimensiones de las Bcl-xL anti-apoptóticas ha proporcionado un primer modelo en el cual las α -hélices se localizaron en los dominios

BH1, BH2 y BH3 creando un bolsillo hidrofóbico alargado donde la α -hélice anfipática del BH3 y otra proteína del Bcl-2 pueden unirse, de la misma manera que un ligando se une a su receptor (*Muchmore y cols., 1996; Diaz y cols., 1997; Sattler y cols., 1997*).

La heterodimerización entre las moléculas inductoras y anti-apoptóticas puede neutralizar la actividad de unas y otras, en función de la concentración relativa de una fracción sobre la otra, influenciando profundamente la susceptibilidad celular a la señal de muerte (*Oltvai y cols., 1993; Sedlak y cols., 1995*). Debido a su capacidad de unión, el motivo BH3 ha llegado a ser un potente mediador de la muerte celular y a menudo es únicamente requerido para la actividad de la célula “asesina” (*Chittenden y cols., 1995b; Polster y cols., 2001*). Dos modelos distintos han sido propuestos para explicar la actividad “asesina” de las proteínas BH3 (*Adams y Cory, 2007*). El modelo directo de activación propone que después de un estímulo de muerte, las proteínas BH3 promueven la apoptosis uniéndose e inhibiendo moléculas que favorecen la supervivencia, como Bcl-2, Bcl-xL Bcl-w, Mcl-1 and A1, o uniéndose a otros agonistas de muerte, como las proteínas multidominio Bax y Bak, las cuales llegan a ser activadas y ejercen sus actividades pro-apoptóticas a nivel mitocondrial. Las proteínas BH3 que neutralizan las proteínas que promueven la supervivencia son conocidas como BH3 “facilitadoras o proteínas de sensibilización”, mientras que aquellas que se unen a pro-apoptóticos Bax o Bak se llaman proteínas BH3 “activadoras o activantes” (*Chittenden, 2002; Letai y cols., 2002; Kuwana y cols., 2005; Kim y cols., 2006*). El modelo indirecto de activación sugiere que todas las proteínas BH3 involucran solamente las proteínas que favorecen la supervivencia evitando que inhiban la activación del Bax o del Bak (*Chen y cols., 2005; Willis y cols., 2005; 2007*).

Los miembros de la familia Bcl-2 son localizados por separado en los distintos compartimientos subcelulares en ausencia de una señal de muerte. Los miembros anti-apoptóticos, como Bcl-2 y el Bcl-xL, residen generalmente en la cara citoplásmica de la membrana mitocondrial externa (MME), en el retículo endoplasmático y la envoltura nuclear (*Hockenbery y cols., 1990; Krajewski y cols., 1993; Zamzami y cols., 1996*). En cambio, los miembros inductores de apoptosis, tales como Bax, Bad y Bid, se encuentran algo libre en la célula sin estimular, a excepción del multidominio Bak, el cual parece residir constitutivamente en la MME (*Gross y cols., 1998; Korsmeyer y cols., 2000; Hsu y cols., 1997b*). Después de una señal de muerte, las proteínas

multidominio inductoras de apoptosis, como el Bax, sufren un cambio conformational que les concede capacidad de insertarse en las membranas intracelulares, especialmente en las mitocondrias. El dominio transmembrana parece ser importante en conferir capacidad de unión tipo muelle a la membrana a ambos miembros pro y anti-apoptóticos así como en proporcionar estabilidad a la proteína, aun cuando algunos estudios indican que la delección de este dominio no invalida la función de la mayoría de las proteínas de la familia Bcl-2 (*Borner et al., 1994; Nguyen et al., 1994*).

La regulación de la permeabilización de la membrana mitocondrial es el medio principal por el cual las proteínas Bcl-2 ejercen su efecto regulador de la apoptosis. Como sitio de convergencia para los múltiples estímulos que inducen la muerte, las mitocondrias son el centro de la decisión que controla la vida y la muerte liberando factores apoptogénicos al citosol. Estas moléculas que inducen la muerte están situadas en el espacio intermembrana mitocondrial e incluyen el citocromo c (*Kluck y colbs., 1997; Yang y colbs., 1997*), Smac/DIABLO (factor que promueve la activación de caspasas por su efecto sobre IAPs (Proteínas Inhibidoras de Apoptosis)) (*Du y colbs., 2000; Verhagen y colbs., 2000*), el factor nuclear AIF (Factor Inductor de Apoptosis) (*Susin y colbs., 1996; 1999a*), Endo G (una DNasa apoptótica) (*Li y colbs., 2001; Parrish y colbs., 2001*), HtrA2/Omi (un inhibidor de IAPs con actividad serina-proteasa pro-apoptótica) (*Suzuki y colbs., 2001b*), y algunas pro-caspasas (*Krajewski y colbs., 1999; Mancini y colbs., 1998; Qin y colbs., 2001; Susin y colbs., 1999b*). La permeabilización de la MME es seguida generalmente por la activación caspasa-9 que conduce a una apoptosis irreversible. Los miembros de la familia Bcl-2 pueden controlar la fase mitocondrial de la permeabilización (*Desagher y Martinou, 2000*) mediante 3 modelos que prevalecen: primero, formando canales autónomos en la MME; en segundo lugar, interfiriendo con la permeabilidad mitocondrial de los poros de transición (PTPm); y, finalmente, promoviendo alteraciones dinámicas en la estructura de la bicapa lipídica (*Gross y colbs., 1998; Kluck y colbs., 1997; Yang y colbs., 1997; Antonsson y colbs., 1997; 2000; Minn y colbs., 1997; Chou y colbs., 1999; McDonnell y colbs., 1999; Schendel y colbs., 1998; Schlesinger y colbs., 1997; Bossy-Wetzel y colbs., 1998; Vander Heiden y colbs., 1997; Saito y colbs., 2000; Pavlov y colbs., 2001; Basañez y colbs., 1999; Kudla y colbs., 2000; Epand y colbs., 2002; Kuwana y colbs., 2002*). Las proteínas anti-apoptóticas parecen ejercer su función en parte inhibiendo la formación de poros de muerte que inducen las proteínas que favorecen la apoptosis. Un

estudio ha divulgado que el Bcl-2 podría potencialmente inhibir la apoptosis evocando el flujo de H^+ de las mitocondrias y preservando el potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) (Shimizu y cols., 1998). Las proteínas anti-apoptóticas pueden también proteger a las células contra la muerte inhibiendo la producción de especies reactivas del oxígeno (Hockenbery y cols., 1993; Kane y cols., 1993), previniendo la acidificación intracelular (Gottlieb et al., 1996), aumentando la capacidad mitocondrial de Ca_2^+ (Susin y cols., 1996; Shimizu y cols., 1998), y proporcionando la estabilización total de la membrana en la cual se insertan (Vander Heiden y cols., 1997; Zamzami y cols., 1995). Estos mecanismos que favorecen la supervivencia no están bien definidos y pueden o no implicar la capacidad de formación de poros de proteínas anti-apoptóticas.

En el primer modelo, las proteínas Bcl-2 modulan la permeabilización de la MME sin alterar la función mitocondrial, lo que significa que el $\Delta\Psi_m$ está mantenido tan bien como la producción de ATP. Esto es crucial porque en ausencia de dATP o ATP, no se puede formar el apoptosoma, la caspasa-9 no se activa, y las células tienden a morir por necrosis y no por apoptosis (Chautan y cols., 1999; Nicotera y cols., 1999). El segundo modelo de permeabilización de la MME implica el PTPm, o los megacanales, que se forman en los sitios de contacto entre la membrana mitocondrial externa e interna (Zamzami y cols., 1998; Zoratti y Szabo, 1995). Sus componentes principales son el canal anión voltaje-dependiente 1 (VDAC1), el translocador del nucleótido de adenina (ANT), el receptor periférico de la benzodiazepina, la ciclofilina de la matriz mitocondrial así como la hexoquinasa y la creatin quinasa, que todos crean un poro permeable a solutos de masa molecular ≤ 1.5 kDa (Bernardi y cols., 1999; Crompton, 1999).

La apertura del PTPm da lugar a la despolarización mitocondrial y a la disipación subsecuente del $\Delta\Psi_m$, al desacoplar la fosforilación oxidativa, e hinchamiento mitocondrial (Bernardi y cols., 1999). La ruptura de MME puede ocurrir eventualmente como consecuencia de la expansión de la matriz, liberando el contenido del espacio intermembrana (cytochrome c, Smac/DIABLO, Omni/HtrA2, AIF) al citosol de una manera no específica (Harris y Thompson, 2000; Zamzami y Kroemer, 2001). Las interacciones entre algunos miembros de la familia Bcl-2 y los componentes del PTPm han sido propuestas por varios estudios. Las moléculas pro-apoptóticas como el Bax podrían unirse al ANT y promover la apertura del mPTP, un efecto prevenido

por el anti-apoptótico Bcl-2 (Marzo y otros., 1998). Los multidominios Bax y Bak podrían también actuar recíprocamente con el VDAC1, aumentando la actividad del canal para permitir el paso del citocromo c, mientras que el dominio BH4 de Bcl-2 anti-apoptótico y del Bcl-xL estimula algo el cierre del canal (Shimizu et al., 1999; 2000; Shimizu y Tsujimoto, 2000). Recientemente, Sugiyama y cols., (2002) han demostrado que el BH3 Bim, pero no el Bid, puede también interactuar recíprocamente con el VDAC1 y promover su apertura, resultando una pérdida de $\Delta\Psi_m$ y liberación de citocromo c. Por interacción con el PTPm, las proteínas pro-apoptóticas parecen ser capaces de realzar la permeabilidad basal del PTPm, permitiendo la difusión a través del mismo de moléculas mayores de 1.5 kDa.

4.2- Vías de Señalización Apoptótica

4.2.1. Vía de receptores y ligandos de muerte

La vía extrínseca de la apoptosis se activa mediante la unión de los *ligandos de citocinas* (es decir, FasL, TNF ó TRAIL) a miembros de la superfamilia receptor TNF- α , los cuales son conocidos como *receptores de muerte* (es decir, Receptores de Fas, también llamados CD95/Apo-1; Receptores de TNF y Receptores de TRAIL) (Ozoren N y cols., 2003; Thorburn A y cols., 2004; Abe K y cols., 2000; Peter ME y cols., 2003; Schulze-Osthoff K y cols., 1998; Ashkenazi A y cols., 1999). Los receptores de muerte contienen un dominio globular intracelular de interacción conocido como Dominio de Muerte (DD). Estos receptores de muerte se agregan a la superficie celular seguido de la unión del ligando a sus dominios extracelulares para formar trímeros. Esto da lugar al reclutamiento de las moléculas adaptadoras a los dominios intracelulares agregados de los receptores. Uno de los adaptadores principales que se reclutarán es el Dominio de Muerte Asociado Fas, FADD, que posee un DD que interactúa recíproca o directamente con los DD de los receptores de muerte, o indirectamente a través de otra molécula del adaptador, TRADD (Dominio de Muerte Asociado del Receptor de TNF). El FADD también contiene un segundo dominio de interacción proteica, conocido como el Dominio Efecto de Muerte (DED). El dominio DED del FADD interactúa recíprocamente con el DED del zimógeno débil activo, pro-caspasa-8, para formar un complejo intracelular multi-proteico que induce la muerte conocido como el complejo (DISC) (Abe K y cols., 2000; Boatright KM y cols., 2003; Cory S y cols., 2002;

Ashkenazi A y colbs., 1998; Wallach D y colbs., 1999). Una vez que está formado, el DISC promueve la activación, inducida por la proximidad, de la caspasa-8, que entonces es procesada más a fondo vía un mecanismo de auto-proteolisis (Salvesen GS y colbs., 1999; Yang X y colbs., 1998). Si todavía está limitado al DISC o liberado en otros compartimientos intracelulares, la caspasa-8 activa, activa a su vez a las caspasas efectoras, tales como la caspasa-3, conduciendo a la ejecución de la célula vía la degradación del núcleo y de otras estructuras intracelulares (Peter ME y colbs., 2003; Ashkenazi A y colbs., 1998; Scaffidi C y colbs., 1998; Cohen GM y colbs., 1997).

4.2.2. Via Mitochondrial

Actualmente se piensa que las mitocondrias son organelas intracelulares implicadas en mediar en la mayoría de las vías apoptóticas en células mamíferas (Newmeyer DD y colbs., 2003; Kroemer G, 2003; Ravagnan L y colbs. 2002; Zamzami N y colbs., 2001; Green DR y colbs., 2004; Sorice M y colbs., 2004). En general, las mitocondrias se encuentran involucradas mediante la vía intrínseca de muerte celular, la cual se puede iniciar por una variedad de estímulos incluyendo radiación UV, radiación γ , calor, daños del ADN, acciones de algunas oncoproteínas y genes supresores del tumor, factores virales, y la mayoría de los agentes quimioterápicos (Kroemer G, 2003). Estas formas diversas de estrés son detectadas por múltiples moléculas citosólicas o intra-organelas, las cuales entonces traducen las señales a la mitocondria, dando por resultado alteraciones de la membrana mitocondrial externa (MME) (Newmeyer DD y colbs., 2003; Zamzami N y colbs., 2001; Green DR y colbs., 2004, Kuwana T y colbs., 2002; Esposti MD y colbs., 2003). Esta rotura inicial de la MME conduce a la permeabilidad creciente de las proteínas que están atrapadas normalmente entre la membrana mitocondrial externa (MME) y la membrana mitocondrial interna (MMI), permitiéndoles así escapar de las mitocondrias y difundir al citosol. La MMI es una membrana altamente enrollada, abundante en proteínas con una composición lipídica inusual (Newmeyer DD y colbs., 2003; Sorice M y colbs., 2004; Kuwana T y colbs., 2002; Esposti MD y colbs., 2003; Esposti MD y colbs., 2002). La fosforilación oxidativa ocurre dentro de la MMI (Newmeyer DD y colbs., 2003, Degli Esposti M., 2002; Shrivastava P., 2004). Debido a la importancia crucial de la fosforilación oxidativa en producir ATP celular, el cual es también esencial para la señal apoptótica

(y la subsecuente formación del apoptosoma), los estímulos apoptóticos auténticos no afectan normalmente las características de la MMI. Sin embargo, algunas fármacos y agentes quimioterápicos pueden activar un complejo multiproteico que promueve la formación de un canal grande en la MMI, el llamado poro de transición de la permeabilidad (PTP) (*Newmeyer DD y colbs., 2003; Zamzami N y colbs., 2001; Degli Esposti M., 2002; Shrivastava P y colbs., 2004; Waterhouse NJ y colbs., 2001*). Cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$ cuya fuente de energía es la fosforilación oxidativa) a menudo han sido observados en células apoptóticas y son interpretados derivados de la apertura del PTP. Sin embargo, lo más frecuente de estos cambios ocurre después de la pérdida inicial de permeabilidad de la MME, reflejando una mezcla de daños mediados por caspasas e independientes de caspasas, incluyendo la apertura del PTP (*Green DR y colbs., 2004*).

El primero, y probablemente el acontecimiento más importante de la vía intrínseca de la apoptosis es la pérdida de integridad de la MME y la consiguiente liberación de proteínas mitocondriales. Entre las proteínas que se escapan fuera de las mitocondrias (*Saelens X y colbs., 2004; Kluck RM y colbs., 1999*) algunas, tales como el citocromo *c*, desempeñan un papel fundamental en promover la cascada de caspasas en la muerte celular, y son conocidos como “factores apoptogénicos”. Parece darse una liberación jerárquica de factores apoptogénicos durante la muerte celular, con el citocromo *c*, Omi/ Htr2A y Smac/Diablo que son liberados primero con cinéticas muy similares (*Saelens X y colbs., 2004*). La posterior liberación del AIF (Factor Inductor de Apoptosis) y de endoG (*Penninger JM y colbs., 2003; Arnoult D y colbs., 2003*) está unida a un daño más severo de la membrana mitocondrial, incluyendo la alteración de la MMI. Es importante señalar que un papel apoptogénico directo ha sido demostrado solamente para el citocromo *c*. Específicamente, el citocromo *c* es imprescindible para la activación de la Proteína Activadora de Apoptosis Factor-1 (Apaf-1) y la formación subsecuente del apoptosoma, última “máquina de muerte celular” (*Arnoult D y colbs., 2004*).

El apoptosoma trabaja como una gran plataforma para reclutar y facilitar la activación de pro-caspasa-9, una caspasa apical de la vía intrínseca de la apoptosis (*Hill MM y colbs., 2003; Chinnaiyan AM, 1999; Salvesen GS y colb., 2002; Shi Y, 2002; Cain K y colbs., 2002; Adams JM y colbs., 2002; Baliga B y colbs., 2003*). Hay una clara semejanza entre la activación de la caspasa-8 por el DISC y la activación de la

caspasa-9 por el apoptosoma, debido a que ambos sistemas se basan en complejos multiproteicos para promover la acumulación de los zimógenos que inician un proceso de activación de caspasas (Hill MM y colbs., 2003; Chinnaiyan AM, 1999; Salvesen GS y colb., 2002; Shi Y, 2002; Cain K y colbs., 2002; Adams JM y colbs., 2002; Baliga B y colbs., 2003). El apoptosoma, sin embargo, requiere de factores reguladores adicionales para activar completamente la cascada de caspasas. Se incluye entre éstos factores Smac/Diablo, una proteína que puede actuar recíprocamente con varias de las Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis (IAP) y desalojarlas de su acción inhibitoria con la procaspasa-9 y las otras caspasas (Shi Y, 2002; Cain K y colbs., 2002; Adams JM y colbs., 2002; Baliga B y colbs., 2003). Como ya se ha mencionado, el Smac/Diablo está también presente en las mitocondrias (unidos directamente al MME) y se libera eficientemente tan pronto como la integridad de MME es alterada después de estímulos intrínsecos de muerte celular (Saelens X y colbs., 2004, Cain K y colbs., 2002).

4.2.3. tBid: Relación Vía Extrínseca e Intrínseca

La permeabilidad de la membrana externa mitocondrial y la vía mitocondrial son crucialmente reguladas por diversos miembros pro- y anti-apoptóticos de la familia del Bcl-2 (Korsmeyer SJ, 1999). Los miembros anti-apoptóticos incluyen Bcl-2, Bcl-XL y Mcl-1, mientras que los miembros pro-apoptóticos incluyen Bax y Bak, también como proteínas BH3, Bid y Bim (Marsden VS y colbs., 2003). En particular, las mitocondrias son dianas de proteínas pro-apoptóticas tales como Bax y Bid (Newmeyer DD y colbs., 2003; Wang X y colbs., 2001; Martinou JC y colbs., 2001; Esposti MD, 2002; Zamzami N y colbs., 2003). El Bid es un potente pro-apoptótico que se encuentra localizado normalmente en el citosol, pero también se transloca a través de las membranas intracelulares debido a su capacidad intrínseca de interacción lipídica. El Bid dividido (y en particular su fragmento C-terminal, tBid) adquiere una fuerte propensión a unirse a la mitocondria, donde promueve una efectiva permeabilización de la MME y la liberación de factores apoptogénicos (Wang X y colbs., 2001; Martinou JC y colbs., 2001; van Loo G y colbs., 2002). La cardiolipina, un lípido mitocondrial o metabolito de la cardiolipina se considera como el receptor mitocondrial para el Bid dividido por la caspasa.

Aunque actualmente es aceptado que t-Bid constituye la unión fundamental entre el DISC y la mitocondria (Wang X y colbs., 2001), algunas observaciones sugieren que señales paralelas podrían ser enviadas a la mitocondria durante la apoptosis mediada por los receptores de muerte. Análisis de la permeabilidad de la membrana mitocondrial después de la activación “in vivo” de Fas en tejidos primarios de ratones han indicado que el daño a la MME que conduce a la inicial liberación del citocromo *c* ocurre antes de la activación palpable de la caspasa-8 (Esposti MD y colbs., 2001). Además, con esto queda claro que la inducción de la apoptosis por la caspasa 8 es amplificada a través de la liberación mitocondrial del citocromo *c* (Kuwana T y colbs. 1998). LeBlanc H y colaboradores (LeBlanc H y colbs., 2002), demostraron que el Bax es necesariamente requerido para la apoptosis inducida por TRAIL, mientras que un segundo artículo ha publicado que la apoptosis inducida por Fas es independiente del Bax. (Wei MC y colbs., 2001). Además, evidencias adicionales indican que el DISC produce una rápida respuesta que parece ser independiente de caspasas (Siegmond D y colbs., 2001; Gougeon ML y colbs., 2003). Excluyendo los conocidos mecanismos mencionados respecto al metabolismo de fosfolípidos, los mecanismos por los cuales vías alternativas de receptores de muerte alcanzan la mitocondria permanecen desconocidos.

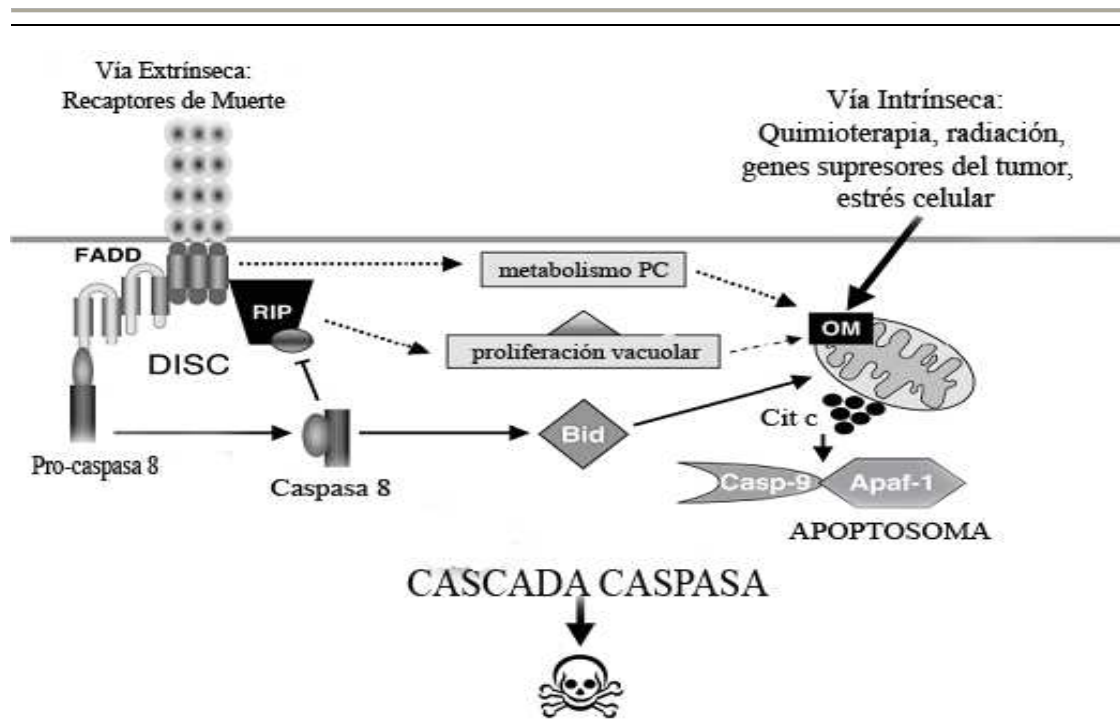


Figura 6: Cascada apoptótica

5.- ESTRÉS OXIDATIVO Y APOPTOSIS

El citocromo *c* está normalmente unido a la membrana mitocondrial interna por asociación con la cardiolipina. La cardiolipina está presente solamente en mitocondria y se encuentra sobre todo en la MMI. Debido a su estructura única entre los fosfolípidos, la cardiolipina confiere fluidez y estabilidad a la membrana mitocondrial (*Tuominen EK y colbs., 2002*).

A diferencia de otros fosfolípidos, los ácidos grasos de la cardiolipina esencialmente se limitan a cadenas C18. La cadena dominante C18 en mamíferos es el linoleico (18:2), el oleico (18:1) y linolénico (18:3). La naturaleza insaturada de los ácidos grasos confiere especialización funcional a la cardiolipina, que parece ser necesaria para la función óptima de muchas de las proteínas implicadas en metabolismo energético mitocondrial. Este grado de insaturación es también importante para la síntesis de cardiolipina. El palmitato, ácido graso saturado libre (16:0) encontrado en plasma a altas concentraciones durante la isquemia, se sabe que activa la apoptosis en muchos tipos celulares. Es importante conocer que, la apoptosis inducida por el palmitato en cardiomiocitos neonatales de rata ha sido atribuida a una disminución en el contenido de cardiolipina, que se correlaciona casi estequiométricamente con el grado de liberación del citocromo *c* en el citosol (*Ostrander DB y colbs., 2001*). Estos resultados apoyan la observación de que el palmitato (16:0) incrementa la apoptosis (con la liberación simultánea del citocromo *c*), mientras que el oleato (18:1) promueve la proliferación de las células de cáncer de pecho (*Hardy S y colbs., 2003*). Por tanto, parece que el palmitato estimula el recambio de cardiolipina y disminuye la concentración de ácidos grasos insaturados precursores de la síntesis de cardiolipina, reduciendo de este modo las cantidades totales de este fosfolípido.

En vista de la unión del citocromo *c* a la MMI, parece que las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre la cardiolipina y el citocromo *c* deben practicar una apertura para que el citocromo *c* deje la mitocondria. Al parecer, la permeabilización de la MME es escasa para la liberación del citocromo *c* y la activación de la cascada de caspasas. Se ha publicado que la oxidación de la cardiolipina disminuye su afinidad por el citocromo *c* y, más recientemente, que la modificación oxidativa de la cardiolipina facilita la movilización del citocromo *c* de la MMI (*Ott M, y colbs., 2002*). De acuerdo con estos resultados, se ha hipotetizado que la liberación del citocromo *c* durante la

apoptosis ocurre en un proceso de dos etapas que implica primero la separación de la hemoproteína de la MMI, seguida por la permeabilización de la MME y liberación del citocromo *c* al entorno extramitocondrial. Estos resultados indican que la cardiolipina desempeña un papel importante no sólo en el metabolismo energético mitocondrial sino también en la retención del citocromo *c* dentro del espacio intermembrana.

Por lo tanto, estos resultados sugieren que los ROS facilitan la separación del citocromo *c* de la cardiolipina antes de su liberación al citoplasma a través de poros en la MME formados por proteínas pro-apoptóticas. De hecho, estudios iniciales que utilizaban partículas submitocondriales de corazón de bovinos demostraron que los ROS generados mitocondrialmente disminuyeron el contenido de cardiolipina en la membrana, y que éste era simultáneo a una disminución de la actividad de la citocromo *c* oxidasa (*Paradies G y cols., 2000*). El contenido de cardiolipina de las partículas se podía restaurar con la cardiolipina exógena agregada, pero no con cardiolipina peroxidada. Los estudios de isquemia de miocardio en conejo también han revelado que la producción creciente de ROS conduce a la oxidación y al agotamiento de cardiolipina, combinados con la inhibición de la actividad del complejo IV en mitocondria. Además, el modelo de toxicidad del glutamato en neuronas demostró que el citocromo *c* está liberado en mitocondria de una manera dependiente de ROS (*Manna SK y cols., 1998*), y la explosión de ROS en neuronas privadas de factor de crecimiento muestra que daña la mitocondria causando una pérdida profunda de cardiolipina (*Atlante A y cols., 2000*).

6.- ADRIAMICINA

6.1- Introducción

La doxorubicina es una antraciclina aminoglucósido, aislada por primera vez de cultivos de *Streptomyces peucetius*, y muestra un amplio espectro de actividad antitumoral en tumores sólidos y leucemias. Su eficacia antitumoral se atribuye principalmente a la unión directa a moléculas de ADN. La dosis máxima acumulada de estos fármacos es limitada a 550 mg/m² (*Lefrak E.A. y cols. 1973*) para prevenir la miocardiopatía crónica e irreversible.

Actualmente se conocen más de 500 antraciclinas, tanto de origen natural como sintético. En particular, la adriamicina (o doxorubicina, ADR) es la utilizada en el presente estudio debido a su utilidad clínica como medicamento contra el cáncer.

En general, las antraciclinas muestran una alta afinidad hacia el ADN y ARN, que es explicada mediante unión por intercalación (*Goldman R. y cols., 1978*). Esta intercalación entre las cadenas de ADN no es el único mecanismo de actividad antimitótica. Considerando las propiedades estructurales, fisico-químicas, y bioquímicas llega a ser obvio que las antraciclinas son agentes complejos y que en muchos casos la actividad antitumoral puede estar separada de parte de los efectos tóxicos. Es decir, la cardiotoxicidad y los efectos antitumorales se piensa que se basan en diferentes mecanismos bioquímicos: la toxicidad cardíaca se cree que está causada por la peroxidación lipídica y se puede atenuar por el tocoferol, mientras que la respuesta antitumoral se debe principalmente a la unión al ADN, es perjudicial y no antagonizada por el tocoferol.

El uso clínico de la adriamicina muestra un amplio espectro en el campo de la toxicidad, la más importante es la cardiotoxicidad, pero también PPE (eritrodisestesia palmo-plantar o síndrome mano-pie) es un efecto secundario grave dosis limitante.

En cuanto a los agentes específicos que median estas toxicidades hay varias hipótesis: la antraciclina por sí misma o uno de sus metabolitos, podría ser responsable del daño celular. Además la terapia con ADR está determinada y limitada por los efectos secundarios como toxinas endógenas o la alta concentración de Ca_2^+ liberado. Brevemente, algunos de los mecanismos que explican la actividad antimitótica son:

- (I) *Reducción a semiquinona*: las antraciclinas quinónicas contienen estructuras que potencialmente pueden reducirse “in vivo” y luego autooxidarse para producir peróxido de hidrógeno y otros metabolitos reactivos del oxígeno. Las reacciones de los radicales libres en las que puede participar la ADR son esquemáticamente representados en (**Figura 5**)
- (II) *Unión a la membrana*: la alta afinidad a ciertos lípidos está fuertemente asociada a la peroxidación lipídica y cambios en la estructura de las membranas;

- (III) *Bioalquilación*: a través de la activación metabólica se forma un radical alquilo que es un potente agente alquilante y en consecuencia causa daño al ADN;
- (IV) *Quelación de metales*: la alta afinidad de cationes bi- y trivalentes, los más importantes el hierro (férrico y ferroso) y cobre (II), se piensa que es un paso importante para la reducción de la activación y metabolización de la droga, y aumento en la producción de radicales libres.

En el tejido cardiaco perfundido con adriamicina se ha observado que ésta se acumula en dos sitios celulares distintos: núcleo y mitocondria (Wallace. K.B y cols., 2000). Una prueba de los daños causados por la ADR en mitocondria es el aumento de la cardiotoxicidad. De hecho, los tejidos cardíacos en su fracción mitocondrial alcanzan el 50% del volumen celular total.

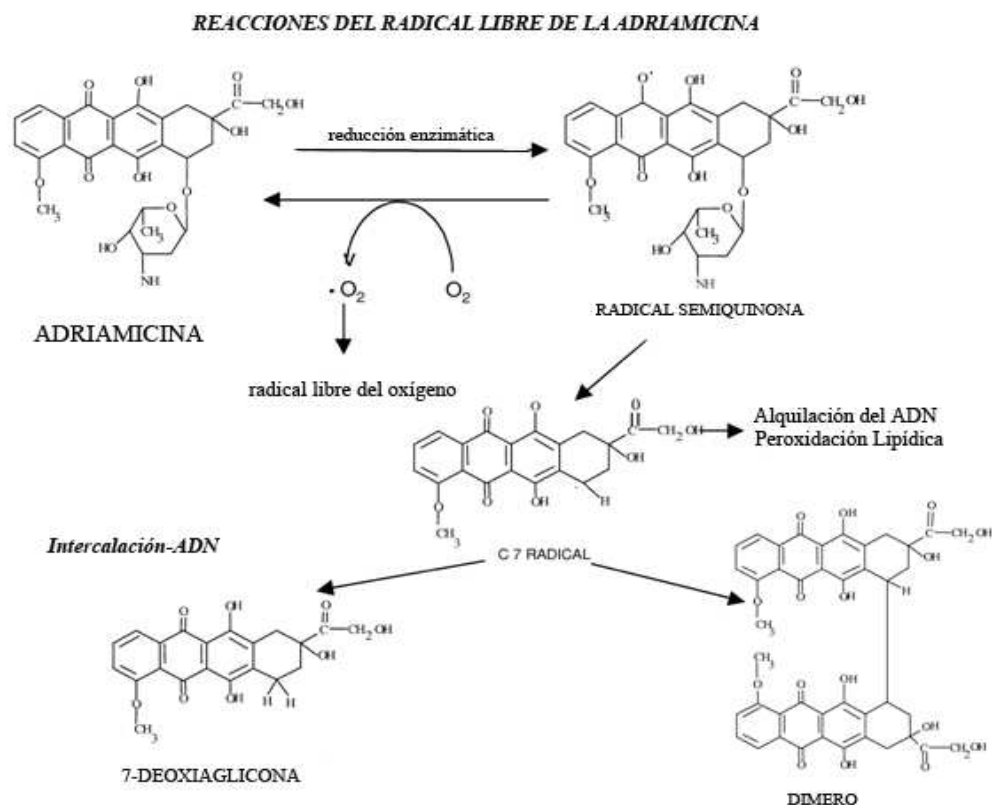


Figura 7: Reacciones del radical libre de la adriamicina

6.2- Efectos de la Adriamicina en mitocondria

6.2.1. – Afinidad a los lípidos

Independientemente de las dianas celulares de la adriamicina, para entrar en la célula ésta debe interactuar con la bicapa lipídica de la membrana celular y posteriormente cruzarla. La capacidad de interactuar con el dominio hidrofílico de la bicapa lipídica apoya la hipótesis de que las antraciclinas difunden a través de las membranas pasivamente. Este hecho tiene dos consecuencias: (i) las membranas pueden ser alteradas por la presencia y la reacción de la ADR, (ii) la ADR por sí misma, puede someterse a reacciones que dan lugar a su modificación estructural y, por tanto, a un cambio de actividad biológica.

La mayoría de los estudios sobre los efectos tóxicos de las antraciclinas apuntan a la membrana mitocondrial, como el blanco principal de la toxicidad celular. Morfológicamente este efecto se manifiesta en el hinchamiento (swelling) y la lisis mitocondrial, rotura de la criptae y cuerpos intramitocondriales densos en Ca_2^+ (Singal PK y colbs., 1986). En la **Tabla 1** encontramos los componentes lipídicos de la membrana mitocondrial interna y externa (Ardail D y colbs., 1990). Cabe señalar que estas organelas celulares son la única estructura que contienen grandes cantidades de cardiolipina, principalmente en la membrana interna. La afinidad de la adriamicina por la cardiolipina es alrededor de 80 veces mayor que por el ácido fosfatídico (Goormaghtigh E y colbs., 1986).

<i>Componentes y Parámetros</i>	<i>Membrana Externa (%)</i>	<i>Membrana Interna (%)</i>
<i>Ácidos Grasos</i>	8.2	7.6
<i>Diacilglicerol</i>	0.3	2.8
<i>Triacilglicerol</i>	0.7	0.6
<i>Colesterol</i>	7.1	2.3
<i>Fosfatidilcolina</i>	40.9	35.1
<i>Esfingomielina</i>	1.8	0.7
<i>Fosfatidilinositol</i>	9.1	5.0
<i>Fosfatidilserina</i>	< 0.1	< 0.1
<i>Fosfatidiletanolamina</i>	26.8	26.5
<i>Cardiolipina</i>	4.0	18.0
<i>Lisofosfatidilcolina</i>	0.4	0.2
<i>Fosfolípidos/Proteína (w/w)</i>	0.5 ± 0.06	0.3 ± 0.02
<i>Proteína/Lípidos (w/w)</i>	1.66 ± 0.05	2.85 ± 0.5
<i>Colesterol/Fosfolípidos (mol/mol)</i>	0.092 ± 0.007	0.025 ± 0.002
<i>Índice de saturación</i>	0.699 ± 0.03	0.368 ± 0.03

Tabla 1. Análisis de la composición lipídica de membrana mitocondrial.

Medidas de fluorescencia muestran que las antraciclinas se unen a los lípidos y a las proteínas que componen las membranas (*Griffin E.A y cols., 1986*).

El acúmulo de cardiolipina debido a la presencia de antraciclinas, podría sin embargo conducir a la formación de bicapas locales no ordenadas dentro de las membranas y, en consecuencia, a cambios en la fluidez y funcionalidad de dichas membranas.

A menudo se ha publicado que las antraciclinas son capaces de inactivar algunas funciones enzimáticas por interacción directa. Sin embargo, sólo en pocos casos esta interacción ha sido demostrada. El mecanismo por el cual la actividad enzimática mitocondrial se inhibe parece ser por unión de las antraciclinas a lípidos que son esenciales para su funcionalidad. En particular, se ha demostrado que la actividad de varias enzimas mitocondriales es dependiente de los lípidos. Es decir, NADH deshidrogenasa, citocromo c oxidasa y citocromo c reductasa requieren ciertas cantidades de cardiolipina para su funcionalidad (*Fry M y cols. 1980; Fry M y cols., 1981*).

6.2.2.- Inducción de Radicales Libres

La hipótesis más investigada de la toxicidad de la ADR es la hipótesis de los radicales libres. A principios de los años 70 fue postulado que los fármacos con estructura quinona pueden producir radicales libres del oxígeno. Hay principalmente dos evidencias importantes que apoyan la validez de la hipótesis radical, por lo menos para la cardiotoxicidad: en primer lugar, la cardiotoxicidad “in vivo” de la adriamicina es disminuida parcialmente por los scavengers de radicales libres, así como por quelantes del hierro. En segundo lugar, los análogos de las antraciclinas tales como iminodaunorubicina 5, que ha demostrado poca cardiotoxicidad, no experimentan un ciclo redox completo, lo que significa que éste no forma el anión de la semiquinona (*Myers CE y colbs., 1976; Lown JW y colbs., 1979; Myers CE y colbs., 1987; Myers CE y colbs., 1979*). Puesto que existe una literatura muy extensa sobre este mecanismo, aquí describiremos la capacidad de las antraciclinas de generar radicales libres en particular en la mitocondria.

Con respecto a la inducción de radicales libres en la mitocondria, un cuadro patológico característico de la adriamicina presenta la rotura de las mitocondrias y de las membranas del retículo sarcoplasmático (*Ferrans VJ, 1978*). Estas roturas es una consecuencia de varios factores, tales como la reducción del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) y la formación del poro de transición de permeabilidad seguido por el hinchamiento de estas organelas. (*Albano E y colbs., 1988; Sakurai K y colbs., 2000*).

Las antraciclinas son recicladas mediante un ciclo redox, principalmente mediado por la actividad enzimática mitocondrial, razón por la cual el daño principal de los radicales libres se presentará en estos orgánulos. Así, la ADR actúa como aceptor alternativo de electrones, compitiendo con los aceptadores naturales, los portadores de la cadena respiratoria mitocondrial. Eso significa que “intercepta” el flujo electrónico y lo conduce hacia su propia reducción. También la adriamicina, provoca una disipación rápida de todos los gradientes transmembrana, incluyendo $\Delta\mu\text{H}^+$.

La hipótesis de los radicales libres no puede explicar la toxicidad total de las antraciclinas. De estudios clínicos se sabe que un uso externo de antioxidantes (vitamina E) o de *scavengers* de radicales no pudieron atenuar toxicidades inducidas por la

doxorubicina, principalmente la cardiomiopatía (*Van-Vleet JF y colbs., 1980*). La disfunción mitocondrial inducida por la doxorubicina es atenuada por el coenzima Q₁₀, un antioxidante con efectos estabilizadores de membrana (*Olson RD y colbs., 1990; Solaini G y colbs. 1987*). A pesar de la mayor capacidad de la doxorubicina de formar radicales libres “in vitro”, la daunomicina es más eficaz en provocar los efectos cardiotóxicos (*Y. Singh y colbs., 1989*). Por otra parte, la toxicidad mitocondrial de las antraciclinas no siempre se correlaciona con su capacidad para generar radicales libres: 4-dimetoxi-DNR produce solo ligeramente más radicales libres que la 4'epiADM, mientras que su toxicidad “in vivo” es mucho más pronunciada (*Praet M y colb. 1993*). La comparación entre los resultados “in vitro” e “in vivo” sin embargo proporciona evidencias de que la producción del radicales libres puede explicar sólo en parte las toxicidades observadas “in vivo” (*Praet M y colbs., 1993*).

6.2.3.- Desordenes de membrana

La unión de la ADR a la membrana da lugar generalmente a un cambio de funciones celulares tales como transducción de la señal, desplazamiento de proteínas y lípidos o la transferencia electrónica (*Sun IL y colbs., 1992*). Estos diversos efectos son todos debidos a un cambio en el orden dentro de la membrana. Las antraciclinas se unen a cualquiera de los lípidos y proteínas de la membrana (*Szwarocka A y colbs., 1996*). La disminución de la fluidez de la membrana inducida por la adriamicina ha sido estudiada por varios años en diversas líneas celulares y/o compartimientos celulares. Una disminución del orden de la membrana, resuelto por resonancia espín electrónica, en las células K562 con respecto a la producción de radicales libres y a la peroxidación lipídica consiguiente que ocurre dentro de las membranas es uno de los mecanismos propuestos (*Marutaka M y colbs., 1994*). También en mitocondria esta disminución de la fluidez de membrana fue demostrada por *Ogura (Ogura R y colbs., 1991)*, con la misma técnica ESR, pero sin dar una hipótesis del mecanismo molecular. Se ha publicado que el colesterol puede modular la localización (*Ferrer-Montiel AV y colbs., 1992*) o la asociación (*Escriba PV y colbs., 1990*) de antraciclinas con vesículas de membrana. *Alegría AE y colaboradores (Alegría AE y colb., 1997)* demostraron que cuanto más alto es el contenido de colesterol, más baja era la incorporación de doxorubicina en las membranas. Es de especial importancia en este contexto observar

que la membrana interna mitocondrial está libre de colesterol. *Bañuelos y colaboradores (Bañuelos S y colbs., 1993)* sostienen que el colesterol compite con las antraciclinas por sitios obligatorios dentro de las regiones hidrofóbicas, puesto que el colesterol, las antraciclinas y sus semiquinonas correspondientes tienen residuos aromáticos voluminosos similares.

6.2.4. Peroxidación Lipídica

Una de las razones principales de la cardiotoxicidad es la peroxidación de los ácidos grasos cardiacos producida por la ADR. *Ya Myers y colaboradores (Myers Ya y colbs., 1977)* publicaron que la peroxidación lipídica y la toxicidad cardiaca en ratones fue reducida por el uso de tocoferol como lipofílico y *scavenger* de radicales (*Myers CE y colbs., 1977*). El tratamiento con tocoferol, sin embargo, no disminuyó la actividad antitumoral de la adriamicina hacia el tumor de ascitis P388, demostrando de nuevo que hay diferentes mecanismos bioquímicos de acción de las antraciclinas.

Una de las razones principales de la toxicidad inducida por la doxorubicina es su reducción unielectrónica a un radical libre semiquinona, principalmente al lado de la NADH deshidrogenasa en las mitocondrias (*Davies KJ y colbs., 1986*). La reacción del radical AQ con oxígeno molecular da lugar a la formación en primer lugar de superóxido y por lo tanto de otros radicales libres del oxígeno, principalmente OH (*Lown JW y colbs., 1982*). Estas especies reactivas del oxígeno (ROS) participan en la peroxidación lipídica de las membranas mitocondriales. Las razones por las que principalmente las membranas mitocondriales están implicadas en la peroxidación lipídica son: (i) la generación de ROS ocurre en la membrana mitocondrial externa y no en otros compartimientos citoplasmáticos celulares; (ii) la membrana interna mitocondrial es particularmente rica en ácidos grasos poliinsaturados, los cuales presentan una mayor susceptibilidad a la oxidación y (iii) la doxorubicina y algunos otros derivados de antraciclinas tienen una alta afinidad por la cardiolipina, lípido que constituye el 18% de la membrana interna mitocondrial (*Nicolay K y colbs., 1984; Goormaghtigh E. y colbs., 1980*). Después de la incubación de mitocondrias de corazón de rata con doxorubicina, la peroxidación lipídica causó cambios en la fluidez de membranas (*M. Praet y colb., 1993*). Estos autores incubaron mitocondrias de corazón de ratones con diversos derivados de antraciclinas en presencia de NADH y

determinaron los índices de peroxidación lipídica por el método del ácido tiobarbitúrico (TBARS). Cuantos más radicales derivados del superóxido eran producidos, más alto era el índice de peroxidación lipídica. Los productos primarios de la peroxidación lipídica son los hidroperóxidos lipídicos. Los hidroperóxidos de la fosfatidilcolina fueron detectados recientemente por quimioluminiscencia (técnica de HPLC) en corazón de ratones administrados con doxorubicina (*Kumakura K y cols., 1997*) demostrando la ocurrencia de peroxidación lipídica inducida por la doxorubicina “in vivo”.

6.2.5. Inhibición enzimática de la cadena de transporte de electrones mitocondrial

Una de las interacciones más específicas entre la adriamicina y la mitocondria puede ser la interacción entre la ADR y las enzimas mitocondriales. Muchos de los efectos secundarios tóxicos podrían ser explicados por la inhibición de las funciones enzimáticas. Actualmente, se conoce muy poco acerca de la interacción directa entre antraciclina y enzimas de la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

El análisis *in vitro* demuestra que la adriamicina y la daunomicina causaron una inhibición dosis-dependiente de la actividad de la citocromo c oxidasa (COX). *Papadopoulou y colaboradores (Papadopoulou LC y cols., 1993)* es, por lo que sabemos, el único que publica una interacción directa de la antraciclina y la enzima. Otros autores ponen de manifiesto que la inactivación observada de la actividad enzimática mitocondrial es debida a la fijación de la antraciclina a los lípidos, principalmente a la cardiolipina, dando por resultado un desorden de la membrana. La interacción entre la cardiolipina con algunas enzimas de la intramembrana es necesaria para su actividad y las antraciclina inhiben estas interacciones lípido-enzima.

Otro mecanismo importante que puede determinar la disfunción de enzimas mitocondriales es la transferencia electrónica entre los complejos de la cadena de transporte de electrones a derivados de la antraciclina que dará lugar por un lado a la interrupción del flujo electrónico a través de la cadena respiratoria; y por otra parte la reducción de la antraciclina que dará lugar a la forma de una semiquinona (AQ) con la formación consiguiente de radicales libres del oxígeno. En mitocondria de corazón los

electrones se desvían de la NADH-deshidrogenasa a la adriamicina (Nohl H y colb., 1983). Esta enzima se asocia al complejo I y cataliza la oxidación del NADH citosólico, transfiriendo electrones del citosol a las mitocondrias (Nohl H, 1987; Schonheit K y colb., 1996). Las mitocondrias de hígado que carecen de esta vía relacionada con NADH no pueden convertir la adriamicina en su radical semiquinona. Este hecho puede, por lo menos parcialmente, explicar la toxicidad del miocardio a la doxorubicina (Gille L y colb., 1997).

Además ha sido demostrado que la producción endógena de superóxido es principalmente debida al escape electrónico (depleción) en el complejo I de la cadena respiratoria hacia el oxígeno molecular (Pitkanen S y colb., 1996; X. Luo y colbs., 1997). La adriamicina causa una inhibición significativa de la actividad del complejo I, pero no de los complejos III y IV (Yen HC y colbs., 1999). Estos autores sugieren que la disminución de la actividad del complejo I puede ser causada por la generación de superóxido por la adriamicina, aunque no se propone ninguna otra hipótesis para explicar el mecanismo molecular.

6.2.6. Inducción de la Apoptosis

La cascada apoptótica se puede iniciar por proteínas que se encuentran limitadas normalmente al espacio intermembranoso mitocondrial, incluyendo el citocromo c y el factor inductor de apoptosis (Zou H y colbs., 1997; Reed JC, 1997). Esta liberación de proteínas se puede determinar por la rotura de la membrana mitocondrial externa, causada por la despolarización (Heiskanen KM y colbs., 1999) o por otro daño químico de la membrana, incluyendo la antraciclina.

La inducción mediada por antraciclinas más específica de la apoptosis es la activación de algunas de las enzimas que pertenecen a la clase de las caspasas. La liberación del citocromo c de las mitocondrias inducido por la ADR determina su unión a un homólogo del CED-4, el Apaf-1, estimulando la activación de la caspasa-9 y quizá de otras seis caspasas (Slee EA y colbs., 1999; Adrain C y colbs., 1999; Hu S y colbs., 1998)

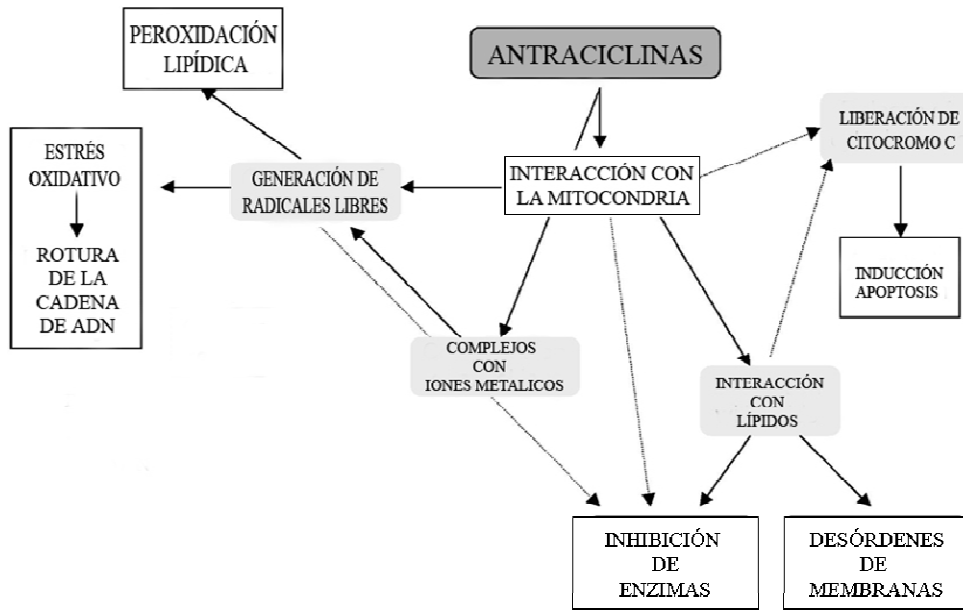


Figura 8. Visión general de los mecanismos moleculares y efectos biológicos de las antraciclinas.

CAPÍTULO III.-MATERIAL Y MÉTODOS

CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1- Productos químicos utilizados

Los reactivos y solventes utilizados en las distintas determinaciones analíticas fueron suministrados por los laboratorios Fluka (St. Louis, MO, USA), Merck (Darmstadt, Alemania), Sigma (St. Louis, MO, USA), Panreac (Barcelona, España), Fisher Scientific (Pittsburg, PA, USA) Boehringer (Manheim, Alemania), Spinreact (Gerona, España), Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), Roche (Basel, Suiza), Amresco (Cleveland, OH, USA), GE Healthcare Bio-Sciences (Piscataway, NJ, USA), Bio-Rad (Hércules, CA, USA) y TaKaRa Bio Inc. (Otsu, Shiga, Japan) siendo todos ellos de la máxima calidad disponible en el mercado. Los patrones para las determinaciones de vitaminas, proteínas y ácidos grasos fueron suministrados por Sigma y Fluka (St. Louis, MO, USA). Los reactivos y solventes orgánicos de calidad HPLC se adquirieron en los laboratorios Merck (Darmstadt, Alemania). Los anticuerpos requeridos para las determinaciones de proteínas, mediante western-blot, fueron suministrados por Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Los aceites de oliva virgen (Aceites ABASA S.A) y de girasol (Koipesol) fueron adquiridos en un supermercado local y el aceite de pescado fue suministrado por la compañía Roche Products Ltd. Los demás componentes empleados en la elaboración de las dietas se compraron a Musal Chemical (Granada, España).

1.2.- Aparatos de uso general

La conservación de las muestras de tejido hepático y cardíaco, así como de las alícuotas obtenidas a partir de las distintas fracciones celulares empleadas posteriormente en las determinaciones analíticas, se llevó a cabo en un congelador de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, modelo REVCO (VLT-1786-5-VUA) (Revco Scientific, USA). Los tampones y en general las soluciones que debían mantenerse refrigeradas, se guardaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un frigorífico modelo LIEBHERR (Ochsenhausen, Alemania). La pesada de las muestras y de reactivos sólidos se realizó mediante una balanza de precisión SCALTEC, modelo SBA-32 (Denver Instruments, Weda, Holanda). El pH de las soluciones tampón se determinó

con un electrodo combinado de pH (CRISON Instruments, S.A., Alella, Barcelona). Previo a cada medida, se realizó un calibrado de dicho electrodo, para lo cual se utilizaron dos soluciones de pH conocido (4.00 y 7.02) elaboradas también por CRISON. La agitación de los tubos empleados en las distintas técnicas analíticas se realizó con un agitador manual modelo STUART SCIENTIFIC, AUTOVORTEX MIXER (Jepson Bolton's products, Reino Unido). Las soluciones reactivas se disolvieron por agitación en un magnetoagitador SELECTA, modelo Agimatic-E (Abrera, Barcelona, España). La manipulación y homogenización de las muestras fueron llevadas a cabo bajo condiciones adecuadas, para lo cual se conservaron en hielo picado generado en una picadora específica modelo SCOTSMAN, AF-10 (Milan, Italia). Para los ensayos analíticos se utilizaron pipetas automáticas BIOHIT (Biohit Proline Pipette, Helsinki, Finlandia). Tanto las muestras como la solución madre de cada una de las curvas patrón realizadas, se adicionaron con microjeringas Hamilton (Bonaduz, Switzerland). La incubación requerida en algunas determinaciones analíticas se llevó a cabo en un baño de capacidad 12 litros y máximo de temperatura 110 °C, MEMMERT (Schwabach, Alemania). Las determinaciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en el espectrofotómetro Perkin Elmer UV-Vis Lambda 16 y en el UV-Vis Lambda 40. Ambos aparatos están equipados con un paquete de software diseñado para el análisis espectrofotométrico. Los aparatos de uso específico empleados se detallarán en cada una de las determinaciones analíticas realizadas.

1.3.- Animales

El estudio se llevó a cabo con un total de 80 ratas Wistar machos (*Rattus norvegicus*), suministrados por el Servicio de Producción Animal de la Universidad de Granada, con un peso inicial de 80-90 g y divididas en 12 grupos experimentales. Desde el destete se alimentaron con dietas experimentales, manteniéndose en jaulas de 4 unidades donde se cuidaron las condiciones de temperatura ($20^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$) y humedad relativa (60-70%), con un fotoperíodo de 12 horas de luz (8.00-20.00h) y 12 horas de oscuridad (20.00-8.00h). El agua y dieta les fue administrada "ad libitum". Los animales fueron sometidos a un control de peso semanal. El cuidado y mantenimiento de se realizó en las instalaciones del Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Granada.

2. MÉTODOS

2.1.- Dietas

Durante las 13 semanas (91 días) de duración del estudio, los animales fueron alimentados con una dieta semisintética e isoenergética con un 8% en peso como grasa, que cubría todos los requerimientos energéticos y nutricionales de las ratas. La dieta empleada fue la AIN-93 G y M, descrita por *Reeves P.G. y col. (1993 y 1997)*, la cual está indicada para el crecimiento, embarazo, lactancia y mantenimiento de las ratas.

Esta dieta se administró a nueve de los doce grupos experimentales, ya que al grupo control se le dio pienso comercial (Harlam Ibérica, Barcelona). La AIN-93G se dio desde el destete hasta los 39 días de vida. Mientras que la AIN-93M, se suministró durante 52 días. En las **Tablas 1, 2, 3 y 4** se muestra su composición y la de los correctores utilizados.

Componentes	AIN-93G (%)	AIN93-M (%)
Almidón	38.7	42.6
Caseína	20	14
Dextrosa	13.2	15.5
Sacarosa	10	10
Aceite*	8 *	8 *
Fibra(Celulosa)	5	5
Mezcla mineral	3.5	3.5
Mezcla de vitaminas	1	1
L-cisteína	0.3	0.18
Metionina		
Bitartrato de colina	0.25	0.25

Tabla 2: Componentes de la dieta (*) La grasa varía para cada grupo (aceite de oliva virgen, aceite de girasol y aceite de pescado)

Componentes Vitamínicos	AIN-93G(%)	AIN93-M(%)
Acido Nicotínico	0,3	0,3
Pantotenato Ca	0,16	0,16
Piridoxina-HCl	0,07	0,07
Tiamina-HCl	0,06	0,06
Riboflavina	0,06	0,06
Acido Fólico	0,02	0,02
D-Biotina	0,002	0,002
Vitamina K	0,0075	0,0075
Vitamina B-12	0,25	0,25
Vitamina A	0,08	0,08
Vitamina D	0,025	0,025
Vitamina E	1,5	1,5
Sacarosa	97,4655	97,4655

Tabla 3: Composición de los correctores vitamínicos

COMPONENTES	AIN-93G(%)	AIN93-M(%)
Fosfato calcico		
Carbonato calcico	35,7	35,7
Fosfato potasico	19,6	25
Citrato potasico	7,078	2,8
Cloruro sodico	7,4	7,4
Sulfato potasico	4,66	4,66
Oxido de manganesio	2,4	2,4
Citrato ferrico	0,606	0,606
Carbonato de zinc	0,165	0,165
Carbonato de manganesio	0,063	0,063
Carbonato cuprico	0,03	0,03
Iodato potasico	0,001	0,001
Selenato sodico	0,001025	0,001025
Paramolibdato amonico	0,000795	0,000795
sacarosa en polvo	22,1026	20,9806

Tabla 4: Composición de los correctores minerales

PIENSO COMPLETO	
Análisis (%)	Aditivos (Kg)
Proteína bruta.....15,6	Vitamina A..... 7.500 UI
Materias grasas brutas.....2,8	Vitamina D3..... 1.500 UI
Celulosa bruta.....4,8	Vitamina E..... 15 mg
Cenizas brutas.....2,8	Sulfato cúprico Pentahidratado..... 14,7 mg
<p>Composición: granos de cereales, productos y subproductos de granos de cereales, productos y subproductos de semillas oleaginosas, productos de panadería y fabricación de pastas alimenticias, minerales, semillas oleaginosas, productos de pescado.</p>	

Tabla 5: Composición del pienso de la dieta

La variación existente entre los grupos experimentales viene dada por el tipo de grasa de la dieta. Las dietas se prepararon semanalmente, y para su elaboración se contó con un molinillo industrial eléctrico. Los correctores tanto mineral como vitamínico se prepararon por separado con mortero y pistilo y se guardaron en un lugar fresco y al abrigo de la luz.

Para la elaboración de la dieta se pesaron los componentes de la dieta base y a continuación se añadió la cantidad complementaria de correctores vitamínico y mineral. El último componente en añadir fue el aceite. Con todo esto se preparó una mezcla que se tamizó en el molinillo. La dieta completa se guardó protegida de la luz a 4°C, con el fin de evitar enranciamientos y contaminaciones ambientales.

En la **Tabla 6** se muestra la composición en ácidos grasos de los aceites empleados en el estudio.

ÁCIDOS GRASOS	ACEITE DE OLIVA VIRGEN	ACEITE DE GIRASOL	ACEITE DE PESCADO
C16:0	8,3	6,4	17,1
C16:1n9	1,1	0,1	9,6
C18:0	3,2	4,7	2,7
C18:1n9	77,7	24,2	15,1
C18:2n6	3,2	62,8	2,8
EPA	0,2	0,1	18,6
22:6n3	0,0	0,0	10,5
Sat	12,6	11,5	30,5
MUFA	83,7	24,4	30,1
n-6 PUFA	3,3	63,7	8,2
n-3 PUFA	0,4	0,4	31,3
PUFA>n-6	0,1	0,9	15,5
PUFA>n-3	0,2	0,2	29,1
PUFA	3,7	64,1	39,4
MUFA/PUFA	22,9	0,4	0,8
n-6/n-3	5,5	171,0	0,3
Ole/Lino	24,1	0,4	5,4

Tabla 6: Composición en ácidos grasos de los aceites

2.2.- Animales

Los animales del estudio fueron divididos al azar en los siguientes grupos experimentales:

- **Control:** Grupo que consumía pienso comercial (C)
- **Control + ADR 2.5:** Grupo que consumía pienso comercial y que estuvo sometido de forma exógena a la inducción de apoptosis mediante la administración intraperitoneal de adriamicina, para una dosis de 2.5 mg/kg/día. (C_{2.5})
- **Control + ADR 10:** Grupo que consumía pienso comercial y que estuvo sometido de forma exógena a la inducción de apoptosis mediante la administración intraperitoneal de adriamicina, para una dosis de 10 mg/kg/día. (C₁₀)
- **Oliva Virgen:** Grupo que consumía aceite de oliva virgen como única fuente grasa y que no estuvo sometido a la inducción de apoptosis. (O)
- **Oliva Virgen + ADR 2.5:** Grupo que consumía aceite de oliva virgen como única fuente grasa y que estuvo sometido de forma exógena a la inducción de apoptosis

mediante la administración intraperitoneal de adriamicina, para una dosis de 2.5 mg/kg/día. (O_{2.5})

- **Oliva Virgen + ADR 10:** Grupo que consumía aceite de oliva virgen como única fuente grasa y que estuvo sometido de forma exógena a la inducción de apoptosis mediante la administración intraperitoneal de adriamicina, para una dosis de 10 mg/kg/día. (O₁₀)
- **Girasol:** Grupo que consumía aceite de girasol como única fuente grasa y que no estuvo sometido a la inducción de apoptosis. (G)
- **Girasol + ADR 2.5:** Grupo que consumía aceite de girasol como única fuente grasa y que estuvo sometido de forma exógena a la inducción de apoptosis mediante la administración intraperitoneal de adriamicina, para una dosis de 2.5 mg/kg/día. (G_{2.5})
- **Girasol + ADR 10:** Grupo que consumía aceite de girasol como única fuente grasa y que estuvo sometido de forma exógena a la inducción de apoptosis mediante la administración intraperitoneal de adriamicina, para una dosis de 10 mg/kg/día. (G₁₀)
- **Pescado:** Grupo que consumía aceite de pescado como única fuente grasa y que no estuvo sometido a la inducción de apoptosis. (P)
- **Pescado + ADR 2.5:** Grupo que consumía aceite de pescado como única fuente grasa y que estuvo sometido de forma exógena a la inducción de apoptosis mediante la administración intraperitoneal de adriamicina, para una dosis de 2.5 mg/kg/día. (P_{2.5})
- **Pescado + ADR 10:** Grupo que consumía aceite de pescado como única fuente grasa y que estuvo sometido de forma exógena a la inducción de apoptosis mediante la administración intraperitoneal de adriamicina, para una dosis de 10 mg/kg/día. (P₁₀)

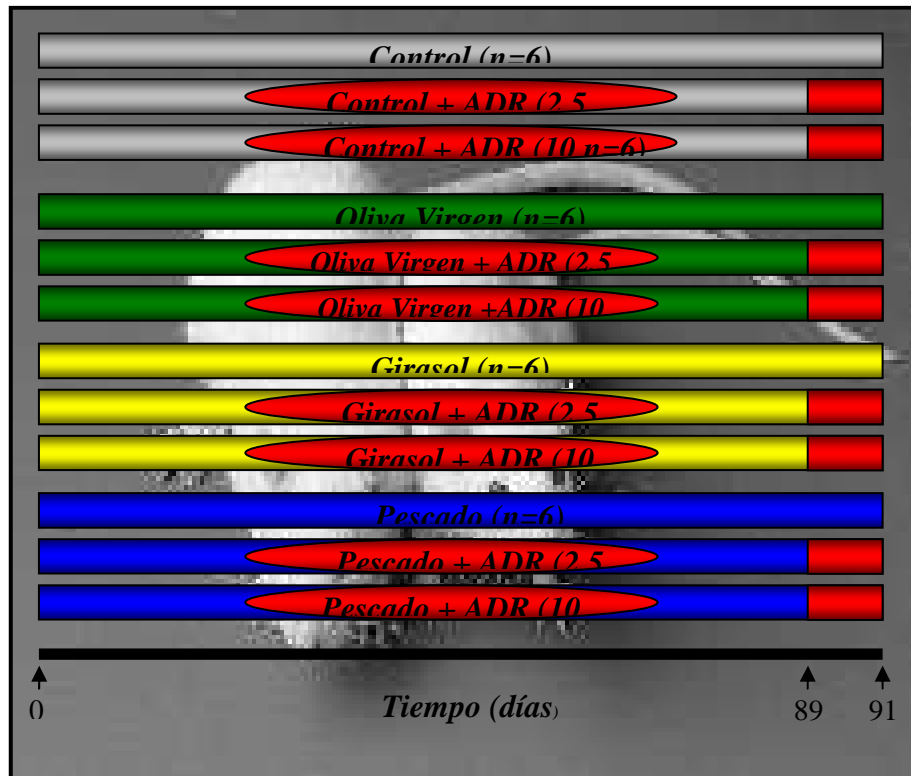


Figura 9: Diseño experimental del estudio

Los grupos experimentales sin adriamicina se les alimentó con la dieta correspondiente durante 13 semanas (91 días), al final de cuyo periodo se les sacrificó. Los grupos experimentales con adriamicina se les alimentó igual, aunque durante los dos días previos al sacrificio se les administró una dosis intraperitoneal de adriamicina, a primera hora de la mañana. Las dosis de adriamicina utilizadas fueron de 2.5 mg/kg/día y 10 mg/kg/día y ésta fue suministrada por Sigma.

2.3.- Sacrificio de los animales y obtención del hígado

A las 13 semanas los animales fueron sacrificados, por desnucación cervical y posterior decapitación por guillotina. Posteriormente se procedió a la obtención del hígado, órgano objeto de estudio, el cual fue lavado en suero fisiológico, y posteriormente secado, pesado y guardado protegido de la luz y en hielo picado. Previa eliminación de tejido graso y restos vasculares, fue troceado y pesado de nuevo. Fue procesado el mismo día de la extracción. Algunas fracciones de hígado necesarias para biología molecular se pasaron por nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C .

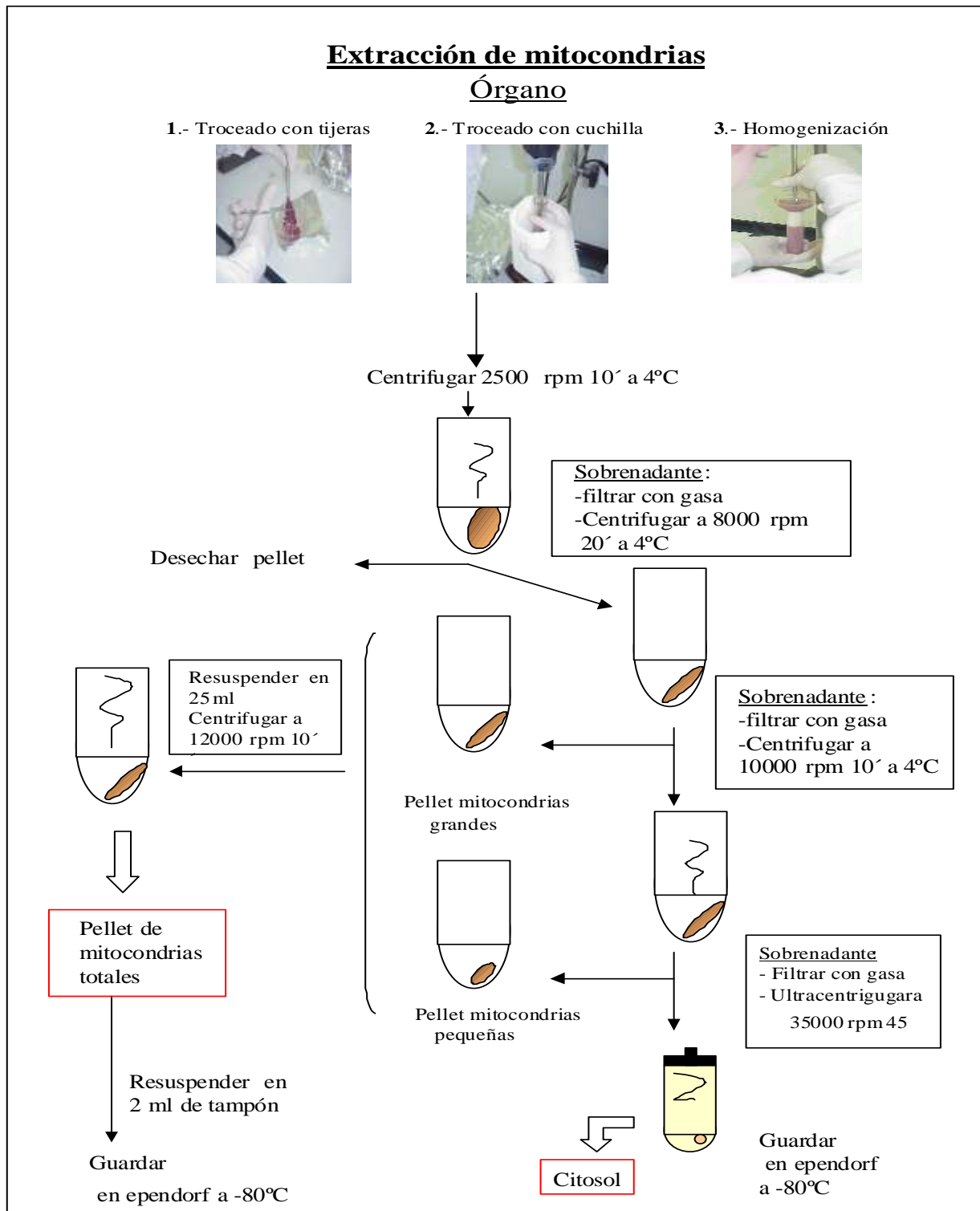


Figura 10: Sacrificio por guillotina y obtención del hígado del animal.

2.4.- Procesamiento del hígado y obtención de las distintas fracciones celulares

El método utilizado para la obtención de mitocondrias fue descrito por *Fleischer y col. (1979)*. El hígado se troceó y se resuspendió en 25 ml de tampón sacarosa-albúmina (sacarosa 0,32M, Tris 10mM, EDTA- Na_2 1mM y Albúmina 1%). Posteriormente se pasó por una *cuchilla automática* modelo PT 10-35 Polytron Kinematica AG, (Lucerna, Suiza) para un mejor fraccionamiento del mismo. Finalmente se homogenizó en un homogenizador mecánico, constituido con pistilo de teflón Heildolf RZR1, (Colonia, Alemania) y póter -Eveljheim de vidrio (AFORA, España), tras lo cual fue centrifugado a 2500 rpm durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada Beckman J-21, con un rotor JA-20 a 4°C. El pellet se eliminó y el sobrenadante obtenido se filtró con una gasa para una mejor eliminación de la grasa y restos de tejido. Este sobrenadante se volvió a centrifugar a 8000 rpm durante 20 minutos, tras lo cual el precipitado resultante, que ya se trata de mitocondrias, se conservó a 4°C en un baño de hielo picado y en oscuridad. El sobrenadante obtenido en esta última centrifugación, fue pasado a otro tubo y centrifugado a 10000 rpm durante 10 minutos; en esta centrifugación el sobrenadante se mantuvo en hielo picado y en oscuridad, mientras que el pellet fue unido al pellet anterior, resuspendiéndose en 25 ml de tampón sacarosa para las mitocondrias hepáticas. El pellet obtenido representa la fracción mitocondrial, la cual se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos.

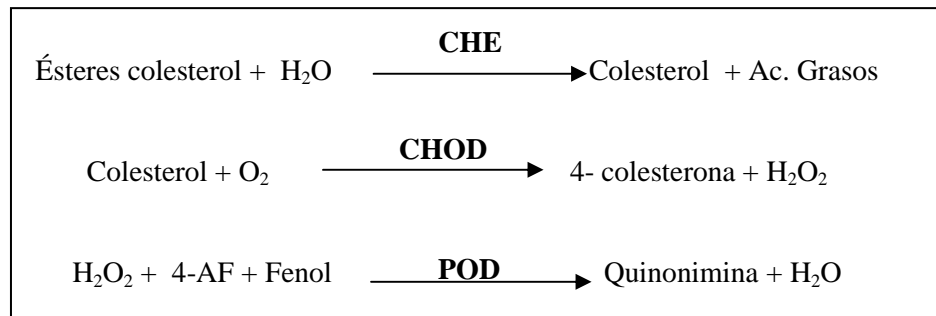
El pellet obtenido de esta última centrifugación fue resuspendido en 2 ml de tampón sacarosa, y se repartió en viales eppendorf que fueron almacenados a -80°C hasta su análisis. El sobrenadante obtenido de la centrífuga a 10.000 rpm. consiste en la fracción citosólica, está fracción también se repartió en viales eppendorf que fueron almacenados a -80°C hasta su estudio.



2.5.- Determinaciones en Plasma

2.5.1.- Determinación de Colesterol total plasmático

El colesterol en plasma se determino mediante un kit comercial de Spinreact (Barcelona, España), basado en reacciones enzimáticas-colorimétricas (CHOD-PAP) según el método descrito por *Richmond et al (1972)* y *Fasce et al (1982)*:



CHE: *colesterol esterasa*; CHOD: *colesterol oxidasa*; POD: *peroxidasa*

Primeramente, se disolvió el contenido de enzimas (peroxidasa, colesterol esterasa, colesterol oxidasa y 4 aminoantipirina) con 20 ml de tampón. La solución reactiva estable 4 meses en nevera o 40 días a temperatura ambiente se protegió de la luz.

Para dicha determinación en plasma se prepararon las muestras, el blanco y un estándar. Para las muestras se puso (2,5 µl de muestra+50 µl de reactivo), para el blanco 50 µl de reactivo y para el estándar (2,5 µl de un estándar de colesterol + 50 µl de reactivo). Esto se mezcló y se determinó la absorbancia por espectrofotometría a una longitud de onda de 505 nm tras una incubación en estufa a 37 °C durante 5 minutos, empleando cubetas de 1 cm de espesor. El equipo se ajustó a cero con el blanco de reactivos.

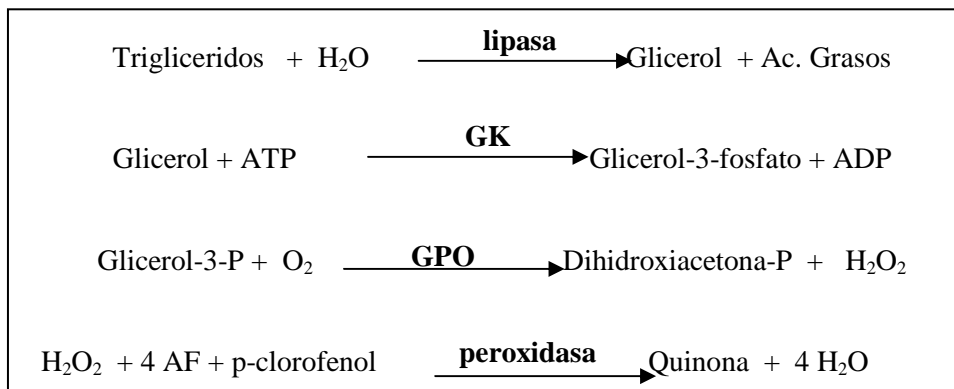
El cálculo de dicha concentración se determinó con la siguiente formula:

$$(D.O \text{ muestra} / D.O \text{ estándar}) \times \text{concentración del estándar de colesterol (200 mg/dL)}$$

mg/dL x 0.0258 = mmol/ L (SI)

2.5.2.- Determinación de Triglicéridos plasmáticos

La concentración de triglicéridos en plasma se determinó mediante un kit comercial, test enzimático-colorimétrico (GPO-PAP). Este método descrito por *Pestaner et al* (1975), consiste en la hidrólisis enzimática de los triglicéridos a glicerol el cual mediante la glicerol kinasa y la glicerol-P-oxidasa, libera peróxido de hidrogeno que se valora mediante la reacción de Trinder, de acuerdo a las siguientes reacciones:



GK: glicerol quinasa; GPO: glicerol fosfato oxidasa; AF: 4-aminofenazona

La cantidad formada de quinona, es proporcional a la concentración de triglicéridos presente en la muestra. La metodología a seguir consiste primeramente en disolver un vial con enzimas (lipoproteinlipasa, glicerol kinasa, glicerol-P-oxidasa, peroxidasa, 4-aminofenazona,ATP) en 20 ml de tampón. Esta mezcla de reactivos es estable 6 semanas a 2-8°C o una semana a 15-25°C.

Para dicha determinación se prepararon las muestras, el blanco y un estándar. En las muestras se pusieron (2 µl de muestra + 200 µl de reactivo), para el blanco 200 µl de reactivo y para el estándar (2 µl de un estándar de triglicéridos + 200 µl de reactivo). Esto se mezclo y se incubo 5 minutos a 37°C. Posteriormente la densidad óptica se midió por espectrofotométria a 505 nm, frente al blanco de reactivo.

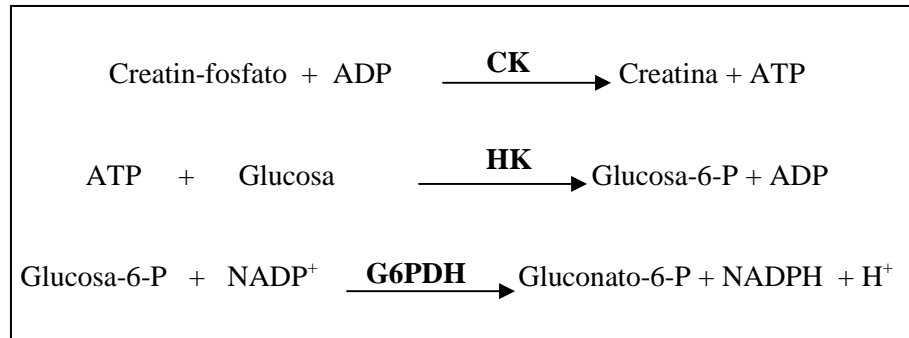
El cálculo de dicha concentración se determinó con la siguiente formula:

(D.O muestra / D.O estándar) x concentración del estándar de triglicéridos (200 mg/dL)

mg/dL x 0.0113 = mmol/ L (SI)

2.5.3.- Determinación de Creatín Quinasa plasmática

La concentración de creatin-quinasa (CK-NAC) en plasma se determinó mediante un test cinético descrito por *Szasz et al.* (1976), después de la activación mediante N-acetilcisteína. El fundamento del método, se basa:



La oxidación de NADP⁺ a NADPH es directamente proporcional a la actividad de CK. Para dicha determinación se realiza un semimicrotest. Primeramente se disuelve un comprimido que contiene (NADP⁺, ADP, AMP, diadenosin-5-P, hexoquinasa, G-6-PDH, N-acetilcisteína, creatin-fosfato) en 2,5 ml de tampón. Este monoreactivo es estable 24 horas a 15-25°C o 5 días a 2-8°C. Para la medida de creatín quinasa se pusieron en eppendorf 62,5 µl de monoreactivo y 2,5 µl de muestra. El contenido de los eppendorf se mezcló y tras incubarlo 2 minutos se tomó la lectura en espectrofotómetro.

También se tomó la lectura a los 5 minutos de haber mezclado. Dichas lecturas se realizaron en espectrofotómetro frente al aire a una longitud de onda de 340 nm. Para el cálculo de dicha concentración se determinó el valor medio de los incrementos de extinción por minuto ($\Delta E/\text{min}$), teniendo en cuenta que dicha determinación se realizó entre 25 y 30 °C:

$$\Delta E/\text{min} \times 4127 = \text{U/L}$$

2.6.- Determinaciones en mitocondrias de hígado

2.6.1.- Determinación cuantitativa de proteínas en mitocondrias hepáticas

La cuantificación del contenido proteico de las distintas fracciones celulares, ha sido realizado utilizando el método de Lowry y colb., (1951).

Se basa en dos reacciones complementarias:

- Biuret; característica de grupos NH_3 que da color violeta.
- Folin; propia de grupos fenólicos con OH reductores que da color azul.

Los reactivos utilizados fueron una solución de sacarosa pH 7, reactivo Biuret extemporáneo (compuesto por Solución A: CO_3NA_2 al 2% en una solución de NaOH 0.1 N y solución B: $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 5% y tartrato sódico al 1%, mezcladas ambas en proporción 50/1) y reactivo Folin comercial, diluido a la mitad con agua bidestilada.

Se tomaron tubos de ensayo (dos para cada muestra ya que se hacen por duplicado), y se añadieron 10 μl de muestra de mitocondrias de hígado. Estos volúmenes se completan hasta 1ml con agua bidestilada o tampón sacarosa. A todo esto se adicionan 5 ml de reactivo de Biuret, se agita y se esperan 15 minutos. Posteriormente se adicionan 0.5 ml de reactivo de Folin, se agita y se esperan 20 minutos, manteniendo los tubos en oscuridad. La reacción que se produce se leyó a una absorbancia de 640 nm. La densidad óptica de las muestras se determinó mediante el empleo de un espectrofotómetro Perkin Elmer UV-VIS Lambda-16 (Norwalk, Conneticut, USA) con un software diseñado para el análisis espectrofotométrico UV-Winlab.

La concentración en proteínas se calculó siguiendo la ecuación de Lambert-Beer con los datos de la curva patrón realizada con albúmina sérica bovina (Sigma, St Louis, MO, USA) de 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

2.6.2.- Determinación de Sustancias Reactivas del Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Se ha empleado esta técnica como aproximación al contenido en malondialdehído (MDA) de las membranas mitocondriales (*Orrenius, S. y colaboradores. 1977*). Es una de las técnicas más empleadas y por eso, independientemente de su baja especificidad, ha sido empleada. Esta técnica se basa en la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con el MDA para dar lugar a un pigmento de color rosa. Consiste en añadir a 100 μl de muestra 0,75 ml de TBA al 8% y 0,75 ml de ácido acético al 20% en agua. Se incuba durante 15 minutos a 100°C, se centrifuga durante 15 minutos a 2500 xg para que precipiten las proteínas (por acción del acético) y se lee la absorbancia a 532 nm.

2.6.3.- Cuantificación del nivel de Hidroperóxidos

Para la cuantificación de hidroperóxidos en mitocondrias se ha realizado la técnica de *Jiang y cols.*, (1992) con ligeras modificaciones. La técnica está basada en la rápida formación de hidroperóxidos mediada por la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} bajo condiciones ácidas. El Fe^{3+} forma un cromóforo con el xilenol orange que absorbe a 560 nm. Esta técnica se utilizó originariamente para lipoproteínas y ha sido adaptada a membranas biológicas mitocondriales.

Se emplea el reactivo de Fox, el cual está compuesto por ácido sulfúrico 250 nM, BHT, xilenol orange, amoniosulfato amónico ferroso y metanol. El reactivo se protege de la luz, almacenándose en una botella opaca.

La muestra y el AAPH (20 μ l) (2,2-azobis-aminopropano), compuesto hidrosoluble que genera radicales libres a una velocidad constante, se incuban durante 30 minutos a 37°C al cabo de los cuales se añade el FOX y tras 60 minutos se lee a 560 nm.

La concentración se calcula realizando una curva patrón a partir de una disolución de n-butyl hidroperóxido e interpolando las densidades ópticas medidas en ella.

2.6.4.- Swelling Mitochondrial

El método empleado para estudiar el swelling mitocondrial se basa en la monitorización continua en espectrofotómetro del descenso de densidad óptica de una preparación de mitocondrias frescas a 540nm durante una hora o más, según *K. Sakurai y cols.* (2000).

Para cada muestra, se tomó la cantidad de 1 mg de proteína mitocondrial. También se puso 12.5 μ l de hidroperóxido de cumeno 0.5 mM y se completó hasta un volumen final de 2.850 ml con tampón sacarosa (0.25 M de sacarosa y 10 mM Tris-HCl) pH 7.4. Seguidamente se incubaron durante 10 minutos a 37°C. Trascorrido este tiempo y antes de monitorizar las lecturas en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV-Vis Lambda 40, se adiciono a las muestras 150 μ l de succinato 5 mM, y se preincubo a 37 °C durante 5 minutos. Las lecturas se tomaron durante 30 minutos a 540 nm.

2.6.5.- Medida del Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi$)

El método seguido para determinar el potencial de membrana mitocondrial fue descrito por *K. Sakurai y colb. (2000)*, bajo condiciones experimentales similares a las del swelling, aunque aquí se utilizó 0.2 mg de proteína mitocondrial.

El $\Delta\Psi$ se midió incubando las preparaciones mitocondriales durante 10 minutos a 37°C con tampón sacarosa-Tris y con succinato 5mM, y durante 5 minutos a 37°C con Rodamina 123 0.2 μ M. Posteriormente se midió el cambio de fluorescencia en un fluorímetro Luminescence Spectrometer LS50B (Perkin Elmer, U.K) con control de temperatura y agitación, a una longitud de excitación de 420-520 nm y una de emisión de 520-650 nm. Las medidas fueron tomadas de forma continua con agitación y temperatura constante. La determinación del Ψ_{mt} se realizó a través de la intensidad de fluorescencia de las muestras.

2.6.6.- Medida de la Actividad y Cantidad de la ATP sintasa (Complejo V)

Para la medida de la cantidad y actividad del Complejo V (ATP Sintasa; EC 3.6.3.14) se ha usado un kit de microplacas (MitoSciences, Eugene, OR, USA). Para ello, el complejo V es inmunocapturado dentro de los pocillos. La enzima funciona hidrolizando el ATP a ADP y fosfato. Esta producción de ADP está acoplada a la oxidación de NADH a NAD⁺, el cual es monitorizado como una disminución en la absorbancia a 340nm (*Lotscher y colbs., 1984*). La actividad de hidrólisis de ATP y la consiguiente reacción acoplada es inhibida por la oligomicina (inhibidor específico del complejo V). La reacción global es la siguiente:

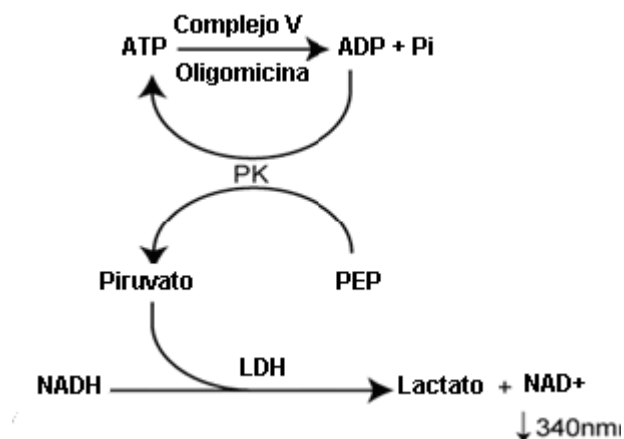


Figura 11: Reacción ATP sintasa

Posteriormente, en los mismos pocillos, se midió la cantidad de enzima por adición de un anticuerpo específico del Complejo V conjugado con fosfatasa alcalina. La fosfatasa cambia el sustrato de incoloro a amarillo (405nm). Esta reacción es tiempo-dependiente de manera proporcional a la cantidad de proteína capturada en el pocillo.

Esta prueba es diseñada para el uso de mitocondria purificada. La muestra de mitocondria homogeneizada fue congelada, descongelada y convertida en pellet, y entonces resuspendida hasta una dilución 5.5mg/ml proteína. Las proteínas han sido extraídas con detergente y marcadas dentro de un rango lineal.

El microplacas utilizado es Sinergy HT (Bio-Tek Instrument, Vermont, USA). El software utilizado es Gen 5.

2.6.7.- Perfil Lipídico de las Membranas Mitocondriales

Para la determinación de los ácidos grasos se ha empleado la técnica de *Lepage y Roy (1986)*, mediante la cual se puede hacer en un solo paso la metilación y transesterificación de las muestras. Se parte de 100 µl de muestra a la que se adicionan 100 µl de estándar interno (0.4 mg/ml), 2 ml de una mezcla de metanol:benceno (4:1) y 200 µl de cloruro de acetilo, se agita con cuidado, se cierran los tubos y se incuban durante una hora en un baño a 100°C. Al cabo de este tiempo se sacan los tubos y se dejan enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente. A continuación se adicionan 2 ml de una disolución de carbonato potásico al 6% que tiene por objeto parar la reacción y neutralizarla; se centrifuga durante 15 minutos a 2900 rpm con el fin de separar las fases. La fase superior bencénica es retirada con pipeta pasteur capilarizada y conservada con la fracción lipídica. Posteriormente se evapora bajo corriente de nitrógeno y los lípidos que quedan en el fondo del tubo son resuspendidos en 50 µl de hexano para ser analizados en el cromatógrafo de gases modelo HP-5890 Series II (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA), equipado con un detector de ionización de llama. El método tiene una duración de 40 minutos y la siguiente rampa de temperatura: 5 minutos a 160°C; 6 °C/min hasta alcanzar los 195°C; 4 °C/min hasta los 220°C; 2 °C/min hasta los 230°C; 12 minutos a 230°C y 14 °C/min hasta 160°C. Se empleó una columna SPTM 2330 F.S (Supelco Inc. Bellefonte, Palo Alto, CA, USA) de 60 m de longitud, 32 mm de i.d. y un grosor de 20 mm; y un inyector automático Hewlet Packard 3393 A.

Los resultados han sido expresados como porcentaje del total de ácidos grasos detectados en el cromatograma. En la **figura 12** se muestra un cromatograma típico de los obtenidos con nuestras muestras.

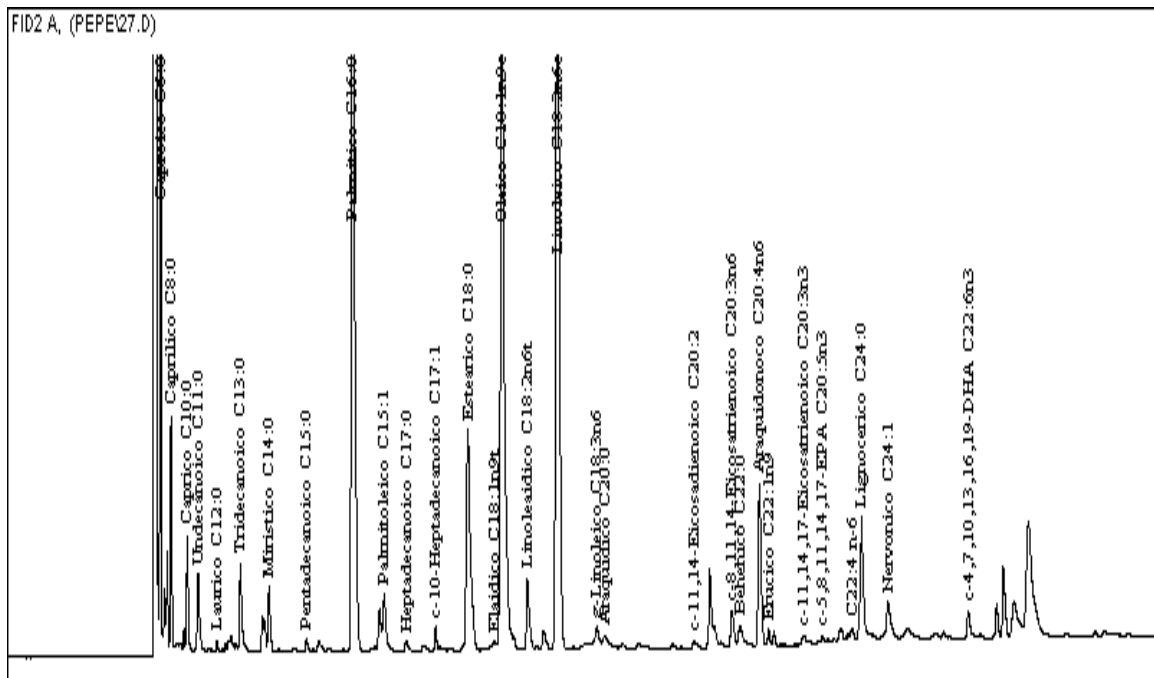


Figura 12: Cromatograma típico de una muestra de membrana mitocondrial hepática.

2.6.8.- Extracción y Determinación de Ubiquinonas y Vitamina E por HPLC en mitocondria.

Basándonos en el método de *Kroger (1978)*, las ubiquinonas Q₉ y Q₁₀ y el α -tocoferol de la membrana mitocondrial fueron extraídos utilizando una mezcla de metanol: éter de petróleo 60:40.

Para la extracción previa, partimos de un volumen de muestra de 1 mg de proteína de mitocondrias hepáticas y se llevó a 0.5 ml de agua bidestilada, adicionando después 2.5 ml de la mezcla metanol: éter de petróleo (60:40). La mezcla se agitó vigorosamente durante 15 s en vortex y centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C en una centrífuga de brazos oscilantes Beckman GS-6R (Beckman, Fullerton, CA, USA) con el fin de que las fases quedaran perfectamente definidas.

La fase etérea superior fue retirada con una pipeta capilarizada y se pasó a otro tubo que se guardó a 4°C; al tubo primitivo se le adicionó 1 ml de éter de petróleo, volviéndose a agitar y centrifugar. La fase etérea extraída en esta segunda centrifugación se mezcló con la anterior. Una vez unidas las dos extracciones se cerraron los tubos perfectamente y se guardaron a -20°C hasta su análisis.

Todas las extracciones de un mismo grupo se realizaron el mismo día utilizando siempre hielo picado y preservando de la luz en cada paso. El día de la analítica se secaron bajo corriente de nitrógeno y se resuspendieron en 200 µl de la fase móvil para determinación por HPLC, pinchándose 175 µl de esta resuspensión en el HPLC y consiguiéndose así la separación cromatográfica.

La determinación se realizó mediante separación cromatográfica líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa, siguiendo el método de *Battino y col. (2001)*, utilizando una columna Spherisorb S5 ODS I de 18 x 0.46 cm con una precolumna de igual relleno. El instrumento utilizado fue un Beckman Gold System, equipado con un detector Diode array 168 y un horno de columna (Beckman) para garantizar que todos los análisis se realizan a 22°C.

La fase móvil empleada fue una mezcla de etanol para HPLC y agua bidestilada en proporción 97:3, siendo la velocidad de flujo de 1ml/minuto y la duración del método de 25 minutos. También se utilizó un inyector automático WatersTM 717 plus Autosampler (GenTech Scientific, NY, USA).

Las concentraciones fueron determinadas mediante una curva patrón realizada a partir de estándares puros de cada compuesto mediante la lectura en espectrofotómetro de las diluciones de esos patrones en solución etanólica y su posterior inyección de forma seriada en el HPLC. De este modo se construyeron curvas patrón de las respectivas moléculas, pinchando a concentraciones crecientes.

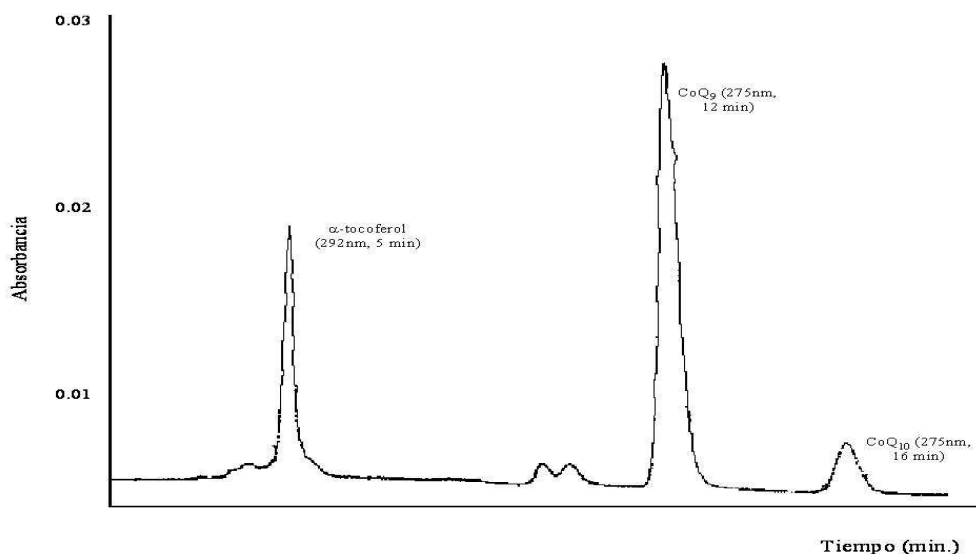


Figura 13: Curva patrón de α -tocoferol, CoQ₉ y CoQ₁₀ en HPLC.

2.6.9.- Microscopía Electrónica de Mitocondrias aisladas de Hígado

Las imágenes de las mitocondrias aisladas de hígado en microscopio electrónico se obtuvieron tras llevar a cabo un proceso de fijación y cortado de las mismas. Tras la extracción mitocondrial, se tomaron 400 μ l del extracto y fueron prefijados durante 2 horas a 4°C en un buffer a pH 7,4 al 1,5 % de formaldehído y 1% de cacodilato. Posteriormente, se centrifugó a 2900 rpm en una centrífuga de mesa Hettich Zentrifugen EBA12 (Tuttlingen, Genesys Instruments 1995). El sobrenadante se eliminó y el pellet tras ser lavado 3 veces con buffer de cacodilato, se fijó con tetroxido de osmio al 1% durante 60 minutos entre 0-4°C. Seguidamente las muestras se deshidrataron con etanol, se fijaron en resina epon y se incubaron toda la noche a 65°C.

Esta resina se cortó en secciones ultra-finas de 70 nm con un cuchillo de diamante usando un ultramicrotomo *ultrakut S Reichert*. Todas estas secciones fueron marcadas con acetato de uranilo y fijadas con solución de citrato de plomo, siendo visualizados por microscopía electrónica. Para ello se utilizó un modelo Carl Zeiss EM10C de 40000x (Oberkochen, Alemania).

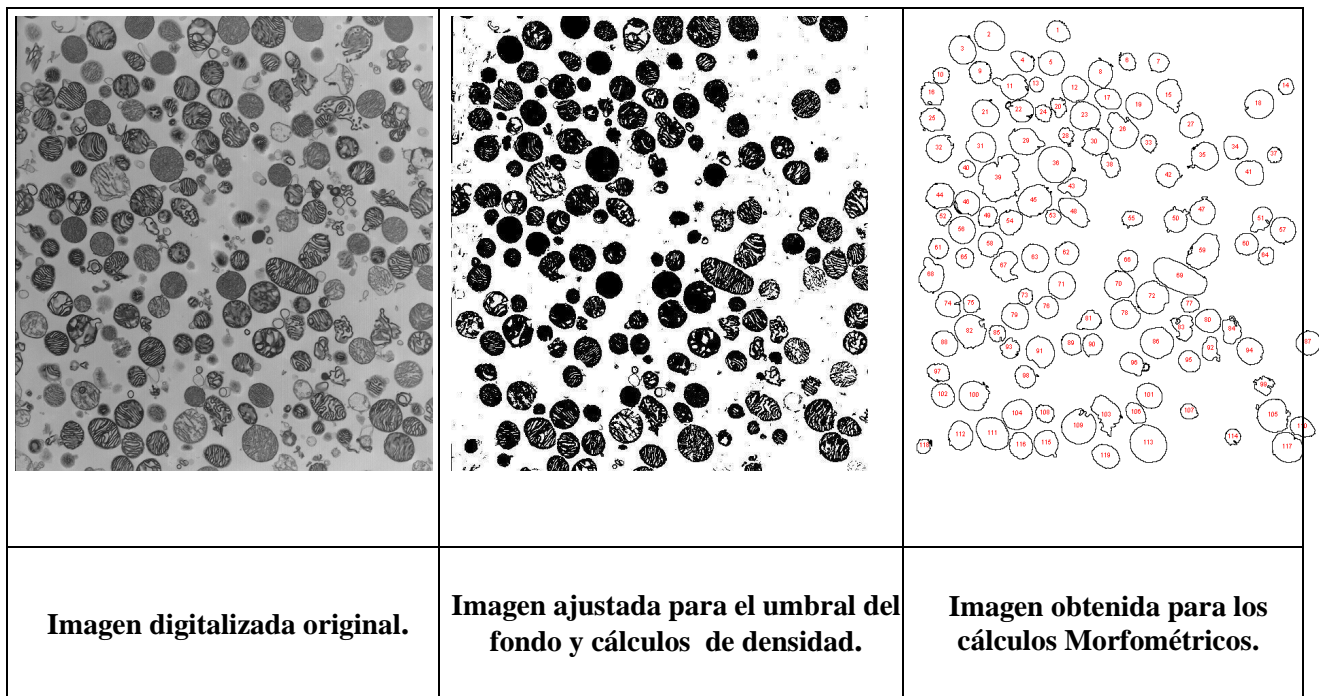


Figura 14: Imágenes digitalizadas de tejido mitocondrial hepático

Las imágenes digitalizadas fueron analizadas con el programa de dominio público *Image J* (National Institutes of Health - NIH, USA) para cuantificar el área, la circularidad y la densidad media e integrada de las mitocondrias aisladas.

Para el cálculo de la circularidad, se utilizó el siguiente algoritmo: $\text{circularidad} = 4\pi(\text{área}/\text{perímetro}^2)$. Un valor de 1 indica un círculo perfecto y a medida que el valor se aproxime a 0.0 nos indicaría un polígono alargado.

También se obtuvieron valores de Densidad Óptica Media, que se define como promedio de densidad óptica dentro de la selección. Es la suma de los valores de densidad óptica de todos los píxeles seleccionados divididos por el número de píxeles.

2.7. Determinaciones en tejido hepático

2.7.1.- Extracción de ADN para estudio de deleciones mitocondriales

En la extracción de ADN para la medida de las deleciones del ADNmt ha sido utilizado Mini Kit QIAamp DNA (Quiagen, USA). El ADN purificado son fragmentos pequeños de entre 20-30 kb predominantemente. El ADN de esta longitud se

desnaturaliza completamente durante un ciclo térmico pudiendo ser amplificado con una alta eficiencia. Para un mantenimiento del ADN a largo plazo el mismo fue conservado a -20°C.

2.7.2.- Determinación de la concentración de ADN

La medida de la concentración y la calidad del ADN mitocondrial de tejido hepático se realizó mediante Nanodrop^R ND-1000 Espectrofotómetro (Wilmington, DE, USA). La unidad de absorbancia medida a 260 nm equivale a 50 µg/ml de muestra y la relación entre absorbancia a 260 nm y absorbancia a 280 nm (ABS_{260}/ABS_{280}) al grado de pureza de las muestras.

2.7.3.- XL-PCR

La detección y la cuantificación de deleciones del ADNmt se ha llevado a cabo mediante PCR modificada (*Chen H, y cols., 2001*).

La PCR tuvo lugar en un termociclador iCycleriQ detection system (BioRad, Hercules, CA, USA). La mezcla de reacción contenía 0.4 ng de ADN total de rata, 4 pmol de cada oligonucleótido de primer, 400 µmol/L de mezcla de dNTP y 0.5 U de enzima LA Taq (Takara Otsu, Shiga, Japan) en un volumen total de 10 µl. Los primers usados (Invitrogen, CA, USA) para la amplificación de los genomas mitocondriales (14.3-kb) eran 5'- ATATTT-ATCACTG-CTGAGTCCCGTGG-3' (forward) y 5'- AATTTTCGGTT-GGGGTGACCTCGGAG-3' (reverse). Las condiciones para la PCR consistieron en una desnaturalización inicial de 1 minuto a 94 °C, seguida por una fase intermedia de 26 ciclos formada por una primera etapa de desnaturalización (94 °C durante 15 segundos) más una etapa de hibridación y extensión (68 °C por 10 minutos), y una extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de la PCR fueron cargados en geles al 0.8% de Agarosa Molecular Biology Grade (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) y 0.5 µg/mL de bromuro de etidio (Bio-Rad, CA, USA) y sometidos a una electroforesis mediante una fuente de alimentación (Bio-Rad, CA, USA) a 70 v durante 3 horas. Como marcador proteico se utilizó DNA Molecular Weight Markekr II (0.12-23.1 kbp) de Roche (Penzberg, Alemania).

La intensidad de las bandas fue medida por análisis de la imagen seguido por una densitometría cuantitativa con el software Image-Quant (versión 3.3 Molecular Dynamics).

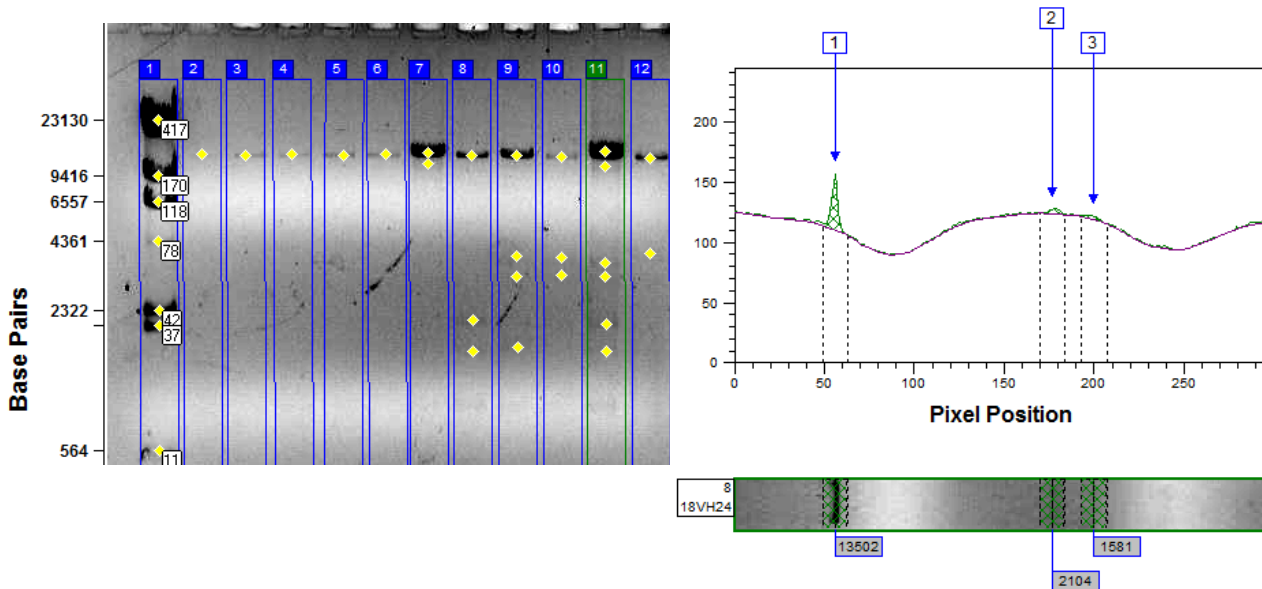


Figura 16: Medida de deleciones del ADNmt mediante XL-PCR

2.7.4.- Western Blot

La técnica utilizada fue descrita por primera vez por *Towbin y cols. (1979)*. Esta técnica está llevada a cabo en varios pasos o etapas. Para la extracción de proteína total de tejido, se partió de un peso determinado del órgano (50-100 mg de tejido). Este tejido se cortó en trozos pequeños y se mezcló con buffer de extracción (NaCl 10mM, EDTA 2mM, EGTA 5mM, NaF 50 mM, Sodio B-glicerofosfato 20mM, Sodio ortovanadato 21mM, Tris 10 mM PMSF 1mM, Cocktail Inhibidor de Proteasas 0.3-1%) El homogenado se dejó en hielo y agitación durante 20 minutos. Finalmente, se centrifugó a 21.000 g en una microcentrifuga (Zentrifugen Hettich EBA 12, MO, USA) durante 30 minutos a 4°C.

Una vez obtenida la proteína, se procedió a la *electroforesis* de las mismas en gel de poliacrilamida. 60 µg de proteína se mezclaron en un eppendorf con loading buffer. Los eppendorfs se mantuvieron a 100°C durante 5 minutos en un termobloque (Labnet International, Inc, NJ, USA). Como marcador proteico se usó medio y alto peso

molecular Sigma (Saint Louis, MO, USA). Las muestras se cargaron en gel de poliacrilamida (12.5% resolving gel y 4% stacking gel), y se procedió a la electroforesis a 200 v durante 50 minutos. Para la electroforesis se usó como fuente de alimentación (PowerPac Basic 300v, 400mA, 75w, Bio-Rad, CA, USA).

Una vez finalizada la electroforesis, se procedió a la transferencia en semy-dry utilizando un sistema Semy-Dry Transblot SD (Bio-Rad, CA, USA), desde el gel a una membrana de PVDF (Immobilon, Milipore). La transferencia se realizó a 15 v durante 30 minutos. Para disminuir la fijación inespecífica de anticuerpos, la membrana fue bloqueada dos veces durante 30 minutos con una solución de leche semidesnatada en polvo al 5% en tampón TTBS a temperatura ambiente y agitación, y posteriormente incubada toda la noche con las diluciones correspondientes de cada anticuerpo primario a 4°C. Después se lavó la membrana con tampón TTBS a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente, se usó anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) diluido en buffer de bloqueo 1 hora también a temperatura ambiente y en agitación. Tras la unión del segundo anticuerpo se lavó la membrana TTBS y TBS.

Finalmente se procedió a la detección de la proteína buscada mediante quimioluminiscencia (Amersham ECL Plus™ GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) La intensidad de las bandas fue medida por análisis de la imagen (Molecular Dinamics) seguido por una densitometría cuantitativa con el software Image-Quant TL v2005 (versión 3.3 Molecular Dinamics).

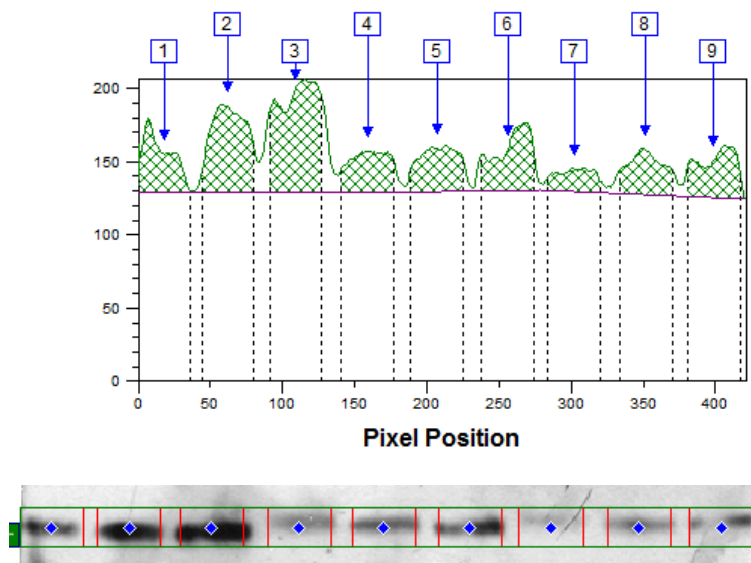


Figura 17: Medida de proteínas mediante western blot

2.8. Tratamiento estadístico de los resultados

Las determinaciones, en general, han sido realizadas por duplicado, dando como valor la media de las dos determinaciones. A su vez se ha realizado un tratamiento estadístico básico en cada uno de los grupos y parámetros, por los que los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM) para cada grupo y parámetro estudiado.

Antes de establecer comparaciones, se estudió la normalidad de las variables por el método de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de la varianza de las distintas variables por el método de Levene. Cuando las variables no siguieron el criterio de normalidad, éstas fueron transformadas y reanalizadas.

Las diferencias entre grupos ($P < 0.05$) se establecieron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) utilizando test “a posteriori” (post-hoc) de comparación entre grupos, los de Scheffe para varianzas homogéneas y T2 de Tamhane para varianzas no homogéneas.

El proceso estadístico ha sido llevado a cabo utilizando el paquete estadístico SPSS (SPSS para Windows, 15.0 SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA).

CAPÍTULO IV.-RESULTADOS

1.- PESO DE LOS ANIMALES Y PESO DEL HÍGADO

1.1.- Peso de las ratas al sacrificio

Los valores correspondientes a las diferencias de peso en los animales antes del sacrificio se muestran en la **figura 18**. Como se observa, para un mismo tipo de dieta el grupo control fue el único grupo que mostró diferencias significativas a distintas dosis de adriamicina. Así las ratas del grupo C sin adriamicina presentaron mayor peso que las del grupo C_{2.5} y C₁₀. En los otros tipos de dietas no se mostraron diferencias de peso con respecto a distintas dosis de adriamicina.

Por otra parte, entre distintas dietas se observa que sólo hay diferencias significativas para la misma dosis de adriamicina en el grupo con una dosis de adriamicina de 10 mg/Kg/día, donde las ratas de los grupos O₁₀, G₁₀ y P₁₀ mostraron pesos mayores a los encontrados en C₁₀.

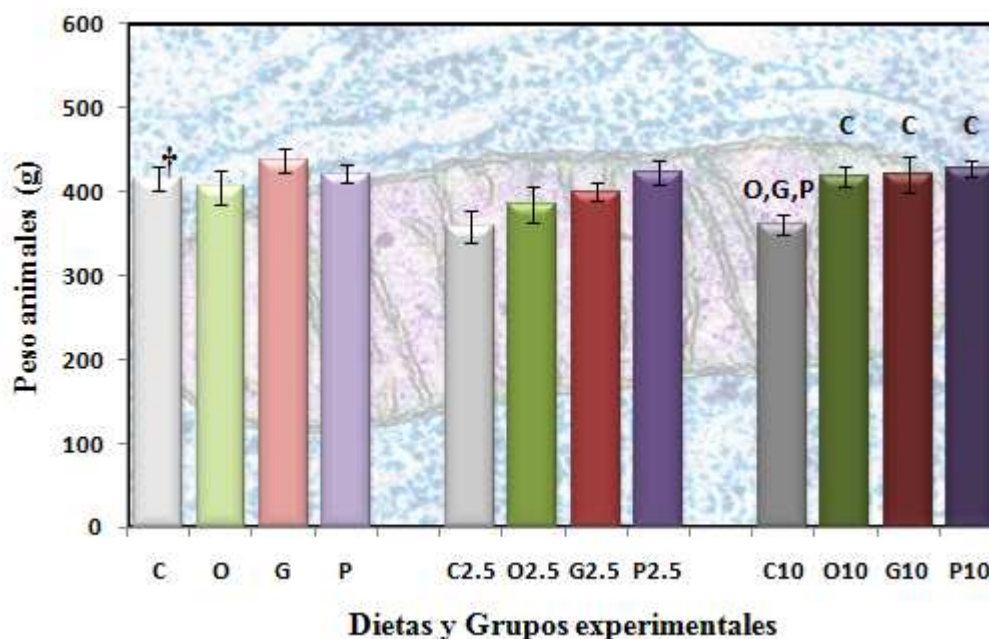


Figura 18. Efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas y la administración intraperitoneal de adriamicina en ratas sobre el peso corporal al sacrificio. Los diferentes grupos experimentales : C= control sin adriamicina; C_{2.5}= control con una dosis de 2,5mg/kg/día; C₁₀= control con dosis de 10 mg/kg/día; O= oliva virgen sin adriamicina; O_{2.5}= oliva virgen con una dosis de 2,5 mg/kg/día; O₁₀= oliva virgen con una dosis de 10 mg/kg/día; G= girasol sin adriamicina; G_{2.5}= girasol con dosis de 2,5 mg/kg/día; G₁₀= girasol con dosis de 10 mg/kg/día; P= pescado sin adriamicina; P_{2.5}= pescado con dosis 2,5 mg/kg/día; P₁₀= pescado con dosis 10 mg/kg/día. Los resultados representan la media ± EEM para 8 animales por grupo. Diferencias estadísticas entre distintas dosis de adriamicina para un mismo tipo de dieta ($P \leq 0.05$): * = 0 vs. 2.5; † = 0 vs 10; ‡ = 2.5 vs 10. Diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) entre distintas dietas para la

misma dosis de adriamicina ($P \leq 0.05$): C= diferencias con respecto a la dosis control; O= diferencias con respecto a la dieta de oliva virgen; G= diferencias con respecto a la dieta de girasol; P= diferencias con respecto a la dieta de pescado.

1.2.- Peso del hígado de los animales

Los valores correspondientes a las diferencias de peso en los animales al sacrificio se muestran en la **figura 19**. Al analizar las diferencias entre diferentes dosis de adriamicina para un mismo tipo de dieta encontramos que todos los grupos basales presentaban valores significativamente superiores respecto a los grupos a los que se les administró una dosis de 2.5 mg/Kg/día de adriamicina. Por otro lado sólo el grupo control, mostró diferencias entre el grupo basal y grupo de dosis de 10 mg/kg/día de adriamicina, presentando el grupo C₀ un peso de hígado superior a C₁₀. No se observan diferencias significativas entre las distintas dosis de adriamicina.

Al estudiar las diferencias entre distintas dietas para una misma dosis de adriamicina encontramos que para los grupos basales sin adriamicina C₀ y O₀ no presentaron diferencias entre ellos, pero si con respecto al grupo P₀. Para una dosis de 2.5 mg/Kg/día de adriamicina, se demostró que el peso en gramos del hígado era significativamente superior en P_{2.5} frente a C_{2.5}, O_{2.5} y G_{2.5}. Esto mismo se reproduce cuando a las ratas se les administro una dosis de adriamicina de 10 mg/kg/día ya que el grupo P₁₀ presentaba diferencias significativas con respecto a C₁₀, O₁₀ y G₁₀. Por otro lado, los hígados de C₁₀ son significativamente inferiores a los de O₁₀.

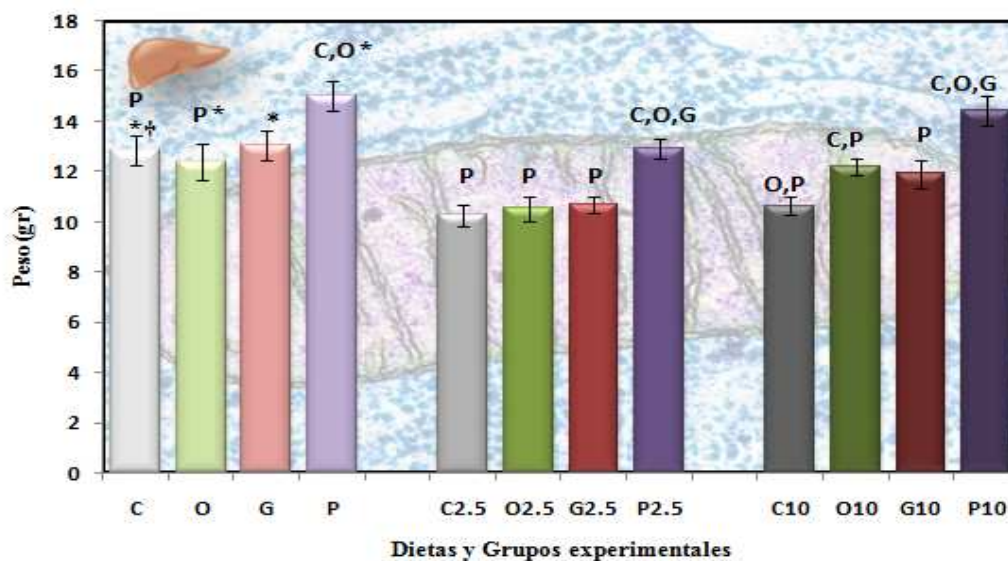


Figura 19. Efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas y la administración intraperitoneal de adriamicina en ratas sobre el peso del hígado de los animales al sacrificio.

2.- BIOQUÍMICA PLASMÁTICA

2.1. Colesterol total plasmático

Los valores correspondientes a los niveles de colesterol total en plasma se muestran en la **figura 20**. Los resultados encontrados entre diferentes dosis de adriamicina para un mismo tipo de dieta mostraron para el grupo control unos niveles de colesterol menores para el grupo C₀ con respecto a C_{2.5} y mayores para el C_{2.5} con respecto a C₁₀. También se observa que para el grupo alimentado con aceite de oliva virgen se presenta una diferencia estadísticamente significativa entre O₀ y O₁₀, siendo el grupo basal el que mostró la menor concentración de colesterol en plasma. En cuanto a los grupos alimentados con aceite de girasol y de pescado, los niveles de colesterol más bajos se presentan en los grupos controles G₀ y P₀, siendo estas diferencias estadísticamente significativas frente a los grupos a los que se les administró una dosis de 2.5 mg/Kg/día y de 10 mg/kg/día de adriamicina. Para estos grupos no se muestran diferencias significativas entre las distintas dosis de adriamicina.

Para una misma dosis de adriamicina entre grupos con distinta dieta se comprueba que a nivel basal los grupos C y P sin adriamicina no presentaban diferencias estadísticamente significativas entre ellos mismos pero si con respecto a los grupos O y G mostrando estos últimos los valores más elevados. Esto mismo se reproduce cuando a las ratas se les administro una dosis de adriamicina de 10 mg/kg/día ya que los grupos C₁₀, P₁₀ presentan diferencias significativas con respecto a O₁₀, G₁₀. Para una dosis de 2.5 mg/Kg/día de adriamicina, se demostró que la concentración de colesterol era significativamente superior en G_{2.5} respecto a O_{2.5} y P_{2.5} y no frente al grupo control.

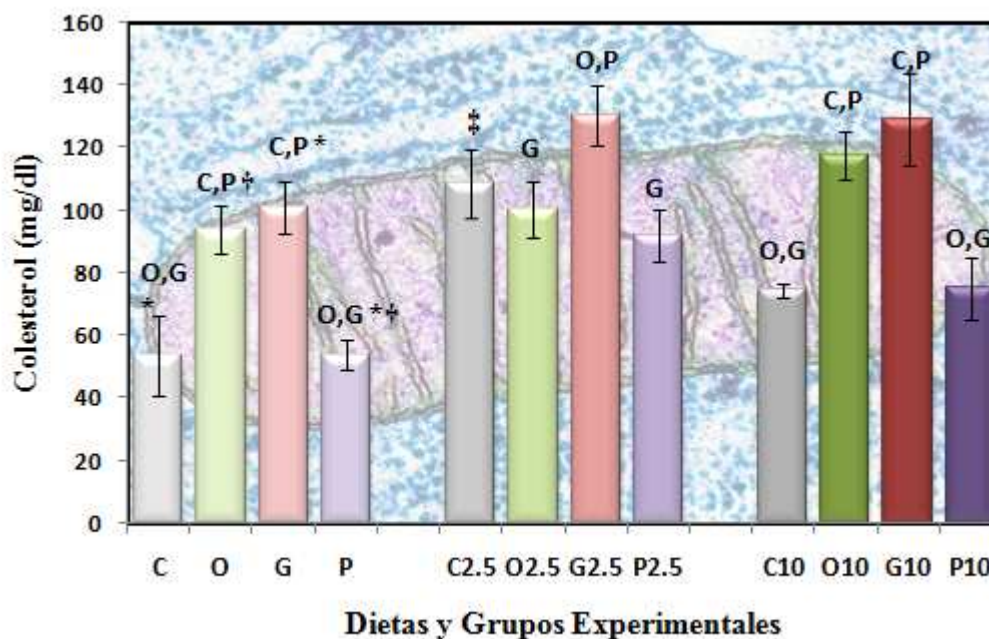


Figura 20. Efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas y la administración intraperitoneal de adriamicina en ratas sobre el nivel de colesterol en plasma de los animales al sacrificio.

2.2. Triglicéridos plasmáticos

Los valores correspondientes a los niveles de triglicéridos en plasma se muestran en la **figura 21**. Para un mismo tipo de dieta, los grupos basales sin adriamicina control, oliva virgen y girasol presentaron los mayores niveles de triglicéridos en sangre, existiendo diferencias estadísticamente significativas de estos grupos frente a los grupos cuando se les administraron dosis de adriamicina de 2.5 mg/kg/día y de 10 mg/kg/día. En los grupos C, O y G se aprecia que la administración de adriamicina provoca un descenso significativo en los niveles de triglicéridos en plasma que fue de igual intensidad para ambas dosis de fármaco no existiendo diferencias entre dosis.

Por otra parte, entre distintas dietas observamos que sólo hay diferencias significativas para los grupos basales sin adriamicina, ya que los grupos C, O y G presentaron mayores niveles de triglicéridos que el grupo de animales alimentados con aceite de pescado.

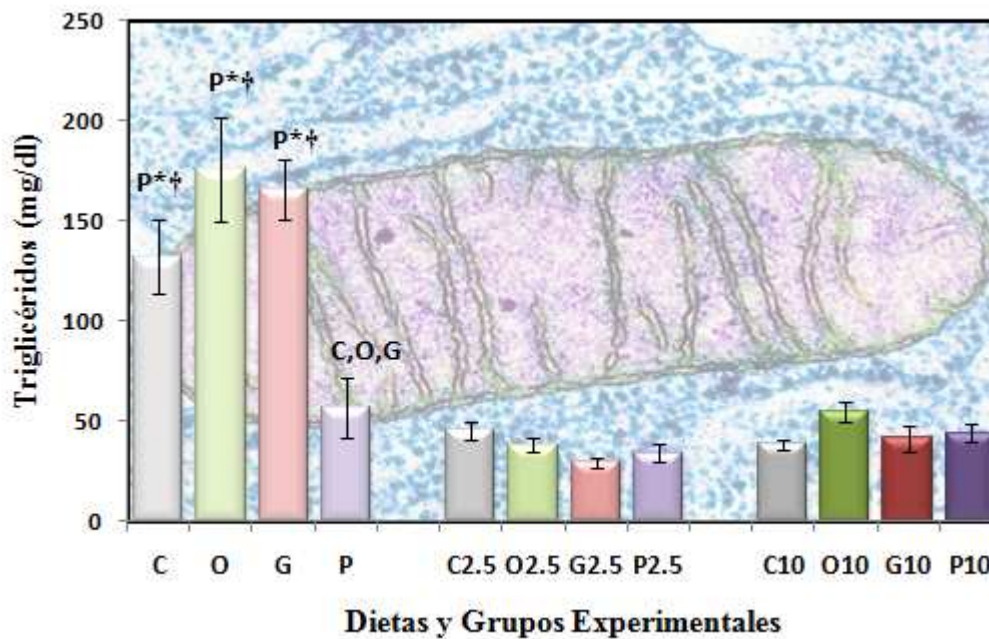


Figura 21. Efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas y la administración intraperitoneal de adriamicina en ratas sobre el nivel de triglicéridos en plasma de los animales al sacrificio.

2.3. Niveles de creatin quinasa plasmática

Los valores correspondientes a los niveles de creatin quinasa en plasma se muestran en la **figura 22**. Analizando cada grupo en función del tipo de dieta, observamos que en el grupo control las ratas sin adriamicina presentaban diferencias significativamente inferiores a las encontradas en los animales del grupo C_{2.5}. Estos resultados se reprodujeron en las dietas de aceite de oliva virgen, aceite de girasol y aceite de pescado. Por otro lado, en todos los grupos para dosis distintas de adriamicina también existen diferencias estadísticas, ya que a lo largo del experimento se observó que los valores de creatin quinasa en los grupos C_{2.5}, O_{2.5}, G_{2.5} y P_{2.5} fueron significativamente superiores respecto a la dosis de 10 mg/kg/día. Luego en todas las dietas para una dosis mayor de adriamicina se produce una disminución de los valores de dicho marcador. Entre las ratas sin adriamicina y las ratas con una dosis de adriamicina de 10 mg/kg/día también existen diferencias estadísticas principalmente en el grupo oliva virgen y girasol, siendo en estos casos menores los niveles para los grupos basales.

Al comparar las distintas dietas entre sí para una misma dosis de adriamicina, se apreció que entre los grupos sin adriamicina el grupo O₀ presentó menores niveles a los

hallados en los animales de los grupos C₀, G₀ y P₀. Por otro lado G₀ mostró diferencias estadísticamente inferiores a las halladas para P₀. Para la dosis de 2.5mg/kg/día, se vio que entre C_{2.5} y O_{2.5}, y G_{2.5} y P_{2.5} no hubo diferencias pero si entre C_{2.5}, O_{2.5} y G_{2.5}, P_{2.5}, siendo menores en el grupo C_{2.5} y O_{2.5}. Cuando se aumentó la dosis de adriamicina a 10 mg/kg/día, no se mostraron diferencias entre grupos con distintas dietas.

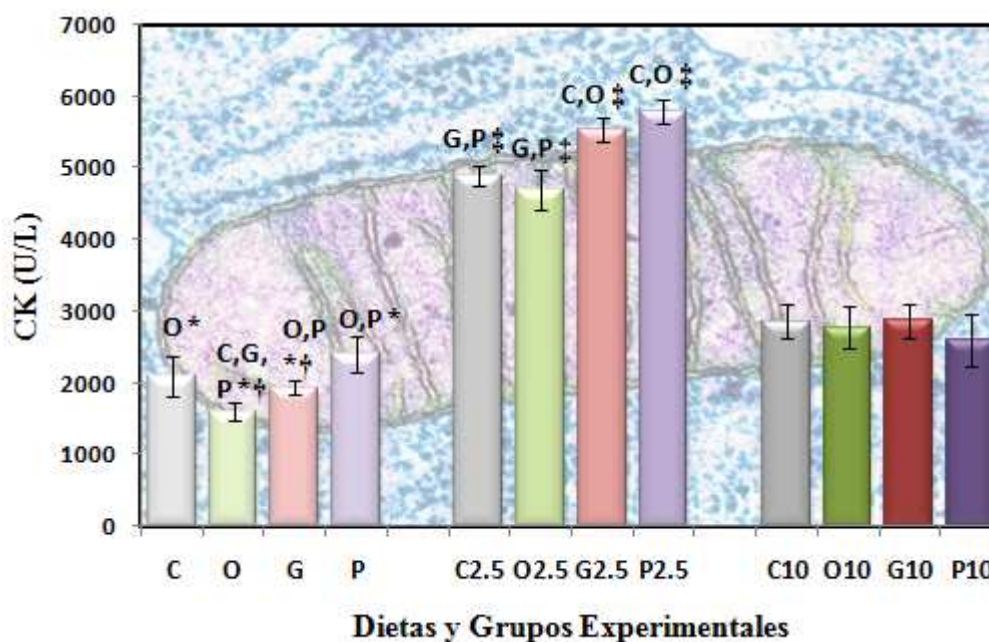


Figura 22. Efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas y la administración intraperitoneal de adriamicina en ratas sobre los niveles de creatín quinasa en plasma de los animales al sacrificio.

3.- VALORES DE PROTEÍNA MITOCONDRIAL EN HÍGADO

Los valores correspondientes a la concentración de proteína mitocondrial hepática se muestran en la **figura 23**. En función del tipo de dieta se observó que los grupos C, O, G y P sin adriamicina presentaban valores significativamente superiores frente a los grupos C_{2.5}, O_{2.5}, G_{2.5} y P_{2.5}. Estos valores de los grupos basales también son más elevados frente a aquellos a los que se les administró la dosis de 10 mg/kg/día, aunque esta diferencia sólo se hace significativa para el grupo pescado. En cuanto a las diferencias entre las distintas dosis de doxorubicina, el nivel de proteínas aumentó en todos los grupos a los que se les administró una dosis de 10 mg/kg/día, siendo además este valor significativamente superior.

Para una misma dosis de adriamicina entre grupos con distinta dieta se comprueba que a nivel basal el grupo alimentado con aceite de pescado P sin adriamicina presentaba diferencias estadísticamente significativas con respecto a los grupos C, O y G. Para la dosis de adriamicina de 2.5 mg/kg/día no se observaron diferencias significativas en cuanto a la concentración de proteínas mitocondriales en hígado en las ratas alimentadas, tampoco para la dosis de 10 mg/kg/día.

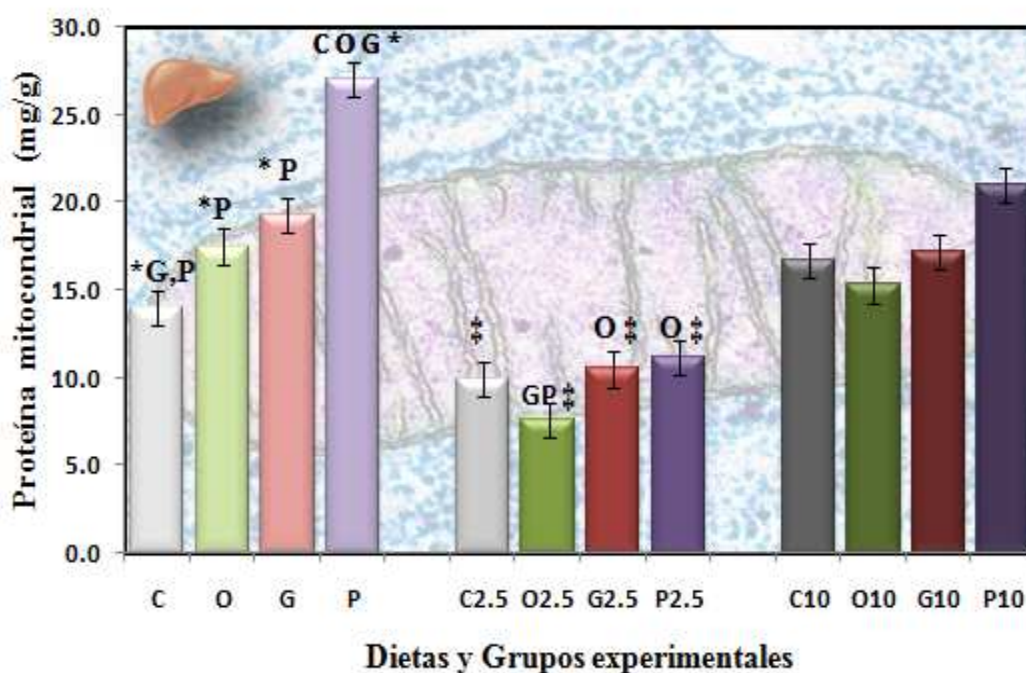


Figura 23. Efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas y la administración intraperitoneal de adriamicina en ratas sobre los valores de proteína mitocondrial hepática.

4.-PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN MEMBRANA MITOCONDRIAL

4.1. Contenido en ácidos grasos saturados en membrana mitocondrial hepática

Los valores correspondientes al contenido en ácidos grasos saturados en membrana mitocondrial hepática se muestran en la **tabla 7**. Con respecto al ácido graso saturado laurico no se observan diferencias significativas entre los grupos alimentados con las diferentes fuentes grasas experimentales. Tampoco el ácido graso mirístico muestra diferencias estadísticas entre los diferentes grupos. En el palmítico por su parte sí se observan diferencias significativas siendo el grupo control en el que se aprecian los niveles más bajos frente a los grupos O, G y P. Por el contrario, en los niveles de

ácido graso esteárico el grupo control es el que presenta valores más altos siendo estas diferencias significativas con respecto a los grupos experimentales girasol y pescado.

4.2. Contenido en ácidos grasos monoinsaturados en membrana mitocondrial hepática

Los valores correspondientes al contenido en ácidos grasos monoinsaturados en membrana mitocondrial hepática se muestran en la **tabla 7**. Para el ácido graso monoinsaturado palmitoleico se comprueba que el grupo control presenta los valores más elevados, diferencia estadísticamente significativa frente a los demás grupos experimentales. Por su parte, los grupos oliva virgen, girasol y pescado no presentan diferencias entre los ellos. Con respecto al ácido graso oleico, en el grupo pescado observamos los niveles más bajos siendo esta diferencia estadísticamente significativa con respecto a C, O y G no presentándose diferencias entre ellos.

4.3. Contenido en ácidos grasos diinsaturados en membrana mitocondrial hepática

Los valores correspondientes al contenido en ácidos grasos diinsaturados en membrana mitocondrial hepática se muestran en la **tabla 7**. Para los niveles de ácidos grasos diinsaturados sólo han sido apreciables los correspondientes al ácido graso linoleico. El grupo alimentado con aceite de girasol presenta los niveles más elevados en este ácido graso. En cambio, en el grupo pescado se observan los niveles más bajos, siendo ambas diferencias estadísticamente significativas. Los grupos C y O no muestran diferencias entre ellos.

4.4. Contenido en ácidos grasos poliinsaturados en membrana mitocondrial hepática

Los valores correspondientes al contenido en ácidos grasos poliinsaturados en membrana mitocondrial hepática se observan en la **tabla 7**. Con respecto al ácido graso araquidónico el grupo girasol viene a presentar niveles superiores a los grupos control, oliva y pescado siendo estas diferencias significativas para los grupos C y P. En el grupo alimentado utilizando como fuente grasa el aceite de pescado se observan los valores más bajos frente a los demás grupos experimentales cuyas diferencias también son significativas. En lo que referente a los ácidos grasos EPA y DHA, el grupo pescado presenta los niveles más elevados y estadísticamente significativos en dichos ácidos grasos con respecto a los grupos experimentales C, O, G.

4.5. Índice AGMI/AGPI en membrana mitocondrial hepática

Los valores correspondientes al índice AGMI/AGPI en membrana mitocondrial hepática se muestran en la **tabla 7**. El grupo experimental pescado presenta el índice más bajo siendo esta diferencia significativa con respecto a los grupos control y oliva por ser estos grupos los que muestran las relaciones más elevadas, no existiendo diferencias estadísticas entre los mismos.

4.6. Índice de Insaturación en membrana mitocondrial hepática

Los valores correspondientes al índice de insaturación en membrana mitocondrial hepática se muestran en la **tabla 7**. El grupo pescado presenta el índice de insaturación más elevado frente a los demás grupos experimentales siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

4.7. Índice de Peroxidación en membrana mitocondrial hepática

Los valores correspondientes al índice de peroxidación en membrana mitocondrial hepática se muestran en la **tabla 7**. El grupo pescado presenta los valores de índice de peroxidación más elevados siendo esta diferencia estadísticamente significativa frente al resto de grupos experimentales.

4.8. Índice oleico/linoleico en membrana mitocondrial hepática

Los valores correspondientes al índice oleico/linoleico en membrana mitocondrial hepática se muestran en la **tabla 7**. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos experimentales aunque existe una tendencia del grupo alimentado usando como fuente grasa el aceite de oliva virgen a presentar la relación más elevada.

4.9. Relación n6/n3 en membrana mitocondrial hepática

Los valores correspondientes a la relación n6/n3 en membrana mitocondrial hepática se muestran en la **tabla 7**. Con respecto a la relación n6/n3 el grupo experimental girasol presentaba los niveles más altos siendo esta diferencia significativa frente a los grupos control y pescado. El grupo pescado a su vez mostró una relación inferior y estadísticamente significativa con respecto al resto de grupos experimentales, es decir, C, O y P.

<i>Ácidos Grasos</i>	<i>Aceite de Oliva</i>							
	<i>Control</i>	<i>Virgen</i>	<i>Aceite de Girasol</i>	<i>Aceite de Pescado</i>				
	<i>Dieta</i>	<i>Dieta</i>	<i>Dieta</i>	<i>Dieta</i>				
	%		%		%		%	
<i>Láurico (C12:0)</i>	36.7 ± 6.4	37.2 ± 6.8	29.7 ± 5.0	23.5 ± 8.1				
<i>Mirístico (C14:0)</i>	4.8 ± 2.7	6.7 ± 1.2	10.0 ± 2.9	3.1 ± 1.8				
<i>Palmítico (C16:0)</i>	2.0 ± 0.0	11.2 ± 3.1	11.0 ± 2.2	10.7 ± 4.7				
<i>Palmitoleico (C16:1)</i>	15.3 ^{OGP} ± 0.9	4.9 ^C ± 3.2	6.4 ^C ± 4.2	2.7 ^C ± 1.1				
<i>Esteárico (C18:0)</i>	14.5 ^{GP} ± 2.4	11.7 ± 1.9	7.6 ^C ± 2.5	5.4 ^C ± 2.7				
<i>Oleico (C18:1)</i>	7.1 ^P ± 2.6	8.0 ^P ± 3.2	6.4 ^P ± 1.4	1.6 ^{COG} ± 0.6				
<i>Linoleico (C18:2n6)</i>	7.0 ^{GP} ± 1.5	6.3 ^{GP} ± 1.9	11.2 ^{COP} ± 1.6	2.1 ^{COG} ± 1.0				
<i>Araquidónico (C20:4n6)</i>	9.5 ^{PG} ± 1.6	10.9 ^P ± 2.9	16.5 ^{PC} ± 1.7	3.9 ^{COG} ± 2.1				
<i>EPA (C20:5n3)</i>	0.1 ^P ± 0.0	0.1 ^P ± 0.0	0.3 ^P ± 0.1	17.8 ^{COG} ± 4.8				
<i>DHA (C22:6n3)</i>	4.5 ^{GP} ± 1.1	2.9 ^{GP} ± 0.7	1.3 ^{COP} ± 0.4	26.9 ^{COG} ± 6.1				
<i>AGMI:AGPI</i>	1.0 ^{GP} ± 0.1	1.0 ^{GP} ± 0.2	0.5 ^{COP} ± 0.2	0.1 ^{COG} ± 0.1				
<i>Índice de Insaturación (II)</i>	1.42 ^P ± 0.2	1.11 ^P ± 0.3	1.68 ^P ± 0.2	6.32 ^{COG} ± 0.5				
<i>oleico/linoleico</i>	1.3 ± 0.5	1.7 ± 0.5	0.8 ± 0.4	1.0 ± 0.5				
<i>n6/n3</i>	5.1 ^{OGP} ± 1.3	17.7 ^{CP} ± 5.8	21.5 ^{CP} ± 5.5	0.3 ^{OGP} ± 0.2				
<i>Índice de Peroxidación (IP)</i>	58.43 ^P ± 11.67	53.86 ^P ± 14.10	68.50 ^P ± 9.08	219.50 ^{COG} ± 57.00				
<i>N</i>	8	8	8	8				

Tabla 7. Valores medios ± EEM, de la composición porcentual de ácidos grasos en mitocondria de hígado de rata de los distintos grupos experimentales. Los ácidos grasos se han designado por su nombre, además de por el número de carbonos, seguido por el número de dobles enlaces. También se indica la posición del primer doble enlace relativo al grupo metilo terminal (n) de la molécula. AGMI: suma de ácidos grasos monoinsaturados ; AGPI: suma de ácidos grasos poliinsaturados; II: índice de insaturación Diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) entre distintas dietas ($P \leq 0.05$): C= diferencias con respecto a la dosis control; O= diferencias con respecto a la dieta de oliva virgen; G= diferencias con respecto a la dieta de girasol; P= diferencias con respecto a la dieta de pescado.

5.- PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN MEMBRANA MITOCONDRIAL HEPÁTICA

5.1.- Hidroperóxidos en mitocondrias hepáticas

Los valores correspondientes a los niveles de hidroperóxidos en mitocondrias de hígado se muestran en la **figura 24**. Cuando se estudió el nivel de hidroperóxidos para cada una de las dietas, se observó que en el grupo control las ratas sin adriamicina presentaban diferencias estadísticamente significativas con respecto a C₁₀. Esta misma diferencia del grupo control también se observó en el grupo oliva virgen y girasol. Por otro lado, en el grupo control se vio que la concentración de hidroperóxidos descendía cuando se aumentaba la dosis de adriamicina, existiendo así diferencias entre C_{2.5} y C₁₀. Esta diferencia entre dosis de adriamicina también se muestra entre O_{2.5} y O₁₀, y entre G_{2.5} y G₁₀. En el grupo de ratas alimentadas con aceite de pescado no había diferencias ni entre los grupos sin y con adriamicina, ni entre las distintas dosis de la misma. En el grupo oliva virgen se encontró que dicha variable incrementaba en O_{2.5} con respecto a O₀ y a O₁₀.

Cuando se compararon los grupos con distintas dietas e igual dosis de adriamicina, se comprobó que los grupos sin adriamicina C₀, O₀ y G₀ no presentaban diferencias significativas entre ellos pero sí con el grupo con mayor concentración de hidroperóxidos P₀. Para la dosis de 2.5 mg/kg/día, C_{2.5} presentó los niveles más bajos de dicha variable siendo esta diferencia estadísticamente significativa. La mayor concentración la presentaron para esta dosis los grupos O_{2.5} y G_{2.5}, seguidos del grupo P_{2.5}, con similar nivel de hidroperóxidos en mitocondrias hepáticas. Cuando se incrementó la dosis de adriamicina hasta 10 mg/kg/día, se encontró el mismo efecto que para los grupos sin adriamicina es decir, los niveles de hidroperóxidos aumentaron significativamente en el grupo de animales alimentados con aceite de pescado frente al resto de grupos experimentales.

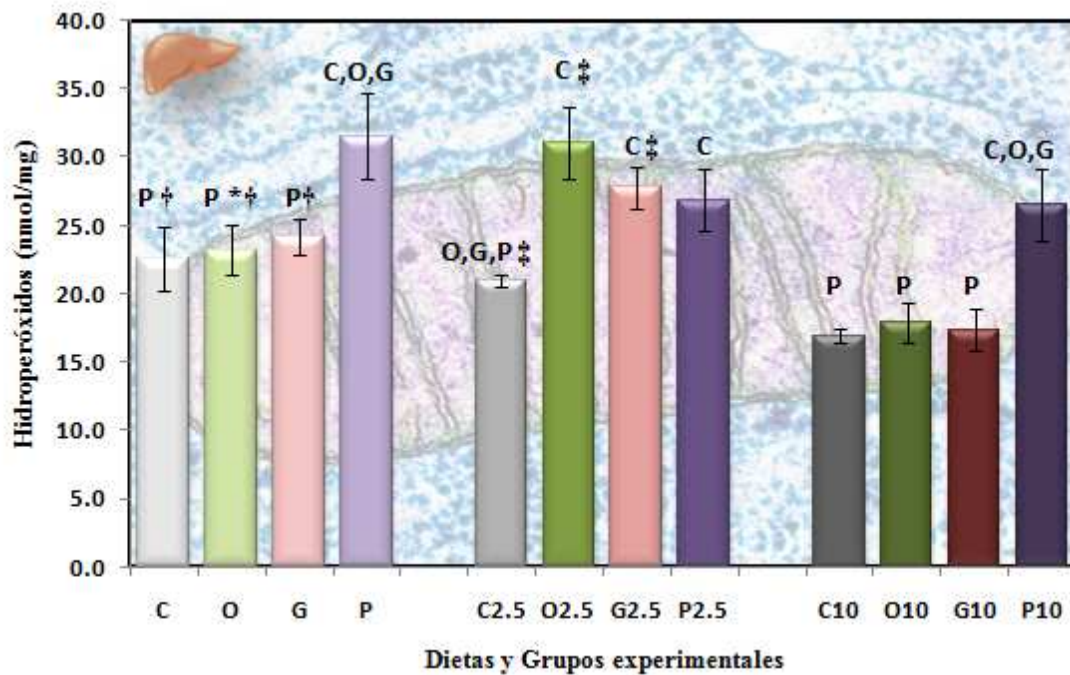


Figura 24. Efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas y la administración intraperitoneal de adriamicina en ratas sobre los niveles de hidroperóxidos en mitocondrias de hígado.

5.2.- Sustancias Reactivas del Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) en mitocondrias hepáticas

Los valores correspondientes a los niveles de TBARS en mitocondrias hepáticas se muestran en la **figura 25**. Analizando cada grupo en función del tipo de dieta, observamos que en el grupo control las ratas sin adriamicina presentaban diferencias significativamente inferiores a las encontradas en los animales del grupo C_{2.5}. Estos resultados se reprodujeron en las dietas de aceite de oliva virgen, aceite de girasol y aceite de pescado. También observamos que los grupos basales muestran valores inferiores a aquellos grupos a los que se les administró la dosis más elevada. Por otro lado, en todos los grupos experimentales para dosis distintas de adriamicina existen diferencias estadísticas, ya que a lo largo del experimento se observó que los valores de TBARS en los grupos C_{2.5}, O_{2.5}, G_{2.5} y P_{2.5} fueron significativamente superiores respecto a la dosis de 10 mg/kg/día, luego en todas las dietas para una dosis mayor de adriamicina se produce una disminución de los valores de TBARS.

Al comparar las distintas dietas entre sí para una misma dosis de adriamicina, se apreció que entre los grupos sin adriamicina C_0 y O_0 , G_0 y P_0 no hubo diferencias pero si entre C_0 , O_0 y G_0 , P_0 siendo menores en el grupo C_0 y O_0 . Para la dosis 2.5mg/kg/día, el grupo $C_{2.5}$ presentó niveles significativamente inferiores a los hallados en los animales de los grupos $O_{2.5}$, $G_{2.5}$ y $P_{2.5}$. Cuando se aumentó la dosis de adriamicina a 10 mg/kg/día, el grupo P_{10} presentó mayores valores de TBARS a los observados en los grupos C_{10} , O_{10} , y G_{10} .

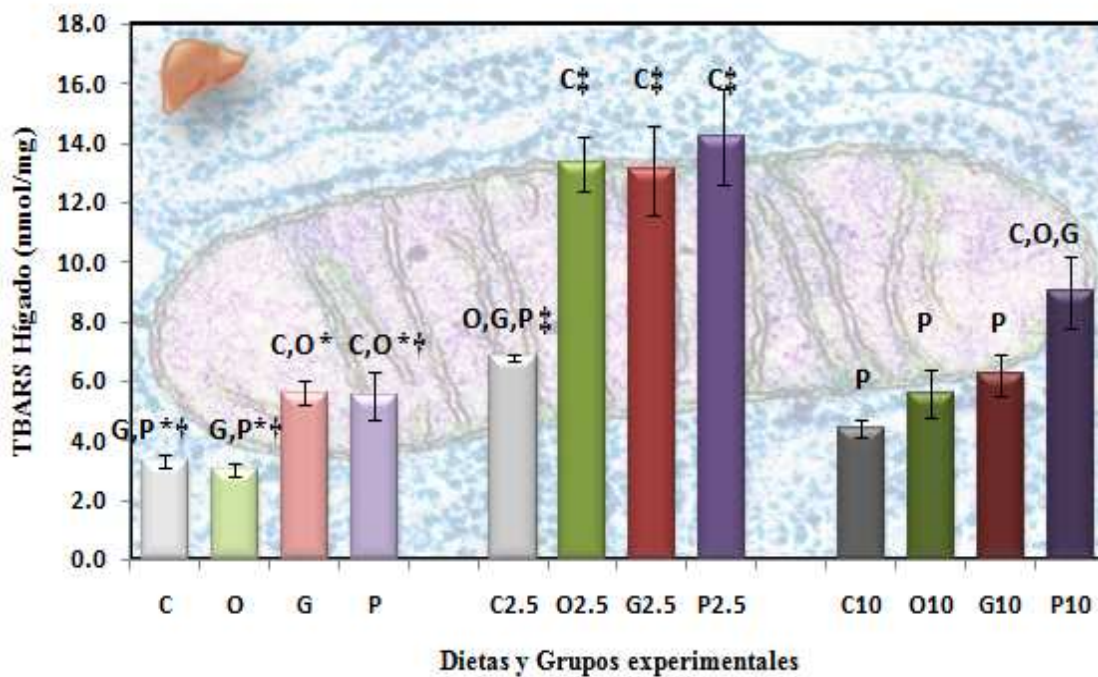


Figura 25. Efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas y la administración intraperitoneal de adriamicina en ratas sobre los niveles de TBARS en mitocondrias de hígado.

6.- ANTIOXIDANTES DE MEMBRANA MITOCONDRIAL HEPÁTICA

6.1.- α - Tocoferol en mitocondrias de hígado

Los valores correspondientes a los niveles de tocoferol en mitocondrias de hígado se muestran en la **figura 26**. Al analizar las diferencias entre diversas dosis de adriamicina para un mismo tipo de dieta encontramos que en los grupos oliva virgen, girasol y pescado se produjo una disminución con respecto a los grupos basales en la concentración de vitamina E cuando se

administró adriamicina a dosis de 2.5 y 10 mg/kg/día. Incluso en estos grupos (oliva virgen, girasol y pescado) con adriamicina se comprobó que los niveles de tocoferol eran mayores para la dosis de adriamicina de 2.5 mg/kg/día, siendo estas diferencias estadísticamente significativas frente a los grupos O₁₀, G₁₀ y P₁₀. Por otra parte, en el grupo alimentado con dieta estándar se observó que el grupo basal C sólo presentaba valores estadísticamente superiores con respecto al grupo C₁₀.

Al estudiar las diferencias entre distintas dietas para una misma dosis de adriamicina encontramos que los grupos basales O y G no presentan diferencias entre ellos pero si con los grupos con menor concentración de tocoferol, C y P. Por otro lado, las ratas del grupo C presentan valores de vitamina E menores que el grupo alimentado con aceite de pescado. Los resultados encontrados en grupos sin adriamicina, se repiten exhaustivamente cuando se administran dosis de adriamicina de 2.5 y 10 mg/kg/día.

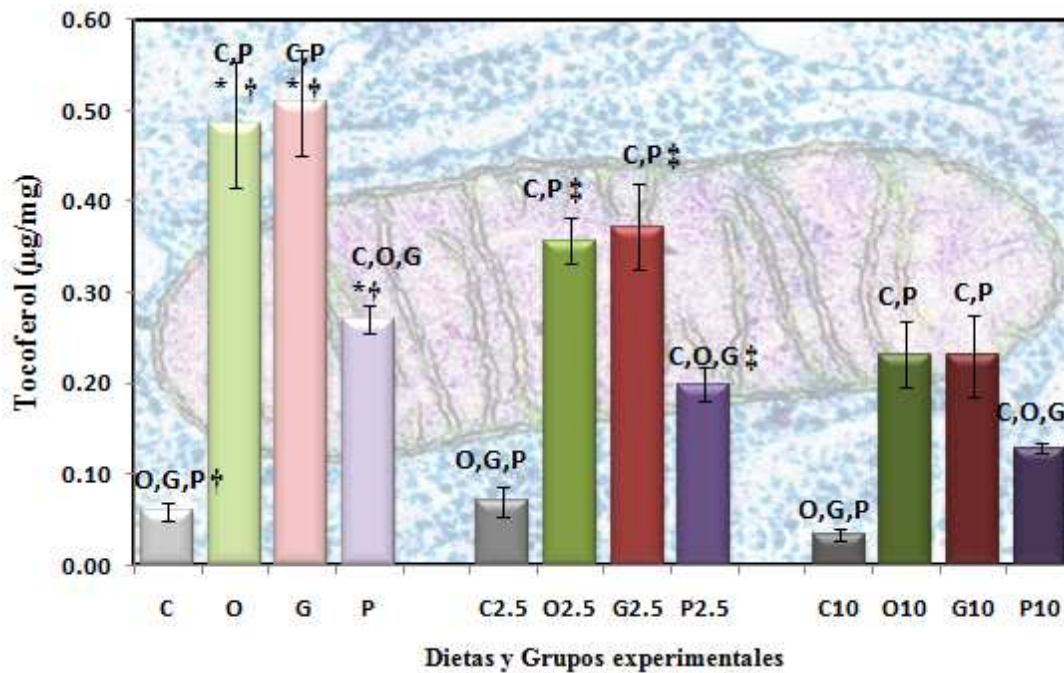


Figura 26. Efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas y la administración intraperitoneal de adriamicina en ratas sobre la concentración de tocoferol en mitocondrias de hígado.

6.2.- Coenzima Q en mitocondrias de hígado

6.2.1.- Coenzima Q₉ en mitocondrias de hígado

Los valores correspondientes a los niveles de Coenzima Q₉ en mitocondrias hepáticas se muestran en la **figura 27**. Al analizar las diferencias entre distintas dosis de adriamicina para un mismo tipo de dieta encontramos que para el grupo control las ratas sin adriamicina presentaban valores significativamente inferiores respecto al grupo C_{2.5}. Estas diferencias también las muestran el grupo O con respecto al grupo O_{2.5}, los animales del grupo G frente a los del grupo G_{2.5} y los de P con respecto a los de P_{2.5}. Por otro lado, en el grupo control los valores de CoQ₉ expresados en (µg/mg) para las dos dosis de adriamicina aumentaron significativamente para la dosis de 2.5 mg/kg/día con respecto a la de 10. Esta diferencia entre dosis de adriamicina se reproduce en las dietas cuya fuente grasa de la dieta es aceite de oliva virgen y aceite de pescado. En las ratas alimentadas con aceite de oliva virgen, se observó diferencias entre los grupos O₀ y O₁₀, al igual que ocurrió para los animales alimentados con aceite de pescado entre sus grupos P₀ y P₁₀, siendo en ambas dietas mayores los niveles de CoQ₉ observados en los grupos con adriamicina.

Al estudiar las diferencias entre distintas dietas para una misma dosis de adriamicina encontramos que para los grupos basales sin adriamicina O₀, G₀ y P₀ no presentaron diferencias entre ellos, pero si con respecto al grupo C₀. Para la dosis de adriamicina de 2.5 mg/kg/día, entre O_{2.5} y G_{2.5}, y C_{2.5} y P_{2.5} no hubo diferencias pero si entre O_{2.5}, G_{2.5} y C_{2.5}, P_{2.5}, siendo menores en los dos últimos. Este mismo comportamiento lo presentaron las ratas cuando se les administró una dosis de adriamicina de 10 mg/kg/día.

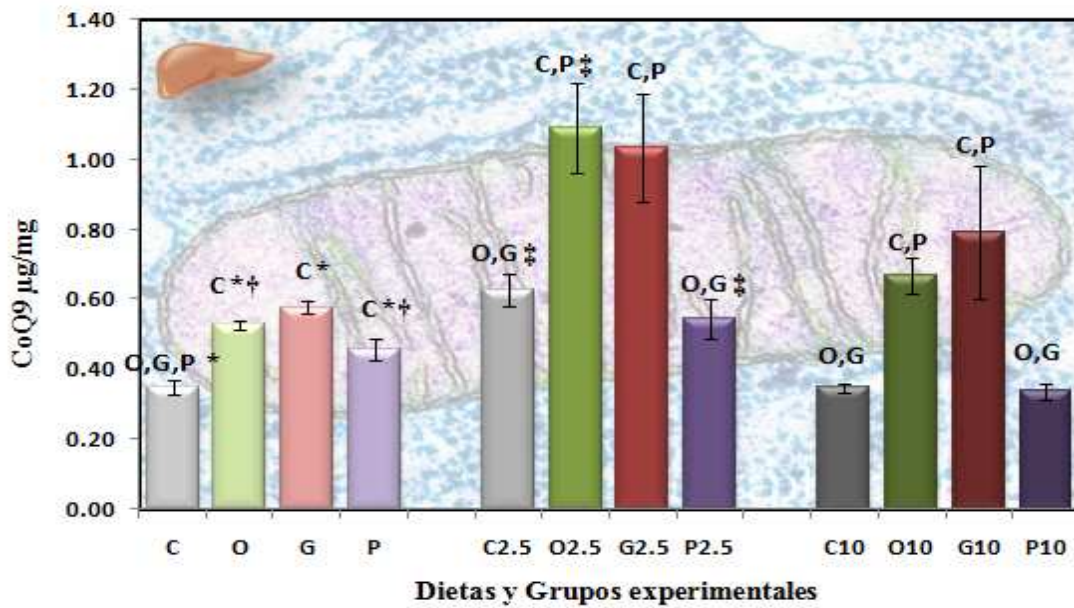


Figura 27. Efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas y la administración intraperitoneal de adriamicina en ratas sobre la concentración de Coenzima Q₉ en mitocondrias hepáticas.

6.2.2- Coenzima Q₁₀ en mitocondrias de hígado

Los valores correspondientes a los niveles Coenzima Q₁₀ en mitocondrias de hígado se muestran en la **figura 28**. Cuando se estudió el nivel de Coenzima Q₁₀ para cada una de las dietas, se observó que en el grupo control las ratas sin adriamicina presentaban aumento estadísticamente significativo con respecto a C_{2.5}. Esta misma diferencia del grupo control también se observó en el grupo oliva virgen y girasol. A su vez los grupos girasol y pescado sin adriamicina mostraron diferencias significativas con respecto a los grupos de dosis de adriamicina más elevada. Por otro lado, en el grupo control se vio que la concentración de Coenzima Q₁₀ descendía cuando se aumentaba la dosis de adriamicina, existiendo así diferencias entre C_{2.5} y C₁₀. Esta diferencia entre dosis de adriamicina también se muestra entre O_{2.5} y O₁₀ y P_{2.5} y P₁₀. En el grupo control y oliva virgen se encontró que dicha variable incrementaba en C_{2.5} y O_{2.5} con respecto a C₀ y O₀ y con respecto a C₁₀ y O₁₀.

Cuando se compararon los grupos con distintas dietas entre sí e igual dosis de adriamicina, se comprobó que los grupos sin adriamicina C₀, O₀ y G₀ no presentaban diferencias significativas entre ellos pero sí con el grupo con mayor concentración de Coenzima Q₁₀ P₀. Para la dosis de 2.5 mg/kg/día, C_{2.5} presentó los niveles más pequeños de dicha variable. La mayor

concentración la presentaron para esta dosis los grupos O_{2.5} y P_{2.5}, seguidos del grupo G_{2.5}, con similar nivel de Coenzima Q₁₀ en mitocondrias hepáticas. Cuando se incrementó la dosis de adriamicina hasta 10 mg/kg/día, se encontró que el único grupo que presenta diferencias significativas con respecto a los demás es el grupo control mostrando los niveles de menor concentración en Coenzima Q₁₀.

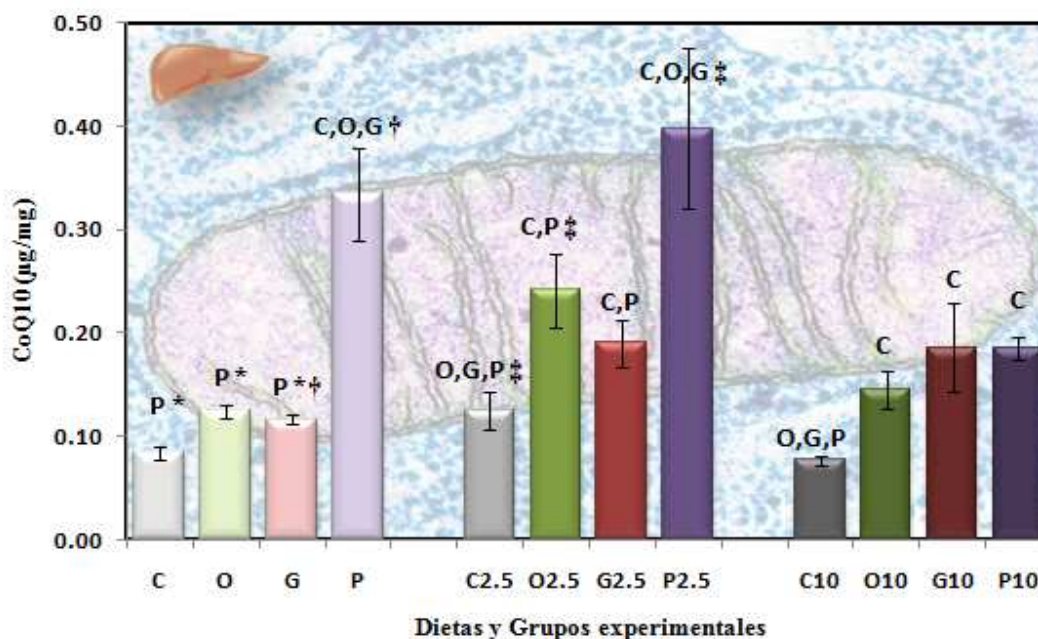


Figura 28. Efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas y la administración intraperitoneal de adriamicina en ratas sobre la concentración de Coenzima Q₁₀ en mitocondrias hepáticas.

6.2.3.-Coenzima Q₉+Q₁₀ en mitocondrias de hígado

Los resultados obtenidos con relación a la concentración de Coenzima Q₉ + Q₁₀ en mitocondrias hepáticas se muestran en la **figura 29**. Al analizar las diferencias entre diferentes dosis de adriamicina para un mismo tipo de dieta encontramos que para el grupo control las ratas sin adriamicina presentaban valores significativamente inferiores respecto al grupo C_{2.5}. Estas diferencias también las muestran los animales del grupo O₀ respecto a los de O_{2.5}, y los del grupo G₀ respecto a G_{2.5}. Por otro lado, en el grupo control los valores de CoQ total expresados en (µg/mg) para las dos dosis de adriamicina aumentaron significativamente para la dosis de 2.5 mg/kg/día con respecto a la de 10. Esta diferencia entre dosis de adriamicina se reproduce en las dietas cuya fuente grasa de la dieta es aceite de oliva virgen, aceite de girasol y aceite de pescado. En las ratas alimentadas con aceite de oliva virgen, se observó diferencias entre los

grupos O₀ y O₁₀, al igual que ocurrió para los animales alimentados con aceite de pescado entre sus grupos P₀ y P₁₀, siendo el nivel superior de CoQ total en el grupo basal del grupo P y menor en el grupo basal de O.

Al estudiar las diferencias entre distintas dietas para una misma dosis de adriamicina encontramos que para los grupos basales sin adriamicina O₀, G₀ y P₀ presentaron diferencias significativas con respecto al grupo C₀. Por otro lado, O₀ presenta niveles de CoQ total menores que P₀. Para la dosis de adriamicina de 2.5 mg/kg/día, entre O_{2.5} y G_{2.5}, y C_{2.5} y P_{2.5} no hubo diferencias pero si entre O_{2.5}, G_{2.5} y C_{2.5}, P_{2.5}, siendo menores en el grupo C_{2.5} y P_{2.5}. Cuando se les administró una dosis de adriamicina de 10 mg/kg/día los animales de los grupos O₁₀, G₁₀, y P₁₀ presentaron diferencias significativamente superiores respecto a los niveles de CoQ total del grupo C₁₀. Además entre O₁₀ y G₁₀ no hubo diferencias, pero estos a su vez presentaron valores mayores al grupo P₁₀.

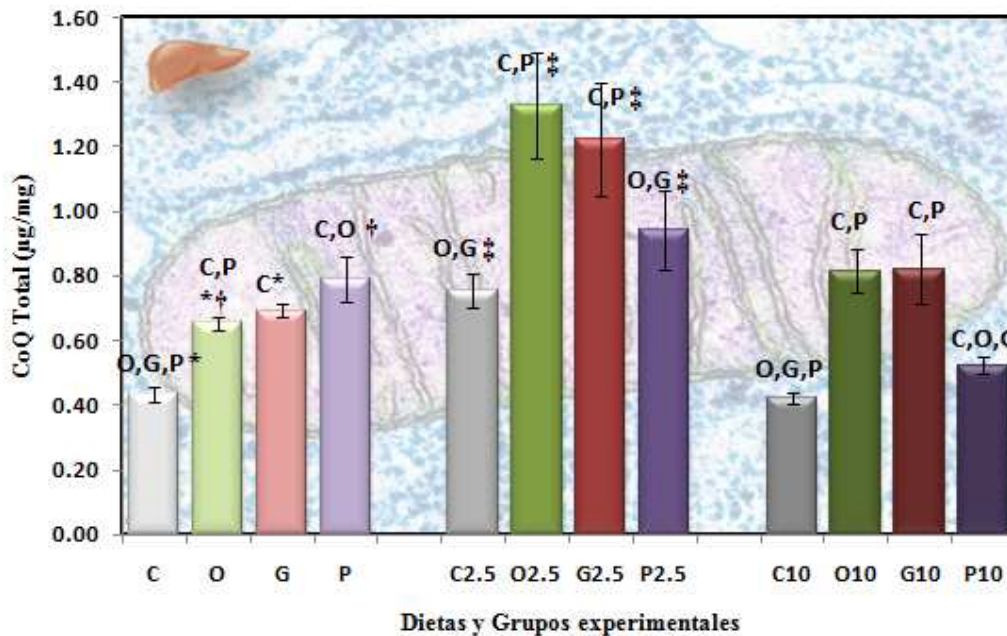


Figura 29. Efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas y la administración intraperitoneal de adriamicina en ratas sobre la concentración de Coenzima Q₉ + Q₁₀ en mitocondrias hepáticas.

7.- DELECCIONES DEL ADN MITOCONDRIAL EN TEJIDO HEPÁTICO

7.1.- Deleciones múltiples del ADNmt en tejido hepático

Los valores correspondientes a las diferencias de deleciones múltiples del ADNmt de tejido hepático hígado se muestran en la **figura 30**.

Al estudiar las diferencias entre distintas dietas para una misma dosis de adriamicina encontramos que para los grupos basales sin adriamicina C₀ y O₀ no se presentan deleciones del ADNmt. Sin embargo, el grupo G₀ y P₀ presentan deleciones del 3.5% y del 10% respectivamente. Para la dosis de adriamicina de 2.5 mg/kg/día, todos los grupos experimentales presentaron deleciones en su ADNmt siendo el grupo girasol seguido del de pescado los que mostraron un porcentaje mayor, en concreto del 15% y 8%. Cuando se les administró una dosis de adriamicina de 10 mg/kg/día los animales de los grupos C₁₀ y O₁₀, no mostraron roturas en su material genético mitocondrial. Para esta dosis en el grupo pescado se observa un 15% de deleciones y un 2.5% para el grupo girasol.

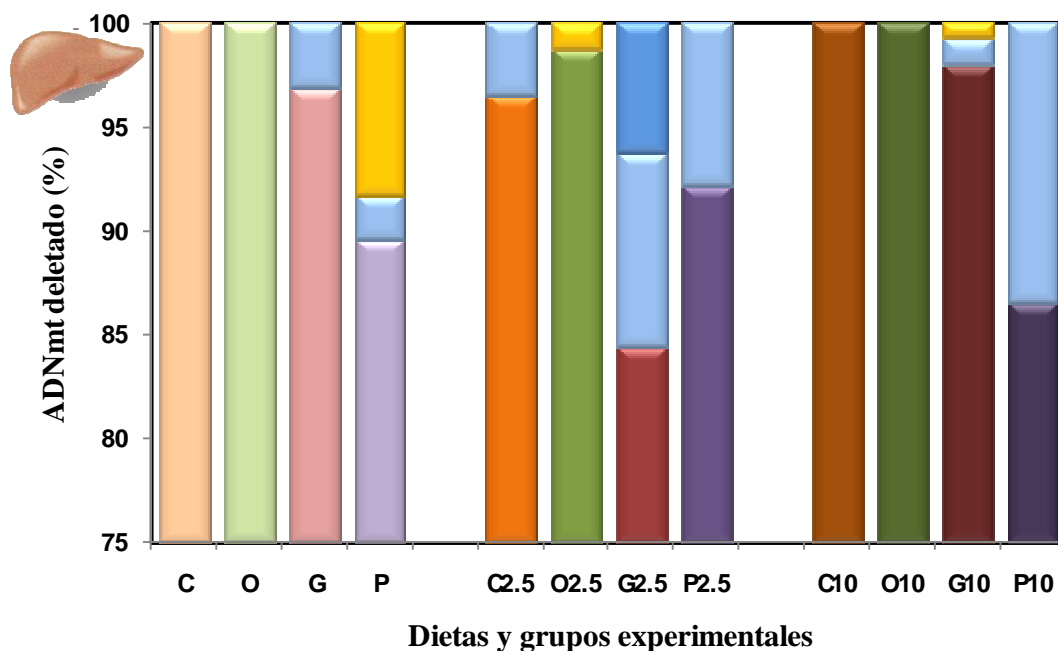


Figura 30. Efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas y la administración intraperitoneal de adriamicina en ratas sobre el nivel de deleciones múltiples del ADNmt de tejido hepático.

7.1.- Número de deleciones del ADNmt en tejido hepático

Los valores correspondientes al número de deleciones en tejido hepático en los animales al sacrificio se muestran en la **figura 31**. Al analizar las diferencias entre diferentes dosis de adriamicina para un mismo tipo de dieta encontramos que sólo el grupo de ratas alimentadas con aceite de girasol ve aumentados los valores de éste parámetro para la dosis 2.5 mg/kg/día haciéndose esta diferencia significativa frente al grupo girasol basal (sin adriamicina).

Al estudiar las diferencias entre distintas dietas para una misma dosis de adriamicina encontramos que para los grupos basales sin adriamicina C₀, O₀, y G₀, no presentaron diferencias entre ellos, pero si con respecto al grupo P₀. Para una dosis de 2.5 mg/Kg/día de adriamicina, se demostró que el número de deleciones era significativamente superior en G_{2.5} frente a C_{2.5}, O_{2.5} y P_{2.5}. Cuando a las ratas se les administro una dosis de adriamicina de 10 mg/kg/día el grupo P₁₀ presentaba diferencias significativas con respecto a C₁₀ y O₁₀.

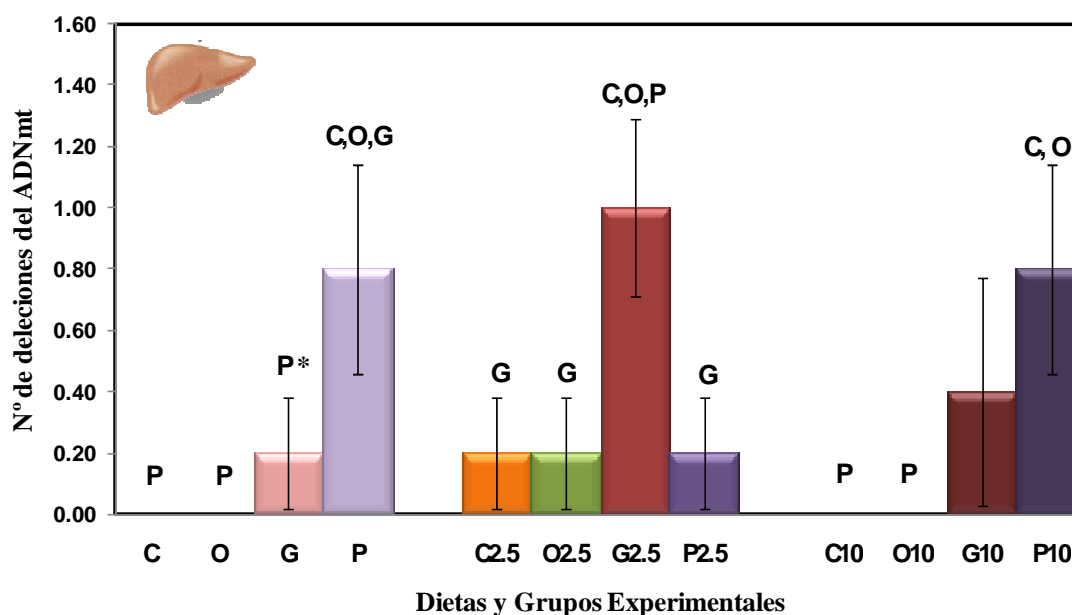


Figura 31. Efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas y la administración intraperitoneal de adriamicina en ratas sobre el número de deleciones del ADNmt de tejido hepático.

7.3.- Contenido de ADNmt en tejido hepático

Los resultados obtenidos en relación al contenido de ADNmt en tejido hepático se muestran en la **figura 32**. Cuando se estudió dicho parámetro para cada una de las

dietas, se observó que en el grupo control las ratas sin adriamicina presentaban un aumento estadísticamente significativo con respecto a C_{2.5}. También el grupo pescado sin adriamicina mostró un contenido de ADNmt mayor, en este caso frente a ambas dosis. Para ningún grupo experimental se observaron diferencias entre dosis de adriamicina

Cuando se compararon grupos alimentados con distintas fuentes grasas e igual dosis de adriamicina entre sí, se comprobó que los grupos sin adriamicina no presentaban diferencias significativas entre ellos. Para la dosis de 2.5 mg/kg/día, G_{2.5} presentó los niveles más elevados de ADNmt haciéndose esta diferencia significativa sólo frente al grupo C_{2.5}. Cuando se incrementó la dosis de adriamicina hasta 10 mg/kg/día, se encontró que el grupo de animales alimentados con aceite de girasol presentaban el contenido de ADNmt más elevado, diferencia significativa únicamente frente al grupo pescado.

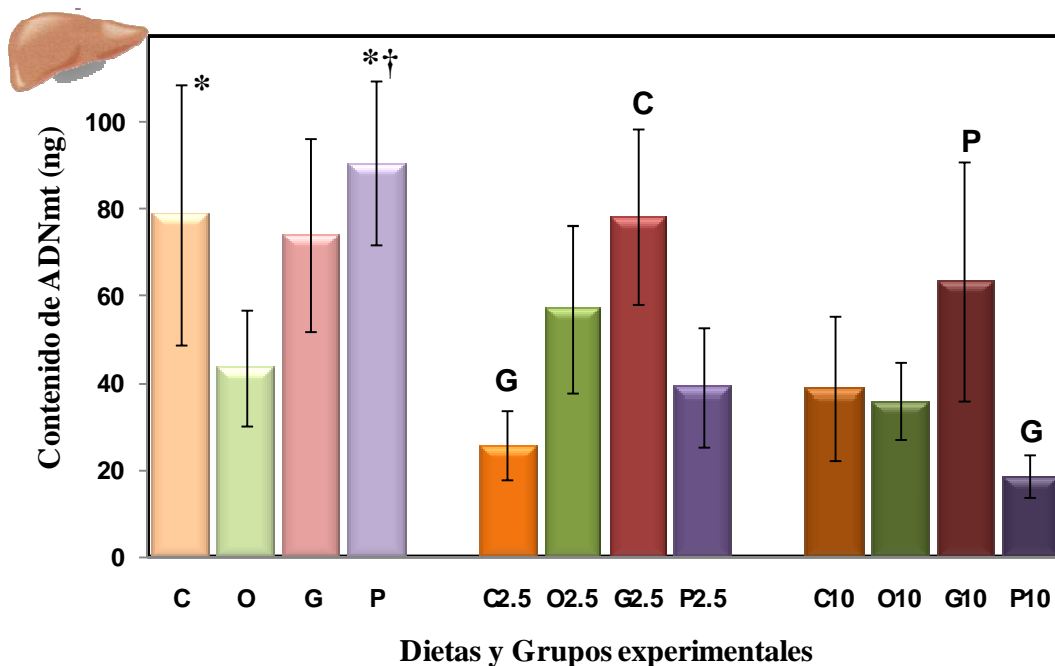


Figura 32. Efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas y la administración intraperitoneal de adriamicina en ratas sobre el contenido de ADNmt de tejido hepático.

8.- COMPLEJO V DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES EN MITOCONDRIA DE HÍGADO

8.1.- Cantidad de ATP sintasa en hígado

Los valores correspondientes a las diferencias en la cantidad de ATP sintasa en mitocondrias de hígado se muestran en la **figura 33**. Como se observa, para un mismo tipo de dieta a distintas dosis de adriamicina ningún grupo mostró diferencias significativas.

Entre los grupos con distintas dietas para la misma dosis de adriamicina sólo encontramos diferencias significativas entre los grupos basales, es decir, aquellos a los que no se les administró dosis de adriamicina. El grupo de animales alimentado con aceite de oliva presentó los valores de cantidad de ATPasa más bajos siendo esta diferencia significativa con respecto a aquellos alimentados con aceite de girasol y pescado, grupos que a su vez no mostraron diferencias significativas entre ellos.

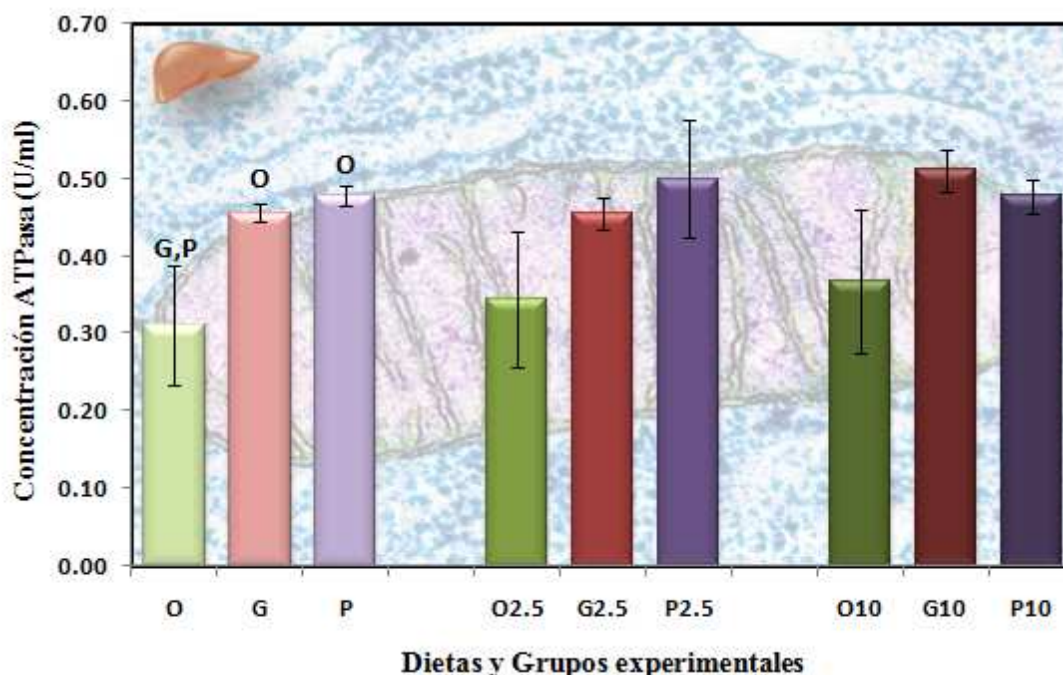


Figura 33. Efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas y la administración intraperitoneal de adriamicina en ratas sobre la concentración enzimática de la ATPasa en mitocondrias de hígado.

8.2.- Actividad de ATP sintasa en hígado

Los valores correspondientes a las diferencias en la actividad de la ATP sintasa en mitocondrias hepáticas se muestran en la **figura 34**. Para un mismo tipo de dieta los

grupos oliva y girasol mostraron diferencias significativas a distintas dosis de adriamicina. Así el grupo O sin adriamicina presentó una mayor actividad ATP sintasa que la del grupo O_{2.5} y O₁₀. En cambio, el grupo G₀ mostró los valores de actividad más bajos respecto a G_{2.5} y G₁₀. En cuanto a las diferencias entre dosis de adriamicina 2.5 y 10 mg/kg/día ni el grupo de animales O_{2.5} ni G_{2.5} presentaron diferencias significativas con respecto a la dosis más elevada. En cambio, en el grupo pescado sí que observamos valores diferentes estadísticamente siendo la dosis 2.5 mg/kg/día la que muestra los valores de actividad más bajos.

Al estudiar las diferencias entre distintas dietas para una misma dosis de adriamicina encontramos que para los grupos basales sin adriamicina el grupo O₀ presentó los valores más elevados con respecto a los grupos G₀ y P₀. Entre los grupos G₀ y P₀ también se dieron diferencias significativas siendo el grupo alimentado con aceite de girasol el que muestra los valores más bajos. Para las dosis 2.5 y 10 mg/kg/día no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales.

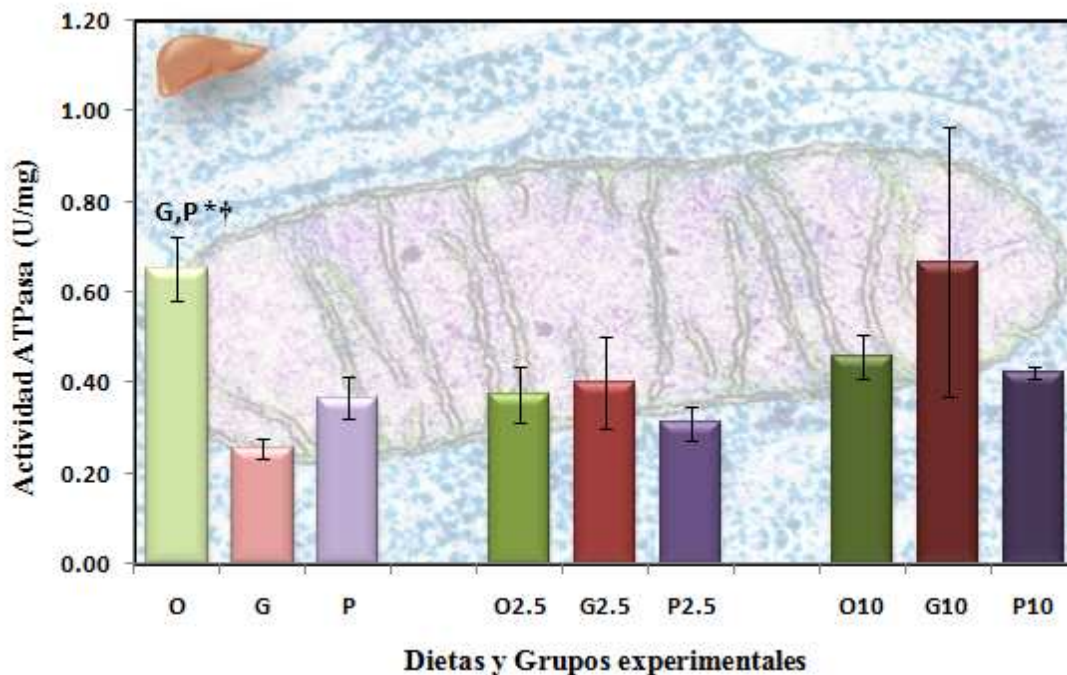


Figura 34. Efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas y la administración intraperitoneal de adriamicina en ratas sobre la actividad de la enzima ATPasa en mitocondrias de hígado.

9.- MORFOLOGÍA MITOCONDRIAL

9.1.-Aspecto general de mitocondrias de hígado

La **figura 35** presenta los resultados del estudio de microscopía electrónica en mitocondrias hepáticas. Se observa como la administración de adriamicina (sólo se presentan datos de los grupos sin adriamicina y con la dosis mayor, ya que ambas dosis de adriamicina han proporcionado resultados similares) genera mitocondrias menos densas (más desorganizadas) que los mismos grupos sin adriamicina. Esto representa una prueba evidente sobre el daño que la adriamicina genera en estos orgánulos. Además, se ve que los grupos sin adriamicina alimentados con aceite de girasol parten de mitocondrias menos funcionales que el resto. El aceite de pescado parece que protege mejor frente a la adriamicina.

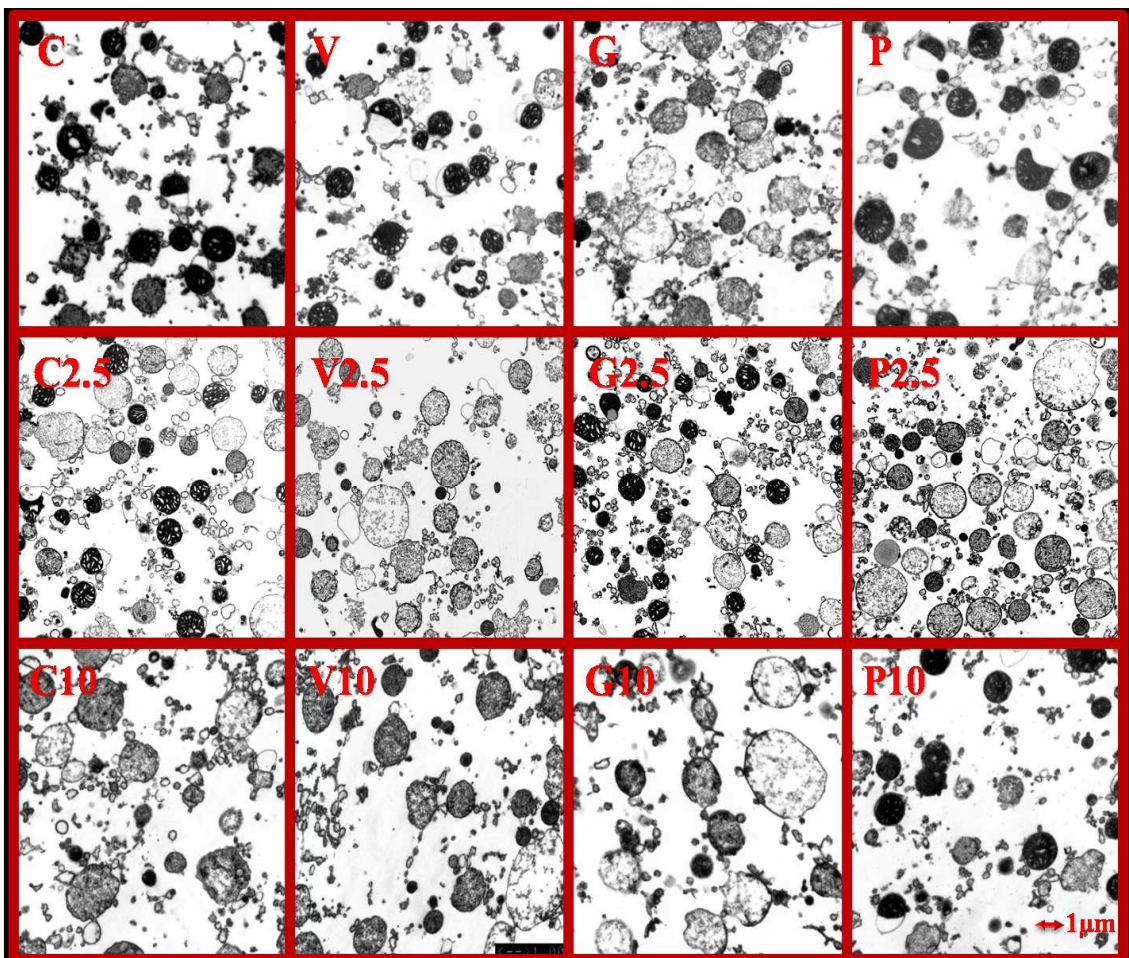


Figura 35: Aspecto general de las mitocondrias de hígado

9.2.-Área de mitocondrias de hígado

Los resultados obtenidos de la medida del área de mitocondrias aisladas de hígado se muestran en la **figura 36**. Cuando se compararon los grupos con y sin adriamicina para un mismo tipo de dieta se encontró que los grupos basales sin adriamicina C_0 , O_0 , G_0 y P_0 presentaron valores de áreas más bajos que sus respectivos grupos a los que se les administró una dosis 2.5 mg/kg/día de adriamicina, $C_{2.5}$, $O_{2.5}$, $G_{2.5}$, $P_{2.5}$ siendo estas diferencias significativas estadísticamente. Sólo los grupos de animales C_0 y O_0 mostraron además diferencias con respecto a C_{10} y O_{10} siendo las áreas de los animales sin adriamicina inferiores a aquellos a los que se les administró la dosis más elevada. En cuanto a las diferencias entre distintas dosis de adriamicina en los grupos alimentados con aceite de oliva y pescado de dosis 2.5 se observaron unos valores superiores significativamente a aquellos alimentados con el mismo tipo de fuente grasa con una dosis 10 mg/kg/día de adriamicina.

Por otro lado, entre los grupos con distinta fuente grasa y sin adriamicina, se observó que los animales del grupo O_0 presentaban valores de áreas significativamente inferiores con respecto a los demás dietas experimentales C_0 , G_0 y P_0 . Además el grupo control también muestra valores inferiores a los dados por el grupo G_0 . Para la dosis de adriamicina de 2.5 mg/kg/día se vio que no existían diferencias estadísticas entre los distintos grupos. Cuando la dosis de adriamicina se aumento hasta 10 mg/kg/día, los animales del grupo P_{10} presentan áreas menores que las halladas para los grupos C_{10} y G_{10} siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

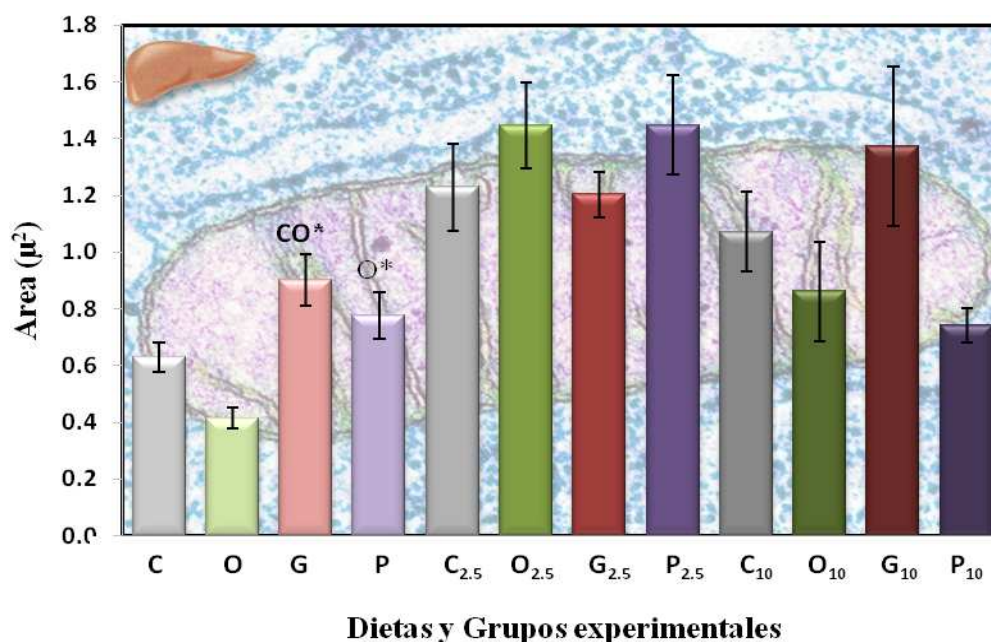


Figura 36. Efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas y la administración intraperitoneal de adriamicina en ratas sobre la densidad integrada de mitocondrias aisladas de hígado.

9.3.-Densidad media de mitocondrias de hígado

Los resultados obtenidos en relación a la densidad media de mitocondrias hepáticas se muestran en la **figura 37**. Al analizar las diferencias entre diferentes dosis de adriamicina para un mismo tipo de dieta encontramos que para el grupo control las ratas sin adriamicina presentaban valores significativamente superiores respecto al grupo C_{2.5}. Estas diferencias también las muestran los animales del grupo O₀ respecto a los de O_{2.5}, y los del grupo G₀ respecto a G_{2.5}. En cambio, en el grupo pescado se observó que el grupo sin adriamicina mostró valores estadísticamente inferiores a P_{2.5}. Además, en los grupos C₀ y O₀ se vieron incrementados valores de densidad óptica media con respecto a C₁₀ y O₁₀. En cambio, para los grupos G₀ y P₀ se mostraron diferencias significativas frente a G₁₀ y P₁₀ siendo los valores de los grupos basales inferiores a la de los grupos a los que se administró una dosis mayor de adriamicina. Por otro lado, en el grupo control los valores de D.O para las dos dosis de adriamicina aumentaron significativamente para la dosis de 10 mg/kg/día con respecto a la de 2.5. Esta diferencia entre dosis de adriamicina se reproduce en las dietas cuya fuente grasa de la dieta es el aceite de girasol y el aceite de pescado. El grupo oliva por su parte no mostró diferencias entre las distintas dosis de adriamicina.

Al estudiar las diferencias entre distintas dietas para una misma dosis de adriamicina encontramos que para los grupos basales sin adriamicina C_0 y O_0 presentaron diferencias significativas con respecto a los grupos G_0 y P_0 siendo los valores de los primeros superiores a los segundos. Para la dosis de adriamicina de 2.5 mg/kg/día, los animales alimentados con aceite de oliva mostraron los valores más altos de D.O seguido de los valores pertenecientes al grupo pescado y éste a su vez del grupo control siendo el grupo de ratas alimentado con aceite de girasol en el que se observaron los niveles más bajos de D.O. Todas estas disminuciones en las densidades ópticas fueron estadísticamente significativas. Cuando se les administró una dosis de adriamicina de 10 mg/kg/día los animales de los grupos C_{10} , O_{10} , y P_{10} presentaron diferencias significativamente superiores frente a valores de densidad óptica del grupo G_{10} . Además entre C_{10} , O_{10} y P_{10} no hubo diferencias.

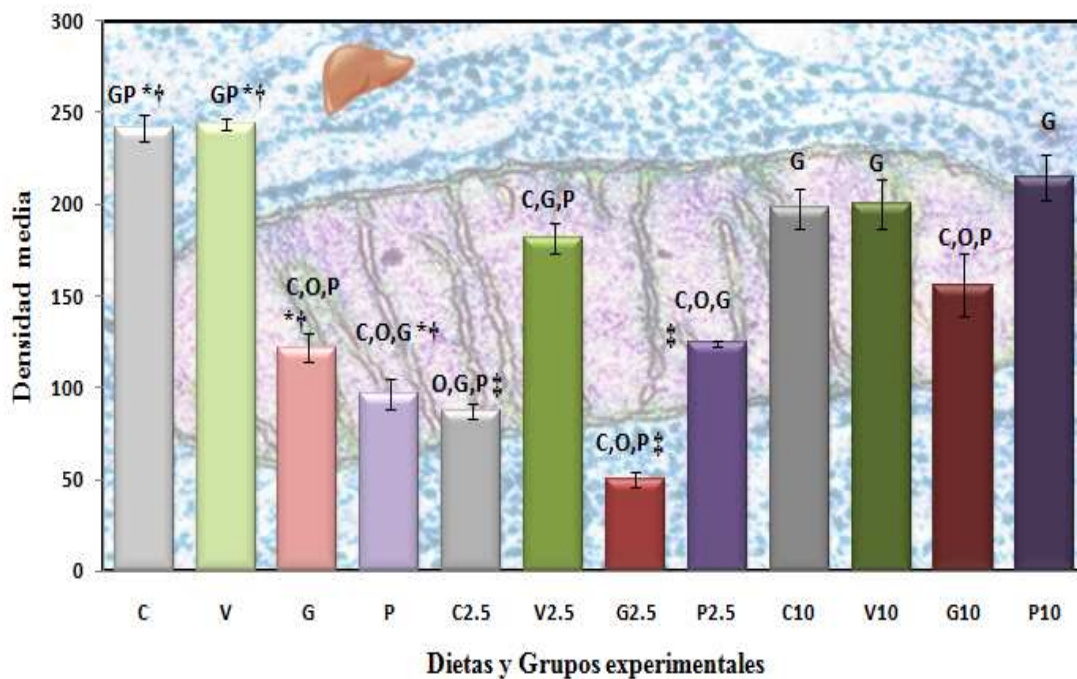


Figura 37. Efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas y la administración intraperitoneal de adriamicina en ratas sobre la densidad media de mitocondrias aisladas de hígado.

9.4.- Circularidad de mitocondrias de hígado

Los valores correspondientes a la circularidad de mitocondrias de hígado se muestran en la **figura 38**. Cuando se estudió la circularidad mitocondrial para cada una de las dietas, se observó que en el grupo control las ratas sin adriamicina presentaban diferencias estadísticamente significativas con respecto a $C_{2.5}$. Esta misma diferencia del

grupo control también se observó en el grupo oliva virgen, girasol y pescado. A su vez el grupo girasol sin adriamicina mostró diferencias significativas frente al grupo de dosis de adriamicina más elevada. Por otro lado, en el grupo control se vio que la circularidad aumentaba cuando se aumentaba la dosis de adriamicina, existiendo así diferencias entre C_{2.5} y C₁₀. Esta diferencia entre dosis de adriamicina también se muestra entre G_{2.5} y G₁₀ y P_{2.5} y P₁₀.

Cuando se compararon entre sí los grupos con distintas dietas e igual dosis de adriamicina, se comprobó que el grupo girasol sin adriamicina mostro los niveles más bajos de circularidad siendo esta diferencia significativa con respecto al resto de grupos C₀, O₀ y P₀. También el grupo control presentó diferencias frente al resto de dietas experimentales G₀, O₀ y P₀. Para la dosis de 2.5 mg/kg/día, O_{2.5} muestra los niveles más elevados de dicha variable. La menor circularidad para esta dosis se observa para G_{2.5}, seguida del grupo C_{2.5} y P_{2.5}. Cuando se incrementó la dosis de adriamicina hasta 10 mg/kg/día, ningún grupo presentaba diferencias significativas frente a los demás.

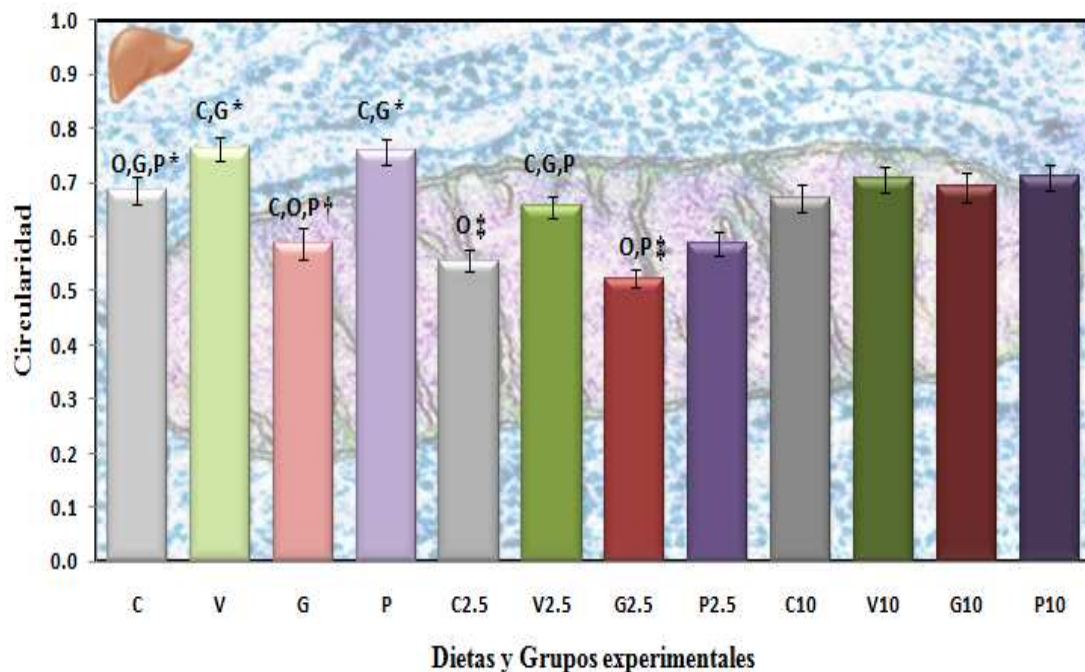


Figura 38. Efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas y la administración intraperitoneal de adriamicina en ratas sobre la circularidad de mitocondrias aisladas de hígado.

10.- POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL Y SWELLING MITOCONDRIAL EN TEJIDO HEPÁTICO

10.1.- Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi$) en hígado

Los valores correspondientes a las diferencias en el potencial de membrana de mitocondrias de hígado se muestran en la **figura 39**. Como se observa, para un mismo tipo de dieta a distintas dosis de adriamicina ningún grupo mostró diferencias significativas.

Entre los grupos con distintas dietas para la misma dosis de adriamicina sólo encontramos diferencias significativas entre los grupos basales, es decir, aquellos a los que no se les administró dosis de adriamicina. El grupo de animales alimentado con aceite de oliva presentó los valores de potencial más altos siendo esta diferencia significativa frente al grupo alimentado con aceite de pescado.

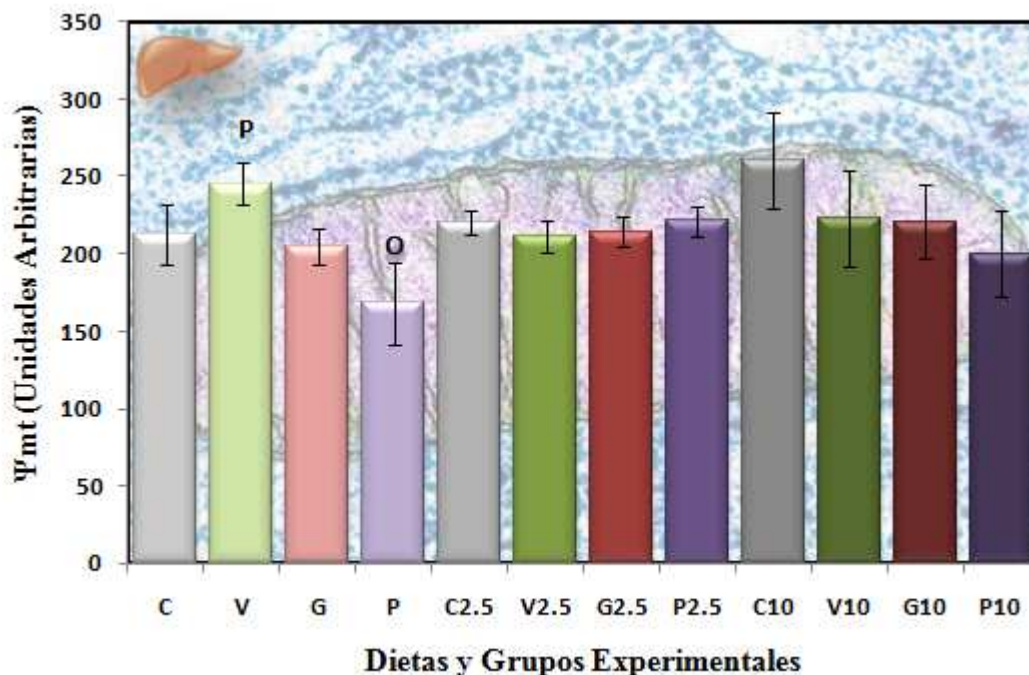


Figura 39: Efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas y la administración intraperitoneal de adriamicina en ratas sobre el potencial de membrana mitocondrial en hígado

10.2.- Swelling en mitocondrias hepáticas

Los valores correspondientes al swelling en mitocondrias hepáticas de los diferentes grupos de estudio se muestran en la **figura 40**. Para un mismo tipo de dieta, los grupos basales sin adriamicina, oliva virgen, girasol y pescado presentaron el mayor $\Delta D.O$, existiendo además diferencias estadísticamente significativas de estos grupos con respecto a sus respectivos grupos cuando se les administran dosis de adriamicina de 2.5 y 10 mg/kg/día. En el grupo basal C se aprecia que la administración de 10 mg/kg/día de adriamicina también provoca un descenso en el swelling mitocondrial. A diferencia de las otras dietas el grupo $C_{2.5}$ presenta diferencias significativas con C_{10} .

Por otra parte, cuando se realizaron comparaciones entre los grupos de animales alimentados con distinta fuente grasa para la misma dosis de adriamicina, se comprobó que para los grupos basales sin adriamicina los mayores $\Delta D.O$ se presentaron en los grupos C, G y P. Hubo diferencias entre estos grupos y el grupo de ratas alimentadas con aceite de oliva virgen. Esto mismo se observó cuando a las ratas se les administró una dosis de adriamicina de 10 mg/kg/día. Cuando a las ratas se les administró una dosis de adriamicina de 2.5 mg/kg/día se observó que el grupo $C_{2.5}$ presentaba diferencias superiores que $O_{2.5}$.

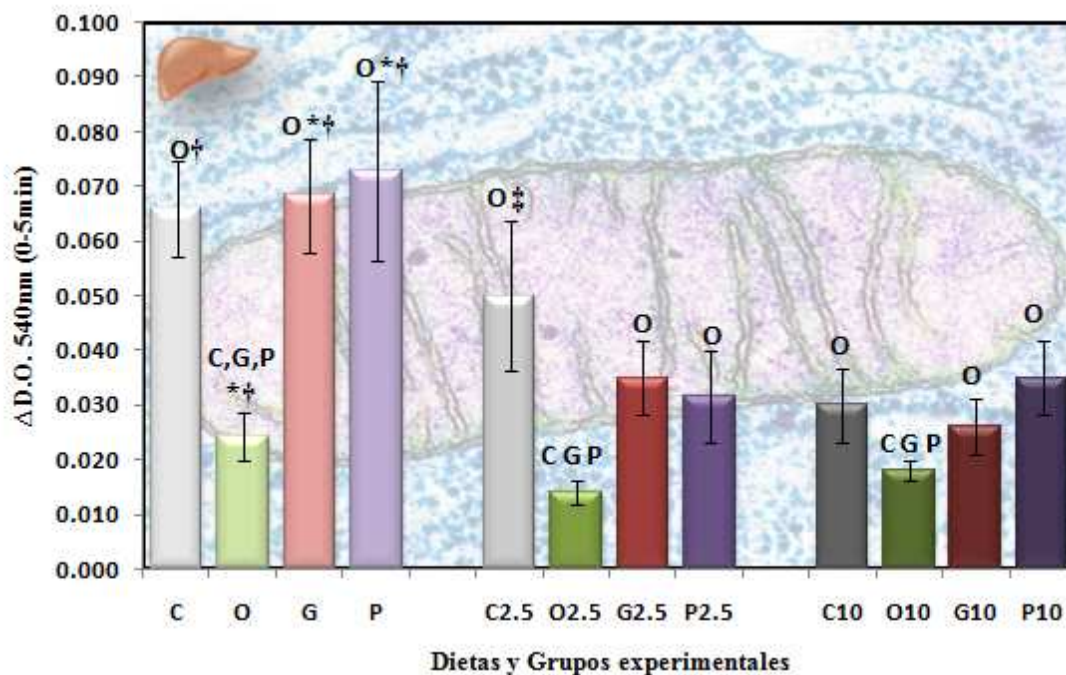


Figura 40. Efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas y la administración intraperitoneal de adriamicina en ratas sobre el hinchamiento de mitocondrias frescas de hígado.

11.- MARCADORES DE APOPTOSIS EN TEJIDO HEPÁTICO

11.1.- Bcl-2

Los valores correspondientes a las diferencias de expresión génica en tejido hepático de Bcl-2 se muestran en la **figura 41**. Los resultados obtenidos muestran que para distintas dosis de adriamicina y un mismo tipo de dieta ningún grupo presenta diferencias significativas.

Por otra parte, entre distintas dietas e igual dosis de adriamicina se observa que sólo hay diferencias significativas para la dosis 2.5 mg/kg/día, donde el grupo oliva muestra los niveles más bajos con respecto a los grupos G y P.

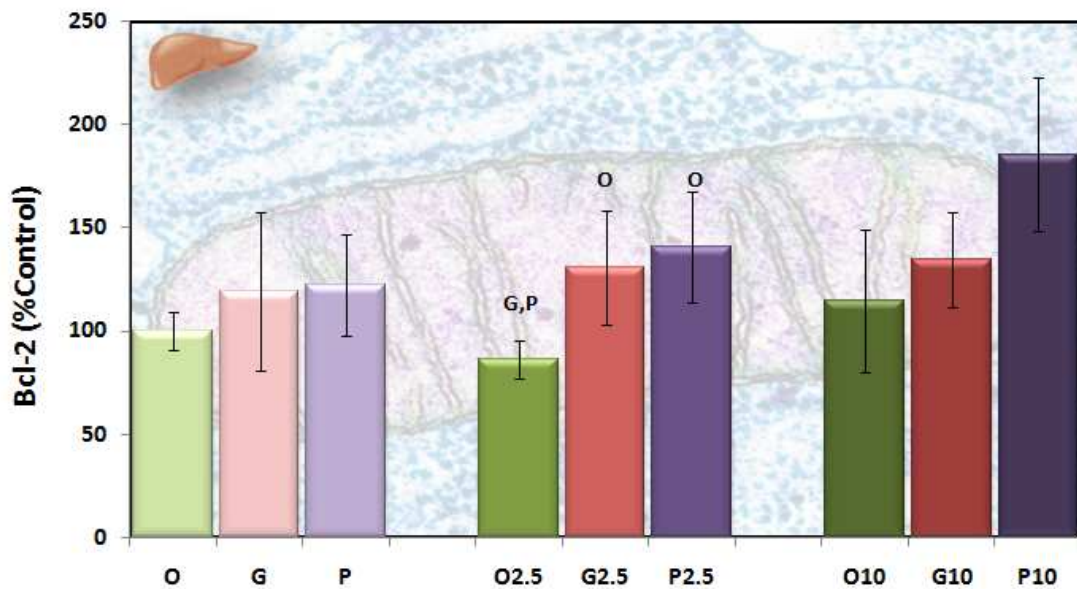


Figura 41: Efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas y la administración intraperitoneal de adriamicina en ratas sobre la expresión génica de Bcl-2 en tejido hepático.

11.2.- Apaf-1

Los valores correspondientes a las diferencias de expresión génica en tejido hepático de Apaf-1 se muestran en la **figura 42**. Para un mismo tipo de dieta no se observó que ningún grupo mostrara diferencias significativas a distintas dosis de adriamicina.

Para los grupos con distintas dietas e igual dosis de adriamicina sólo se presentó diferencia significativa entre los grupos O y G de dosis 10 mg/kg/día siendo el grupo oliva en el que se observaran los valores significativamente superiores respecto al de girasol.

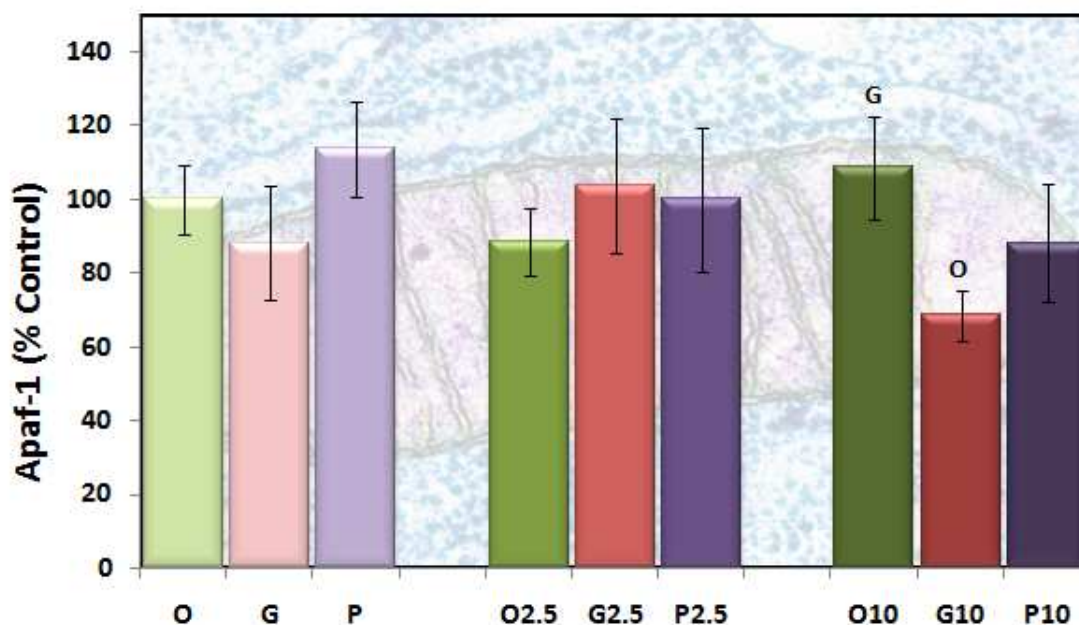


Figura 42: Efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas y la administración intraperitoneal de adriamicina en ratas sobre la expresión génica de Apaf-1 en tejido hepático.

11.3.- Caspasa-3

Los valores correspondientes a las diferencias de expresión génica en tejido hepático de Caspasa-3 se muestran en la **figura 43**. Al analizar las diferencias entre diferentes dosis de adriamicina para un mismo tipo de dieta encontramos que para el grupo oliva las ratas sin adriamicina presentaban valores significativamente inferiores

respecto al grupo O_{2.5}. En cambio, en los grupos G y P se muestran diferencias significativas superiores frente a sus respectivos grupos de dosis 10 mg/kg/día.

Al estudiar las diferencias entre distintas dietas para una misma dosis de adriamicina encontramos que los grupos basales sin adriamicina G₀ y P₀ no presentaron diferencias significativas entre ellos, pero sí P₀ con respecto al grupo O₀. Para una dosis 2.5 mg/kg/día de adriamicina no se observaron diferencias entre grupos. Tampoco para los grupos con dosis 10 mg/Kg/día.

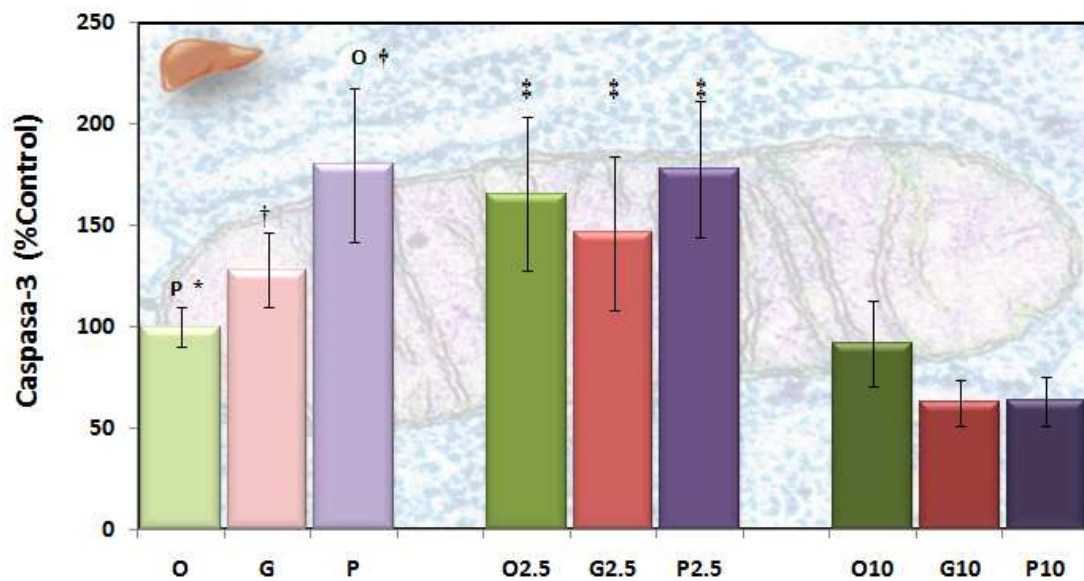


Figura 43: Efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas y la administración intraperitoneal de adriamicina en ratas sobre la expresión génica de Caspasa-3 en tejido hepático.

CAPÍTULO V.-DISCUSIÓN

CAPÍTULO V.- DISCUSIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Los organismos multicelulares están constituidos por un número predeterminado de células, que es característico para cada especie. Ese número resulta de la suma de dos procesos conocidos, (a) la multiplicación celular y (b) la muerte y eliminación de un número igual de células redundantes. El desequilibrio entre estos dos procesos determina efectos que pueden ser letales, ya sea por exceso en la destrucción celular, causa de atrofia de tejidos y órganos o por destrucción defectuosa, causa de hiperplasias o neoplasias. (Vaux DL y colbs., 1999; Vaux DL, 1999; Kroemer G y colbs.,1995). La muerte celular programada es un término funcional, que se usa para definir la muerte celular como parte normal de la vida de los organismos multicelulares. La apoptosis (Kerr, 1972) es un término descriptivo que define un tipo de muerte celular con diversas características morfológicas. (Vaux DL y colbs., 1999; Vaux DL, 1999; Kroemer G y colbs.,1995; Thompsom CB., 1995; Buja LM., 1993; Vaux DL y colbs., 1994; Haecker G y colbs., 1994; Stewart BW y colbs., 1994; Martin SJ y colbs., 1994; Orrenius S., 1995; Bär PR, 1996; Umansky SR., 1996; Samali A y colbs., 1996; Cummings MC y colbs., 1997; Leist M y colbs., 1997). Los términos apoptosis y muerte celular programada han originado controversia y en general, se acepta su sinonimia cuando la muerte celular depende de la intervención de proteasas (caspasas). Sin embargo, se ha demostrado que ciertas formas de apoptosis son independientes de caspasas (Leist, M y colbs., 2001). Recientes estudios han evidenciado que la mitocondria juega un papel importante en ambas formas de apoptosis.

Las mitocondrias juegan un importante papel en la apoptosis y sufren modificaciones importantes durante este proceso (Wallace KB y colbs., 1997; Mignotte B y colbs., 1998; Juin P y colbs., 1998; Bernardi P y colbs., 1999; Kroemer G y colbs., 1997; Karbowski M y colbs., 1999; Kroemer G., 1999). Los siguientes efectos demuestran la importancia de la función mitocondrial en la apoptosis: (a) alteración de la permeabilidad y disipación del potencial de membrana mitocondrial que precede a menudo a otras modificaciones inherentes a la apoptosis (Dubinsky JM y colbs., 1999; Zamzami N y colbs., 1995; Zamzami N y colbs., 1996; Vercesi AE y colbs., 1997; Satoh T y colbs., 1997; Bradham CA y colbs., 1998; Qian T y colbs., 1999); (b) inhibición de la cadena de transporte de electrones (Wolvetang EJ y colbs., 1994; Higuchi M y colbs.,

1998) y de la síntesis de ATP (*Richter C y colbs., 1996*); (c) rotura de las membranas mitocondriales con salida de proteínas solubles tanto las pertenecientes a la matriz mitocondrial como las provenientes del espacio intermembrana, entre las más conocidas el citocromo *c* (*Kantrow SP y colbs., 1997; Cai J y colbs., 1998; Zhivotovsky B y colbs., 1998; Martinou I y colbs., 1999*); (d) acción antiapoptóticas de drogas capaces de estabilizar las membranas mitocondriales (*Xia Z y colbs., 1999; Kagedal K y colbs., 1999*); producción/interacción de especies reactivas del oxígeno (*Boveris A y colbs., 1973; Cadenas E y colbs., 1977; Chance B y colbs., 1979; Giulivi C y colbs., 1995; Tada-Oikawa S y colbs., 1999; Shoji Y y colbs., 1995*) y del nitrógeno (*Poderoso JJ y colbs., 1996; Giulivi C y colbs., 1998*) en las membranas mitocondriales, con acción citotóxica conocida (*Boveris A y colbs., 1973; Cadenas E y colbs., 1977*); (f) acción de la familia de proteínas Bcl-2, que inhiben o activan mecanismos mitocondriales.

Desde los años sesenta, la doxorubicina (Adriamicina; DXR) ha sido uno de los fármacos quimioterápicos más usado en el tratamiento de una amplia variedad de cánceres humanos (*Weiss R.B., 1992*). Desafortunadamente, además de su potente efecto antitumoral, el uso de la DXR está asociado a un número de efectos indeseados, especialmente una cardiotoxicidad severa. Esta complicación representa el mayor obstáculo del uso prolongado de la droga y/o el acúmulo de dosis excediendo los 550 mg/m². (*Basser RL y colbs., 1993; Minotti G y colbs., 2004; Olson RD y colbs., 1990; Singal PK y colbs., 1997*). La DXR ejerce su acción anticancerígena y tóxica por distintos mecanismos; la respuesta anticancerosa está asociada con su intercalación en la cadena de ADN, la inhibición de la topoisomerasa II y la apoptosis, mientras que la toxicidad está principalmente vinculada al estrés oxidativo. Hasta el momento tal separación no está del todo justificada. Parece ser que la respuesta beneficiosa (terapéutica/anticancerígena) y la perjudicial (tóxica) al tratamiento con DXR se superponen, es decir, ambas comparten efectores comunes, tales como el estrés oxidativo, y ambas involucran la apoptosis.

Debido a la amplia utilidad de la doxorubicina en la quimioterapia para el tratamiento de muchos tipos de cáncer, numerosos investigadores tratan de impedir o atenuar los efectos secundarios tóxicos de la administración de la misma. Con este fin, varias estrategias han sido aportadas, incluyendo; optimización de la dosis, síntesis y uso de análogos, y terapia combinada. En relación a la terapia combinada, el método más eficaz ha sido la combinación de la administración de la droga junto con

antioxidantes con el fin de reducir el estrés oxidativo. Durante los últimos 15 años, nuestro grupo de investigación ha estado trabajando en los efectos del aceite de oliva virgen y de los antioxidantes presentes en el mismo (polifenoles, coenzima Q, vitamina E...) en relación con la toxicidad de la adriamicina en ratas. Varios aspectos del metabolismo, en particular aquellos relacionados con la composición mitocondrial, función y generación de radicales libres han sido estudiados en relación a la adriamicina y la ingesta de aceite de oliva virgen u otros tipos de grasas comestibles. Entre otros resultados encontramos que cuando las ratas consumían como fuente grasa aceite de oliva virgen se producían niveles más bajos de peroxidación en mitocondria de hígado y se atenuaban los efectos tóxicos de la droga en varios componentes de la cadena de transporte de electrones. Ha sido ampliamente demostrado que la efectividad del aceite de oliva virgen en la protección de membranas biológicas es mayor que la del aceite de girasol o aceites de semillas. Hecho debido a que el estrés oxidativo está relacionado con la composición lipídica de las membranas biológicas, de modo que una fuente grasa poliinsaturada (aceite de girasol) generará membranas más susceptibles al daño oxidativo que una fuente grasa saturada (grasa animal) o monoinsaturada (aceite de oliva). Para estudiar la importancia relativa de los antioxidantes presentes en el aceite de oliva, comparamos un aceite de oliva refinado bajo en antioxidantes con otro aceite de oliva refinado enriquecido con vitamina E. El aceite de oliva refinado suplementado con vitamina E mejora mucho los efectos de este aceite comestible contra la toxicidad de la adriamicina en ratas. De hecho, los niveles de hidroperóxidos producidos por la adriamicina inyectada intraperitonealmente eran más altos en aceite de oliva refinado que en el aceite de oliva virgen o refinado suplementado con vitamina E.

El objetivo del presente estudio es comprobar si las mitocondrias de tejido hepático enriquecidas de forma fisiológica a través de la grasa dietética en ácido oleico y en antioxidantes (polifenoles, vitamina E...) son menos susceptibles a la peroxidación lipídica y, por tanto, teóricamente, más resistentes al proceso apoptótico inducido por diferentes dosis de doxorubicina que aquellas enriquecidas con ácidos grasos poliinsaturados. Estos resultados podrían ayudar a determinar cómo mediante la intervención dietética (o nutricional) podíamos impedir o atenuar los efectos secundarios tóxicos de la administración de la adriamicina sin interferir en su mecanismo anticanceroso, en un intento de mejora de la calidad de vida de los pacientes sometidos a esta terapia antitumoral.

El presente estudio es novedoso además de lo ya destacado, porque aborda aspectos de la apoptosis desde un punto de vista fisiológico a nivel del hígado, órgano central en el metabolismo y de naturaleza mitótica, es decir, con capacidad de regeneración

2.- ESTUDIO SOBRE LA ADAPTACIÓN DE LOS ANIMALES AL MODELO EXPERIMENTAL: ADAPTACIÓN DE LOS FOSFOLÍPIDOS DE MEMBRANA MITOCONDRIAL AL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LA DIETA

El objetivo fundamental de esta investigación ha consistido en la búsqueda de diferencias, en el caso de que las hubiera, en la modulación de los mecanismos apoptóticos celulares inducidos por distintas dosis de doxorubicina en ratas alimentadas durante un periodo de tiempo de tres meses con fuentes grasas que difieren entre sí en cuanto a su perfil en ácidos grasos, en concreto aceite de oliva, girasol y pescado (Tabla 8).

Ácido graso	Aceite de oliva virgen (g/100g)	Aceite de girasol (g/100g)	Aceite de pescado (g/100)
Ácido oleico (C 18:1n9)	77,7	24,2	15,1
Ácido linoleico (C:18:2n6)	3,2	62,8	2,8
EPA (C20:5n-3)	0,2	0,1	18,6
DHA (C22:6n3)	0,1	0,1	10,5

Tabla 8.- Principales diferencias en cuanto al perfil de ácidos grasos de los aceites experimentales.

Por tanto, se hace necesario comprobar si los animales, y en concreto, las membranas mitocondriales de hígado, se han adaptado a la ingesta de estas fuentes grasas, entendiendo por adaptación la presencia de un perfil lipídico en sus fosfolípidos similar al menos en un cierto grado al de la fuente grasa ingerida. Las relaciones oleico/linoleico (**Tabla 9**) y n6/n3 (**Tabla 10**) son ideales para un estudio de adaptación.

INDICE OLEICO/LINOLEICO		
Grupo	Dieta	Hígado
Control	3,15	1,3
Oliva	24,1	1,7
Girasol	0,4	0,8
Pescado	5,4	1

Tabla 9.- Relación oleico/linoleico en la grasa de la dieta y en membranas mitocondriales de hígado.

El hecho de que el índice oleico/linoleico (**Tabla 9**) sea más elevado en el grupo de animales alimentado con aceite de oliva virgen radica en la mayor proporción de ácido oleico presente en el aceite de oliva en comparación con el contenido del mismo en el aceite de girasol y pescado. Estos datos ponen de manifiesto lo expuesto ampliamente en bibliografía en relación a la capacidad que tienen las membranas celulares de reflejar en sus fosfolípidos el perfil de ácidos grasos de la dieta (*Huertas J y cols., 1991ab; Ramirez-Tortosa MC y cols., 1999; Quiles JL y cols., 1999; 2002a; Battino M y cols., 2002b; Ochoa J y cols., 2002*).

En cuanto a la relación n6/n3, (**Tabla 10**) como se puede observar, la relación más elevada la posee el grupo de animales alimentados con aceite de girasol por ser ésta la fuente grasa con un contenido mayoritario de ácidos grasos n6. Lo contrario ocurre con los animales alimentados con aceite de pescado, donde se muestra el mayor contenido en ácidos grasos poliinsaturados de la serie n3 en los animales alimentados con esta grasa dietética.

INDICE n6/n3		
Grupo	Dieta	Hígado
Control	70	5,1
Oliva	5,5	17,7
Girasol	171	21,5
Pescado	0,3	0,3

Tabla 10.- Relación n6/n3 en la grasa de la dieta y en membranas mitocondriales de hígado.

Estos resultados obtenidos nos permiten afirmar que para este órgano se ha producido una adaptación a la dieta a nivel mitocondrial, premisa necesaria para afrontar el resto de objetivos de esta Tesis Doctoral.

3.- EFECTO DE LA GRASA DE LA DIETA Y LA DOSIS DE ADRIAMICINA SOBRE EL PESO DE LOS ANIMALES Y SOBRE EL PESO DEL HÍGADO

3.1.- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre el peso de los animales

En la **figura 18** se muestra el efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas y la administración intraperitoneal de adriamicina sobre el peso corporal de los animales al sacrificio. Con respecto al efecto de las distintas grasas no se muestran diferencias significativas en esta variable a excepción del grupo control que presenta los valores más bajos frente a los demás grupos experimentales. En anteriores experiencias de nuestro grupo de investigación no se observaron diferencias significativas en el peso de los animales (*Quiles JL y colbs., 1999*). La introducción de un grupo control es un aspecto novedoso de este estudio. La disminución en el peso de los animales alimentados con pienso comercial pensamos que puede ser cuestión de una ingesta inferior por parte de los mismos.

Tal y como se puso de manifiesto en el apartado correspondiente a los resultados, para distintas dosis de adriamicina sólo el grupo control mostró una disminución significativa del peso corporal de los animales. Así, las ratas del grupo control sin adriamicina presentaron mayor peso que las del grupo C_{2.5} y C₁₀. Una posible explicación a este hecho sería que esta disminución fuera una consecuencia de la movilización de las reservas de glucógeno y triglicéridos frente a un ayuno generado por la adriamicina. En relación al efecto de la adriamicina en animales de experimentación sobre la disminución del peso corporal de diferentes órganos debido a la muerte celular apoptótica, en todos los casos los cambios eran observados a partir del cuarto día en adelante de la administración de una única dosis, en el caso de intoxicación aguda (*Yang YM y colbs., 2004*) o en tratamientos crónicos, en casos de intoxicación crónica (*Gurusher S. Panjrath y colb., 2007*). En nuestro estudio el sacrificio tuvo lugar 24-48 horas después de la administración de la droga, siendo ésta la posible razón por la cual el peso de los animales se ve poco influenciado por el tratamiento.

3.2.- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre el peso del hígado

En la **figura 19** se muestra el efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas y la administración intraperitoneal de adriamicina sobre el peso del hígado al sacrificio. Para las diferencias entre grasas, el grupo pescado muestra los pesos de hígado más elevados. Este resultado coincide con una disminución de triglicéridos y colesterol a nivel plasmático. Por tanto, pensamos que el aumento de peso de tejido hepático es una consecuencia de la movilización y el acúmulo de triglicéridos y colesterol en hígado como reserva energética para llevar a cabo mecanismos tanto de dinámica como de reparación de los daños causados por el aumento de peroxidación lipídica que genera la ingesta de este tipo de grasa dietética.

En cuanto al efecto de la adriamicina observamos que la dosis 2.5 mg/kg/día produce una disminución significativa del peso del tejido hepático respecto a los grupos controles. La dosis de 10 mg/kg/día también genera una disminución del peso de este órgano frente a los grupos basales (sin adriamicina), aunque en este caso las diferencias no son significativas. Como veremos más adelante relacionando diferentes parámetros, esta disminución de peso se debe a la respuesta por parte del hígado frente a la toxicidad de la adriamicina. Estos resultados apoyan la hipótesis de una movilización y utilización metabólica de las reservas de glucógeno y triglicéridos consecuencia de variaciones en procesos de obtención de energía y, con el objetivo de hacer frente a los mecanismos de defensa antioxidante y procesos de dinámica mitocondrial. Además del efecto ayuno que genera la adrimicina per sé, el cual se traduce con mayor rapidez a nivel hepático por ser éste el órgano central del metabolismo.

4.- EFECTO DE LA GRASA DE LA DIETA Y LA DOSIS DE ADRIAMICINA SOBRE PARÁMETROS DE BIOQUÍMICA PLASMÁTICA

4.1- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre el contenido de colesterol y triglicéridos totales en plasma

Los valores correspondientes al contenido de colesterol y triglicéridos totales en plasma en función de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina se muestran en las **figuras 20 y 21**. En cuanto a las diferencias entre grasas para los grupos basales (sin adriamicina), observamos que el grupo alimentado con aceite de pescado presenta

valores significativamente más bajos de colesterol y triglicéridos en plasma. Como hemos comentado anteriormente estos resultados pueden ser debidos a la movilización y acúmulo de triglicéridos y colesterol a nivel hepático por efecto de la ingesta de aceite de pescado como fuente grasas, lo que justificaría no sólo la disminución de colesterol y triglicéridos plasmáticos sino también el aumento significativo del peso de este órgano frente a los demás grupos experimentales.

En el estudio del efecto de la adriamicina encontramos que para el colesterol plasmático ambas dosis producen un aumento de los niveles en todos los grupos experimentales respecto a los grupos basales (sin adriamicina). Diversos autores publicaron que la administración de xenobióticos y de diversos fármacos anticancerosos, como la adriamicina y la bleomicina, provocan una hipercolesterolemia en ratas (*Nagaoka, S y cols., 1986*). Además *Nagaoka y colaboradores*. sugirieron que podría deberse principalmente a una inducción de la síntesis hepática de colesterol. Esta hipótesis sobre el aumento de la actividad de la HMG-CoA reductasa tras la administración de adriamicina coincide con nuestros resultados y con resultados de estudios previos de nuestro grupo de investigación. *Huertas J y colaboradores (Huertas J y cols., 1992)* sugirieron que este aumento de colesterol plasmático puede deberse a la movilización de colesterol desde las membranas mitocondriales hacia el plasma como efecto del tratamiento con doxorubicina. En cambio, sobre el nivel de triglicéridos plasmáticos la ADR muestra un efecto contrario, encontrando una disminución significativa en todos los grupos a los que se les administró el quimioterápico respecto a aquellos controles. Tampoco en este parámetro se dan diferencias significativas entre ambas dosis. Este descenso en los niveles de triglicéridos plasmáticos, podría estar relacionado, como hemos comentado anteriormente con la acumulación de triglicéridos hepáticos con el fin de obtener más energía y poder hacer frente a los mecanismos de dinámica mitocondrial y/o de reparación de los daños causados por el aumento de peroxidación generado por el tratamiento con doxorubicina.

4.2- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre los niveles de Creatín Quinasa en plasma.

El efecto de la ingesta de diversas fuentes grasas de la dieta y de la administración intraperitoneal de diferentes dosis de adriamicina sobre los niveles de creatín quinasa en plasma se muestra en la **figura 22**. La creatín quinasa en plasma es

un marcador de daño celular. Entre diferentes grasas para grupos controles (sin adriamicina), comprobamos que el grupo alimentado con aceite de oliva virgen muestra valores significativamente inferiores frente a los demás grupos experimentales, comprobando así que mediante la ingesta de este tipo de grasa se genera un menor daño a nivel celular. Estos resultados muestran el efecto beneficioso del aceite de oliva virgen respecto a las demás grasas de la dieta.

En el estudio de la administración intraperitoneal de adriamicina y según los resultados obtenidos comprobamos el efecto deletéreo de la adriamicina sobre todos los grupos experimentales. También comprobamos que dicho efecto es mayor para la dosis 2.5 mg/Kg/día, resultado que viene a confirmar que la dosis inferior genera mayor daño celular mayor que la dosis 10 mg/Kg/día.

5.- EFECTO DE LA GRASA DE LA DIETA Y DOSIS DE ADRIAMICINA SOBRE PROTEINAS MITOCONDRIALES DE HÍGADO

Los valores de proteína mitocondrial hepática se muestran en la **figura 23**. Con respecto al efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas se observa que el grupo alimentado con aceite de pescado presenta niveles significativamente más elevados de proteína mitocondrial. Una posible explicación a estos resultados sería que la ingestión de ácidos grasos poliinsaturados n3 y adaptación a este perfil de las membranas mitocondriales generan membranas de mayor susceptibilidad a la peroxidación, de esta forma las proteínas mitocondriales están sometidas a un ataque oxidativo mayor por lo que el turnover o recambio proteico se vea aumentado. Los demás grupos no presentan diferencias significativas entre ellos aunque si observamos una tendencia por parte de los grupos oliva y control a mostrar los niveles de proteína mitocondrial más bajos.

En cuanto al efecto de la adriamicina diversos son los estudios que apuntan a la interferencia en la síntesis de proteínas (*Muller I y cols., 1998; Singal PK y cols., 2000; Gewirtz DA y cols., 1999*) y destrucción de las mismas como uno de los mecanismos de toxicidad de la adriamicina. En nuestras condiciones experimentales, el aspecto más evidente a destacar es la disminución significativa en la concentración de proteína mitocondrial en todos los grupos experimentales a la dosis 2.5 mg/Kg/día de adriamicina frente a los grupos basales. Los grupos a los que se les administró una dosis de 10 mg/Kg/día también vieron disminuidos los niveles de dicho parámetro

aunque estas diferencias no fueron significativas. Este resultado aporta una evidencia más de que la dosis 2.5 mg/Kg/día ejerce una acción más potente que la de 10 mg/Kg/día. Además, *Marcillat y colaboradores (Marcillat O. y cols., 1988)* publicaron que un aumento en la concentración de adriamicina en las mismas condiciones experimentales conducía a una disminución de la proteólisis tal y como ocurre en nuestros resultados.

6.- EFECTO DE LA GRASA DE LA DIETA SOBRE LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL DE HÍGADO

6.1.- Efecto de la grasa de la dieta sobre la fracción de ácidos grasos saturados (AGS) en membrana mitocondrial hepática

Los valores correspondientes al contenido en ácidos grasos saturados en membrana mitocondrial hepática se muestran en la **tabla 7**. En general, se observa que aunque la proporción de AGS aportada por las fuentes grasas de la dieta no es alta, el hígado presenta elevadas proporciones de éstos ácidos grasos. Dichos valores porcentuales están entorno a un 40-50% y coinciden con los datos de otros autores en relación a la proporción de AGS en membranas biológicas de rata (*Navarro MD y cols., 1994; Quiles JL y cols., 1999^a; Martín F. 2002*).

Como podemos observar **tabla 7** el tipo de aceite ingerido no fue muy determinante del contenido de ácidos grasos saturados totales, no observándose diferencias significativas entre grupos experimentales respecto a la fracción de AGS.

En cuanto a los ácidos grasos saturados considerados individualmente, se muestra en la **tabla 7**, en ella se puede apreciar que no se presentaron diferencias significativas en el contenido en láurico ni mirístico. En cuanto los niveles de palmítico y esteárico, sólo el grupo control muestra diferencias significativas frente a los demás grupos presentando los niveles más bajos en palmítico y los más altos en esteárico. Ha sido ampliamente demostrado que el ácido graso palmitato (C16:0) está implicado en la inducción de la apoptosis en cultivos celulares de una amplia variedad de tejidos. El mecanismo por el cual el palmitato induce la apoptosis en cardiomiocitos de ratas involucra varios marcadores de muerte celular programada incluyendo translocación de la fosfatidilserina, fragmentación del ADN y activación de la caspasa-3. En concreto, se

ha descrito que en cardiomiocitos el palmitato inducía la apoptosis a través de la modificación de funciones mitocondriales (*Kong JY y cols., 2000*).

6.2.- Efecto de la grasa de la dieta sobre la fracción de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) en membrana mitocondrial hepática

Los valores correspondientes al contenido en ácidos grasos monoinsaturados en membrana mitocondrial hepática se muestran en la **tabla 7**. En conjunto, podemos observar que el grupo de animales alimentados con aceite de pescado presenta un contenido en AGMI menor significativamente al resto de grupos experimentales. Según estudios previos de nuestro grupo de investigación, este resultado puede suponer una desventaja frente a la peroxidación lipídica de las membranas mitocondriales ya que un menor porcentaje en AGMI genera un estado basal más sensible, de mayor susceptibilidad a la acción de los radicales libres generados (*Huertas J y cols., 1999; Ochoa JJ y cols., 2003*).

De forma particular ha sido estudiado el contenido relativo en ácido palmitoleico (C16:1) y en ácido oleico (C18:1) de las membranas mitocondriales de hígado. Es llamativo que los porcentajes en palmitoleico no son inferiores a los hallados en ácido oleico, como se desprende de anteriores estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación (*Ibañez S, 2003*), salvo para el grupo oliva para el cual esta diferencia no es significativa. Para el caso del ácido oleico no se dan diferencias entre grupos a excepción del grupo pescado que muestra niveles significativamente más bajos en este ácido graso. El grupo alimentado con aceite de pescado ingiere predominantemente ácidos grasos de la serie n3. Estos ácidos grasos producen una potente inhibición de la Δ_6 desaturasa que incorpora ácidos grasos de la serie n9, razón por la cual el ácido oleico presenta unos niveles inferiores significativamente en el grupo alimentado con aceite de pescado frente a los demás grupos experimentales.

6.3.- Efecto de la grasa de la dieta sobre la fracción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en membrana mitocondrial hepática

Los ácidos grasos poliinsaturados totales representan conjuntamente el otro gran componente de los ácidos grasos de la membrana mitocondrial hepática, inferiores no obstante a los saturados que constituyen la fracción principal.

La fracción poliinsaturada de la membrana mitocondrial está involucrada en situaciones de estrés oxidativo y apoptosis mitocondrial. Cuanto más insaturada es una membrana, más sensible a la acción perjudicial de los radicales libres y como consecuencia de esto se produce una modificación de sus propiedades fisicoquímicas, alterando la fluidez y por tanto, el ambiente que rodea a las proteínas y a otros componentes de la membrana interna mitocondrial, generadora de la mayor proporción de energía que la célula consume (*Spiteller G., 2001; 2002*). Los PUFA son moléculas que inducen la apoptosis de células HL-60. Esta inducción depende del equilibrio entre el número de dobles enlaces y de la longitud de la cadena de ácidos grasos (*Arica K y colbs., 2001*)

Ha sido ampliamente demostrado que una dieta cuya fuente grasa es el aceite de pescado, rica en ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) es más capaz de iniciar el proceso de apoptosis que aquella combinada con aceite de girasol o semillas, rica en ácido linoleico (18:2n-6). Según *Young Hong Mee y colaboradores.*, el mecanismo que activa la apoptosis se basa en la incorporación de ácidos grasos n3 a los fosfolípidos de las membranas mitocondriales incrementando su susceptibilidad a la peroxidación resultando una disminución de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, liberación del citocromo c al citosol y activación de la caspasa-3. (*Young Hong Mee y colbs., 2002*).

a) PUFA n-6 en membrana mitocondrial hepática

Los valores correspondientes al contenido en ácidos grasos poliinsaturados n-6 en membrana mitocondrial hepática considerados individualmente se muestran en la **tabla 7**. Los valores estadísticamente más elevados en ácidos grasos de la serie n-6, linoleico y araquidónico, lo presenta el grupo de animales alimentados usando como fuente grasa el aceite de girasol, de acuerdo con la ya conocida adaptación de ácidos grasos en tejidos animales como reflejo de los ácidos grasos de las dietas animales (*Huertas J y colbs., 1991; Conroy DM y colbs., 1986; Holmes RP y colbs., 1985*)

b) PUFA n-3 en membrana mitocondrial hepática

Los valores correspondientes al contenido en ácidos grasos poliinsaturados n-3 en membrana mitocondrial hepática considerados individualmente se muestran en la **tabla 7**. El aceite de pescado está altamente enriquecido principalmente en dos ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de la serie n3, EPA y DHA, razón por la cual los valores más elevados en éstos ácidos grasos, lo presentan las mitocondrias del grupo de animales alimentados usando como fuente grasa el aceite de pescado. El EPA y DHA incorporados a los fosfolípidos de las membranas mitocondriales tienen efectos en la composición y función de las membranas (*Hong MY y cols., 2002*), producción de ROS (*Hong MY y cols., 2002; Watkins SM y cols., 1998*), oxidación lipídica de las membranas (*Hawkins RA y cols., 1998*), y apoptosis (*Chang WC y cols., 1997*). Numerosas evidencias sugieren que el estrés oxidativo, en particular la oxidación lipídica de la membrana, puede modular la apoptosis en células enriquecidas con PUFA n3 (*Yeevoon Ng y cols., 2005*).

6.4.-Efecto de la grasa de la dieta sobre la relación ácidos grasos monoinsaturados/ácidos grasos poliinsaturados (AGMI/AGPI) en membrana mitocondrial hepática

Los valores correspondientes a la relación AGMI/AGPI en membrana mitocondrial hepática se muestran en la **tabla 7**. La relación AGMI/AGPI más elevada se observa en los grupos experimentales control y oliva virgen presentando diferencias significativas con respecto a los grupos girasol y pescado en los cuales la relación va disminuyendo significativamente, siendo, el grupo pescado el que muestra la relación más baja. Estos resultados están de acuerdo con lo esperado, aquellos grupos de animales alimentados utilizando como fuente grasa el aceite de oliva acumulan en sus membranas mitocondriales un mayor contenido en AGMI, hecho que contribuye al aumento en la relación AGMI/AGPI. En cambio, las membranas mitocondriales de los animales alimentados con grasa de pescado presentan mayores cantidades de ácidos grasos poliinsaturados siendo la relación AGMI/AGPI la más baja de todos los grupos experimentales.

6.5.- Efecto de la grasa de la dieta sobre el índice de insaturación e índice de peroxidación en membrana mitocondrial hepática

Estos índice son indicativos de la mayor o menor susceptibilidad de las membranas a sufrir daño oxidativo.

Los valores correspondientes al índice de insaturación y peroxidación en membrana mitocondrial hepática se muestran en la **tabla 7**. El grupo pescado presenta valores significativamente más elevados de ambos índices; insaturación y peroxidación, lo cual está justificado debido a que el aceite de pescado posee gran contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) que contienen un alto grado de insaturación (EPA y DHA) y altamente peroxidables (*Gotto AM., 1998; Gardner HW., 1989; Sugihara N y colbs., 1994; Allard JP y colbs., 1997; Palozza P y colbs., 1996*). Aunque hay numerosos estudios que describen una relación entre peroxidación lipídica y apoptosis, la vía específica por la cual la peroxidación conduce a la apoptosis parece ser elucidada. En un estudio realizado por *Hawkins RA y colaboradores (Hawkins RA y colbs., 1998)* se estableció una correlación positiva entre el número de dobles enlaces en los ácidos grasos, su incrementada susceptibilidad a la peroxidación lipídica y su potencial para la inducción de la apoptosis.

En cambio, el grupo oliva junto con el control presenta el índice de insaturación más bajo, ya que el aceite de oliva posee menor grado de insaturación que aceites de girasol y pescado. Entre los grupos control, oliva virgen y girasol no se presentan diferencias significativas en cuanto al índice de peroxidación. Este hecho es llamativo para el grupo oliva, en el cual este índice teóricamente debería ser inferior al del grupo girasol. La justificación puede ser debida a que, como se puede observar en la **tabla 7**, el grupo oliva posee un mayor contenido de ácidos grasos n3 (EPA y sobre todo DHA) que el grupo girasol, lo que puede contribuir al aumento del índice de peroxidabilidad de este grupo que “a priori” y teóricamente sería menor.

7.- EFECTO DE LA GRASA DE LA DIETA Y LA DOSIS DE ADRIAMICINA SOBRE PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN MEMBRANA MITOCONDRIAL DE HÍGADO: HIDROPERÓXIDOS y TBARS

Como se ha indicado repetidamente, se ha observado que los perfiles lipídicos de la membrana mitocondrial generados tras la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados son

más susceptibles a la peroxidación lipídica que los generados mediante el consumo preferente de ácidos grasos monoinsaturados. Esta susceptibilidad a la peroxidación tiene como consecuencia la modificación en las propiedades de las membranas que los contienen y de las proteínas integradas en ellas, entrando en un círculo vicioso de generación de radicales libres y alteración de la función mitocondrial, hecho que conlleva al declive en la capacidad de obtención de energía por la principal fuente de suministro de la célula como es la mitocondria y en última instancia a la muerte de la célula (Huertas JR y cols., 1991; Mataix J y cols., 1998).

Para estimar el grado de peroxidación de las membranas mitocondriales hepáticas se han empleado en el presente estudio dos parámetros: La determinación de hidroperóxidos lipídicos, que son los productos iniciales de la oxidación de ácidos grasos fosfolipídicos (Teoh CY y Davies KJA; 2003) y la medición de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), marcador de la fase terminal de la cadena de peroxidación lipídica (Quiles JL., 1995).

Las dietas experimentales control, oliva y girasol generan los mismos niveles de hidroperóxidos en las membranas mitocondriales hepáticas, mientras que la dieta con grasa de pescado es la que produce mayor cantidad de estos compuestos iniciales en la cadena de peroxidación lipídica, alcanzando valores de 22 mmol/mg. Este incremento significativo es lógico y atribuible a que la grasa de pescado determina membranas mitocondriales con mayor grado de insaturación, de hecho en estas mitocondrias, existen 10 ácidos grasos poliinsaturados por cada monoinsaturado, lo que determina unas membranas con alta densidad de dobles enlaces, que son los puntos de actuación de las especies reactivas derivadas del oxígeno, y acentuado por el elevado contenido de ácidos grasos n3 de larga cadena. En nuestro estudio, sin embargo, la dieta con la fuente grasa girasol, no genera más cantidad de hidroperóxidos en mitocondrias hepáticas que las dietas control y oliva virgen. Ello se podría deber a que en estas mitocondrias, la relación monoinsaturados:poliinsaturados es de 0.55, valor intermedio entre lo observado en membranas del grupo pescado (0.11) y lo observado en los grupos oliva y control, cuyo índice es superior (0.98 y 1.00 respectivamente). En mitocondrias hepáticas del grupo girasol, por tanto, existirían dos ácidos grasos poliinsaturados por cada monoinsaturado, por lo que la probabilidad de que sus ácidos grasos se peroxidan es netamente inferior a lo que ocurre con la dieta pescado y algo superior a las dietas

control y oliva virgen, en cuyas membranas la proporción ácidos grasos monoinsaturados:poliinsaturados sería de 1:1. En estas condiciones, el sistema de eliminación de hidroperóxidos en mitocondrias hepáticas, a cargo del doble sistema enzimático, Glutación peroxidasa y Glutación S-Transferasa sería (**figura 45**) más eficiente en los grupos control, oliva virgen y girasol que en el de pescado.

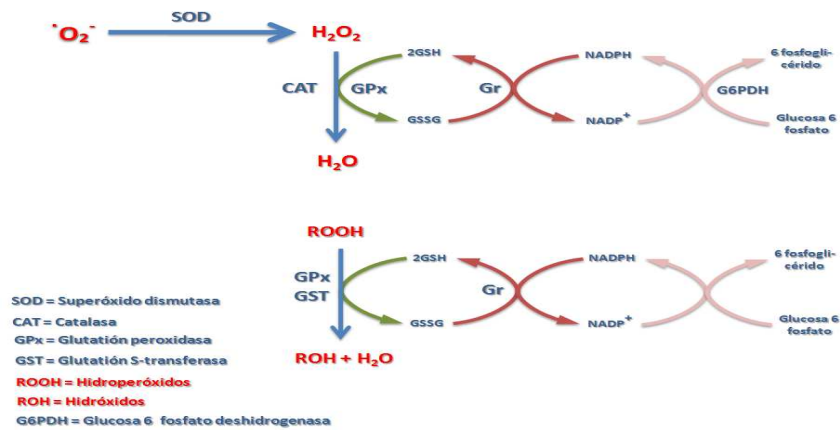


Figura 45: Sistema de eliminación de hidroperóxidos en mitocondrias hepáticas

Esta hipótesis, estaría también abalada por el menor contenido de a-tocoferol (**figura 26**) en las mitocondrias, como consecuencia de su mayor actuación.

Por otra parte, los valores observados de TBARS, uno de los productos finales de la peroxidación lipídica, demuestran que son las dietas girasol y pescado las que generan un mayor estrés peroxidativo, resultados que están de acuerdo con lo demostrado por *Huertas y colaboradores (Huertas y cols., 1991)* en un diseño experimental similar al nuestro, si bien estos autores expresaron este marcador de peroxidación en función de gramos de tejido fresco. Cuando nosotros hacemos esta transformación observamos una total coincidencia en los resultados obtenidos. El MDA, es una molécula que se genera con mayor facilidad a partir de peróxidos cíclicos, los cuales a su vez, se producen a partir de la peroxidación de ácidos grasos que como mínimo han de tener dos dobles enlaces. Por ello deberíamos de haber esperado mayor producción de TBARS en las membranas mitocondriales del grupo pescado lo que probablemente no se produce porque el sistema enzimático en hepatocitos responsable de la eliminación de MDA es muy eficiente o bien porque una mayor parte de hidroperóxidos se habrían derivado hacia la potenciación del ciclo en cascada de peroxidación lipídica.

Estos resultados apoyan la idea de que la fuente grasa poliinsaturada genera un mayor estrés peroxidativo que la fuente grasa monoinsaturada (*Quiles JL y cols., 1995; Mataix y cols., 1998*) siendo el grupo pescado el que muestra los niveles más elevados de hidroperóxidos y TBARS junto con el aceite de girasol. En cambio, el grupo oliva virgen presenta valores inferiores a los demás grupos experimentales resultado que está de acuerdo con estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación (*Huertas J y cols., 1992; Quiles JL y cols., 1999*).

Cuando sobre el estrés peroxidativo crónico, generado por el grado de insaturación de la grasa de la dieta, aplicamos un fuerte estrés agudo por la inyección intraperitoneal de adriamicina, a las 48 y 24 horas previas al sacrificio de los animales de experimentación, observamos que los valores de hidroperóxidos generados en mitocondrias, difieren en función de la grasa de la dieta y de la dosis de adriamicina aplicada. Es la dosis intermedia, 2.5 mg/kg/día, la que genera mayor cantidad de hidroperóxidos en los grupos control, oliva virgen y girasol, si bien, los valores obtenidos con los grupos control y pescado no difieren de lo observado con las dietas experimentales sin adriamicina. Además, la dosis de 10 mg/kg/día, genera menos hidroperóxidos, en todos los grupos experimentales, frente a sus respectivos grupos sin adriamicina. Este comportamiento, “a priori” tan contradictorio, podría estar relacionado con procesos de mitoptosis y apoptosis de las células hepáticas. Probablemente, la adriamicina ha inducido un estrés oxidativo responsable del establecimiento de mecanismos mitoptóticos y/o apoptóticos dependientes de la dosis administrada. La dosis de 10 mg/kg/día, podría haber determinado la eliminación de gran cantidad de mitocondrias y células hepáticas de tal forma, que los valores de hidroperóxidos, reflejarían el estatus oxidativo de células de nueva formación, en las que los mecanismos de defensa primarios habrían sido inducidos y por tanto serían más eficientes en su acción enzimática. En este sentido, está bien demostrado que el hígado, órgano mitótico, presenta una gran capacidad de regeneración. Además la adriamicina, tal y como se argumenta en la introducción bibliográfica, es un fármaco con elevada capacidad apoptótica.

La doxorubicina, antraciclina aminoglucósido, muestra un amplio espectro de actividad antitumoral, atribuida principalmente a que muestran una alta afinidad hacia el ADN y ARN (*Goldman R. y cols., 1978*) así como una elevada toxicidad causada por la peroxidación lipídica. De hecho, la mayoría de los estudios sobre los efectos

cardiotóxicos de las antraciclinas apuntan a la membrana mitocondrial, como el blanco principal de la toxicidad celular. En este sentido, *Singal y colaboradores (Singal y cols., 1986)* ya apuntaron que la adriamicina, a dosis elevadas induce swelling y lisis mitocondrial, rotura de criptas y formación de cuerpos intramitocondriales densos en Ca_2^+ . Estos efectos mitocondriales se ven acentuados porque estas organelas celulares son las únicas estructuras celulares que contienen cardiolipina y la afinidad de la adriamicina por la cardiolipina es alrededor de 80 veces mayor que por otros fosfolípidos (*Goormaghtigh E y cols., 1986*).

Los valores obtenidos de TBARS, con ambas dosis podrían ratificar la hipótesis anterior. Este marcador de peroxidación lipídica final, incrementa muy significativamente con respecto a las dietas sin adriamicina en todos los grupos experimentales, sobre todo cuando el contenido de la grasa de la dieta es oliva virgen, girasol y pescado a dosis de adriamicina de 2.5 mg/kg/día. Estos resultados estarían de acuerdo, con que esta dosis generaría suficiente estrés peroxidativo como para que se hayan iniciado procesos de mitoptosis mitocondrial y en menor medida los de apoptosis celular. Sin embargo, con una dosis cuatro veces superior de esta droga (10 mg/kg/día) habría habido un predominio de los mecanismos apoptóticos sobre los de mitoptosis, lo que justificaría que los valores de TBARS fuesen significativamente más bajos en todas las dietas experimentales, con respecto la dosis inferior, aunque ligeramente más elevados a sus respectivos controles. Esta argumentación, estaría justificada por el descenso en el peso de hígado de los animales de experimentación de todas las dietas experimentales con la dosis baja de adriamicina así como la recuperación parcial con la dosis elevada. Asimismo, los valores de proteína mitocondrial siguen esta misma pauta, lo que nos indica que la adriamicina genera una importante población de mitocondrias, más acentuada con la dosis de 2.5 mg/kg/día.

8.- EFECTO DE LA GRASA DE LA DIETA Y LA DOSIS DE ADRIAMICINA SOBRE EL CONTENIDO MITOCONDRIAL EN MOLÉCULAS ANTIOXIDANTES EN HÍGADO: α -TOCOFEROL Y COENZIMA Q

8.1- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre el contenido mitocondrial en α -tocoferol en hígado.

El contenido mitocondrial de α -tocoferol en hígado muestra valores muy dispares en función de la grasa de la dieta. La dieta experimental control es la que induce menor contenido de este antioxidante (0.059 $\mu\text{g}/\text{mg}$) frente a las dietas oliva virgen y girasol (0.4847 $\mu\text{g}/\text{mg}$ y 0.5091 $\mu\text{g}/\text{mg}$), mientras que la dieta con pescado determina valores intermedios (0.2703 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Estas diferencias no dependen del aporte dietético de este antioxidante, puesto que como mostramos en la **tabla 11**, la dieta de pescado y la control son las que aportan mayor y menor contenido de α -tocoferol respectivamente, mientras que oliva virgen y girasol aportan valores intermedios.

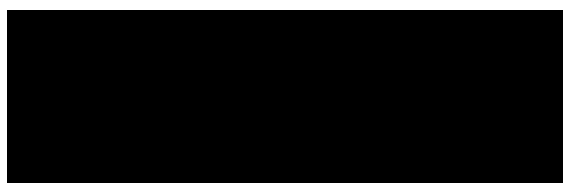


Tabla 11: Contenido de α -tocoferol en las dietas experimentales del estudio

Probablemente, el contenido de α -tocoferol, de las membranas mitocondriales sea más dependiente del grado de peroxidación lipídica crónico, determinado por el perfil de ácidos grasos mitocondriales como consecuencia de la adaptación a las respectivas fuentes grasas, aunque esta hipótesis tampoco explicaría completamente el contenido mitocondrial de este antioxidante. En este sentido, nuestros estudios precedentes con las mismas fuentes grasas, demuestran que el contenido de α -tocoferol en membranas, cuando el estrés oxidativo es crónico y de baja intensidad, suele mostrar una relación inversa con los productos de peroxidación lipídica. Es decir, cuanto más estrés peroxidativo, menor contenido de antioxidantes en membranas, como consecuencia de su acción/recambio y a pesar de la movilización del pool plasmático del correspondiente antioxidante hacia las membranas celulares. En nuestro estudio, tal y como se muestra en la **figura 46**, existe una tendencia a mantener mayores concentraciones de α -tocoferol en membranas mitocondriales a medida que mayor es la producción de hidroperóxidos, y esta correlación es mayor en las dietas experimentales oliva y girasol, mientras que es menor en pescado e inexistente con la dieta control. Esto pone de manifiesto que este antioxidante funciona de forma apropiada con las dos primeras dietas experimentales, mientras que con la de pescado y sobre todo con la dieta control, se produce cierta limitación en el mantenimiento del pool requerido en membranas mitocondriales para este antioxidante. Es decir, con la dieta girasol, no es el α -tocoferol

el factor limitante, podrían ser otros antioxidantes, y si lo sería con la dieta experimental pescado, con la que la elevada actuación antioxidante impide un apropiado recambio del a-tocoferol.

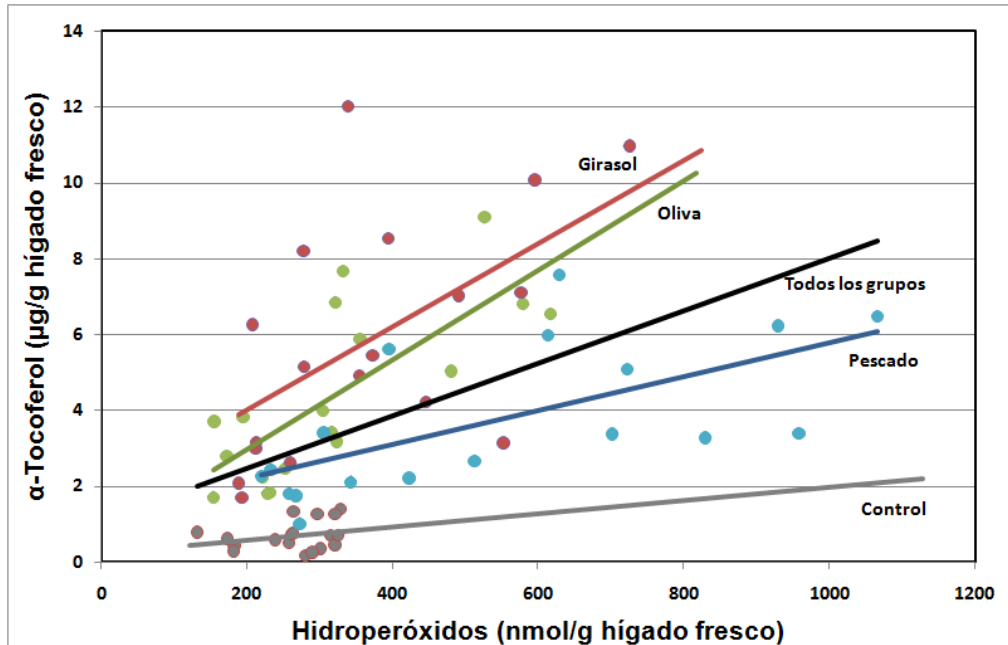


Figura 46: Correlación entre a-tocoferol e hidroperóxidos en peso de hígado fresco

Según este argumento, sería difícil explicar los valores obtenidos en el grupo control porque se deberían de esperar mayores valores de a-tocoferol, dada la baja concentración de hidroperóxidos y TBARS que genera. Probablemente, para esta dieta podría prevalecer más el aporte dietético de este antioxidante, de hecho es la que menor contenido dietético aporta, sin descartar otros factores como son el contenido y actividad del conjunto de antioxidantes celulares. Otra posible explicación, en el caso de la dieta control, es que ésta genere membranas con mayor contenido de ácidos grasos saturados, es decir, los animales alimentados con una dieta control generen membranas con una relación ácidos grasos: proteína muy alta y además con un II similar al de pescado. Otra posibilidad es que esta dieta experimental genere una mayor tasa de recambio y regeneración celular junto al menor aporte dietético de a-tocoferol.

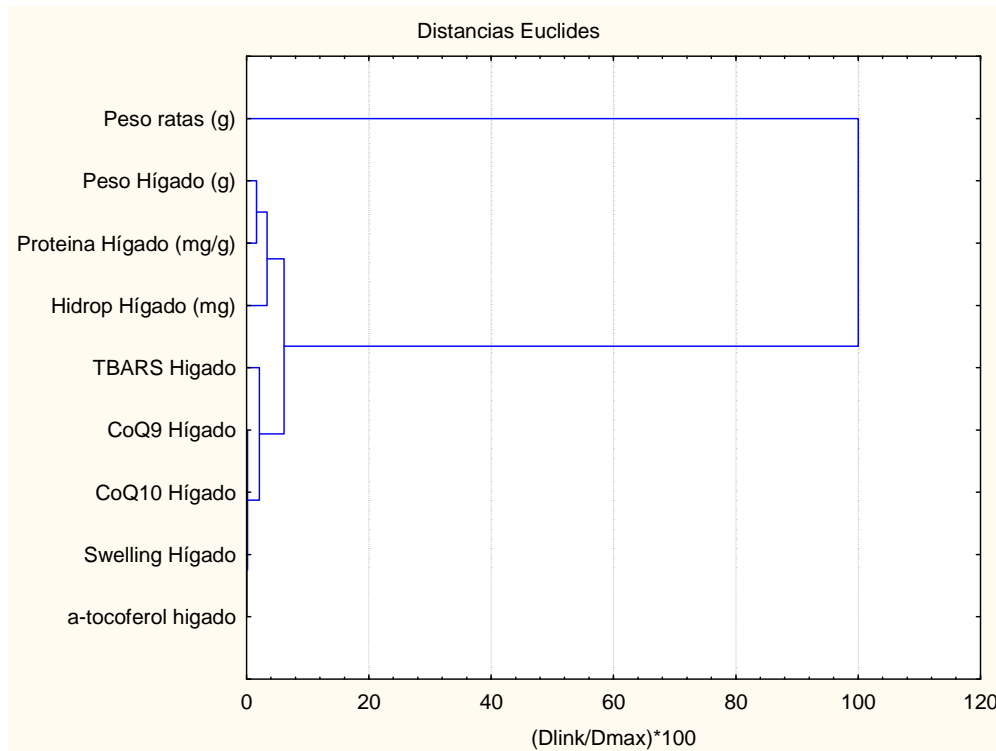


Figura 47:

Cuando inducimos un estrés oxidativo agudo con dosis de adriamicina de 2.5 y 10 mg/kg a las 24h y 48h antes del sacrificio, disminuye el contenido mitocondrial de α -tocoferol en todos los grupos experimentales y de forma más acentuada con la dosis más elevada. Estos resultados pueden ser explicados mediante la función *scavenger* del α -tocoferol. Sabiendo que la distribución de vitamina E se haya próxima de los AG poliinsaturados (Gómez-Fernández y cols. 1989) y que la adriamicina produce peroxidación lipídica como mecanismo de toxicidad podemos explicar estas disminuciones en los niveles de antioxidante como un efecto neutralizador de radicales libres. El α -tocoferol rompe la reacción en cadena de peroxidación lipídica debido a que los radicales peroxilo reaccionan con el α -tocoferol el doble de rápido que con otros lípidos. Esta hipótesis explicaría los resultados obtenidos de TBARS e hidroperóxidos, donde observamos que la dosis de adriamicina de 10 mg/kg/día presenta los niveles más bajos de α -tocoferol, así como de hidroperóxidos. En cualquier caso, el descenso del α -tocoferol vendría determinado por su acción *scavenger* y por la dificultad del mantenimiento del pool reducido de este antioxidante por el ácido ascórbico, coenzima Q y glutatión peroxidasa, entre otros, mecanismos que verían mermada su acción. Serían las dietas experimentales oliva virgen y girasol, al tener mayor capacidad de

movilizar este antioxidante desde el pool plasmático a membranas celulares, las que presentaría mayor capacidad en la actuación de esta molécula.

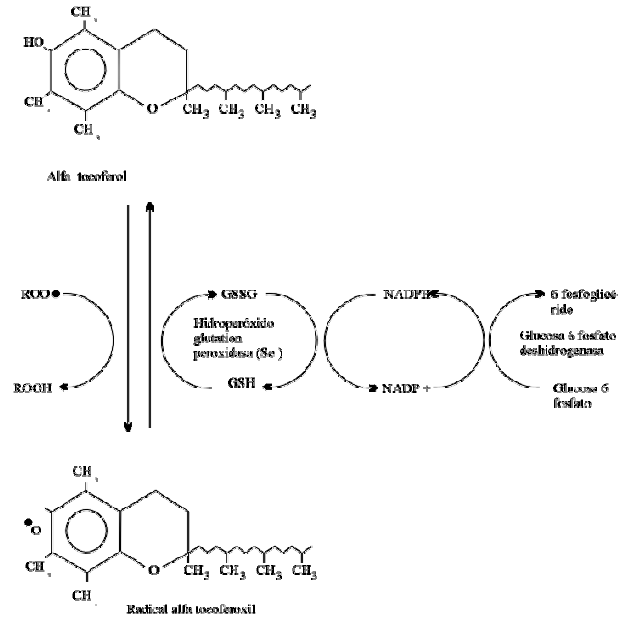


Figura 48: función *scavenger* de la molécula α -tocoferol

8.2- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre el contenido mitocondrial de coenzima Q en hígado.

El contenido de coenzima Q en mitocondrias como se muestra en la **figura 29** es dependiente de numerosos factores, todos ellos relacionados con su función. Por un lado, es un elemento clave en el sistema de transporte de electrones mitocondrial, su función principal, en donde mantiene una estequiometría de 10:1 con respecto a los complejos multienzimáticos (complejos I, II y iV), llegando en algunas situaciones a convertirse en un cuello de botella y limitar la función mitocondrial. Por otra parte, puede actuar como antioxidante, lo que explica su amplia distribución en membranas subcelulares y por último también tiene una función de regeneración de antioxidantes como el alfa-tocoferol.

La concentración de Coenzima Q en mitocondrias de hígado de ratas puede variar en función del estado nutricional y/o de las condiciones ambientales del animal. Huertas y colaboradores (1991) en un estudio similar al nuestro observó que el

contenido mitocondrial de coenzima dependía del grado de insaturación de la grasa dietética. Cuando la grasa era poliinsaturada (aceite de maíz), los valores de Q₉ eran el doble con respecto a una dieta con grasa monoinsaturada (aceite de oliva virgen). En general, observaron un incremento de Q₉ dependiente del grado de peroxidación lipídica inducido por la grasa de la dieta. En nuestro estudio experimental, también observamos una concentración de CoQ dependiente del grado de peroxidación lipídica inducida por la dieta experimental, aunque no tan marcado y en cualquier caso dentro del rango fisiológico observado por previamente (*Huertas y cols., 1991*). Cuando la concentración de Q₉ se expresa por gramo de órgano fresco **figura 48**, nuestros resultados son coincidentes con los de otros estudios similares, así es la dieta pescado, la que genera mayor contenido mitocondrial seguido de las dietas oliva y girasol siendo la dieta control, la que genera menor concentración. Este comportamiento, dependiente del grado de insaturación generado por la dieta, fue atribuido por *Huertas y colaboradores (Huertas y cols., 1991)* a la mayor necesidad mitocondrial de obtener energía y poder así afrontar la reparación de los ácidos grasos fosfolípidicos peroxidados, debido a una mayor peroxidación lipídica por parte de las membranas enriquecidas en n3, el a-tocoferol como antioxidante trataría de atenuar el estado oxidativo, como se muestra en la **figura 26**, hecho que implicaría la respuesta sinérgica del CoQ₉, para mantener el pool de a-tocoferol (*Huertas y cols., 1991*). Además el CoQ puede reaccionar con radicales del oxígeno previniendo así el daño directo a biomoléculas, además de la iniciación y propagación de la peroxidación lipídica (*Frei y cols., 1990; Ernster y Dallner., 1995*). En nuestro estudio, también se podría atribuir la diferencial concentración de la ubiquinona 9 a este motivo, dado su doble función: antioxidante y componente clave en el sistema de transporte de electrones mitocondrial. De esta forma, las mitocondrias asegurarían que este último proceso no resultase limitante.

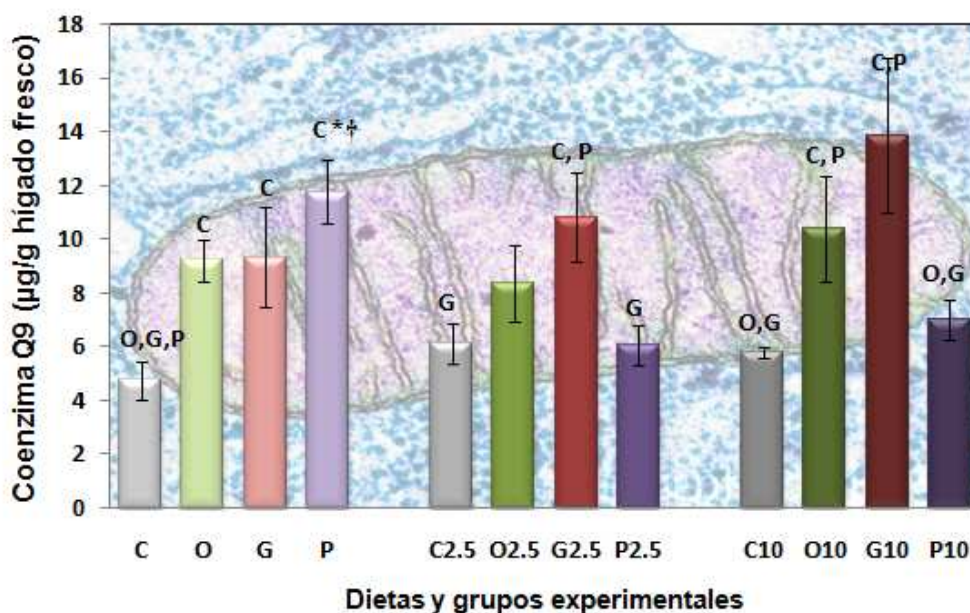


Figura 48: Concentración de CoQ9 en peso de hígado fresco

Cuando los animales de experimentación alimentados con las distintas dietas fueron sometidas a un estrés agudo (2.5 y 10 mg/kg día de adriamicina), incrementa el estrés oxidativo celular así como las necesidades energéticas para hacer frente a los mecanismos de reparación. Sería por ello por lo que en general las concentraciones de Q₉ tienden a incrementar en todos los grupos, aunque de forma significativa con las dietas oliva virgen y girasol, con las que se duplica la concentración, con la dosis de 2.5 mg/kg día. Con la dosis mayor de adriamicina (10 mg/kg día), La concentración de ubiquinona Q₉ disminuye con respecto a la dosis inferior en todos los grupos, lo que es más evidente con las dietas control y pescado, cuyos valores descienden a los valores de los grupos sin adriamicina. Estos resultados ponen en evidencia que la dosis de 10 mg/kg día, produce ciertas limitaciones en la función mitocondrial de esta molécula sobre todo en los grupos control y pescado. Las mitocondrias, al estar más peroxidadas, podrían perder capacidad en la obtención de energía y en su acción antioxidante. Esta pérdida podría estar relacionada con una acción de la adriamicina a dosis elevadas sobre la maquinaria biosintética de esta molécula y/o como consecuencia de un mecanismo que intentaría mantener la fluidez de membrana y que supondría la movilización tanto de ubiquinonas como de colesterol.

En la rata, el coenzima Q predominante es el Q₉, a diferencia de en el hombre en donde es el coenzima Q₁₀. En nuestro estudio, la relación Q₉/Q₁₀ es de de 3 a 4. Esta

ubiquinona, de mayor peso molecular, tiene una función más relevante como antioxidante que como transportador de electrones en la respiración mitocondrial en la rata. Como se muestra en la **figura 28**, la concentración de Q₁₀ es cuatro veces superior en las mitocondrias de ratas alimentadas con la dieta pescado con respecto a las demás, razón que disminuye a 2.5 cuando se administra la dosis baja de adriamicina y a 1.5-2 con la dosis mayor. Estos resultados evidencian el importante papel de la ubiquinona Q₁₀ en la dieta de pescado, en cuyas membranas mitocondriales podría suplir la deficiencia en la concentración de Q₉ en los grupos control y a la dosis baja de la antraciclina. Sin embargo, los resultados obtenidos con la dosis mayor de adriamicina reforzarían la hipótesis anterior de que el daño mitocondrial podría afectar a la vía biosintética de las ubiquinonas y/o como consecuencia del mantenimiento de la fluidez de las membranas.

En cualquier caso, la concentración de ubiquinona 9 y 10 observadas en nuestro estudio evidencian una dinámica en cuanto a su función más beneficiosa para las dietas experimentales oliva virgen y girasol, aunque la concentración de Q₁₀ en la dieta de pescado con o sin adriamicina podría suplir parcialmente esta deficiencia.

9.- EFECTO DE LA GRASA DE LA DIETA Y LA DOSIS DE ADRIAMICINA SOBRE EL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL Y SWELLING MITOCONDRIAL EN HÍGADO

9.1.- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre el potencial de membrana mitocondrial en tejido hepático

En condiciones normales las células tienen un potencial de membrana mitocondrial elevado. El $\Delta\Psi_m$ es consecuencia del paso de electrones a través de la cadena respiratoria, y su interrupción provoca una disminución del mismo, pudiendo inducir apoptosis y/o digestión de las mitocondrias defectuosas.

En la **figura 39** podemos observar el efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas y de la administración intraperitoneal de adriamicina sobre el $\Delta\Psi_m$ en hígado de rata. En cuanto al efecto de las diferentes fuentes grasas, nuestros resultados evidencian que es la dieta experimental oliva virgen la que determina valores de potenciales de membrana mitocondrial más elevado, seguido de la dieta experimental control y girasol y por último la de pescado, grupo que viene a mostrar el potencial más bajo. Numerosos

autores manifiestan que un alto potencial de membrana mitocondrial está relacionado con una correcta función de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y con una equilibrada síntesis de ATP (Maik Hüttemann y cols., 2008; Lambert y Brand 2004; Nicholls 1974). Serían, por tanto, las mitocondrias de los animales de experimentación alimentados con aceite de oliva virgen, las que tendrían una mejor función mitocondrial, atendiendo a este parámetro, y probablemente debido al menor estrés oxidativo crónico como consecuencia del enriquecimiento en sus membranas con ácido oleico y/o del balance en los mecanismos de acción antioxidante.

En cuanto al efecto de la adriamicina se observa una normalización del potencial de membrana mitocondrial en todos los grupos experimentales, que es más aparente a la dosis más baja. Numerosos trabajos sostienen que la administración de la doxorubicina conduce a disminuciones en el potencial de membrana mitocondrial (Du C y cols., 2000; Chai J y cols., 2000), aunque la mayoría de estos trabajos se realizan utilizando modelos experimentales *in vitro*. Estos autores sostienen además, que este descenso está directamente relacionado con la inducción de apoptosis. Así, estudios realizados por Sweeney y colaboradores (Sweeney y cols., 2007) demostraron recientemente en cultivos de monocitos que el tratamiento con EPA y DHA induce una muerte celular dosis-dependiente por pérdida de $\Delta\Psi_m$.

En nuestro estudio, al utilizar un modelo *in vivo*, pensamos que la administración de ADR, al inducir un fuerte estrés oxidativo, podría incrementar de forma importante la población mitocondrial, el swelling o hinchamiento, el descenso del potencial de membrana y estimular los procesos de digestión celular y/o apoptosis, relativamente rápidos, de tal forma que cuando nosotros sacrificamos a los animales, observamos una normalización de este parámetro, entre otros. Normalmente, cuando los daños sobre las mitocondrias son en un nivel relativamente bajo, activan a los lisosomas primarios para la digestión de las mitocondrias, mientras que cuando el nivel de estrés mitocondrial es en un nivel relativamente alto, activan los mecanismos celulares de muerte programada. Probablemente, la dosis utilizadas de adriamicina en este estudio, 2.5 y 10 mg/kg, se podrían considerar baja y media, respectivamente. Teniendo esto en cuenta, y los resultados mostrados hasta el momento, probablemente con la dosis baja predominarían los procesos de digestión y mitoptosis mitocondrial mientras que con la dosis alta, podrían también inducirse procesos de apoptosis. Hay que tener en cuenta que el hígado

es un tejido mitótico, con una alta capacidad de regeneración. Además el proceso de digestión de mitocondrias alteradas y/o el de mitoptosis, no ocurre en el conjunto de mitocondrias de una célula, sino que suele ocurrir en determinadas zonas.

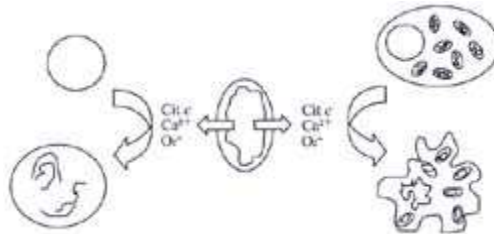


Figura 49: Las señales mitocondriales de “desnutrición” (O_2^- , Ca_2^+ , y citocromo c) (a) (izquierda) en un nivel relativamente bajo, activan a los lisosomas primarios para la digestión de las mitocondrias, (b) (derecha) en un nivel relativamente alto, activan los mecanismos celulares de muerte programada.

Por otra parte, *Legros F y colaboradores (Legros F y colbs., 2002)* demostraron que la disipación del potencial de membrana inhibe la fusión mitocondrial, por mecanismos aun no bien conocidos. La disipación del $\Delta\psi$ puede inducir modificaciones de la estructura mitocondrial que inhiba la función o la coordinación de la maquinaria de fusión. A su vez, cambios en el estado energético de la mitocondria inducen severas modificaciones en el compartimento de la matriz (*Hackenbrock, 1968*) y afecta a la talla y la frecuencia de los sitios de contacto entre las membranas mitocondriales interna y externa (*Knoll y Bridczka., 1983; Biermans y colbs., 1990*). No obstante, en nuestro estudio y tal y como se revela del análisis de imágenes a microscopía electrónica, no parece que el proceso de fusión y/o fisión se pongan de manifiesto a la dosis de adriamicina ensayadas, lo cual a su vez estaría avalado por la poca variabilidad en el potencial de membrana mitocondrial observado.

9.2.- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre el swelling mitocondrial en tejido hepático

Durante décadas, los cambios en el volumen mitocondrial han sido asociados con un amplio rango de importantes funciones biológicas y patologías. La pérdida de homeostasis en el volumen mitocondrial acompañado de swelling o hinchamiento, son los primeros signos de daño celular. En concreto, el swelling mitocondrial puede ser el resultado de un flujo de iones descontrolado cuando el poro de transición de permeabilidad mitocondrial se abre. La relación entre potencial de membrana mitocondrial y swelling es tema de controversia: muchos autores han asociado el swelling mitocondrial con la pérdida de potencial de membrana en células intactas pero no en mitocondrias aisladas. Sin embargo, numerosas aportaciones sugieren que el swelling mitocondrial no es una manifestación del daño celular que representa el estadio final de la disfunción mitocondrial, aunque sí juega un papel crucial en el daño celular. Como ejemplo, swelling mitocondrial es uno de los mecanismos probables por los cuales el citocromo c y el AIF (factor inductor de apoptosis) son liberados (*Petit PX y cols., 1998*).

Como se muestra en la **figura 40** y en cuanto a la influencia de las diferentes fuentes grasas observamos que es el grupo de oliva virgen el que muestra los valores de swelling más bajos frente a los demás grupos experimentales siendo estas diferencias estadísticamente significativas y de un orden tres veces inferior. Estos resultados evidencian que el enriquecimiento de las membranas mitocondriales con ácidos grasos monoinsaturados soportan mejor el estrés oxidativo crónico generado por la ingesta de grasas poliinsaturadas y determina que estos microorgánulos sean más resistentes a las primeras fases de inducción de digestión/mitoptosis y/o de apoptosis.

En cuanto al efecto de la doxorubicina sobre el swelling mitocondrial de tejido hepático observamos que se traduce en una disminución del hinchamiento, y en concreto, en los grupos control y girasol de manera dosis dependiente. De nuevo, como hemos discutido con otros parámetros, la administración intraperitoneal de esta molécula, determina una mejora del hinchamiento mitocondrial con respecto al estrés crónico inducido solamente por la ingesta de las respectivas grasas. Probablemente, este comportamiento se podría atribuir a que en las mitocondrias de hepatocitos operan con gran rapidez los mecanismos que eliminan a aquellas mitocondrias más alteradas por el

estrés oxidativo agudo inducido por la droga, bien por digestión/mitoptosis o incluso por eliminación de células dañadas a través de mecanismos apoptóticos inducidos con mayor relevancia por la vía mitocondrial. En cualquier caso, El fenómeno de digestión y/o mitoptosis se manifiesta como un importante proceso cara a eliminar los microorgánulos dañados y preservar la integridad celular, convirtiéndose como indica *Lyamzaev KG y colaboradores (Lyamzaev KG y cols., 2008)*, en un potente mecanismo antioxidante. Lo que no podemos conocer hasta el momento, con los datos discutidos es el predominio de digestión-mitoptosis, que afectaría solo a mitocondrias, sobre la apoptosis, que afectaría al conjunto celular. El hecho de que disminuya la proteína mitocondrial, pero también el peso del órgano, de forma más marcada con la dosis inferior, nos podría hacer pensar que con la dosis intermedia predominaría más la digestión y/o mitoptosis, mientras que con la dosis superior podría haber un mayor predominio de apoptosis por la vía mitocondrial, que cursaría a su vez con una mayor regeneración de hepatocitos.

Relacionando estos resultados con los del potencial de membrana mitocondrial podemos afirmar que los potenciales de membrana inferiores se corresponden con estados de swelling superiores en los grupos basales (sin adriamicina), es decir, los grupos control, girasol y pescado muestran valores menores de $\Delta\Psi$ y mayores de swelling, de forma estadísticamente significativa frente al grupo oliva virgen. Además comprobamos que por efecto de la adriamicina, los potenciales de membrana se normalizan contribuyendo a su vez a la normalización del volumen mitocondrial. *Safiulina D y colaboradores* publicaron recientemente (*Safiulina D y cols., 2006*) que es la pérdida de potencial de membrana la que conduce a un swelling mitocondrial, aunque otros autores demostraron que pérdidas en potencial de membrana no producían cambios de volumen o dichos cambios eran muy bajos (*Kahlert S y Reiser G., 2002; Rintoul GL y cols., 2003*). Tal y como está diseñado nuestro estudio, y con los datos analizados hasta el momento, no podemos discutir acerca de si el Swelling mitocondrial es una causa o consecuencia de las variaciones del potencial de membrana.

10.- EFECTO DE LA GRASA DE LA DIETA Y LA DOSIS DE ADRIAMICINA SOBRE LA MORFOLOGÍA MITOCONDRIAL EN HÍGADO

Dentro de las células, las mitocondrias se observan a microscopía electrónica como pequeñas organelas con forma de túbulos alargados, redes de filamentos extendidos conectados por uniones intermitocondriales en tejido cardíaco, mientras que en hepatocitos su morfología es más ovoide (*Chen LB y colbs., 1988; Yaffe MP., 1999; Capaldi RA y colbs., 2000; De Giorgi y colbs., 2000; Gilkerson RW., 2000*). Esta diversidad morfológica está relacionada con el tipo de célula y sobre todo con su condición metabólica, y se cree que es el resultado de alteraciones entre la movilidad mitocondrial y/o balance entre procesos de fisión y fusión mitocondrial (*Yi M y colbs., 2004; Collins TJ y colbs., 2002; Stojanovski D y colbs., 2003; Lee Y y colbs., 2004*). Cambios en la morfología y masa mitocondrial se presentan durante una amplia variedad de condiciones, tales como la división celular (*Berger KH y colbs., 1996; Kennady KP y colbs., 2004*), apoptosis (*Frank S y colbs., 2001; Pacher P y colb., 2001*), estrés oxidativo (*Koopman WJH y colbs., 2005*) y disfunción metabólica (*Koopman WJH y colbs., 2005*). Estas evidencias sugieren que estos cambios morfológicos tiene consecuencias en la propagación de la señal intermitocondrial (*Skulachev VP., 2001; De Giorgi y colbs., 2000; Koopman WJH y colbs., 2005*), aumento del Ca_2^+ mitocondrial (*Frieden M y colbs., 2004*), y protección contra estímulos apoptóticos (*Szabadkai G y colbs., 2004*).

Alteraciones en la morfología mitocondrial se han observado generalmente como cambios en el número, longitud, área/talla, y/o complejidad del orgánulo (*Skulachev VP., 2001; Yaffe MP., 1999; Capaldi RA y colbs., 2000; De Giorgi y colbs., 2000; Gilkerson RW., 2000; Stojanovski D y colbs., 2003; Lee Y y colbs., 2004; Berger KH y colbs., 1996; Kennady KP y colbs., 2004; Frank S y colbs., 2001; Koopman WJH y colbs., 2005; Szabadkai G y colbs., 2004*).

Análisis de microscopía electrónica de muestras extraídas de animales tratados con DOX indicaban alteraciones morfológicas de las mitocondrias. Estos datos están también de acuerdo con estudios previos que indican una degeneración mitocondrial inducida por la adriamicina. El efecto más pronunciado de la exposición a dicha droga es el daño mitocondrial dosis-dependiente (*Alderton PM y colbs., 1992*).

10.1.- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre el área de mitocondrias de hígado

Los valores de áreas de mitocondrias hepáticas se muestran en la **figura 36**. En cuanto a las diferencias entre animales alimentados con diferentes fuentes grasas a una misma dosis de droga comprobamos que el grupo oliva virgen muestra los valores de áreas más bajos frente a los demás grupos experimentales. Este hecho toma especial relevancia cuando observamos en las **figuras 37 y 38**, que este grupo a su vez presenta las mitocondrias de mayor densidad y circularidad, al contrario de lo que sucede para los grupos de animales girasol y pescado que muestran áreas mayores junto a densidades menores. Este fenómeno puede ser indicativo de mitocondrias menos funcionales en los grupos girasol y pescado o incluso de mitocondrias hinchadas. Por tanto estos parámetros pueden darnos una idea sobre la funcionalidad mitocondrial siendo el grupo de oliva el que presenta unas mitocondrias morfológicamente más activas y el que genera menor estrés crónico con respecto al grado de insaturación de la grasa dietética.

Como podemos observar, el tratamiento con adriamicina conduce a un aumento del área mitocondrial en todos los grupos estudiados. Este incremento es mayor en aquellos grupos experimentales a los que se les administró una dosis de 2.5 mg/kg/día siendo estas diferencias significativas con respecto a aquellos a los que se les administró una dosis más elevada (10 mg/kg/día) y aquellos basales (sin adriamicina). Las diferencias entre los grupos a los que se les administró una dosis de 10 mg/kg/día y los controles también se muestran significativas siendo, como hemos comentado anteriormente, aquellos animales tratados con quimioterápico presentan áreas mayores. No obstante, es importante subrayar que aunque las mitocondrias de hepatocitos del grupo oliva, son las que muestran un mayor incremento de volumen, también son las que se muestran de forma significativa una mayor densidad a la dosis baja, lo que sugiere que este incremento de volumen, inducido por la inyección intraperitoneal de 2.5 mg/kg día de adriamicina, no supondría una pérdida de funcionalidad de las mismas, a diferencia de lo que si parece ocurrir en los otros grupos experimentales. En cualquier caso, nuestros resultados ponen de evidencia que la adriamicina produce importantes cambios morfológicos sobre las mitocondrias y que podrían repercutir negativamente sobre su función. Por otra parte, el hecho de que la dosis más baja de este

quimioterápico sea el que induzca mayores cambios morfológicos, incremento de volumen y pérdida de densidad, estaría de acuerdo con lo discutido anteriormente con el swelling y potencial de membrana mitocondrial, en que con la dosis mayor predominarían los procesos apoptóticos que conllevarían a una mayor regeneración del tejido hepático. No obstante, no podemos descartar que este fenómeno pueda ser consecuencia de la dinámica mitocondrial activada por la droga. Así, podemos hipotetizar que en el momento del sacrificio las mitocondrias de animales a los que se les administró una dosis de 2.5 mg/kg/día sufrieron un proceso de fusión mitocondrial, con la consiguiente formación de “megamitocondrias”. En cambio, para la dosis de 10 mg/kg/día se observa un fenómeno de fisión mitocondrial, que se iniciaría tras una inhibición de la etapa de fusión mitocondrial. Según *Bernardi y colaboradores*, la fusión es inhibida durante la apoptosis, cuando la apertura del PTP disipa el $\Delta\Psi$ (*Bernardi y cols., 2001*). Por lo que podemos pensar que la dosis más elevada de adriamicina induciría, por vía mitocondrial, una mayor tasa de apoptosis.

10.2.- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre la circularidad mitocondrial de hígado

Como podemos observar en la **figura 35**, las mitocondrias de tejido hepático tienen forma más o menos esférica. *Das M y colaboradores (Das M y cols., 2003)* publicaron que en varios tipos celulares las mitocondrias son esféricas u ovaladas en condiciones normales, como ejemplo la mitocondria de cardiomiocitos, razón por la cual podría incrementar su volumen sólo en un 20-30% sin perder la integridad de la membrana mitocondrial externa. Sin embargo, en tipos celulares donde las mitocondrias son alargadas, el incremento de volumen podría ser más sustancial, hecho comprobado en mitocondrias de neuronas del cerebelo las cuales podrían incrementar su volumen el doble sin perder la integridad de su membrana más externa.

Con respecto a los datos obtenidos en los cuatro grupos experimentales sin administración de adriamicina (figura 38) podemos señalar que el grupo girasol viene a mostrar los valores más bajos de circularidad mitocondrial frente a los demás grupos experimentales, hecho que viene a apoyar los anteriores resultados en los que en el grupo girasol presenta valores más elevados de áreas mitocondriales y más bajos en densidad de crestas mitocondriales.

Como se muestra en la **figura 38** y en cuanto al efecto de la doxorubicina en líneas generales podemos advertir que la ADR disminuye significativamente la circularidad mitocondrial a la dosis inferior, aunque de nuevo, es la dieta experimental de oliva virgen, la que determina menor cambio para este parámetro. Sin embargo, la dosis superior (10 mg/kg día), de nuevo, tal y como ocurría con otros parámetros (densidad mitocondrial y potencial de membrana mitocondrial, sobre todo) determina una normalización para este parámetro. Este parámetro representa un factor más a favor de la hipótesis expuesta en anteriores apartados.

Habría que indicar, que las imágenes a microscopía electrónica, se muestran como un parámetro sumamente revelador para este tipo de estudios y que habría que incluir siempre.

11.- EFECTO DE LA GRASA DE LA DIETA Y LA DOSIS DE ADRIAMICINA SOBRE MARCADORES DE APOPTOSIS EN HÍGADO

Hace ya más de una década que se conoce el papel central de la mitocondria en la apoptosis. Inicialmente, la participación mitocondrial en la apoptosis era relacionada con el colapso del $\Delta\psi$ que estaba considerado como un punto de no retorno en la cascada de muerte celular (*Zamzami N y cols., 1995*). La hipótesis de que durante las etapas iniciales de la apoptosis varias proteínas tales como el citocromo c y smac/diablo son liberadas desde el espacio intermembrana hasta el citosol, donde se unen a objetivos citosólicos específicos y subsecuentemente activan las vías de caspasas, también sugiere que la mitocondria regula la viabilidad celular. El citocromo c es liberado de la mitocondria y junto con el Apaf-1 forma el apoptosoma en el citosol, que activa a la procaspasa-9 y subsecuentemente a las caspasas efectoras-3 y -7, induciendo así la apoptosis. Proteínas pro- y antiapoptóticas de la familia Bcl-2 parecen ser reguladores centrales de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa (*Letai A y cols., 2002*).

En nuestro estudio, hemos analizado la expresión de tres marcadores de apoptosis, Bcl-2, de origen mitocondrial y Apa-1 y caspasa-3 de origen citoplasmático (**figura 49**). Por problemas de organización, no hemos podido determinar estos marcadores de apoptosis en el grupo control.

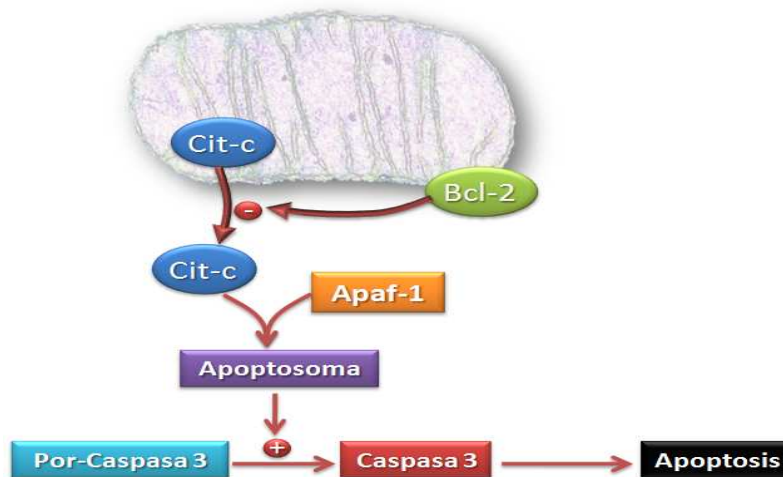


Figura 49: Marcadores de la vía intrínseca de la apoptosis

11.1.- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre los niveles de Bcl-2 en tejido hepático

Como podemos comprobar en la **figura 41** y en relación al efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas observamos una tendencia del grupo oliva virgen a presentar los valores de Bcl-2 más bajos. Una posible explicación sería debida al hecho de que el grupo de aceite de oliva virgen presenta menores niveles de estrés oxidativo, por tanto, posee menores necesidades de Bcl-2, molécula de reconocido efecto antioxidante (*Hockenbery DM y cols., 1993*). Por su parte, el ligero y no significativo mayor contenido de este antioxidante de origen mitocondrial en los grupos experimentales girasol y pescado, estaría en consonancia con el hecho de que generan mayor formación de hidroperóxidos y de TBARS.

En referencia a los efectos de la adriamicina sobre los niveles de este antiapoptótico mitocondrial en tejido hepático, no se muestran diferencias significativas entre grupos controles (sin adriamicina) frente a los tratados, ni tampoco entre grupos de dosis diferentes de doxorubicina. Sólo podemos observar una tendencia al aumento de Bcl-2 dosis-dependiente. Esta sobreexpresión puede justificarse debido a la función antiapoptótica del Bcl-2 el cual juega un papel central en la protección celular frente a la apoptosis (*Chaudhary y cols., 1999*) ayudando a mantener la integridad de la membrana mitocondrial previniendo así la liberación del citocromo c al citoplasma, limitando la activación de caspasas ejecutoras de apoptosis y protegiendo a las células de la muerte celular por apoptosis (*Gross J y cols., 1999; Reed J., 1999; Lowe SW y*

colb., 2000). Resultados que están de acuerdo con los obtenidos en la medida de los niveles de caspasa-3, los cuales muestran unos niveles de proteína más bajos a la dosis de 10 mg/kg/día (**figura 43**).

C. Jane Hanson y colaboradores (C Jane Hanson y colbs., 2008) recientemente han publicado que altos niveles de expresión de Bcl-2 causan peroxidación lipídica y que estos efectos perjudiciales podrían ser eliminados por *scavenger* de ROS. Cuando se expresaba a bajos niveles, el Bcl-2 no dañaba la estructura de la mitocondria o activaba la apoptosis espontánea, protegiendo a la célula de estímulos pro-apoptóticos.

Por otra parte, la acción más importante del Bcl-2 sería la de impedir la apertura de los poros de transición, ante descensos del potencial de membrana mitocondrial, e impidiendo la liberación de citocromo c, factores que se presentan en nuestras condiciones experimentales al administrar adriamicina. En este sentido, la expresión de esta proteína en nuestras condiciones experimentales, evidencia que su expresión es estimulada, a mayor dosis de adriamicina, para impedir la cascada apoptótica, especialmente para el grupo experimental de pescado.

11.2.- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre los niveles de Apaf-1 en hígado

El efecto de la ingesta de diferentes fuentes grasas y de la administración intraperitoneal de adriamicina en ratas sobre la expresión génica de Apaf-1 en tejido hepático se muestra en la **figura 42**. Como podemos observar, las diferencias entre grupos experimentales alimentados con diversas fuentes grasas no son significativas aunque comprobamos una tendencia por parte del grupo pescado a presentar valores más elevados.

En relación a este marcador de la vía intrínseca de apoptosis y el efecto del tratamiento con adriamicina podemos observar que no se muestran diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales. Aunque se aprecia una tendencia de los grupos alimentados con fuentes grasas poliinsaturadas para la dosis más elevada a disminuir los niveles de de Apaf-1, hecho que estaría íntimamente relacionado con el aumento en los niveles de antiapoptótico Bcl-2.

El hecho de que en los grupos experimentales girasol y pescado y tras la administración intraperitoneal de adriamicina de 10 mg/kg día, podría estar relacionado con una mayor regeneración del tejido hepático a esta dosis con respecto al grupo oliva, como mecanismo de defensa frente al fuerte estrés oxidativo que experimentan sus células.

11.3.- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre los niveles de caspasa-3 en tejido hepático

Los niveles de caspasa 3 en tejido hepático se muestran en la **figura 43**. En cuanto al efecto de las distintas fuentes grasas observamos que el grupo oliva virgen presenta valores de caspasa-3 inferiores al resto de grupos experimentales, resultado que confirma el efecto antiapoptótico del aceite de oliva virgen. Además este resultado está de acuerdo con los niveles de Bcl-2 disminuidos ligeramente para este mismo grupo. Por otro lado, observamos que el grupo pescado incrementa los niveles de caspasa-3 de forma significativa respecto al grupo oliva virgen. Numerosos estudios usando como fuente grasa el aceite de pescado y PUFA n3 señalan la translocación de citocromo c al citosol y activación de la caspasa-3 como evento temprano de la cascada apoptótica (*Green DR y cols., 1998; Shidoji Y y cols., 1999; Paradies G 1998*). *Hong MY y colaboradores (Hong MY y cols., 2002)* propusieron un mecanismo de aumento de apoptosis: incorporación de ácidos grasos n3 dentro de los fosfolípidos mitocondriales incrementando su susceptibilidad a la peroxidación resultando una disminución de MMP, liberación de citocromo c al citosol y activación de la caspasa-3. En cualquier caso, nuestros datos experimentales ponen de manifiesto, para este marcador, un mayor perfil apoptótico a medida que las fuentes grasas de la dieta incrementan su grado de insaturación. Esto se podría entender como un mecanismo por el que a mayor estrés oxidativo celular, se facilitaría la eliminación gradual de células dañadas, en situaciones de estrés crónico y de baja intensidad.

Tal y como podemos observar, el tratamiento con adriamicina en líneas generales, conlleva una tendencia al aumento de dicha proteína a la dosis de 2.5 mg/kg/día, de forma más marcada para el grupo oliva, y una disminución significativa, en todos los grupos experimentales, para la dosis de 10 mg/kg/día. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en Bcl-2 para la dosis de 10 mg/kg/día para la cual observamos los

valores más elevados, lo que sugiere que la dosis más alta de doxorubicina activa de forma más eficiente mecanismos antiapoptóticos que en el caso de dosis más baja e incluso controles (sin adriamicina). Este resultado confirma todo lo expuesto anteriormente entorno a la dosis de 10 mg/kg/día frente a la dosis 2.5 mg/kg/día. La dosis más elevada responde de una forma más eficiente frente a los daños generados por la adriamicina. En cambio, la dosis más baja genera un mayor daño celular ya que como hemos podido comprobar mecanismos de defensa antioxidantes de membrana y antiapoptóticos tienen comportamiento diferente en función de la dosis de adriamicina. Del mismo modo, estas bajas concentraciones a la dosis de 10 mg/kg día, estarían en consonancia con la hipótesis planteada con anteriores parámetros, en el sentido de que se habría incrementado notablemente la regeneración celular y eliminado a una importante población de células dañadas por el estrés oxidativo generado.

12.- EFECTO DE LA GRASA DE LA DIETA Y LA DOSIS DE ADRIAMICINA SOBRE EL ADN MITOCONDRIAL Y EL COMPLEJO V DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES EN HIGADO

12.1.- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre el ADN mitocondrial en tejido hepático

Como podemos comprobar en el capítulo de resultados, **figura 30**, solamente aparecen deleciones del ADN mitocondrial de hepatocitos con las dietas experimentales girasol y pescado (3.17% y 10.47% respectivamente). Además, mientras con girasol solamente aparece un tipo de deleción, con pescado son dos los tipos, caracterizadas por ser de gran peso molecular (sobre 14.000 y 15.000 pares de bases). No obstante, este porcentaje de ADN deletado, no debe suponer una limitación para la función del conjunto de mitocondrias hepáticas de ambos grupos., máxime teniendo en cuenta que el tejido hepático es mitótico y presenta una elevada capacidad de regeneración.

Estos resultados confirman que la ingesta de fuentes grasas poliinsaturadas, generan un estrés oxidativo crónico, que incluso afecta al ADN mitocondrial. Así mismo, confirman que el enriquecimiento de las membranas celulares y sobre todo de mitocondriales con ácido oleico, protege a los fosfolípidos de membrana de ser peroxidados, o por lo menos permite que los mecanismos de reparación sean de gran eficiencia, al descender el número de ácidos grasos que se peroxidan. Esto es lo que

ocurre precisamente con las dietas experimentales oliva y control en nuestro diseño experimental.

Desde hace casi dos décadas, se conoce que la doxorubicina genera mutaciones y deleciones del ADNmt ya que ésta fue diseñada para estimular un índice muy alto de radicales libres a nivel de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (*Ogura R y colbs., 1991; Yakes FM y colbs., 1997; Giulivi y colbs., 1995*). En nuestro estudio, la dosis de adriamicina que genera mayor cantidad de deleciones del ADN mitocondrial es la de 2.5 mg/kg día. A esta dosis, aparecen deleciones en los cuatro grupos experimentales, aunque es en la dieta oliva virgen la que genera menor cantidad (1.27 %), seguida de la dieta control (3.52%) y de la de pescado (7.83%), siendo la dieta girasol la que genera mayor cantidad (15.66%). Estos resultados evidencian que la administración intraperitoneal de 2.5 mg/kg día, es suficiente para generar un importante estrés oxidativo, confirmando mucho de lo discutido hasta ahora y que un descenso en la densidad de dobles enlaces de las membranas mitocondriales es crucial para impedir la cascada de peroxidación lipídica en situaciones de estrés oxidativo agudo, como ocurre con la ingesta de las dietas experimentales control y oliva virgen. A esta dosis, el hecho de que las mitocondrias del grupo pescado presente menor cantidad de deleciones del ADN, nos indicaría que la suma del estrés crónico por la grasa de la dieta más el de la adriamicina, son suficientes como para haber inducido con más rapidez y/o eficiencia, procesos de digestión de las mitocondrias dañadas, e incluso procesos apoptóticos encaminados a eliminar las células ni viables.

Cuando se administra intraperitonealmente adriamicina a una dosis de 10 mg/kg día, no aparece ADN mitocondrial deletado, ni en el grupo control ni en el oliva virgen; disminuye el porcentaje en el grupo girasol (de 15.66%, a la dosis cuatro veces inferior, a 2.07%) y ahora es en el grupo pescado en donde se observa mayor porcentaje (13.5%). Estos resultados nos permiten hipotetizar, que esta dosis del fármaco, es lo suficientemente elevada, como para haber eliminado la mayor parte de mitocondrias dañadas en las dietas control, oliva virgen y girasol y no así en la de pescado. Probablemente, además de procesos de digestión-mitoptosis mitocondrial, han operado con más intensidad los procesos apoptóticos. En el caso de la dieta experimental pescado, probablemente la suma del estrés crónico, inducido por el elevado grado de insaturación de las membranas mitocondriales, más el agudo por la administración de

adriamicina, exceda a los mecanismos de eliminación de mitocondrias por digestión-mitoptosis y de células dañadas por apoptosis. Se estaría limitando por tanto el ciclo de regeneración celular.

El estudio de deleciones múltiples por XL-PCR, nos permite simultáneamente hacer una aproximación al contenido total de ADN mitocondrial. Como se muestra en la **figura 50**, las distintas dietas experimentales producen una cantidad de ADN mitocondrial del orden de los 80 ng para los grupos control, girasol y pescado, mientras que en el grupo Oliva, el contenido de ADN es inferior, aunque no significativo, con 42ng. La administración de adriamicina, cambia el contenido de este material genético, aunque de forma distinta en función de la dieta experimental utilizada. Así en la dietas oliva virgen y girasol, no experimentan importantes cambios, mientras que con las dietas control y pescado, la administración de adriamicina, a ambas dosis, produce un descenso que es especialmente significativo en el grupo pescado. Estos resultados, ponen en evidencia, lo discutido en apartados anteriores con otros parámetros, en el sentido de que la administración de adriamicina produce daños que determinan a su vez digestión-mitoptosis de mitocondrias dañadas y/o mecanismos apoptóticos que afectaría a una población de células hepáticas.

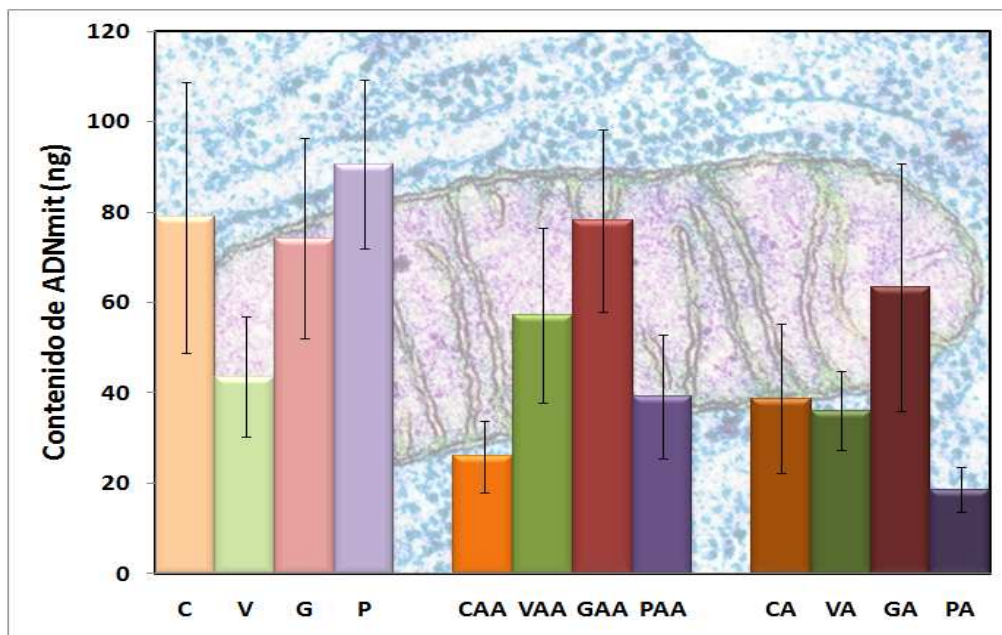


Figura 50: Contenido de ADN mitocondrial en tejido hepático

12.2.- Efecto de la grasa de la dieta y la dosis de adriamicina sobre el complejo V de la cadena de transporte de electrones en hígado

La **figura 33** nos muestra los valores de cantidad de ATPasa (Complejo V) de la cadena de transporte de electrones. Como hemos comentado brevemente en el apartado anterior, no se observan diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales, ni por efecto de la adriamicina ni de la grasa dietética, aunque en los grupos alimentados con aceites de girasol y pescado observamos una tendencia a aumentar la cantidad de dicho complejo. *Kaasik A y colaboradores (Kaasik A y cols., 2006)* hipotetizaron que durante el estrés energético, cuando las necesidades de ATP son altas y los $\Delta\psi$ disminuyen, un incremento del volumen mitocondrial podría activar la cadena respiratoria. Esto explicaría en nuestros resultados el aumento en la cantidad ATPasa en los grupos girasol y pescado. No obstante se debería de observar un incremento en concentración, tras la dosis de adriamicina de este complejo V de la membrana interna mitocondrial, dado que las necesidades energéticas estarían aumentadas para hacer frente a los mecanismos de reparación, mitogénesis y biogénesis en general y puesto que como discutiremos más adelante no hay aumentos de la actividad ATPasa. Esta situación, no se puede atribuir al porcentaje de deleciones del ADN mitocondrial, como hemos discutido anteriormente y estaría más relacionado con los mecanismos de transporte y acoplamiento de las subunidades de este complejo enzimático.

La **figura 44** nos muestra los valores de actividad de la ATPasa (Complejo V) de la cadena de transporte de electrones. Por otro lado, en referencia a las diferencias entre los grupos experimentales debidas a las distintas grasas comprobamos que el grupo oliva virgen muestra actividades significativamente superiores a los demás grupos, hecho que puede ser debido a poseer mitocondrias más densas, como vimos anteriormente, e inducir un menor estrés oxidativo crónico.

Con respecto al efecto de la doxorubicina podemos observar comportamientos diferentes dependiendo de la grasa de la dieta, es decir, en el grupo de animales alimentados con aceite de oliva virgen la droga tiende a disminuir la actividad de la ATPasa. En cambio, para el grupo girasol los valores de actividad de la enzima tienden a aumentar. Por último para el grupo pescado, los valores no se ven significativamente alterados por efecto de la dosis. Ha sido ampliamente demostrado que la ADR reduce la

actividad de la ATPasa mitocondrial y afecta al estado redox de los transportadores de la cadena respiratoria (*Bianchi C y cols., 1987; Ji LL y cols., 1994*). Este complejo, necesita de un microambiente lipídico con predominio de cardiolipina y como describimos en la introducción bibliográfica es especialmente peroxidado por la acción de esta droga.

Teniendo en cuenta estos resultados, creemos que tanto la concentración como la actividad del Complejo V mitocondrial, se ve muy afectado por el estrés oxidativo inducido tanto crónico como agudo, especialmente para las dietas experimentales girasol y pescado.

CAPÍTULO VI.-CONCLUSIONES

CAPÍTULO VI.- CONCLUSIONES

Conclusión 1ª: Según hemos comprobado se ha producido una adaptación en el perfil lipídico de las membranas mitocondriales hepáticas en función del perfil de la fuente grasa suministrada. Es decir, las membranas mitocondriales muestran una mayor proporción en ácidos grasos característicos de la fuente grasa consumida.

Conclusión 2ª: En relación a la peroxidación lipídica, el grupo oliva virgen presenta los valores más bajos de hidroperóxidos y TBARS frente a los demás grupos experimentales.

Conclusión 3ª: La dieta experimental oliva virgen determina valores de potenciales de membrana mitocondrial más elevados y de swelling más bajos. Serían, por tanto, las mitocondrias de los animales alimentados con aceite de oliva virgen, las que tendrían una mejor función mitocondrial.

Conclusión 4ª: Los resultados obtenidos confirman que la ingesta de fuentes grasas poliinsaturadas, generan un estrés oxidativo crónico, que afecta al ADN mitocondrial.

Conclusión 5ª: El grupo oliva virgen muestra los valores de áreas mitocondriales más bajos frente a los demás grupos experimentales y a su vez presenta las mitocondrias de mayor densidad y circularidad, fenómeno que puede ser indicativo de mitocondrias morfológicamente más activas, generadoras de un menor estrés crónico con respecto al grado de insaturación de la grasa dietética

Conclusión 6ª: Nuestros datos experimentales ponen de manifiesto, un mayor perfil apoptótico a medida que las fuentes grasas de la dieta incrementan su grado de insaturación. Esto se podría entender como un mecanismo por el que un mayor estrés oxidativo celular, facilitaría la eliminación gradual de células dañadas, en situaciones de estrés crónico y de baja intensidad.

Conclusión 7^a: La adrimicina genera de manera dosis-dependiente disminuciones en los niveles de α -tocoferol como un efecto neutralizador de radicales libres. Nuestros resultados ponen en evidencia que la adriamicina produce importantes cambios morfológicos sobre las mitocondrias pudiendo repercutir negativamente sobre su función.

Conclusión 8^a: La adriamicina induce un estrés oxidativo agudo responsable del establecimiento de mecanismos mitoptóticos para la dosis de 2.5 mg/kg/día y/o apoptóticos para la dosis de 10 mg/kg/día.

CONCLUSIÓN GENERAL

Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de partida pudiendo concluir que, una dieta basada en el aceite de oliva virgen puede mejorar significativamente la susceptibilidad de las mitocondrias de los hepatocitos frente a la doxorubicina, lo cual refuerza la importancia de la dieta en la atenuación de los efectos secundarios tóxicos derivados de la administración del quimioterápico, pudiendo conseguirse, teóricamente, de esta manera una mejora de la calidad de vida de los pacientes sometidos a esta terapia antitumoral.

CAPÍTULO VII.-BIBLIOGRAFÍA

CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA

- Abe K, Kurakin A, Mohseni-Maybodi M, Kay B, Khosravi-Far R. (2000). “The complexity of TNF related apoptosis-inducing ligand”. *Ann N Y Acad Sci*; 926:52-63.
- Acker, H., & Xue, D. H. (1995). “Mechanisms of O₂ sensing in the carotid-body in comparison with other O₂ sensing cells”. *News Physiol. Sci.*, 10, 211–216.
- Ackrell BAC, Johnson MK, Ginsalus RP, Cechini G (1992). “Estructure and function of succinate dehydrogenase and fumarate reductase”. *Biochemistry of Flavoenzymes. Muller F. ed Boca Ratón FL: CRC Press* 229.
- Adachi T & X. L. Wang (1998) “Association of extracellular-superoxide dismutase phenotype with the endothelial constitutive nitric oxide synthase polymorphism”. *FEBS Lett* 433, 166-168
- Adams JM, Cory S. (2002). “Apoptosomes: engines for caspase activation”. *Curr Opin Cell Biol*; 14:715-20.
- Adams PL, Turnbull DM (1996). “Disorders of the electrón transport chain”. *J. Inher. Metab. Dis.* 19: 463.
- Adams, J.M., Cory, S., (2001). “Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family”. *Trends Biochem. Sci.*, 26(1):61-66.
- Adams, J.M., Cory, S., (2007). “The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9): 1324-1337.
- Adrain, E.A. Slee, M.T. Harte and S.J. Martin, “Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region”. *J. Biol. Chem.* 274 (1999), pp. 20855–20860.
- Albano E, Bellomo G, Parola M, Carini R, Dianzani MU. (1991). “Stimulation of lipid peroxidation increases the intracellular calcium content of isolated hepatocytes”. *Biochim. Biophys. Acta* 1091:310–16
- Albano E, Tomasi A., Goria-Gatti L and Dianzani, (1988)

- MU, “Spin trapping of free radical species produced during the microsomal metabolism of ethanol”. *Chem. Biol. Interact.* **65** pp. 223–234.
- Albelda, S. M., Smith, C. W., & Ward, P. A. (1994). “Adhesion molecules and inflammatory injury”. *FASEB J.*, **8**, 504–512.
 - Frenette, P. S., & Wagner, D. D. (1996). Adhesion molecules. Part I. *N. Engl. J. Med.*, **334**, 1526–1529.
 - Alegría EA and Santiago G, (1997), “Adriamycin and daunomycin semiquinone membrane/buffer partition constants using the spin-broadening technique”. *Arch. Biochem. Biophys.* **346** pp. 91–95.
 - Algeciras-Schimnich A, Barnhart BC, Peter ME. (2002). “Apoptosis-independent functions of killer caspases”. *Curr Opin Cell Biol*; **14**:721-6.
 - Algeciras-Schimnich A, Shen L, Barnhart BC, Murmann AE, Burkhardt JK, Peter ME.(2002) “Molecular ordering of the initial signaling events of CD95”. *Mol Cell Biol*; **22**:207-20.
 - Ameisen JC. (2002). “On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years”. *Cell Death Differ*; **9**:367-93.
 - Ames BN, Shigenaga MK and Hagen TM, (1995), “Mitochondrial decay in aging”. *Biochim. Biophys. Acta* **1271** pp. 165–170.
 - Ames BN,. Shigenaga MK and Hagen TM, (1993), “Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** pp. 7915–7922.
 - Andersen, J. K. (2004). “Oxidative stress in neurodegeneration: Cause or consequence?” *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**, S18–S25.
 - Anderson S, BankierAT, Barrell BG, de BruijnMH,Coulson AR, et al. (1981). “Sequence and organization of the human mitochondrial genome”. *Nature* **290**:457–65
 - Andersson M, Ericsson J, Appelkvist EL, Schedin S, Chojnacki T, Dallner G. (1994). “Modulations in hepatic branch-point enzymes involved in isoprenoid biosynthesis upon

- dietary and drug treatments of rats". *Biochim Biophys Acta* 1214:79–87.
- Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermod, J.J., Mazzei, G., *et al.*, (1997). "Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2". *Science*, 277(5324): 370-372.
 - Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R., Martinou, J.C., (2000). "Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria." *Biochem. J.*, 345(2):271-278.
 - Appelkvist EL, Åberg F, Guan Z, Parmryd I, Dallner G. (1994). "Regulation of coenzyme Q biosynthesis". *Mol Aspects Med* 15S:37–46.
 - Arcamone F, Penco S, Vigevani A, Redaelli S, Franchi G, DiMarco A, Casazza AM, Dasdia T, Formelli F, Necco A and Soranzo C, (1975). "Synthesis and antitumor properties of new glycosides of daunomycinone and adriamycinone". *J. Med. Chem.* 18 pp. 703–707.
 - Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, Sharpe JC, Cecconi F, Youle RJ. (2003) "Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization". *EMBO J*; 22:4385-99.
 - Ashkenazi A, Dixit VM. (1998). "Death receptors: signalling and modulation". *Science*; 281: 1305^ 8.
 - Ashkenazi A, Dixit VM. (1999). "Apoptosis control by death and decoy receptors". *Curr Opin Cell Biol*; 11:255-60.
 - Atlante A, Calissano P, Bobba A, Azzariti A, Marra E, Passarella S. (2000). "Cytochrome c is released from mitochondria in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion and can operate as a ROS scavenger and as a respiratory substrate in cerebellar neurons undergoing excitotoxic death. *J. Biol. Chem.* 275:37159–66

- Attardi, G., & Schatz, G. (1988). "Biogenesis of mitochondria". *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 4, 289–333.
- Bacon BR, O'Neill R, Britton RS. (1993). "Hepatic mitochondrial energy production in rats with chronic iron overload". *Gastroenterology* 105:1134–40
- Bacon BR, O'Neill R, Park CH. (1986). "Iron-induced peroxidative injury to isolated rat hepatic mitochondria". *J. Free Radic. Biol. Med.* 2:339–47
- Bae, J., Leo, C.P., Hsu, S.Y., Hsueh, A.J., (2000). "Mcl-1S, a splicing variant of the antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain". *J. Biol. Chem.*, 275(33):25255-25261.
- Baliga B, Kumar S. (2003). "Apaf-1/cytochrome c apoptosome: an essential initiator of caspase activation or just a sideshow?" *Cell Death Differ*; 10:16-8.
- Banci L, M. Benedetto, I. Bertini, R. Del Conte, M. Piccioli & M. S. Viezzoli (1998). "Solution structure of reduced monomeric Q133M2 copper, zinc superoxide dismutase (SOD). Why is SOD a dimeric enzyme?" *Biochemistry* 37, 11780-11791
- Bañuelos S, Arrondo JL, Canaves JM, Ferragut JA and Muga A, (1993), The interaction of daunomycin with model membranes. Effect of the lipid physical state and the lipid composition. *Eur. J. Biochem.* 213 pp. 1269–1275.
- Barcia RN, Valle NS, McLeod JD. (2003), "Caspase involvement in RIP-associated CD95-induced T cell apoptosis". *Cell Immunol*; 226:78-85.
- Basañez, G., Nechushtan, A., Drozhinin, O., Chanturiya, A., Choe, E., Tutt, S., Wood, K.A., Hsu, Y., Zimmerberg, J., Youle, R.J., (1999). "Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations". *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 96(10):5492-5497.
- Bauerova, K., & Bezek, S. (1999). "Role of reactive oxygen and nitrogen species in

- etiopathogenesis of rheumatoid arthritis". *Gen. Physiol. Biophys.*, 18, 15–20.
- Beckman KB and Ames BN, (1998), "The free radical theory of aging matures". *Physiol. Rev.* **78** pp. 547–581.
 - Beckman KB, Ames BN. (1998). "The free radical theory of aging matures". *Physiol. Rev.* 78:547–81
 - Benov L & I. Fridovich (1998). "Growth in iron-enriched medium partially compensates *Escherichia coli* for the lack of manganese and iron superoxide dismutase". *J Biol Chem* 273, 10313-10316
 - Bergmann A, Yang AY, Srivastava M. (2003). "Regulators of IAP function: coming to grips with the grim reaper". *Curr Opin Cell Biol*; 15:717-24.
 - Bernardi, P., Scorrano, L., Colonna, R., Petronilli, V., Di Lisa, F., (1999). "Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues". *Eur. J. Biochem.*, 264(3):687-701.
 - Berry, C. E., & Hare, J. M. (2004). "Xanthine oxidoreductase in the cardiovascular system: Molecular mechanisms and pathophysiologic implications". *J. Physiol.*, 555, 589–606.
 - Beyer RE, Segura-Aguilar J, Di Bernardo S, Cavazzoni M, Fato R, Fiorentini D, Galli MC, Setti M, Landi L, Lenaz G. (1996). "The role of DTdiaphorase in the maintenance of the reduced antioxidant form of Coenzyme Q in membrane systems". *Proc Natl Acad Sci USA* 93:2528–2532.
 - Bingle, C.D., Craig, R.W., Swales, B.M., Singleton, V., Zhou, P., Whyte, M.K., (2000). "Exon skipping in Mcl-1 results in a bcl-2 homology domain 3 only gene product that promotes cell death". *J. Biol. Chem.*, 275(29):22136-22146.
 - Bjerneboe, A., Bjerneboe, G.E., Drevon, C.A. (1990) "Absorption, transport and distribution of vitamine E". *J. Nutr.*, 120:233-242.
 - BlagosklonnyMV. (2000). "Cell death beyond apoptosis". *Leukemia* ;14:1502^ 8.
 - Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H,

- Pedersen IM, Ricci JE, Edris WA, Sutherlin DP, Green DR, Salvesen GS. (2003). "A unified model for apical caspase activation". *Mol Cell*; 11:529-41.
- Bohr VA, Anson RM. (1999) "Mitochondrial DNA repair pathways". *JBioenergBiomembr.* 31(4):391-8. Review.
 - Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G., Thompson, C.B., (1993). "Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death". *Cell*, 74(4): 597-608.
 - Borner C, Monney L. (1999). "Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine?" *Cell Death Differ*;6:497^507.
 - Borner, C., (1996). "Diminished cell proliferation associated with the death-protective activity of Bcl-2". *J. Biol. Chem.*, 271:12695-12698.
 - Borner, C., Martinou, I., Mattmann, C., Irmler, M., Schaefer, E., Martinou, J.C., Tschopp, J., (1994). "The protein bcl-2 alpha does not require membrane attachment, but two conserved domains to suppress apoptosis". *J. Cell. Biol.*, **126**(4):1059-1068.
 - Bossy-Wetzler, E., Newmeyer, D.D., Green, D.R., (1998). "Mitochondrial cytochrome C release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization". *EMBO J.*, **17**(1):37-49.
 - Boya P, Andreau K, Poncet D, et al. (2003). "Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion". *J Exp Med* ;197:1323^34.
 - Boyd, J., Malstrom, S., Subramanian, T., Venkatesh, L.K., Schaefer, U., Elangovan, B., D'Sa-Eipper, C., Chinnadurai, G., (1994). "E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins". *Cell*, 79(2):341-351.
 - Boyd, J.M., Gallo, G.J., Elangovan, B., Houghton, A.B., Malstrom, S., Avery, B.J., Ebb,

- R.G., Subramanian, T., Chittenden, T., Lutz, R.J., *et al.*, (1995). "Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins". *Oncogene*, 11:1921-1928.
- Boyer PD (1993). "The binding change mechanism for ATP synthase- some probabilities and possibilities". *Biochim. Biophys Acta 1140: 215*.
 - Boyer PD (1997). "The ATP synthase – a splendid molecular machine". *Annu. Rev. Biochem. 66: 717*.
 - Braun HP, Schmitz UK (1995). "Are de "core" proteins of the mitochondrial bcl complex evolutionary relics of a processing protease?" *Trends Biochem Sci.20:171*
 - Bredt, D. S., Hwang, P. M., Glatt, C. E., Lowenstein, C., Reed, R. R., & Synder, S. H. (1991). "Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome 450 Reductase". *Nature*, 351, 714–718.
 - Bristow, M.R., Thompson, P.D., Martin, R.P., Mason, J.W., Bollingham, M.E., Harrison, D.C., (1978). "Early anthracycline cardiotoxicity". *Am. J. Med.* 65, 823_/832.
 - Broker LE, Huisman C, Span SW, Rodriguez JA, Kruyt FA, Giaccone G. (2004). "Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non-small cell lung cancer cells". *Cancer Res*;64: 27^30.
 - Buettner, G.R. y Jurkiewicz, B.A., (1995). "Chemistry and biochemistry of ascórbico acid. En: Handbook of Antioxidants". Packer, L y Cadenas, E. eds. Marcel Dekker, Inc. New York. 91-115.
 - Burns TF, el-Deiry WS. (2003). "Cell death signaling in malignancy". *Cancer Treat Res*; 115:319-43.
 - Bursch W. (2001) "The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death". *Cell Death Differ* ;8: 569^81.
 - Burton, G.W. (1989) "Antioxidant action of

- carotenoids". J. Nutr. 119(1):109-111.
- Buschfort C, M. R. Müller, S. Seeber, M. F. Rajewsky & J. Thomale (1997). "DNA excision repair profiles of normal and leukemic human lymphocytes: functional analysis at the single-cell level". *Cancer Res* 57, 651-658
 - Butterfield, D. A., Castegna, A., Lauderback, C. M., & Drake, J. (2002). "Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death". *Neurobiol. Aging*, 23, 655-664.
 - Cadenas E, Davies KJ. (2000). "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging". *Free Radic. Biol. Med.* 29:222-30
 - Cadenas E, Davies KJ. (2000) "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging". *Free Radic Biol Med* .;29(3-4):222-30.
 - Cain K, Bratton SB, Cohen GM. (2002). "The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex". *Biochimie*; 84:203-14.
 - Cande C, Vahsen N, Garrido C, Kroemer G. (2004). Apoptosis-inducing factor (AIF)
 - Canuto RA, Tessitore L, Muzio G, Autelli R, Baccino FM. (1993). "Tissue protein turnover during liver carcinogenesis". *Carcinogenesis* ;14: 2581^7.
 - Carr, B. Frei, "Does Vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions?" *FASEB J.* 13 (1999) 1007-1024.
 - Carter SK 1975. "Adriamycin" A review. *J Natl. Cancer. Inst.* 55:1265-1274.
 - Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. (2004) "Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition". *Oncogene*; 23: 2825^37.
 - Cauwels A, Janssen B, Waeytens A, Cuvelier C, Brouckaert P. (2003). "Caspase inhibition causes hyperacute tumor necrosis factor-induced shock via oxidative stress and phospholipase A2". *Nat Immunol*; 4:387^93.
 - Cecconi F, Alvarez-Bolado G, Meyer BI, Roth KA, Gruss P.

- (1998). “Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death”
- Chance B, Sies H and Boveris A, (1979), “Hydroperoxide metabolism in mammalian organs”. *Physiol. Rev.* **59** pp. 527–605.
 - Chao, D.T., Korsmeyer, S.J., (1998). “Bcl-2 family: regulators of cell death”. *Annu. Rev. Immunol.*, **16**(1):395-419.
 - Chautan, M., Chazal, G., Cecconi, F., Gruss, P., Golstein, P., (1999). “Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway”. *Curr. Biol.*, **9**(17): 967-970.
 - Cheeseman, K.H. y Slater, T.F. (1993). “An introduction to free radical biochemistry”. *British Medical Bulletin.* **49**(3):481-493.
 - Chen JJ, Bertrand H, Yu BP. (1995). “Inhibition of adenine nucleotide translocator by lipid peroxidation products”. *Free Radic. Biol. Med.* **19**:583–90
 - Chen, G., Cizeau, J., Vande Velde, C., Park, J.H., Bozek, G., Bolton, J., Shi, L., Dubik, D., Greenberg, A., (1999). “Nix and Nip3 form a subfamily of pro-apoptotic mitochondrial proteins”. *J. Biol. Chem.*, **274**(1):7-10.
 - Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M., Huang, D.C., (2005). “Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function”. *Mol. Cell*, **17**(3):393-403.
 - Chi S, Kitanaka C, Noguchi K, et al. (1999) “Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cells”. *Oncogene*; **18**: 2281-90.
 - Chinnaiyan AM. (1999) “The apoptosome: heart and soul of the cell death machine”. *Neoplasia*; **1**:5-15.
 - Chipuk, J.E., Bouchier-Hayes, L., Kuwana, T., Newmeyer, D.D., Green, D.R., (2005). “Puma couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53”. *Science*, **309**(5741):1732-1735.

- Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., Green, D.R., (2004). "Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis". *Science*, 303(5660): 1010-1014.
- Chittenden, T., (2002). "BH3 domains: intracellular death-ligands critical for initiating apoptosis". *Cancer Cell*, 2(3):165-166.
- Chittenden, T., Flemington, C., Houghton, A.B., Ebb, R.G., Gallo, G.J., Elangovan, B., Chinnadurai, G., Lutz, R.J., (1995b). "A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J.*, 14:5589-5596.
- Chittenden, T., Harrington, E.A., O'Connor, R., Flemington, C., Lutz, R.J., Evan, G.I., Guild, B.C., (1995a). "Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak". *Nature*, 374(6524):733-736.
- Choi, S.S., Park, I.C., Yun, J.W., Sung, Y.C., Hong, S.I., Shin, H.S., (1995). "A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow". *Oncogene*, 11:1693-1698.
- Chou, J.J., Li, H., Salvesen, G.S., Yuan, J., Wagner, G., (1999). "Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling". *Cell*, 96(5):615-624.
- Chu FF, Esworthy RS, Chu PG, Longmate JA, Huycke MM, Wilczynski S, Doroshow JH, "Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes", *Cancer Res.* 64 (2004) 962–968.
- Clarke PG (1990). "Developmental cell death:morphological diversity and multiple mechanisms". *Anat Embryol (Berl)* ;181:195^213.
- Clayton, D. A., Doda, J. N., & Friedberg, E. C. (1974). "The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71, 2777–2781.
- Cleary, M.L., Smith, S.D., Sklar, J., (1986). "Cloning and

- structural analysis of cDNAs for *bcl-2* and a hybrid *bcl-2*/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation". *Cell*, 47(1):19-28.
- Cleary, M.L., Smith, S.D., Sklar, J., (1986). "Cloning and structural analysis of cDNAs for *bcl-2* and a hybrid *bcl-2*/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation". *Cell*, 47(1):19-28.
 - Cohen GM. (1997)"Caspases: the executioners of apoptosis". *Biochem J*; 326:1-16.
 - Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J, "Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease", *FASEB J.* 17 (2003) 1195–1214.
 - Cortes, E.P., Lutman, G., Wanka, J., Wang, J.J., Pickren, J., Wallace, J., Holland, J.F., 1975. "Adriamycin (NSC-123127) cardiotoxicity. A clinicopathologic correlation". *Cancer Treat. Rep.* 6, 215_/225.
 - Cory, S., Adams, J.M., (2002). "The *bcl2* family: regulators of the cellular life-or-death switch". *Nat. Rev. Cancer*, 2(9): 647-656.
 - Crane FL, Navas P. (1997). "The diversity of coenzyme Q function". *Mol Aspects Med* 18:s1–s6.
 - Cristea IM, Degli Esposti M. (2004). "Membrane lipids and cell death": an overview. *Chem Phys Lipids*; 129:133-60.
 - Cuervo AM. (2004) "Autophagy: in sickness and in health". *Trends Cell Biol* ;14:70^7.
 - Cullis PR, Verkleij AJ and Ververgaert PH, (1978), "Polymorphic phase behaviour of cardiolipin as detected by ³¹P NMR and freeze-fracture techniques. Effects of calcium, dibucaine and chlorpromazine". *Biochim. Biophys. Acta* 513 pp. 11–20.
 - D. Ardail, J.P. Privat, M. Egret-Charlier, C. Levrat, F. Lerme and P. Louisot, (1990). Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics". *J. Biol. Chem.* 265 pp. 18797–18802.
 - D.C. Wallace, (1999). "Mitochondrial diseases in man

- and mouse". *Science* **283** pp. 1482–1488.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., & Milzani, A. (2006). "Biomarkers of oxidative damage in human disease". *Clin. Chem.*, 52, 601–623.
 - Danial NN, Korsmeyer SJ. (2004). "Cell death: critical control points". *Cell*;116:205^19.
 - Daniel PT, Wieder T, Sturm I, Schulze-Osthoff K. (2001). "The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy". *Leukemia*; 15:1022-32.
 - Das, R., Reddy, E.P., Chatterjee, D., Andrews, D.W., (1996). "Identification of a novel Bcl-2 related gene, Brag-1, in human glioma". *Oncogene*, 12:947-951.
 - Daum, G., Heidorn, E., Paltauf, F (1986). "Intracellular transfer of phospholipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Biochim. Biophys. Acta.* 878(1): 93-101.
 - Davies KJ and Doroshow JH, (1986), "Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase". *J. Biol. Chem.* 261 pp. 3060–3067.
 - Davies KJ, Doroshow JH and Hochstein, P (1983), "Mitochondrial NADH dehydrogenase-catalyzed oxygen radical production by adriamycin, and the relative inactivity of 5-iminodaunorubicin". *FEBS Lett.* **153** pp. 227–230.
 - De Haan J, C. Bladier, P. Griffiths, M. Kelner, R. D. O'Shea, N. S. Cheung, R. T. Bronson, M. J. Silvestro, S. Wild, S. S. Zheng, P. M. Beart, P. J. Herzog & I. Kola (1998). "Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide". *J Biol Chem* 273, 22528- 22536
 - Degli Esposti M. (1999). "To die or not to die—The quest of the TRAIL receptors". *J Leukoc Biol*; 65:535-42.
 - Degli Esposti M. (2002) "Measuring mitochondrial

- reactive oxygen species”. *Methods*;26:335-40.
- Degtarev A, Boyce M, Yuan J. (2003). “A decade of caspases”. *Oncogene*;22:8543-67
 - DePierre JW, Ernster L. “Enzyme topology of intracellular membranes”. *Annu Rev Biochem.* 1977; 46: 201-62.
 - Desagher, S., Martinou, J.C., (2000). “Mitochondria as the central control point of apoptosis”. *Trends Cell Biol.*, **10**(9): 369-377.
 - Dhalla, N. S., Temsah, R. M., & Netticadan, T. (2000). “Role of oxidative stress in cardiovascular diseases”. *J. Hypertens.*, 18, 655-673.
 - Ding L, Z. Liu, Z. Zhu, G. Luo, D. Zhao & J. Ni (1998). “Biochemical characterization of selenium-containing catalytic antibody as a cytosolic glutathione peroxidase mimic”. *Biochem J* 332, 251-255
 - Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H, “Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement”, *Free Radic. Biol. Med.* 32 (2002) 1102- 1115.
 - Dizdaroglu, M “Chemical determination of free radical-induced damage to DNA”. *Free Rad. Biol. Med.* 10 (1991), pp. 225-242.
 - Doroshow JH, (1983), “Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart”. *Cancer Res.* **43** pp. 460-472.
 - Doulias PT, Barbouti A, Galaris D, Ischiropoulos H, “SIN-1-induced DNA damage in isolated human peripheral blood lymphocytes as assessed by single cell gel electrophoresis (comet assay)”, *Free Radic. Biol. Med.* 30 (2001) 679- 685.
 - Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X., (2000). “Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition”. *Cell*, **102**(1):33-42.
 - Dumont, P., Leu, J.I., Della Pietra, A.C., George, D.L., Murphy, M., (2003). “The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential”. *Nat. Genet.*, **33**(3):357-365.

- Elchuri S, Oberley TD, Qi W, Eisenstein RS, Jackson L, Roberts H, Van Remmen, C.J. Epstein, Huang, TT (2005) “CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life”, *Oncogene* 24 367–380.
- Emelyanov VV. “Mitochondrial connection to the origin of the eukaryotic cell”. *Eur. J. Biochem.* 2003;270(8):1599-618.
- Ernster L, Dallner G. (1995). “Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function”. *Biochim Biophys Acta* 1271:195–204.
- Ernster L, Forsmark P, Nordenbrand K. (1992). “The mode of action of lipidsoluble antioxidants in biological membranes: Relationship between the effects of ubiquinol and vitamin E as inhibitors of lipid peroxidation in submitochondrial particles”. *BioFactors* 3:241–248,.
- Escriba PV, Ferrer-Montiel AV, Ferragut JA and Gonzalez-Ros JM, (1990), “Role of membrane lipids in the interaction of daunomycin with plasma membranes from tumor cells: implications in drug-resistance phenomena”. *Biochemistry* 29 pp. 7275–7282.
- Esposti MD, Cristea IM, Gaskell SJ, Nakao Y, Dive C. (2003). “Proapoptotic Bid binds to monolysocardiolipin, a new molecular connection between mitochondrial membranes and cell death”. *Cell Death Differ*; 10:1300-9.
- Esposti MD, Erler JT, Hickman JA, Dive C. (2001). “Bid, a widely expressed proapoptotic protein of the Bcl-2 family, displays lipid transfer activity”. *Mol Cell Biol*; 21:7268-76.
- Esposti MD. (2002). “Lipids, cardiolipin and apoptosis: a greasy licence to kill”. *Cell Death Differ*; 9:234-6.
- Esposti MD. (2002). “The roles of Bid”. *Apoptosis*; 7:433-40.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. (1991);”Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes”. *Free Radic Biol Med.* 11(1):81-128. Review.

- Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS, “Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance”, *Mutat. Res.* 567 (2004) 1–61.
- Farrow, S.N., White, J.H., Martinou, I., Raven, T., Pun, K.T., Grinham, C.J., Martinou, J.C., Brown, R., (1995). “Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K”. *Nature*, 374(6524):731-733.
- Ferrans, VJ (1978), “Overview of cardiac pathology in relation to anthracycline cardiotoxicity”. *Cancer Treat. Rep.* 62 pp. 955–961.
- Ferrer-Montiel AV, Gonzalez-Ros JM and Ferragut JA, (1992), “Different distribution of daunomycin in plasma membranes from drug-sensitive and drug-resistant P388 leukemia cells”. *Biochim. Biophys. Acta* 1104 pp. 111–116.
- Fiallo MM and Garnier-Suillerot A, (1986), “Interaction of adriamycin with cardiolipin-containing vesicles. Evidence of an embedded site for the dihydroanthraquinone moiety”. *Biochim. Biophys. Acta* 854 pp. 143–146.
- Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenaabeele P. (1999). “More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage”. *Oncogene*; 18:7719-30.
- Firestein, G.S., Echeverri, F., Yeo, M., Zvaifler, N. J., & Green, D. R. (1997). “Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 10895–10900.
- Foghsgaard L, Wissing D, Mauch D, et al. (2001). “Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor”. *J Cell Biol*; 153: 999^1010.
- Fossel, M. (2003). “Cells, Aging and Human Disease”. New York: Oxford University Press.
- Freireich EJ, Gehan EA, Rall DP, Schmidt LH, Skipper HE: “Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in Mouse, rats, hamster, dog, monkey, and man”. *Cancer*

- Chemother. Rep.* 1966. 50:219-244.
- Fridovich I. (1997). "Superoxide anion radical (O_2^-), superoxide dismutases, and related matters". *J. Biol. Chem.* 272:18515–17
 - Friedrich T, Steinmuller A, Weiss H (1995). "The proton pumping respiratory complex I of bacteria and mitochondria and its homologue in chloroplasts". *FEBS Lett.* 367:107.
 - Fry M and Green DE, (1980), "Cardiolipin requirement by cytochrome oxidase and the catalytic role of phospholipid". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93 pp. 1238–1246.
 - Fry M and Green DE, (1981), "Cardiolipin requirement for electron transfer in complex I and III of the mitochondrial respiratory chain". *J. Biol. Chem.* 256 pp. 1874–1880.
 - Fukuda F, Kitada M, Horie T and Awazu S, "Fluorescent substances and high molecular weight protein aggregates formed in rat heart mitochondria upon doxorubicin-induced lipid peroxidation". *J. Pharm. Pharmacol.* 47 (1995), pp. 246–249.
 - Geske FJ, Gerschenson LE. (2001). "The biology of apoptosis". *Hum Pathol*; 32:1029–38.
 - Gibson, L., Holmgren, S.P., Huang, D.C.S., Bernard, O., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sutherland, G.R., Baker, E., Adams, J.M., Cory, S., (1996). "Bcl-W, a novel member of the Bcl-2 family, promotes cell survival". *Oncogene*, 13:665–675.
 - Gille Land Nohl H, "Analyses of the molecular mechanism of adriamycin-induced cardiotoxicity". *Free Rad. Biol. Med.* 23 (1997), pp. 775–782.
 - Giulivi, A. Boveris and E. Cadenas, (1995), "Hydroxyl radical generation during mitochondrial electron transfer and the formation of 8-hydroxydesoxyguanosine in mitochondrial DNA". *Arch. Biochem. Biophys.* 316 pp. 909–916.
 - Gokcimen A, Cim A, Tola HT, Bayram D, Kocak A, Özgüner F y Ayata A. "Protective effect of N-acetylcysteine, caffeic acid and vitamin E on doxorubicin hepatotoxicity". *Human and*

- Experimental Toxicology*. 2007
26:519-525.
- Goldman R, Facchinetti T, Bach D, Raz A and Shinitzky M, (1978). “A differential interaction of daunomycin, adriamycin and their derivatives with human erythrocytes and phospholipid bilayers”. *Biochim. Biophys. Acta* **512** pp. 254–269.
 - Goormaghtigh E, Brasseur R and Ruyschaert JM, (1982), Adriamycin inactivates cytochrome *c* oxidase by exclusion of the enzyme from its cardiolipin essential environment”. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104 pp. 314–320.
 - Goormaghtigh E, Chatelain P., Caspers J and Ruyschaert JM, “Evidence of a complex between adriamycin derivatives and cardiolipin: possible role in cardiotoxicity”. *Biochem. Pharmacol.* 29 (1980), pp. 3003–3010.
 - Goormaghtigh E, Huart P, Brasseur R and Ruyschaert JM, (1986). “Mechanism of inhibition of mitochondrial enzymatic complex I–III by adriamycin derivatives”. *Biochim. Biophys. Acta* 861 pp. 83–94.
 - Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J.M., 1984. “Anthracycline glycoside_/membrane interactions”. *Biochim. Biophys. Acta* 779, 271_/288.
 - Gottlieb, R.A., Nordberg, J., Skowronski, E., Babior, B.M., (1996). “Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification”. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **93**(2):654-658.
 - Gottlieb, T.M., Oren, M., (1998). “p53 and apoptosis”. *Semin. Cancer Biol.*, **8**(5):359-368.
 - Gougeon ML, Kroemer G. (2003). “Charming to death: caspase-dependent or -independent?” *Cell Death Differ*; 10:390-2.
 - Gozuacik D, Kimchi A. (2004). Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* ; 23:2891^906.
 - Gray MW, Burger G, Lang BF. “Mitochondrial evolution”. *Science*.1999; 283 (5407): 1476-81.
 - Grazioli V, R. Schiavo, E. Casari, F. Marzatico, R.

- Rodriguez y Baena & P. Gaetani (1998). "Antioxidant enzymatic activities and lipid peroxidation in cultured human chondrocytes from vertebral plate cartilage". *FEBS Lett* 431, 149-153.
- Green DR, Evan GI. (2002). "A matter of life and death". *Cancer Cell*; 1:19-30.
 - Green DR, Kroemer G. (2004) "The pathophysiology of mitochondrial cell death". *Science* ; 305:626-9.
 - Griffin EA, Vanderkooi JM, Maniara G and Erecinska M, (1986), "Anthracycline binding to synthetic and natural membranes. A study using resonance energy transfer". *Biochemistry* 25 pp. 7875–7880.
 - Grollman, A. P., & Moriya, M. (1993). "Mutagenesis by 8-oxoguanine: An enemy within". *Trends in Genetics*, 9, 246–249.
 - Gross, A., Jockel, J., Wei, M.C., Korsmeyer, S.J., (1998). "Enforced dimerization of Bax results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis". *EMBO J.*, 17(14):3878-3885.
 - Guan Y, M. J. Hickey, G. E. Borgstahl, R. A. Hallewell, J. R. Lepock, D. O'Connor, Y. Hsieh, H. S. Nick, D. N. Silverman & J. A. Tainer (1998). "Crystal structure of Y34F mutant human mitochondrial manganese superoxide dismutase and the functional role of tyrosine 34". *Biochemistry* 37, 4722-4730
 - Guenebaut V, Schlitt A, Weiss H, Keonard A, Friedrich T (1998). "Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH ubiquinone oxidoreductase (complex I)". *J. Biol. Chem.* 276:105
 - Guicciardi ME, Deussing J, Miyoshi H, et al. (2000). "Cathepsin B contributes to TNF- α -mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c". *J Clin Invest*;106:1127^37.
 - Guo, B., Godzik, A., Reed, J.C., (2001). "Bcl-G, a novel pro-apoptotic member of the bcl-2 family". *J. Biol. Chem.*, 276(4):2780-2785.
 - Gupta, M., Fan, S.J., Zhan, Q.M., Kohn, K.W., O'Connor, P.M., Pommier, Y., (1997). "Inactivation of p53 increases

- the cytotoxicity of camptothecin in human colon HCT116 and breast MCF-7 cancer cells”. *Clin. Cancer Res.*, **3**:1653-1660.
- Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B. (1994) “Antioxidants in nutrition, health, and disease”. Oxford University Press; 4:63-81.
 - H. Nohl, L. Gille and K. Staniek, (1998), “The exogenous NADH dehydrogenase of heart mitochondria is the key enzyme responsible for selective cardiotoxicity of anthracyclines”. *Z. Naturforsch. C* 53 pp. 279–285.
 - Haenen, G.R.M., Bast, A. (1983) “Protection against lipid peroxidation by a microsomal glutathione-dependent factor” *FEBS. Lett*; 159:24-28.
 - Halliwell, B. (1988) “Albumin, an important extracellular antioxidant?”. *Biochem. Pharmacol.*; 37:569-571.
 - Hamuro, J., Murata, Y., Suzuki, M., Takatsuki, F., & Suga, T. (1999). “The triggering and healing of tumor stromal inflammatory reactions regulated by oxidative and reductive macrophages”. *Gann. Monograph Cancer Res.*, 48, 153–164.
 - Han, J., Flemington, C., Houghton, A.B., Gu, Z., Zambetti, G.P., Lutz, R.J., Zhu, L., Chittenden, T., (2001). “Expression of Bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals”. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **98**(20):11318-11323.
 - Han, J., Sabbatini, P., White, E., (1996). Induction of apoptosis by human Nbk/Bik, a BH3-containing protein that interacts with E1b 19k. *Mol. Cell Biol.*, 16:5857-5864.
 - Hardy S, El-Assaad W, Przybytkowski E, Joly E, Prentki M, Langelier Y. (2003). Saturated fatty acid-induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. A role for cardiolipin. *J. Biol. Chem.* 278:31861–70
 - Harman, D. (1956). Aging—A theory based on free-radical and radiation-chemistry. *J. Gerontol.*, 11, 298–300.
 - Harris, M.H., Thompson, C.B., (2000). The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer

- mitochondrial membrane permeability. *Cell Death Differ.*, 7(12):1182-1191.
- Hasinoff BB and Davey JP, (1988), “The iron(III)-adriamycin complex inhibits cytochrome *c* oxidase before its inactivation”. *Biochem. J.* 250 pp. 827–834.
 - Hatch, G.M., Vance, D.E. y Wilton, D.C. (1993). “Rat liver mitochondrial phospholipase A₂ is an endotoxin-stimulated membrane-associated enzyme of Kupffer cells which is released during liver perfusion”. *Biochem. J.* 293:143-150.
 - Hawkins CL, Davies MJ, “Hypochlorite-induced damage to DNA, RNA, and polynucleotides: formation of chloramines and nitrogen-centered radicals”, *Chem. Res. Toxicol.* 15 (2002) 83–92.
 - Hay BA. (2000). “Understanding IAP function and regulation: a view from *Drosophila*”. *Cell Death Differ.*; 7:1045-56.
 - Hayflick, L. (1998). How and why we age. *Exp. Gerontol.*, 33, 639–653.
 - Hegde, R., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E.S., (1998). Bcl-2, a BH3-containing mouse protein that interacts with Bcl-2 and Bcl-xL, is a potent death agonist. *J. Biol. Chem.*, 273(14):7783-7786.
 - Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407, 770–776.
 - Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T., Zhang, L., Thiagalingam, S., (1997). “14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression”. *Mol. Cell*, 1(1):3-11.
 - Hickman JA. (2002). “Apoptosis and tumorigenesis”. *Curr Opin Genet Dev*; 12:67-72.
 - Higuchi M, Singh S, Chan H, Aggarwal BB. (1995). “Protease inhibitors differentially regulate tumor necrosis factor-induced apoptosis, nuclear factor-kappa B activation, cytotoxicity, and differentiation”. *Blood*; 86:2248-56.
 - Hill MM, Adrain C, Martin SJ. (2003). “Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows”. *Mol Interv*; 3:19-26.

- Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, et al. (1997). "The apoptosis necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death". *Oncogene* ;15:1573-81.
- Ho Y, Gargano M, Cao J, Bronson RT, Heimler I, & Hutz RJ (1998). "Reduced Fertility in Female Mice Lacking Copper-Zinc Superoxide Dismutase". *J Biol Chem* 273,7765-7769
- Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D., Korsmeyer, S.J., (1990). "Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death". *Nature*, 348(6299):334-336.
- Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J., (1993). "Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis". *Cell*, 75(2):241-251.
- Hofhaus G, Weiss H, Leonard K (1991). "Electron microscopy analysis of the peripheral and membrane parts of mitochondrial NADH dehydrogenase (complex I)". *J. Mol. Biol.* 221:1027.
- Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, Bodmer JL, Schneider P, Seed B, Tschopp J. (2000). "Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule". *Nat Immunol*; 1:489-95.
- Horvitz HR. (1999). "Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*". *Cancer Res*; 59:1701s-6s.
- Hsieh Y, Y. Guan, C. Tu, P. J. Bratt, A. Angerhofer, J. R. Lepock, M. J. Hickey, J. A. Tainer, H. S. Nick & D. N. Silverman (1998). "Probing the active site of human manganese superoxide dismutase: the role of glutamine 143". *Biochemistry* 37, 4731-4739
- Hsu, S.Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M., Hsueh, A.J.W., (1997a). "Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members". *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. (USA)*, 94(23): 12401-12406.
- Hsu, S.Y., Lin, P., Hsueh, A.J.W., (1998). “Bod (Bcl-2-related ovarian death gene) is an ovarian BH3 domain-containing proapoptotic Bcl-2 protein capable of dimerization with diverse antiapoptotic Bcl-2 members”. *Mol. Endocrinol.*, **12**(9):1432-1440.
 - Hsu, Y.T., Wolter, K.G., Youle, R.J., (1997b). “Cytosol- to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X-L during apoptosis”. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **94**(8): 3668-3672.
 - Hu S, Snipas SJ, Vincenz C, Salvesen G and Dixit VM, “Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease”. *J. Biol. Chem.* **273** (1998), pp. 29648–29653.
 - Huertas JR, Battino M, Barzanti V, Maranesi M, Parenti-Castelli G, Littarru GP, Turchetto E, Mataix FJ, Lenaz G. “Mitochondrial and microsomal cholesterol mobilization after oxidative stress induced by adriamycin in rats fed with dietary olive and corn oil”. *Life Sci.* 1992;50(26):2111-8
 - Huertas JR, Battino M, Lenaz G, Mataix FJ (1991) “Changes in mitochondrial and microsomal rat liver coenzyme Q9 and Q10 content induced by dietary fat and endogenous lipid peroxidation”. *FEBS Lett.* 5;287(1-2):89-92
 - Huertas JR, Battino M, Mataix F, Littarru GP, Lenaz G (1991) “Cytochrome oxidase induction following oxidative stress produced by adriamycin in the heart of rats fed olive oil”]
 - Huertas JR, Battino M, Mataix FJ, Lenaz G. (1991) “Cytochrome oxidase induction after oxidative stress induced by adriamycin in liver of rats fed with dietary olive oil”. *Biochem Biophys Res Commun.* 27;181(1):375-82.
 - Huertas, J.R., Battino, M., Mataix, F.J., Lenaz, G., (1991b). “Cytochrome oxidase induction after oxidative stress induced by adriamycin in liver of rats fed with dietary olive oil”. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 375_/382.
 - Huertas, JR., Battino, M., Barzanti, V., Maranesi, M., Parenti-Castelli, G., Littarru,

- GP., Turchetto, E., Mataix, FJ., Lenaz, G. (1992) "Mitochondrial and Microsomal Cholesterol Mobilization after oxidative stress induced by adriamycin in rats fed with dietary olive and corn oil". *Life Sci.* 50(26):2111-8
- Hunt C, J. E. Sim, S. J. Sullivan, T. Featherstone, W. Golden, C. V. Kapp-Herr, R. A. Hock, R. A Gomez, A. J. Parsian & D. R. Spitz (1998). "Genomic instability and catalase gene amplification induced by chronic exposure to oxidative stress". *Cancer Res* 58, 3986-3992
 - Hwang C, Sinskey AJ, Lodish HF, "Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic-reticulum", *Science* 57 (1992) 1496–1502.
 - Ibañez, S. (2003). "Efecto del tipo de grasa de la dieta (aceite de oliva y aceite de girasol) y de la adición de coenzima Q₁₀ sobre diversos aspectos del envejecimiento mitocondrial (deleciones del ADN mitocondrial) en hígado". Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
 - Ignarro, L. J., & Kadowitz, P. J. (1985). "The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation". *Ann. Pharmacol. Toxicol.*, 25, 171–191.
 - Imai H, K. Narashima, M. Arai, H. Sakamoto, N. Chiba & Y. Nakagawa (1998). "Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase". *J Biol Chem* 273, 1990-1997
 - Imaizumi, K., Morihara, T., Mori, Y., Katayama, T., Tsuda, M., Furuyama, T., Wanaka, A., Takeda, M., Tohyama, M., (1999). "The cell death-promoting gene DP5, which interacts with the BCL2 family, is induced during neuronal apoptosis following exposure to amyloid beta protein". *J. Biol. Chem.*, **274**(12):7975-7981.
 - Innocente, S.A., Abrahamson, J.L., Cogswell, J.P., Lee, J.M., (1999). "p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1". *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **96**(5):2147-2152.

- Inohara, N., Ding, L.Y., Chen, S., Nunez, G., (1997). Harakiri, “a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X-L”. *EMBO J.*, **16**(7):1686-1694.
- Inohara, N., Ekhterae, D., Garcia, I., Carrio, R., Merino, J., Merry, A., Chen, S., Núñez, G., (1998b). “Mtd, a novel Bcl-2 family member activates apoptosis in the absence of heterodimerization with Bcl-2 and Bcl-X-L”. *J. Biol. Chem.*, **273**(15):8705-8710.
- Inohara, N., Gourley, T.S., Carrio, R., Muniz, M., Merino, J., Garcia, I., Koseki, T., Hu, Y., Chen, S., Nunez, G., (1998a). Diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3-independent cell death”. *J. Biol. Chem.*, **273**(49):32479-32486.
- Ishii K, Zhen LX, Wang DH, Funamori Y, Ogawa K, Taketa K, (1996) “Prevention of mammary tumorigenesis in acatalasemic mice by vitamin E supplementation”, *Jpn. J. Cancer Res.* **87** 680–684.
- Iwatta S, Ostermeier C, Ludwig B, Mitchel H (1995). “Structure al 2.8 A resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*”. *Nature* **376**: 660.
- Iyanagi T and Yamazaki I, (1970), “One-electron-transfer reactions in biochemical systems. V. Difference in the mechanism of quinone reduction by the NADH dehydrogenase and the NAD(P)H dehydrogenase (DT-diaphorase)”. *Biochim. Biophys. Acta* **216** pp. 282–294.
- Izawa S, Y. Inoue & A. Kimura (1996). “Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*”. *Biochem J* **320**, 61-67
- Jäättelä M. (2004) “Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression”. *Oncogene* ;**23**:2746^56.
- Jacks, T., (1996). “Tumor suppressor gene mutations in mice”. *Ann. Rev. Genet.*, **30**(1):603 636.

- Jaenke, R.S., Fajardo, L.F., 1977. "Adriamycin-induced myocardial lesions: report of a workshop". *Am. J. Surg. Pathol.* 1, 55_/60.
- Jenner, P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, 53, S26–S36.
- Ji LL and Mitchell EW, (1994), "Effects of adriamycin on heart mitochondrial function in rested and exercised rats". *Biochem. Pharmacol.* 47 pp. 877–885.
- Jiang , Z.Y. Woolard, A.C.S., Wolf, S.P. (1992) "Lipid hidroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and iodometric method". *Anal. Biochem.* 202: 384-389.
- Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., Lowe, S.W., (2002). "Apoptosis. A link between cancer genetics and chemotherapy". *Cell*, **108**(2):153-164.
- Jones, S. A., O'donnell, V. B., Wood, J. D., Broughton, J. P., Hughes, E. J., & Jones, O. T. (1996). "Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells". *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 271, H1626–H1634.
- Juranek, I., & Bezek, S. (2005). "Controversy of free radical hypothesis: Reactive oxygen species—Cause or consequence of tissue injury?" *Gen. Physiol. Biophys.*, 24, 263–278.
- K.M. Heiskanen, M.B. Bhat, H.W. Wang, J. Ma and A.L. Nieminen, "Mitochondrial depolarization accompanies cytochrome *c* release during apoptosis in PC6 cells". *J. Biol. Chem.* 274 (1999), pp. 5654–5658.
- Kagan V, Serbinova E, Packer L. (1990). "Antioxidant effects of ubiquinones in microsomes and mitochondria are mediated by tocopherol recycling. *Biochem Biophys Res Commun* **169**:851–857.
- Kagedal K, ZhaoM, Svensson I, Brunk UT (2001). "Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases". *BiochemJ*; 359: 335^43.
- Kane, D.J., Sarafian, T.A., Anton, R., Hahn, H., Gralla, E.B., Valentine, J.S., Ord, T., Bredesen, D.E., (1993). "Bcl-2 inhibition of neural death:

- decreased generation of reactive oxygen species”. *Science*, **262**(5137):1274-1277.
- Kang, D., Nishida, J., Iyama, A., Nakabeppu, Y., Furuichi, M., Fujiwara, T., et al. (1995). “Intracellular localization of 8-oxodGTPase in human cells, with special reference to the role of the enzyme in mitochondria”. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 14659–14665.
 - Karbowski M, Youle RJ. “Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis”. *Cell Death Differ* (2003); **10**:870.
 - Karoui H, Hogg N, Frejaville C, Tordo P, Kalyanaraman B, (1996) “Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxynitrite— ESR-SPIN trapping and oxygen uptake studies”, *J. Biol. Chem.* **271** 6000–6009.
 - Kastan, M.B., Canman, C.E., Leonard, C.J., (1995). “p53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer”. *Cancer Metast. Rev.*, **14**(1):3-15.
 - Kataoka, T., Holler, N., Micheau, O., Martinon, F., Tinel, A., Hofmann, K., Tschopp, J., (2001). “Bcl-rambo, a novel Bcl-2 homologue that induces apoptosis via its unique C-terminal extension”. *J. Biol. Chem.*, **276**(22): 19548-19554.
 - Kaufmann, W.K., Paules, R.S., (1996). “DNA damage and cell cycle checkpoints”. *FASEB J.*, **10**:238-247.
 - Kawahara A, Ohsawa Y, Matsumura H, Uchiyama Y, Nagata S. (1998). “Caspase-independent cell killing by Fas-associated protein with death domain”. *J Cell Biol*; **143**:1353-60.
 - Kawai Y, Morinaga H, Kondo H, Miyoshi N, Nakamura Y, Uchida K, Osawa T, (2004) “Endogenous formation of novel halogenated 20-deoxycytidine. Hypohalous acidmediated DNA modification at the site of inflammation”, *J. Biol. Chem.* **279** 51241–51249.
 - Ke, N., Godzik, A., Reed, J.C., (2001). “Bcl-B, a novel Bcl-2 family member that differentially binds and regulates

- Bax and Bak". *J. Biol. Chem.*, 276(16):12481-12484.
- Keisari, Y., Braun, L., & Flescher, E. (1983). "The oxidative burst and related phenomena in mouse macrophages elicited by different sterile inflammatory stimuli. *Immunobiology*, 165, 78–89.
 - Kelekar, A., Thompson, C.B., (1998). "Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis". *Trends Cell Biol.*, 8(8):324-330.
 - Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics". *BrJCancer* ;26: 239^57.
 - Kiefer, M.C., Brauer, M.J., Powers, V.C., Wu, J.J., Umansky, S.R., Tomei, L.D., Barr, P.J., (1995). "Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak". *Nature*, 374(6524):736-739.
 - King KL, Cidlowski JA. (1995) "Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death". *J Cell Biochem* ;58:175^80.
 - Kisen GO, Tessitore L, Costelli P, et al. (1993). Reduced autophagic activity in primary rat hepatocellular carcinoma and ascites hepatoma cells. *Carcinogenesis* ;14: 2501^5.
 - Kitanaka C, Kuchino Y. (1999). "Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology". *Cell Death Differ*;6:508^15.
 - Klein JA, Longo-Guess CM, Rossmann MP, Seburn KL, Hurd RE, Frankel WN, Bronson RT, Ackerman SL. (2002) "The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor". *Nature*; 419:367-74.
 - Kluck RM, Esposti MD, Perkins G, Renken C, Kuwana T, Bossy-Wetzel E, Goldberg M, Allen T, Barber MJ, Green DR and others. (1999). "The pro-apoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol". *J Cell Biol*; 147:809-22.

- Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., Newmeyer, D.D., (1997). “The release of cytochrome C from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis”. *Science*, **275**(5303):1132-1136.
- Kohn, K.W., (1996). “Regulatory genes and drug sensitivity”. *J. Natl. Cancer Inst.*, **88**(18):1255-1256.
- Kohn, K.W., Jackman, J., O'Connor, P.M., (1994). “Cell cycle control and cancer chemotherapy”. *J. Cell. Biochem.*, **54**(4):440-452.
- Kojo S, “Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress”, *Curr. Med. Chem.* 11 (2004) 1041–1064.
- Korsmeyer S.J. (1999). “BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death”. *Cancer Res*; 59:1693s-1700s.
- Korsmeyer, S.J., (1992). “Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death”. *Blood*, 80:879-886.
- Korsmeyer, S.J., Wei, M.C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K.J., Schlesinger, P.H., (2000). “Pro-apoptotic cascade activates Bid, which oligomerizes Bak or Bax into pores that result in the release of cytochrome c”. *Cell Death Differ.*, **7**(12):1166-1173.
- Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. (1996). “Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca²⁺ is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species”. *FEBS Lett.* 378:150–52
- Kozopas, K.M., Yang, T., Buchan, H.L., Zhou, P., Craig, R.W., (1993). “Mcl1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to Bcl-2”. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **90**(8):3516-3520.
- Krajewski, S., Krajewska, M., Ellerby, L.M., Welsh, K., Xie, Z.H., Deveraux, Q.L., Salvesen, G.S., Bredesen, D.E., Rosenthal, R.E., Fiskum, G., Reed, J.C., (1999). “Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia”. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **96**(10):5752-5757.

- Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M.J., Fenton, W., Reed, J.C., (1993). “Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes”. *Cancer Res.*, **53**:4701-4714.
- Kroemer G. (2003). “Mitochondrial control of apoptosis: an introduction”. *Biochem Biophys Res Commun*; 304:433-5.
- Kröger, A. (1978) “Determination of contents and redox state of ubiquinone and menaquinone”. *Methods Enzymol.* 53: 579-591.
- Kudla, G., Montessuit, S., Eskes, R., Berrier, C., Martinou, J.C., Ghazi, A., Antonsson, B., (2000). “The destabilization of lipid membranes induced by the C-terminal fragment of caspase 8-cleaved bid is inhibited by the N-terminal fragment”. *J. Biol. Chem.*, **275**(30):22713-22718.
- Kukreja, R. C., & Hess, M. L. (1992). “The oxygen free-radical system—From equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection”. *Cardiovasc. Res.*, 26, 641–655.
- Kumakura K, Kitada M, Horie T and Awazu, S (1997), “Detection of phosphatidylcholine hydroperoxide produced in the heart of the doxorubicin administered mouse”. *Anal. Lett.* 30 pp. 1483–1490.
- Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneider R, Green DR, Newmeyer DD. (2002). “Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane”. *Cel*; 111:331-42.
- Kuwana T, Smith JJ, Muzio M, Dixit V, Newmeyer DD, Kornbluth S. (1998). “Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c”. *J Biol Chem*; 273:16589-94.
- Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J.E., Bonzon, C., Sullivan, B.A., Green, D.R., Newmeyer, D.D., (2005). “BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-

- mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly". *Mol. Cell*, **17**(4):525-535.
- Lamas, S., Marsden, P. A., Li, G. K., Tempst, P., & Michel, T. (1992). "Endothelial nitric oxide synthase: Molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 6348–6352.
 - Lambert AJ, Brand MD (2004) "Superoxide production by NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane". *Biochem J* **382**:511–517
 - Larm JA, Vaillant F, Linnane AW, Lawen A. (1994). "Up-regulation of the plasma membrane oxidoreductase as a prerequisite for the viability of human Namalwa rho 0 cells". *J Biol Chem* **269**:30097–30100.
 - Lawen A. (2003) "Apoptosis-an introduction". *Bioessays*; **25**:888-96.
 - LeBlanc H, Lawrence D, Varfolomeev E, Totpal K, Morlan J, Schow P, Fong S, Schwall R, Sinicropi D, Ashkenazi A. (2002). "Tumor-cell resistance to death receptor-induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog" *Bax. Nat Med*; **8**:274-81.
 - Lee Y, Galoforo SS, Berns CM, Chen JC, Davis BH, Sim JE, Corry PM & Spitz: DR (1998). "Glucose deprivation-induced cytotoxicity and alterations in mitogen-activated protein kinase activation are mediated by oxidative stress in multidrug-resistant human breast carcinoma cells". *J Biol Chem* **273**, 5294-5299
 - Lee, H. C., & Wei, Y. H. (2000). "Mitochondrial role in life and death of the cell". *Journal of Biomedical Science*, **7**, 2–15.
 - Lefrak EA, Pitha J, Rosenheim S and Gottlieb JA, (1973). "A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity". *Cancer* **32** pp. 302–314.
 - Lefrak, E.A., Pitha, J., Rosenheim, S., Gottlieb, J.A., (1973). "A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity". *Cancer* **32**, 302_/314.

- Leist M, Jäättelä M. (2001) “Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms”. *Nat Rev Mol Cell Biol*;2:589-98.
- Lenaz G, Barnabei O, Robbi A, Battino M, Beyer RE, Ernster L. (1990). “The antioxidant role of Coenzyme Q”. In: Eds. *Highlights of Ubiquinone Research*. London: Taylor & Francis, pp191–213.
- Lenaz G.(1998) “Role of mitochondria in oxidative stress and aging”. *Biochim Biophys Acta*. 10;1366(1-2):53-67. Review.
- Lenaz, G (1998), Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim. Biophys. Acta* **1366** pp. 53–67.
- Lenaz, G. (1998) “Role of mitochondria in oxidative stress and ageing”. *Bioch. Biophys*; 1366:53-67.
- Lepage, G., Roy, C.C. (1986) “Direct transesterification of all classes of lipids in one-step reaction”. *J. Lipid Res*. 27: 114-120.
- Letai, A., Bassik, M., Walensky, L., Sorcinelli, M., Weiler, S., Korsmeyer, S., (2002). “Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics”. *Cancer Cell*, **2**(3):183-192.
- Leu, J.I.J., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M.E., George, D.L., (2004). “Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex”. *Nat. Cell Biol.*, **6**(5):443-450.
- Levine, A.J., (1997). “p53, the cellular gatekeeper for growth and division”. *Cell*, 88(3):323-331.
- Li H, Yuan J. (1999). “Deciphering the pathways of life and death”. *Curr Opin Cell Biol*;11:261-6.
- Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C and Chan PH, (1995), “Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase”. *Nat. Genet*. 11 pp. 376–381.
- Li, L.Y., Luo, X., Wang, X., (2001). “Endonuclease G is an apoptotic DNase when released

- from mitochondria". *Nature*, 412(6842):95-99.
- Lin, E.Y., Orlofsky, A., Berger, M.S., Prystowsky, M.B., (1993). "Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2". *J. Immunol.*, 151:1979-1988.
 - Littarru, G.P., Battino, M. (1994) "Natural antioxidants and sports medicine". *Int. J. Sport. Cardiol.*; 2:127-130.
 - Liu, Z., Lu, H., Jiang, Z.H., Pastuszyn, A., Hu, C.A., (2005). "Apolipoprotein L6, a novel proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein, induces mitochondria-mediated apoptosis in cancer cells". *Mol. Cancer Res.*, 3:21-31.
 - Lledías F, P. Rangel & W. Hansberg (1998). "Oxidation of catalase by singlet oxygen". *J Biol Chem* 273, 10630-10637
 - Lock RB, Stribinskiene L. (1996) "Dual modes of death induced by etoposide in human epithelial tumor cells allow Bcl-2 to inhibit apoptosis without affecting clonogenic survival". *Cancer Res*;56: 4006¹².
 - Lockshin RA, Osborne B, Zakeri Z. (2000) "Cell death in the third millennium". *Cell Death Differ*; 7:2⁷.
 - Lockshin RA, Zakeri Z. (2004). "Apoptosis, autophagy, and more". *Int J Biochem Cell Biol*; 36:2405-19 .
 - Lockshin RA, Zakeri Z. (2004). "Caspase-independent cell death?" *Oncogene*; 23:2766-73.
 - Lowe, S.W., Bodis, S., McClatchey, A., Remington, L., Ruley, H.E., Fisher, D.E., Housman, D.E., Jacks, T., (1994). "p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo". *Science*, 266(5186):807-810.
 - Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T., Housman, D.E., (1993). "p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents". *Cell*, 74(6):957-967.
 - Lown JW, Chen HH, Plambeck JA and Acton EM, (1979), "Diminished superoxide anion generation by reduced 5-iminodaunorubicin relative to daunorubicin and the relationship to cardiotoxicity of the anthracycline antitumor

- agents”. *Biochem. Pharmacol.* 28 pp. 2563–2568.
- Lown JW, Chen HH, Plambeck JA and Acton, EM (1982), “Further studies on the generation of reactive oxygen species from activated anthracyclines and the relationship to cytotoxic action and cardiotoxic effects”. *Biochem. Pharmacol.* 31 pp. 575–581.
 - Lowry O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.G. (1951) “Protein measurement with folin phenol reagent” *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
 - Lucas DT and Szweda, LI (1998), “Cardiac reperfusion injury: aging, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** pp. 510–514.
 - Luo X, Pitkanen S, Kassovska-Bratinova S, Robinson BH and Lehotay DC, “Excessive formation of hydroxyl radicals and aldehydic lipid peroxidation products in cultured skin fibroblasts from patients with complex I deficiency. *J. Clin. Invest.* 99 (1997), pp. 2877–2882.
 - Lyamzaev KG, Nepryakhina OK, Saprunova VB, Bakeeva LE, Pletjushkina OY, Chernyak BV, Skulachev VP. (2008) “Novel mechanism of elimination of malfunctioning mitochondria (mitoptosis): formation of mitoptotic bodies and extrusion of mitochondrial material from the cell”. *Biochim Biophys Acta.*;1777(7-8):817-25..
 - Madesh M, Hajnoczky G. (2001). “VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release”. *J. Cell Biol.* 155:1003–15
 - Maik Hüttemann & Icksoo Lee & Alena Pecinova & Petr Pecina & Karin Przyklenk & Jeffrey W. Doan “Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease” *J Bioenerg Biomembr* (2008) 40:445–456.
 - Majima H, T. D. Oberley, K. Furukawa, M. P. Mattson, H. C. Yen, L. I. Szweda & D. K. St. Clair (1998). “Prevention of Mitochondrial Injury by

- Manganese Superoxide Dismutase Reveals a Primary Mechanism for Alkaline-induced Cell Death.” *J Biol Chem* 273, 8217-8224
- Malis, C.D., Weber, P.C., Leaf, A y Bonventre, J.V. (1990). “Incorporation of marine lipids into mitochondrial membranes increases susceptibility to damage by calcium and reactive oxygen species. Evidence for enhanced activation of phospholipase A2 in mitochondria enriched with n-3 fatty acids”. *Proc. Natl. Acd. Sci. USA.* 87:8845-8849.
 - Mancini, M., Nicholson, D.W., Roy, S., Thornberry, N.A., Peterson, E.P., Casciola-Rosen, L.A., Rosen, A., (1998). “The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling”. *J. Cell Biol.*, 140(6):1485-1495.
 - Manna SK, Zhang HJ, YanT, OberleyLW, Aggarwal BB. (1998). “Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1”. *J. Biol. Chem.* 273:13245–54
 - Marnett, L. J. (1999). “Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde”. *Mut. Res-Fund. Mol. Mech Mutagen.*, 424, 83–95.
 - Marnett, L. J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21, 361–370.
 - Marsden VS, Strasser A. (2003). “Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more”. *Annu Rev Immunol* ; 21:71-105.
 - Martin SJ. (2002). “Destabilizing influences in apoptosis: sowing the seeds of IAP destruction”. *Cell*; 109:793-6.
 - Martinou JC, Green DR. (2001). “Breaking the mitochondrial barrier”. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2:63-7.
 - Martins LM, Iaccarino I, Tenev T, Gschmeissner S, Totty NF, Lemoine NR, Savopoulos J, Gray CW, Creasy CL, Dingwall C and others. (2002). “The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like

- motif". *J Biol Chem* ; 277:439-44.
- Marutaka M, Iwagaki H, Suguri T, Tanaka N and Orita K, (1994), "Alterations of membrane fluidity in K562 cells exposed to the anticancer drug adriamycin". *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 85 pp. 163–170.
 - Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J.M., Susin, S.A., Vieira, H.L., Prevost, M.C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J.C., Kroemer, G., (1998). "Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis". *Science*, 281(5385):2027-2031.
 - Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C, "Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes", *J. Nutr. Biochem.* 16 (2005) 577–586.
 - Masini A, Ceccarelli D, Trenti T, Corongiu FP, Muscatello U. (1989). "Perturbation in liver mitochondrial Ca_2^+ homeostasis in experimental iron overload: a possible factor in cell injury. *Biochim. Biophys. Acta* 1014:133–40
 - Mataix J, J. L. Quiles, J. R. Huertas, M. Battino & M. Mañas (1998). "Tissues specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation". *Free Rad Biol Med* 24, 511-521
 - Mataix, B. (2005). "Efecto de los ácidos grasos de la dieta y la suplementación con coenzima Q₁₀ sobre el estrés oxidativo cerebral durante el envejecimiento". Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
 - Matsumura H, Shimizu Y, Ohsawa Y, Kawahara A, Uchiyama Y, Nagata S. (2000). Necrotic death pathway in Fas receptor signaling. *J Cell Biol*; 151:1247-56.
 - Matsushima, M., Fujiwara, T., Takahashi, E., Minaguchi, T., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y., Suzumori, K., Nakamura, Y., (1998). "Isolation, mapping, and functional analysis of a novel human cDNA (*BNIP3L*) encoding a protein homologous to human NIP3". *Genes.*

- Chromos. Cancer*, **21**(3):230-235.
- Mazel, S., Burtrum, D., Petrie, H.T., 1996. "Regulation of cell division cycle progression by bcl-2 expression: a potential mechanism for inhibition of programmed cell death". *J. Exp. Med.*, 183(5):2219-2226.
 - McCay, P.B. (1985) "Vitamine E: interactions with radicals and ascorbate". *Ann. Rev. Nutr.*; 323-340.
 - McDonnell, J.M., Fushman, D., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J., Cowburn, D., (1999). "Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists". *Cell*, 96(5):625-634.
 - McMillin, J.B., Dowhan, W. (2002) "Cardiolipin and apoptosis". *Biochim. Biophys. Acta*; 1585(2-3):97-107.
 - Meredith MJ and Reed DJ, (1983), "Depletion in vitro of mitochondrial glutathione in rat hepatocytes and enhancement of lipid peroxidation by adriamycin and 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU). *Biochem. Pharmacol.* 32 pp. 1383–1388.
 - Micheau O, Tschopp J. (2003). "Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes". *Cell*; 114:181-90.
 - Michikawa Y, Mazzucchelli F, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G. (1999) "Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human DNAmT control region for replication" *Science*. 22; 286(5440):774-9.
 - Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., Moll, U.M., (2003). "p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria". *Mol. Cell*, 11(3):577-590.
 - Mimnaugh E.G., Trush M.A. and Gram T.E., (1981), "Stimulation by adriamycin of rat heart and liver microsomal NADPH-dependent lipid peroxidation". *Biochem. Pharmacol.* **30** pp. 2797–2804.
 - Mimnaugh EG, Trush MA and Gram TE, (1986), "A possible role for membrane lipid peroxidation in anthracycline nephrotoxicity". *Biochem. Pharmacol.* **35** pp. 4327–4335.

- Minn, A.J., Velez, P., Schendel, S.L., Liang, H., Muchmore, S.W., Fesik, S.W., Fill, M., Thompson, C.B., (1997). “Bcl-xL forms an ion channel in synthetic lipid membranes”. *Nature*, 385(6614):353-357.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B., Reed, J.C., (1994). “Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo”. *Oncogene*, 9:1799-1805.
- Miyashita, T., Reed, J.C., (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 80(2):293-299.
- Montine TJ, Neely MD, Quinn JF, Beal MF, Markesbery WR, Roberts LJ, Morrow JD (2002). “Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer’s disease”. *Free Radic Biol Med.* 1;33(5):620-6. Review.
- Morré DM, Lenaz G, Morré DJ. (2000). “Surface oxidase and oxidative stress propagation in aging. *J Exp Biol* **203**:1513–1521.
- Moyes, C. D., & Hood, D. A. (2003). “Origins and consequences of mitochondrial variation in vertebrate muscle”. *Annual Review of Physiology*, 65, 177–201.
- Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettlesheim, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.L., Ng, S.C., Fesik, S.W., (1996). “X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death”. *Nature*, 381(6580):335-341.
- Murphy, M., Kehrer, J.P. (1983) “Lipid peroxidation inhibitory factors in liver and muscle of rat, mouse and chicken”. *Arch. Biochem. Biophys. Acta*; 767:21-28.
- Myers CE, McGuire W and Young R, (1976), “Adriamycin: amelioration of toxicity by alpha-tocopherol”. *Cancer Treat. Rep.* 60 pp. 961–962.
- Myers CE, McGuire WP, Liss RH, Ifrim I, Grotzinger K and Young RC, (1977). “Adriamycin: the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity

- and tumor response". *Science* 197 pp. 165–167.
- Myers CE, Muindi JR, Zweier J and Sinha BK, (1987), "5-Iminodaunomycin. An anthracycline with unique properties". *J. Biol. Chem.* 262 pp. 11571–11577.
 - Nagaoka S, Masaki H, Aoyama Y, Yoshida A. (1986). "Effects of excess dietary tyrosine or certain xenobiotics on the cholesterologenesis in rats". *J Nutr.*;116(5):726-32.
 - Nakamura S and Yamazaki I, (1969), "One-electron transfer reactions in biochemical systems. IV. A mixed mechanism in the reaction of milk xanthine oxidase with electron acceptors. *Biochim. Biophys. Acta* **189** pp. 29–37.
 - Nakano, K., Vousden, K.H., (2001). "Puma, a novel proapoptotic gene, is induced by p53". *Mol. Cell*, 7(3):683-694.
 - Nakano, K., Vousden, K.H., (2001). "Puma, a novel proapoptotic gene, is induced by p53". *Mol. Cell*, 7(3):683-694.
 - Neumann CA, Krause DS, Carman CV, Das S, Dubey DP, Abraham JL, Bronson RT, Y. Fujiwara, S.H. Orkin, R.A. Van Etten, "Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression", *Nature* 424 (2003) 561–565.
 - Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. (2003). "Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death". *Cell*; 112:481-90.
 - Nguyen, M., Branton, P.E., Walton, P.A., Oltvai, Z.N., Korsmeyer, S.J., Shore, G.C., (1994). "Role of membrane anchor domain of Bcl-2 in suppression of apoptosis caused by E1B-defective adenovirus". *J. Biol. Chem.*, 269: 16521-16524.
 - Nicholls DG (1974) "The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton-electrochemical gradient across the inner membrane of rat-liver mitochondria as determined by ion distribution". *Eur J Biochem* 50:305–315.
 - Nicolay K, Fok JJ, Voorhout W, Post JA and B. de-Kruijf, (1986), "Cytofluorescence detection of adriamycin–mitochondria interactions in

- isolated, perfused rat heart”. *Biochim. Biophys. Acta* 887 pp. 35–41.
- Nicolay K, Timmers RJ, Spoelstra E, Van der Neut R, Fok JJ, Huigen YM, Verkleij AJ and De Kruijff B, (1984), “The interaction of adriamycin with cardiolipin in model and rat liver mitochondrial membranes”. *Biochim. Biophys. Acta* 778 pp. 359–371.
 - Nicotera, P., Leist, M., Ferrando-May, E., (1999). “Apoptosis and necrosis: different execution of the same death”. *Biochem. Soc. Symp.*, 66:69-73.
 - Niki, E. (1987) “Antioxidants in relation to lipid peroxidation”. *Chem. Phys. Lipids*; 44:227-253.
 - Nisoli E, Clementi E, Moncada S, Carruba MO. “Mitochondrial biogenesis as a cellular signalling framework”. *Biochem. Pharmacol.* (2004); 67:1-15.
 - Nohl H and Jordan W, (1983), “OH⁻ generation by adriamycin semiquinone and H₂O₂; an explanation for the cardiotoxicity of anthracycline antibiotics”. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114 pp. 197–205.
 - Nohl H, (1988), “Identification of the site of adriamycin-activation in the heart cell”. *Biochem. Pharmacol.* 37 pp. 2633–2637.
 - Nohl H, “Demonstration of the existence of an organo-specific NADH dehydrogenase in heart mitochondria”. *Eur. J. Biochem.* 169 (1987), pp. 585–591.
 - O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L.A., Hausmann, G., Adams, J.M., Cory, S., Huang, D.C., (1998). Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis”. *EMBO J.*, 17(2):384-395.
 - O'Connor, P.M., (1997). “Mammalian G1 and G2 phase checkpoints”. *Cancer Surv.*, 29:151-182.
 - O'Connor, P.M., Jackman, J., Bae, I., Myers, T.G., Fan, S., Mutoh, M., Scudiero, D.A., Monks, A., Sausville, E.A., Weinstein, J.N., *et al.*, (1997). “Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute drug screen and correlations with the growth-

- inhibitory potency of 123 anticancer agents". *Cancer Res.*, 57:4285-4300.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, Y., Tokino, T., Taniguchi, T., Tanaka, N., (2000). "Noxa, a BH3-only member of the bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis". *Science*, 288(5468):1053-1058.
 - Ogura R, Sugiyama M, Haramaki N and Hidaka T, (1991), "Electron spin resonance studies on the mechanism of adriamycin-induced heart mitochondrial damages". *Cancer Res.* 51 pp. 3555–3558.
 - Okada H, Mak TW. (2004) "Pathways of apoptotic and non apoptotic death in tumour cells" *.Nat Rev Cancer* 4:592^603.
 - Olson RD and Mushlin PS, (1990), "Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses". *FASEB J.* 4 pp. 3076–3086.
 - Oltvai, Z.N., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J., (1993). "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death". *Cell*, 74(4):609-619.
 - Orrenius, S., Moldeus, P., Theor, H. (1977) "In: Microsomes and drugs oxidation". Ulrich, V., Roots, I., Hilderbrandt, A. Et al. (edts). P.292. Pergamon Press. New York.
 - Ostrander DB, Sparagna GC, Amoscato AA, McMillin JB, Dowhan W. (2001). Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrome *c* release in palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276:38061–67
 - Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S. (2002). "Cytochrome *c* release from mitochondria proceeds by a two-step process". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:1259–63
 - Ozoren N, El-Deiry WS. (2002), "Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia*; 4:551-7.
 - Ozoren N, El-Deiry WS. (2003). "Cell surface Death Receptor signaling in normal and cancer cells". *Semin Cancer Biol*; 13:135-47.

- Paglin S, Hollister T, Delohery T, et al. (2001) “A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles”. *Cancer Res*; 61:439-44.
- Palmeira CM, Serrano J, Kuehl DW and Wallace K, “Preferential oxidation of cardiac mitochondrial DNA following acute intoxication with doxorubicin”. *Biochim. Biophys. Acta* 1321 (1997), pp. 101-106.
- Papadopoulou LC and Tsiftoglou AS, “Mitochondrial cytochrome *c* oxidase as a target site for daunomycin in K-562 cells and heart tissue”. *Cancer Res*. 53 (1993), pp. 1072-1078.
- Papas, A.M. (1993) “Vitamin E and exercise: aspect of biokinetic and bioavailability. En: “Nutricion and fitness in health and disease”. *Simopulus, A.P. Ed. World Nutr. Diet.* Basel, Karger, Switzerland; 72: 165-176.
- Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Ruggiero FM. (2000). “The effect of reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain on the cytochrome *c* oxidase activity and on the cardiolipin content in bovine heart submitochondrial particles”. *FEBS Lett.* 466:323-26
- Paradies G, Ruggiero JM, Petrosillo G, Quagliariello E (1998) “Peroxidative damage to cardiac mitochondria: cytochrome oxidase and cardiolipin alterations”. *FEBS Lett* 13;424(3):155-8.
- Parrish, J., Li, L., Klotz, K., Ledwich, D., Wang, X., Xue, D., (2001). “Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. Elegans*”. *Nature*, 412(6842):90-94.
- Passalaris, T.M., Benanti, J.A., Gewin, L., Kiyono, T., Galloway, D.A., (1999). “The G(2) checkpoint is maintained by redundant pathways”. *Mol. Cell Biol.*, 19:5872-5881.
- Pavlov, E.V., Priault, M., Pietkiewicz, D., Cheng, E.H.Y., Antonsson, B., Manon, S., Korsmeyer, S.J., Mannella, C.A., Kinnally, K.W., (2001). “A novel, high conductance channel of mitochondria linked

- to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast". *J. Cell Biol.*, 155(5):725-732.
- Penninger JM, Kroemer G. (2003). "Mitochondria, AIF and caspases--rivaling for cell death execution". *Nat Cell Biol*; 5:97-9.
 - Perfettini JL, Kroemer G. (2003) "Caspase activation is not death". *Nat Immunol* ;4:308^10.
 - Perfettini, J.L., Kroemer, R.T., Kroemer, G., (2004). "Fatal liaisons of p53 with bax and Bak". *Nat. Cell Biol.*, 6(5):386-387.
 - Peter ME, Krammer PH. (1998). "Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis". *Curr Opin Immunol*; 10:545-51.
 - Peter ME, Krammer PH. (2003). "The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond". *Cell Death Differ*; 10:26-35.
 - Peters JH, Evans MJ, Jensen RA and Acton EM, (1980), "Effects of 5-iminodaunorubicin on nucleoli of rats". *Cancer Chemother. Pharmacol.* 4 pp. 263–266.
 - Petrosillo, G., Ruggiero, F. M., & Paradies, G. (2003). "Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria". *FASEB J.*, 17, 2202–2208.
 - Pitkanen S and Robinson BH, "Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase". *J. Clin. Invest.* 98 (1996), pp. 345–351.
 - Podmore ID, Griffiths HR, Herbert KE, Mistry N, Mistry P, Lunec J, "Vitamin C exhibits pro-oxidant properties", *Nature* 392 (1998) 559.
 - Pollakis G, Goormaghtigh E, Delmelle M, Lion Y and Ruyschaert JM, (1984), "Adriamycin and derivatives interaction with the mitochondrial membrane: O₂ consumption and free radicals formation". *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 44 pp. 445–459.
 - Polster, B.M., Kinnally, K.W., Fiskum, G., (2001). "BH3 death domain peptide induces cell type-selective mitochondrial outer membrane permeability".

- J. Biol. Chem.*, 276: 37887-37894.
- Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. (1997). "A model for p53-induced apoptosis". *Nature* 389:300–5
 - Praet M and Ruyschaert JM, (1993), "In-vivo and in-vitro mitochondrial membrane damages induced in mice by adriamycin and derivatives". *Biochim. Biophys. Acta* 1149 pp. 79–85.
 - Puthalakath, H., Huang, D.C.S., O'Reilly, L.A., King, S.M., Strasser, A., (1999). "The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex". *Mol. Cell*, 3(3):287-296.
 - Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L.A., Beaumont, J.G., Coultas, L., Cheney, R.E., Huang, D.C., Strasser, A., (2001). "Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis". *Science*, 293(5536):1829-1832.
 - Qin, Z.H., Wang, Y., Kikly, K.K., Sapp, E., Kegel, K.B., Aronin, N., DiFiglia, M., (2001). "Pro-caspase-8 is predominantly localized in mitochondria and released into cytoplasm upon apoptotic stimulation". *J. Biol. Chem.*, 276(11):8079-8086.
 - Qu X, YuJ, Bhagat G, et al. (2003) "Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* ;112: 1809^20.
 - Quillet-Mary, V. Mansat, E. Duchayne, M.G. Come, M. Allouche, J.D. Bailly, C. Bordier and G. Laurent, (1996), "Daunorubicin-induced internucleosomal DNA fragmentation in acute myeloid cell lines". *Leukemia* 10 pp. 417–425.
 - Ramon, J.R. (1993). "Protocolos: Radicales libres y antioxidantes en clínica humana". *Editorial IDEPSA*.
 - Ramotar, D. y Demple, B. (1993). "Enzymes that repair oxidative damage to DNA. DNA and Free Radicals". *Halliwell, B. y Aruoma, O.I. (eds). Ellis*

- Horwood. New York*, pp 165-191.
- Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G. (2002). "Mitochondria, the killer organelles and their weapons". *J Cell Physiol*; 192:131-7.
 - Reaume A, J. L. Elliot, E. K. Hoffman, N. W. Kowall, R. J. Ferrante, D. F. Siwek, H. M. Wilcox, D. G. Flood, M. F. Beal, R. H. Brown Jr., R. W. Scott & W. D. Snider (1996). "Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury". *Nature Genet* 13, 43-47
 - Reddy, C.C., Scholz, R.W., Thomas, C.C., Massaro, E.J. (1982). "Vitamine E dependent reduced glutathione inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation". *Life Sci.*; 31:571-576.
 - Reed JC, "Cytochrome *c*: can't live with it—can't live without it". *Cell* 91 (1997), pp. 559–562.
 - Reed JC. (2000). "Mechanisms of apoptosis". *Am J Pathol*; 157:1415-30.
 - Reed, J.C., (1997). "Double identity for proteins of the Bcl-2 family". *Nature*, 387(6635):773-776.
 - Reed, J.C., (1998). "Bcl-2 family proteins". *Oncogene*, 17(25):3225-3236.
 - Reeves, PG "Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A Diet". *J. Nutr.* 127:838S-841S. 1997.
 - Remmen, H.V., Richardson, A. (2001). "Oxidative damage to mitochondria and aging". *Exp. Gerontol.*; 36:957-968.
 - Rice-Evans C, "Flavonoid antioxidants", *Curr. Med. Chem.* 8 (2001) 797–807.
 - RiceEvans CA, Miller NJ, Paganga, G "Structure–antioxidante activity relationships of flavonoids and phenolic acids", *Free Rad. Biol. Med.* 20 (1996) 933–956.
 - Richter C, Park JW and Ames BN, (1988), "Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** pp. 6465–6467.
 - Richter C, Suter M, Walter PB.(1998) "Mitochondrial free radical damage and DNA

- repair". *Biofactors*. 7(3):207-8.
Review.
- Robinson, N. C. (1993). "Functional binding of cardiolipin cytochrome-c-oxidase". *J. Bioen. Biomembr.*, 25, 153–163.
 - Roche E, Romero-Alvira D. (1996). "Changes in DNA induced by oxidative stress" *Med Clin*. 3;106(4):144-53.
Review.
 - Romero Alvira, C. y González Martínez, F. (1992). "Estrés oxidativo y su relación con la patología pediátrica". *An. Esp. Pediatr*. 36(2):85-97.
 - Roninson IB, Broude EV, Chang BD. (2001) "If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells". *Drug Resist Updat*; 4:303^13.
 - Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. (2004). "Toxic proteins released from mitochondria in cell death". *Oncogene*; 23:2861-74.
 - Saito, M., Korsmeyer, S.J., Schlesinger, P.H., (2000). "Bax-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes". *Nat. Cell Biol.*, 2(8):553-555.
 - Sakurai K, Stoyanovsky DA, Fujimoto Y and Cederbaum A.I, (2000), "Mitochondrial permeability transition induced by 1-hydroxyethyl radical". *Free Rad. Biol. Med.* 28 pp. 273–280.
 - Sakurai K., Stoyanovsky D.A., Fujimoto Y., Cederbaum A.I., (2000) "Mitochondrial permeability transition induced by 1-hydroxyethyl radical - death by a thousand cuts?" *Free Radical Biology and Medicine* 28: 273-280(8).
 - Salvesen GS, Dixit VM. (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*; 91:443-6.
 - Salvesen GS, Dixit VM. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model". *Proc Natl Acad Sci USA*; 96:10964-7.
 - Salvesen GS, Renatus M. (2002). "Apoptosome: the seven-spoked death machine". *Dev Cell*; 2:256-7.
 - Saraste M (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 283: 1488.
 - Sastre, J., Pallardó, F.V., De La Asunción, G.J., Viña, J. (1999). "Mitochondria, Oxidative Stress

- and Aging". *Free Rad. Biol. Med.*; 3
- Sattler, M., Liang, H., Nettlesheim, D., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Eberstadt, M., Yoon, H.S., Shuker, S.B., Chang, B.S., Minn, A.J., *et al.*, (1997). "Structure of Bcl-x(L)-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis". *Science*, 275(5302):983-986.
 - Sauberlich, H.E. (1994). "Pharmacology of vitamin C". *Ann. Rev. Nutr.* 14:371-391.
 - Sax, J.K., Fei, P., Murphy, M.E., Bernhard, E., Korsmeyer, S.J., El-Deiry, W.S., (2002). "BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity". *Nat. Cell Biol.*, 4(11):842-849.
 - Sayre, L. M., Smith, M. A., & Perry, G. (2001). "Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease". *Curr. Med. Chem.*, 8, 721–738.
 - Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. (1998) "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways". *EMBO J*; 17:1675-87.
 - Scaffidi C, Kirchhoff S, Krammer PH, Peter ME. (1999). "Apoptosis signaling in lymphocytes". *Curr Opin Immunol*; 11:277-85.
 - Schaefer, A.M. *et al.* (2008). "The prevalence of mitochondrial DNA disease in adults". *Ann. Neurol.* **63**, 35–39
 - Schendel, S.L., Montal, M., Reed, J.C., (1998). "Bcl-2 family proteins as ion-channels". *Cell Death Differ.*, 5(5):372-380.
 - Schlesinger, P.H., Gross, A., Yin, X.M., Yamamoto, K., Saito, M., Waksman, G., Korsmeyer, S.J., (1997). "Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic Bax and antiapoptotic Bcl-2". *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **94**(21): 11357-11362.
 - Schmitt, E., Paquet, C., Beauchemin, M., Bertrand, R., (2004). "Bcl-xES, a BH4- and BH2-containing antiapoptotic protein, delays Bax oligomer formation and binds Apaf-1, blocking procaspase 9

- activation". *Oncogene*, 23(22): 3915-3931.
- Schneider-Brachert W, Tchikov V, Neumeyer J, Jakob M, Winoto-Morbach S, Held-Feindt J, Heinrich M, Merkel O, Ehrenschwender M, Adam D and others. (2004). "Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptosomes as death signaling vesicles". *Immunity*; 21:415-28.
 - Schonheit K and Nohl H, "Oxidation of cytosolic NADH via complex I of heart mitochondria". *Arch. Biochem. Biophys.* 327 (1996), pp. 319–323.
 - Schroeter H., Boyd C., Spencer J.P.E., Williams R.J., Cadenas E, Rice-Evans C., (2002) "MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide", *Neurobiol. Aging* 23 861–880.
 - Schulte U, Fecke W, Krull C (1994). "In vivo dissection of the mitochondrial NADH ubiquinona oxidoreductasa (complex I)". *Biochim. Biophys Acta* 1187:121.
 - Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. (1998). Apoptosis signaling by death receptors". *Eur J Biochem*; 254:439-59.
 - Schulze-Osthoff K, M. K. Bauer, M. Vogt & S. Wesselborg (1997) "Oxidative stress and signal transduction". *Int J Vitam Nutr Res* 67, 336-342
 - Schutze S, Machleidt T, Adam D, Schwandner R, Wiegmann K, Kruse ML, Heinrich M, Wickel M, Kronke M. (1999). "Inhibition of receptor internalization by monodansylcadaverine selectively blocks p55 tumor necrosis factor receptor death domain signaling". *J Biol Chem*; 274:10203-12.
 - Schwarze PE, Seglen PO. (1985) "Reduced autophagic activity, improved protein balance and enhanced in vitro survival of hepatocytes isolated from carcinogen-treated rats". *ExpCellRes* ;157: 15^ 28.
 - Schweichel JU, Merker HJ (1973)."Themorphology of various types of cell death in

- prenatal tissues". *Teratology* ;7:253-266.
- Sedlak, T.W., Oltvai, Z.N., Yang, E., Wang, K., Boise, L.H., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J., (1995). "Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax". *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **92**(17):7834-7838.
 - Serrano J, Palmeira CM, Kuehl DW and Wallace KB, "Cardioselective and cumulative oxidation of mitochondrial DNA following subchronic doxorubicin administration". *Biochim. Biophys. Acta* **1411** (1999), pp. 201-205.
 - Shanske A; Shanske S, DiMauro S (2001) "The Other Human Genome". *Arch Pediatr Adolesc Med.*:155:1210-1216
 - Sheikh MS, Huang Y. (2004). "Death receptors as targets of cancer therapeutics". *Curr Cancer Drug Targets*; 4:97-104.
 - Shi Y. (2002). "Apoptosome: the cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure (Camb)*"; 10:285-8.
 - Shibue, T., Takeda, K., Oda, E., Tanaka, H., Murasawa, H., Takaoka, A., Morishita, Y., Akira, S., Taniguchi, T., Tanaka, N., (2003). "Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response". *Genes Dev.*, **17**(18):2233-2238.
 - Shigenaga MK, Hagen TM and Ames BN, (1994), "Oxidative damage and mitochondrial decay in aging". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** pp. 10771-10778.
 - Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Funahashi, Y., Mignon, A., Lacronique, V., Matsuda, H., Tsujimoto, Y., (1998). "Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux". *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **95**(4):1455-1459.
 - Shimizu, S., Konishi, A., Kodama, T., Tsujimoto, Y., (2000). "BH4 domain of antiapoptotic bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death". *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **97**(7):3100-3105.
 - Shimizu, S., Narita, M., Tsujimoto, Y., (1999). "Bcl-2

- family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC". *Nature*, 399(6735):483-487.
- Shimizu, S., Tsujimoto, Y., (2000). "Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity". *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 97(2):577-582.
 - Shintani T, Klionsky DJ. (2004) "Autophagy in health and disease: a double-edged sword". *Science* ;306: 990^5.
 - Shrivastava P, Pantano C, Watkin R, McElhinney B, Guala A, Poynter ML, Persinger RL, Budd R, Janssen-Heininger Y. (2004). "Reactive nitrogen species-induced cell death requires Fasdependent activation of c-Jun N-terminal kinase". *Mol Cell Biol*; 24:6763-72.
 - Siegmund D, Mauri D, Peters N, Juo P, Thome M, Reichwein M, Blenis J, Scheurich P, Tschopp J, Wajant H. (2001). "Fas-associated death domain protein (FADD) and caspase-8 mediate up-regulation of c-Fos by Fas ligand and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) via a FLICE inhibitory protein (FLIP)-regulated pathway". *J Biol Chem*; 276:32585-90.
 - Sies H, V. S. Sharov, L. O. Klotz & K. Briviba (1997). "Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase". *J Biol Chem* 272, 27812-27817
 - Simic, M.G. "Vitamine E radicals". En: Rodgers, M.A.J. Powers, E.L. (1981). Eds. "Oxygen and oxyradicals in chemistry and biology". *Academic Press*; 109-118.
 - Singal PK and Pierce GN, (1986). "Adriamycin stimulates low-affinity Ca²⁺ binding and lipid peroxidation but depresses myocardial function". *Am. J. Physiol.* 250 pp. H419-425.
 - Singal PK, Pierce GN. (1986) "Adriamycin stimulates low-affinity Ca²⁺ binding and lipid peroxidation but depresses

- myocardial function". *Am J Physiol.* ;250(3 Pt 2):H419-25.
- Singh Y, Ulrich L, Katz D, Bowen P and Krishna G, (1989), "Structural requirements for anthracycline-induced cardiotoxicity and antitumor effects". *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 100 pp. 9–23.
 - Skulachev VP (1999). "Mitochondrial physiology and pathology: concepts of programmed death of organelles, cells and organism". *Mol. Aspect Med.* 20:139.
 - Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed CJ, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR and Martin SJ, "Ordering the cytochrome *c*-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner". *J. Cell. Biol.* 144 (1999), pp. 281–292.
 - Sohal RS. (2002). Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic. Biol. Med.* 33:37–44
 - Solaini G, Landi L, Pasquali P and Rossi CA, (1987), "Protective effect of endogenous coenzyme Q on both lipid peroxidation and respiratory chain inactivation induced by an adriamycin–iron complex". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147 pp. 572–580.
 - Song, Q.Z., Kuang, Y.P., Dixit, V.M., Vincenz, C., (1999). Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1. *EMBO J.*, 18(1):167-178.
 - Sorice M, Circella A, Cristea IM, Garofalo T, Renzo LD, Alessandri C, Valesini G, Esposti MD. (2004). "Cardiolipin and its metabolites move from mitochondria to other cellular membranes during death receptor-mediated apoptosis". *Cell Death Differ*; 11:1133-
 - Sperandio S, de B I, Bredesen DE. (2000). "An alternative, non apoptotic form of programmed cell death". *Proc Natl Acad Sci USA*;97:14376^ 81.
 - Sperandio S, Poksay K, de BI, et al. (2004) "Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix". *Cell Death Differ* 11: 1066^75.

- Speranza M, A. C. Bagley & R. E. Lynch (1993). "Cells enriched for catalase are sensitized to the toxicities of bleomycin, adriamycin, and paraquat". *J Biol Chem* 268, 19039-19043
- Stadman, E.R. (1991). "Ascorbic Acid and oxidative inactivation of protein" *Am. J. Clin. Nutr.* 54:1125S-1128S.
- Stadtman ER, Oliver CN. (1991). "Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences". *J. Biol. Chem.* 266:2005–8
- Starke-Reed PE, Oliver CN. (1989). Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* 275:559–67
- Stegh AH, Peter ME. (2001). "Apoptosis and caspases". *Cardiol Clin*;19:13-29.
- Stoka V, Turk B, Schendel SL, et al. (2001). "Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route". *J Biol Chem*;276:3149^57.
- Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. (2000). "Apoptosis signaling". *Annu Rev Biochem*; 69:217-45.
- Sugiyama, T., Shimizu, S., Matsuoka, Y., Yoneda, Y., Tsujimoto, Y., (2002). "Activation of mitochondrial voltage- dependent anion channel by apro-apoptotic BH3-only protein Bim". *Oncogene*, 21(32):4944-4956.
- Sun IL, Sun EE, Crane FL, Morre DJ and Faulk WP, (1992), "Inhibition of transplasma membrane electron transport by transferrin–adriamycin conjugates". *Biochim. Biophys. Acta* 1105 pp. 84–88.
- Sun J, Y. Chen, M. Li & Z. Ge (1998). "Role of antioxidant enzymes on ionizing radiation resistance". *Free Rad Biol Med* 24, 586-593
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Isabel Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., et al., (1999a). "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor". *Nature*, 397(6718):441-446.

- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prevost, M.C., Alzari, P.M., Kroemer, G., (1999b). "Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process". *J. Exp. Med.*, 189(2): 381-393.
- Susin, S.A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M., Kroemer, G., (1996). "Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease". *J. Exp. Med.*, 184(4):1331-1341.
- Szwarcrocka, T. Robak, E. Krykowski and Z. Jozwiak, (1996), "Interaction of anthracyclines with human erythrocytes hyperthermic temperature". *Int. J. Pharm.* 135 pp. 167–176.
- Takahashi T, Yamaguchi T, Shitashige M, Okamoto T, Kishi T. (1995). "Reduction of ubiquinone in membrane lipids by rat liver cytosol and its involvement in the cellular defense system against lipid peroxidation". *Biochem J* **309**:883–890.
- Tampo Y, M. Tsukamoto & M. Yonaha (1998). "The antioxidant action of 2-methyl-6-(p-methoxyphenyl)-3,7-dihydroimidazo[1,2-alpha]pyrazin-3-one (MCLA), a chemiluminescence probe to detect superoxide anions". *FEBS Lett* 430, 348-352
- Tan, K.O., Tan, K.M.L., Chan, S.L., Yee, K.S.Y., Bevort, M., Ang, K.C., Yu, V.C., (2001). "MAP-1, a novel proapoptotic protein containing a BH3-like motif that associates with Bax through its Bcl-2 homology domains". *J. Biol. Chem.*, 276(4):2802-2807.
- Tanaka, N., Ishihara, M., Lamphier, M.S., Nozawa, H., Matsuyama, T., Mak, T.W., Aizawa, S., Tokino, T., Oren, M., Taniguchi, T., (1996). "Cooperation of the tumour suppressors Irf-1 and p53 in response to DNA damage". *Nature*, 382(6594):816-818.
- Tappel, A.L. (1962). "Vitamin E: a biologic oxidant". *Vitam.Horm.*; 20:493-510.

- Taylor S, L. D. Davenport, M. J. Speranza, G. T. Mullenbach & R. E. Lynch (1993). "Glutathione peroxidase protects cultured mammalian cells from the toxicity of adriamycin and paraquat". *Arch Biochem Biophys* 305, 600- 605
- Thannickal, V. J., & Fanburg, B. L. (1995). "Activation of an H₂O₂- generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor beta 1." *J. Biol. Chem.*, 270, 30334–30338.
- Thayer W.S. (1977) "Adriamycin stimulated superoxide formation in submitochondrial particles, *Chem. Biol. Interact.* 19 265-278.
- Thompson CB. (1995) "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease". *Science*; 267:1456-62.
- Thorburn A. (2004). "Death receptor-induced cell killing". *Cell Signal*; 16:139-44.
- Thyagarajan, B., Padua, R. A., & Campbell, C. (1996). Mammalian mitochondrial possess homologousDNArecombination activity". *Journal of Biological Chemistry*, 271, 27536–27543.
- Towbin H., Staehelin T, and Gordon J. (1979) "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(9): 4350–4354.
- Tretter, L., Sipos, I., & Adam-Vizi, V. (2004). "Initiation of neuronal damage by complex I deficiency and oxidative stress in Parkinson's disease". *Neurochem. Res.*, 29, 569–577.
- Trumpower BL (1990). "The proton motive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bcl complex". *J. Biol. Chem.* 265: 11409-11412.
- Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C., Croce, C.M., (1984). "Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14:18) chromosome translocation. *Science*, 226(4678):1097-1099.
- Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Ohta S, Kagawa Y

- (1995). "Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8. Å". *Science* 269: 1069.
- Tuominen EK, Wallace CJ, Kinnunen PK. (2002). "Phospholipid-cytochrome c interaction: evidence for the extended lipid anchorage". *J. Biol. Chem.* 277:8822–26
 - Turrens JF. (2003). "Mitochondrial formation of reactive oxygen species". *J. Physiol.* 552:335–44
 - Unal-Cevik I, Kilinc M, Can A, Gursoy-Ozdemir Y, Dalkara T. (2004) "Apoptotic and necrotic death mechanisms are concomitantly activated in the same cell after cerebral ischemia". *Stroke*;35: 2189–94.
 - Ursini, F., Bindoli, A. (1987). "The risk of selenium peroxidases in the protection against microsomal lipid peroxidation". *Chem. Phys. Lipid.*; 44:255-276.
 - V. Mansat de Mas, C. Bezombes, A. Quillet-Mary, A. Bettaieb, A.D. D'orgeix, G. Laurent and J.P. Jaffrezou, "Implication of radical oxygen species in ceramide generation, c-Jun N-terminal kinase activation and apoptosis induced by daunorubicin". *Mol. Pharmacol.* 56 (1999), pp. 867–874.
 - Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., & Telser, J. (2004). "Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence". *Mol. Cell. Biochem.*, 266, 37–56.
 - Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer". *Chem. Biol. Interact.*, 160, 1–40.
 - Van Loo G, Saelens X, van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenabeele P. (2002). "The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet". *Cell Death Differ*; 9:1031-42.
 - Van Remmen H, Richardson A. (2001) "Oxidative damage to mitochondria and aging". *Exp Gerontol.*;36(7):957-68. Review.
 - Van Remmen H., Ikeno Y, Hamilton M, Pahlavani M, Wolf N, Thorpe SR, Alderson NL,

- Baynes JW, Epstein CJ, Huang TT, Nelson J, Strong R, Richardson A, “Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging”, *Physiol. Genomics* 16 (2003) 29–37.
- Vanden Berghe T, Denecker G, Brouckaert G, Vadimovich Krysko D, D'Herde K, Vandenabeele P. (2004). “More than one way to die: methods to determine TNF-induced apoptosis and necrosis”. *Methods Mol Med*; 98:101-26.
 - Vander Heiden, M.G., Chandel, N.S., Williamson, E.K., Schumacker, P.T., Thompson, C.B., (1997). “Bcl-X(L) regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria”. *Cell*, 91(5):627-637.
 - Vander Heiden, M.G., Thompson, C.B., (1999). “Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis?” *Nat. Cell Biol.*, 1(8):E209-E216.
 - Van-Vleet JF., Ferrans VJ and Weirich WE, (1980), “Cardiac disease induced by chronic adriamycin administration in dogs and an evaluation of vitamin E and selenium as cardioprotectants”. *Am. J. Pathol.* 99 pp. 13–42.
 - Vaux DL, Korsmeyer SJ. (1999). “Cell death in development”. *Cell*; 96:245-54.
 - Vaux DL, Silke J. (2003). “Mammalian mitochondrial IAP binding proteins”. *Biochem Biophys Res Commun*; 304:499-504.
 - Vaux DL. (2002). “Apoptosis timeline”. *Cell Death Differ*; 9:349-54.
 - Vaux, D.L., Cory, S., Adams, J.M., (1988). “Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with *c-myc* to immortalize pre-B cells”. *Nature*, 335(6189):440-442.
 - Verhagen AM, Vaux DL. (2002). “Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac”. *Apoptosis*; 7:163-6.
 - Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Vaux, D.L., (2000). “Identification of

- DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins". *Cell*, 102(1):43-53.
- Villalba JM, Navarro F, Cordoba F, Serrano A, Arroyo A, Crane FL, Navas P. (1995). "Coenzyme Q reductase from liver plasma membrane: Purification and role in trans - plasma-membrane electron transport". *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4887–4891.
 - Villunger, A., Michalak, E.M., Coultas, L., Müllauer, F., Böck, G., Ausserlechner, M.J., Adams, J.M., Strasser, A., (2003). "p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins Puma and Noxa". *Science*, 302(5647): 1036-1038.
 - Vogt M, M. K. Bauer, D. Ferrari & K. Schulze-Osthoff (1998). "Oxidative stress and hypoxia/reoxygenation trigger CD95 (APO-1/Fas) ligand expression in microglial cells". *FEBS Lett* 429, 67-72
 - Von Hoff, D.D., Layard, M.W., Basa, P., Davis, H.L., Von Hoff, A.L., Rozenzweig, M., Muggia, F.M., 1979. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure.
 - Wagner B, G. R. Buettner, L. W. Oberley & C. P. Burns (1998). "Sensitivity of K562 and HL-60 cells to edelfosine, an ether lipid drug, correlates with production of reactive oxygen species". *Cancer Res* 58, 2809-2816
 - Walker, JE (1995). "Determination of the structures of respiratory chain enzyme complexes from mammalian mitochondria". *Biochim. Biophys Acta* 1271: 221.
 - Wallace KB and Starkov AA, (2000). "Mitochondrial targets of drug toxicity". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40 pp. 353–388.
 - Wallace, DC "Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994), pp. 8739–8746.
 - Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. (1999). "Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms". *Annu Rev Immunol*; 17:331-67.

- Wallach D. (1997). "Apoptosis. Placing death under control". *Nature*; 388:123, 125-6.
- Wang X. (2001). "The expanding role of mitochondria in apoptosis". *Genes Dev*; 15:2922-33.
- Wang, K., Yin, X.M., Chao, D.T., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J., (1996). "BID: a novel BH3 domain-only death agonist". *Genes. Dev.*, 10:2859-2869.
- Wang, X.W., Zhan, Q.M., Coursen, J.D., Khan, M.A., Kontny, H.U., Yu, L., M. Hollander, M.C., O'Connor, P.M., Fornace, A.J.Jr, Harris, C.C., (1999a). "GADD45 induction of a G(2)/M cell cycle checkpoint". *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 96(7):3706-3711.
- WangY, Li X,Wang L, et al. (2004) "An alternative form of paraptosis-like cell death, triggered byTAJ/TROY and enhanced by PDCD5 overexpression". *JCell Sci*; 117:1525^ 32.
- Waterhouse NJ, Goldstein JC, Kluck RM, Newmeyer DD, Green DR. (2001). "The (Holey) study of mitochondria in apoptosis". *Methods Cell Biol*; 66:365-91.
- Weglarczyk K, Baran J, Zembala M, Pryjma J. (2004). Caspase-8 activation precedes alterations of mitochondrial membrane potential during monocyte apoptosis induced by phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus*". *Infect Immun*; 72:2590-7.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death". *Science*; 292:727-30.
- Wei, Y. H., & Lee, H. C. (2002). "Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging". *Experimental Biology and Medicine*, 227, 671–682.
- Weisiger RA and Fridovich I, (1973), "Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization". *J. Biol. Chem.* 248 pp. 4793–4796.

- Westman N & S. L. Marklund (1981). “Copper- and zincontaining superoxide dismutase and manganesecontaining superoxide dismutase in human tissues and human malignant tumors”. *Cancer Res* 41, 2962-2966
- Whittaker M & J. W. Whittaker (1998). “A glutamate bridge is essential for dimer stability and metal selectivity in manganese superoxide dismutase”. *J Biol Chem* 273, 22188-22193
- Willis, S.N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J.I., Adams, J.M., Huang, D.C.S., (2005). “Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins”. *Genes Dev.*, 19(11): 1294-1305.
- Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., van Delft, M.F., Chen, L., Czabotar, P.E., Ierino, H., Lee, E.H., Fairlie, W.D., Bouillet, P., *et al.*, (2007). “Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak”. *Science*, 315(5813):856-859.
- Wolin, M. S., Burke-Wolin, T. M., & Mohazzab-H, K. M. (1999). Roles of NADPH oxidases and reactive oxygen species in vascular oxygen sensing mechanisms. *Respir. Physiol.*, 115, 229–238.
- Wyllie AH, Golstein P. (2001). “More than oneway to go”. *Proc Natl Acad Sci USA* ;98:11^3.
- Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ. (1996). “BAX-induced cell death may not require interleukin 1 h-converting enzyme-like proteases”. *Proc Natl Acad Sci USA* ;93:14559 ^63.
- Xie, Q. W., Cho, H. J., Calaycay, J., Mumford, R. A., Swiderek, K. M., Lee, T. D., et al. (1992). “Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages”. *Science*, 256, 225–228.
- Yakes FM and Van Houten B, Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997), pp. 514–519.

- Yan H & J. J. Harding (1997). "Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase". *Biochem J* 328, 599-605
- Yang X, Chang HY, Baltimore D. (1998). "Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization". *Mol Cell*; 1:319-25.
- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J., (1995). "Bad, a heterodimeric partner for Bcl-xL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death". *Cell*, 80(2):285-291.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P., Wang, X., (1997). "Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome C from mitochondria blocked". *Science*, 275(5303):1129-1132.
- Yasuda, M., Han, J.W., Dionne, C.A., Boyd, J.M., Chinnadurai, G., (1999). "BNIP3 alpha: a human homolog of mitochondrial proapoptotic protein BNIP3". *Cancer Res.*, 59: 533-537.
- Yen HC, Oberley TD, Gairola CG, Szweda LI and St-Clair DK, (1999), "Manganese superoxide dismutase protects mitochondrial complex I against adriamycin-induced cardiomyopathy in transgenic mice". *Arch. Biochem. Biophys.* **362** pp. 59–66.
- Yen HC, Oberley TD, Vichitbandha S, Ho YS and St-Clair DK, (1996), "The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice". *Clin. Invest.* 98 pp. 1253–1260.
- Yin, X.M., Oltvai, Z.N., Korsmeyer, S.J., (1994). "BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax". *Nature*, 369(6478): 321-323.
- Yoneda M, Katsumata K, Hayakawa M, Tanaka M, Ozawa T.(1995) "Oxygen stress induces an apoptotic cell death associated with fragmentation of mitochondrial genome" *Biochem Biophys Res Commun.* 17;209(2):723-9

- You WC, Zhang L, Gail MH, Chang YS, Liu WD, Ma JL, Li JY, Jin ML, Hu YR, Yang CS, Blaser MJ, Correa P, Blot WJ, Fraumeni JF, Xu GW, “Gastric cancer: *Helicobacter pylori*, serum Vitamin C, and other risk factors”, *J. Natl. Cancer Inst.* 92 (2000) 1607–1612.
- Youn H, E. J. Kim, J. H. Roe, Y. C. Hah & S. O. Kang (1996). “A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp”. *Biochem J* 318, 889-896
- Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, Baehrecke EH, Lenardo MJ. (2004). Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8”. *Science*; 304:1500-2.
- Yu L, Lenardo MJ, Baehrecke EH. (2004). “Autophagy and caspases: A new cell death program”. *Cell Cycle*; 3:1124-6.
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P.M., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., (2001). “Puma induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells”. *Mol. Cell*, 7(3):673-682.
- Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. (2003). “Beclin1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci USA*;100:15077^ 82.
- Zakeri Z, Lockshin RA. (2002) “Cell death during development”. *J Immunol Methods*; 265:3- 20.
- Zamzami N, Kroemer G. (2001). “The mitochondrion in apoptosis”: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2:67-71.
- Zamzami N, Kroemer G. (2003). “Apoptosis: Mitochondrial membrane permeabilization—The (w)hole story? *Curr Biol*; 13:R71-3.
- Zamzami, N., Brenner, C., Marzo, I., Susin, S.A., Kroemer, G., (1998). “Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins”. *Oncogene*, 16(17):2265-2282.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S.A., Petit, P.X., Mignotte, B., Kroemer, G., (1995). “Sequential reduction of mitochondrial transmembrane

- potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death” *J. Exp. Med.*, 182(2):367-377.
- Zamzami, N., Susin, S.A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez- Monterrey, I., Castedo, M., Kroemer, G., (1996). “Mitochondrial control of nuclear apoptosis”. *J. Exp. Med.*, 183(4):1533-1544.
 - Zeidan Q, Strauss M, Porras N, Anselmi G. “Diferential long-term subcelular responses in heart and liver to adriamycin stress”. Exogenous L-carnitine cardiac and hepatic prtectioin. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2002; 34: 315-21.
 - Zhan, Q., Antinore, M.J., Wang, X.W., Carrier, F., Smith, M.L., Harris, C.C., Fornace, A.J.Jr, (1999). “Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45”. *Oncogene*, **18**(18): 2892-2900.
 - Zhang, H., Holzgreve, W., de Geyter, C., (2001). “Bcl2-L-10, a novel anti-apoptotic member of the Bcl-2 family, blocks apoptosis in the mitochondria death pathway but not in the death receptor pathway”. *Hum. Mol. Genet.*, 10(21): 2329-2339.
 - Zoratti, M., Szabo, I., (1995). “The mitochondrial permeability transition”. *Biochim. Biophys. Acta*, **1241**:139-176.
 - Zornig M, Hueber A, Baum W, Evan G. (2001). “Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis”. *Biochim Biophys Acta*, 1551:F1-37.

CAPÍTULO VIII.-SUMMARY

SUMMARY

A balance between cell division and cell death is vitally important for the development and maintenance of multicellular organisms. Disorders in either process may have pathological consequences and produce erroneous embryogenesis, neurodegenerative disease or the development of cancer. Thus, the balance between life and death is rigorously controlled and any defective elements are eliminated effectively by a process known as “programmed cell death” (PCD) (*Daniel NN et. al., 2004*). Apoptosis is a type of inherently controlled programmed cell death that requires a family of cysteine-proteases known as caspases, the function of which is to execute cell death in a programmed fashion, leading to typical morphological changes (*Degterev A., 2003*).

Nowadays mitochondria are considered to be intracellular power-station organelles which mediate in most apoptotic routes in mammalian cells (*Newmeyer DD et. al., 2003; Kroemer G, 2003; Ravagnan L et. al. 2002; Zamzami N et. al., 2001; Green Dr et. al., 2004; Sorice M et. al., 2004*). In particular, mitochondria are involved in cell death, which can be stimulated by a variety of means, including UV radiation, γ radiation, heat, damage to the DNA, the activity of oncoproteins and viral gene suppressors of the tumour factors, and most chemotherapeutical agents (*Kroemer G, 2003*).

Doxorubicin is an aminogluco-side anthracycline isolated for the first time from cultures of *Streptomyces peucetius* and appears to have a wide spectrum of antitumoral activity in solid tumours and leucemias. Most studies into the toxic effects of doxorubicin have been directed at the mitochondrial membrane, this being the main focal point for its cell toxicity. Morphologically it produces mitochondrial swelling and lysis, the consequence of factors such as the reduction of the mitochondrial membrane's potential ($\Delta\psi$) and the formation of permeability transition pores (*Albano et. al., 1988; Sakurai K et. al., 2000*).

Due to the usefulness of doxorubicin in chemotherapy for the treatment of many types of cancer, researchers are trying to prevent, or at least attenuate, the secondary effects of its administration. Several strategies have been adopted to this end, including dosage optimisation, the synthesis and use of analogues, and combined therapy. As far as

combined therapy is concerned, the most effective method has been the administration of the drug combined with an antioxidant in an attempt to reduce oxidative stress. Through diet, more specifically dietary fat, it is possible to influence the oxidative condition of the cell. It has been observed that lipid profiles for the mitochondrial membrane after the ingestion of polyunsaturated fatty acids are more susceptible to peroxidation than those generated by monounsaturated fatty-acid consumption. One consequence of this susceptibility to peroxidation is a modification in the properties of the mitochondrial membranes and the proteins integrated in them, which results in a vicious circle of the generation of free radicals and alteration of the mitochondrial function, events that entail a decline in the cell's capacity to obtain energy from its main source of supply, the mitochondrion, and finally cell death (*Huertas JR et. al., 1991; Mataix J et. al., 1998*). Over the last 15 years our research group has been working on the effects of virgin olive oil and the antioxidants it contains, such as polyphenols, coenzyme Q and vitamin E in relation to the toxicity of doxorubicin (administered as Adriamycin) in rats. Several aspects of metabolism, such as those related to mitochondrial composition and the generation and function of free radicals, have been studied with regard to this chemotherapeutic drug and the intake of virgin olive oil or other edible types of fat.

The aim of our study was to ascertain whether the mitochondria of hepatic tissue enriched physiologically via the dietary fat in oleic acid and its antioxidants (polyphenols, vitamins and CoQ) are less susceptible to lipid peroxidation and therefore theoretically more resistant to the apoptotic process induced by different doses of doxorubicin than those enriched with polyunsaturated fatty acids. These findings would help to determine how dietary intervention might prevent or attenuate the indirect toxic effects of the administration of Adriamycin without interfering with its antitumoral mechanism and possibly improve the quality of life of patients subject to this therapy.

This investigation is also novel because it approaches the toxic aspects of doxorubicin at the level of hepatic tissue. The liver is a mitotic organ, that is to say, with regenerative capacity and functionally it is the metabolic power station of the organism. Doxorubicin is metabolised in the liver.

The experiments started with twelve groups of rats fed until 3 months old on semisynthetic diets in which the source of fats, virgin olive oil, sunflower oil and fish oil, were varied to generate membranes richer in oleic, linoleic, EPA and DHA

respectively. A control group was fed on a standard diet. Adriamycin was administered in doses of 2.5 mg/kg/day and 10 mg/kg/day two days before the rats were killed.

To analyse our experimental results we used trustworthy markers of the process of cell apoptosis such as variations in membrane potential ($\Delta\psi$), mitochondrial swelling and various apoptotic proteins (caspase-3, Apaf-1, and Bcl-2) under a specific nutritional influence. In this way we verified adaptations in the lipid profile of the hepatic mitochondrial membranes as a function of the profile of the fatty acids of the fat source provided, i.e. the mitochondrial membranes showed a greater proportion of the fatty acids characteristic of the fat source consumed. As a result of these adaptations, the group of rats fed on virgin olive oil presented the lowest hydroperoxide and thiobarbituric-acid-reactive substance (TBARS) values than the other experimental groups.

Another point worth emphasising is that the experimental diet with virgin olive oil resulted in mitochondrial membranes with higher potential and less swelling. Therefore, the hepatic cells of rats fed on this vegetable fat presented better mitochondrial function. This result is also supported by the parameters concerning mitochondrial morphology, the group fed on virgin olive oil showing the lowest values for mitochondrial area and greater density and circularity, all indicative of morphologically more active mitochondria. As far as the damage caused to mitochondrial DNA is concerned, our results confirmed that the ingestion of polyunsaturated fat sources generates a chronic oxidative stress that affects the mitochondrial DNA, which is translated into an increase in deletion in these molecules.

With regard to Adriamycin, we have demonstrated that this drug induces important morphological changes in the mitochondria, which has a negative effect on their capacity to function. In particular, under our experimental conditions Adriamycin induced acute oxidative stress, which was responsible for the establishment of mitoptotic mechanisms with the 2.5 mg/kg/day dose and/or apoptotic ones with the 10 mg/kg/day dose.

According to the results described above, we conclude that a diet based on virgin olive oil can significantly improve the resistance of hepatocyte mitochondria to the toxic effects of doxorubicin, which reinforces the concept of the importance of diet in the attenuation of these indirect toxic effects deriving from chemotherapy and the

contribution towards an improvement in the quality of life of patients subject to this kind of antitumoral therapy.

CAPÍTULO IX.-CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1st conclusion: Our results show that the lipid profile of hepatic mitochondrial membranes is altered by the profile of the dietary source of the type of fats ingested.

2nd conclusion: As far as lipid peroxidation is concerned, the virgin-olive-oil group presented lower values of hydroperoxides and TBARS compared to the other experimental groups.

3rd conclusion: The virgin-olive-oil experimental diet led to higher membrane-potential values and less swelling. Therefore, the mitochondrial function of animals fed on virgin olive oil would be better.

4th conclusion: The mitochondrial areas in the virgin-olive-oil group were smaller, denser and more circular compared to the other experimental groups. This morphology may indicate that the mitochondria are more active and less subject to chronic stress with regard to the level of unsaturation of dietary fat.

5th conclusion: Our results confirm that the ingestion of polyunsaturated fats generates chronic oxidative stress, which affects the mitochondrial DNA.

6th conclusion: Our experimental results also show a tendency towards a higher apoptotic profile concomitant with an increase in the level of unsaturated fats in the diet. This could be understood like a mechanism by which to greater cellular oxidative stress, it would facilitate the gradual elimination of damaged cells in situations of chronic stress and low intensity.

7th conclusion: Adriamycin causes dose-dependent decreases in α -tocopherol levels because it neutralises free radicals. Furthermore, our results show that it produces

significant morphological changes in the mitochondria that negatively affect their normal function.

8th conclusion: Adriamycin induces acute oxidative stress, which is responsible for the establishment of mitoptotic mechanisms with a 2.5 mg/kg/day dose and/or apoptotic ones with a 10 mg/kg/day dose.

GENERAL CONCLUSION

According to our results we conclude that a diet based on virgin olive oil may significantly improve the susceptibility of hepatocyte mitochondria to the toxic effects of doxorubicin, which reinforces the concept of the importance of diet in the attenuation of the secondary toxic effects deriving from the administration of this chemotherapeutic drug and in this way improving the quality of the lives of patients subject to this type of antitumoral therapy.

