



Rol del Citocromo C y los lípidos mitocondriales en la apoptosis celular.

Ciclo de Metodología Científica II-2018

Grupo 33

Br. Gabriela Duarte

Br. Florencia Lees

Br. Denisse Simovic

Br. Leticia Soto

Br. Victoria Tambasco

Br. Lucía Vale

Orientador: Prof. Adj. Verónica Demicheli

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Avda. General Flores 2125, 11800 Montevideo, Uruguay

Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Universidad de la República, Avda. General Flores 2125, 11800 Montevideo, Uruguay

Índice de contenidos

Resumen y palabras clave	2
1. Introducción	3
1.1 Citocromo C	4
1.2 Funciones del Citocromo C	6
1.3 Cardiolipina	7
2. Metodología	7
3. Citocromo C y su unión a la Cardiolipina	8
3.1 Cardiolipina y Citocromo C	8
3.2 Funciones de la Cardiolipina	8
3.3 Síntesis	9
3.4 Síndrome de Barth	10
3.5 Interacción Citocromo C – Cardiolipina	10
3.6 Sitios de unión	11
3.7 Efectos de la fuerza iónica	13
3.8 Efecto del pH	14
4. Apoptosis	15
4.1 Oxidación de la Cardiolipina en la apoptosis celular	18
5. Evolución del Citocromo C y mutaciones	20
5.1 Mutaciones y clínica	21
5.1.1 Mutación G41S	21
5.1.2 Mutación Y48H	24
5.1.3 Mutación A51V	25
5.1.4 Mutaciones sin traducción clínica	25
6. Conclusiones	26
7. Bibliografía	27

Rol del citocromo C y los lípidos mitocondriales en la apoptosis celular.

Resumen

El citocromo c es una hemoproteína monomérica, de 13 kDa, compuesta por 94-114 residuos de aminoácidos. Es una molécula hidrosoluble con carga positiva a pH neutro, que se encuentra en la cara externa de la membrana mitocondrial interna.

Es de amplio conocimiento su rol como transportador de electrones entre el Complejo III y Complejo IV de la cadena respiratoria, interviniendo en procesos de óxido-reducción donde se obtiene energía en forma de ATP. Además, posee una actividad peroxidasa aumentada al asociarse a diversos lípidos de membrana, tal como la cardiolipina, la cual desempeña un rol importante en el inicio de la apoptosis celular.

La cardiolipina es un fosfolípido dimérico que contiene cuatro ácidos grasos y dos cargas negativas, exclusivo de la membrana mitocondrial y de las células procariotas. Su función es el apoyo a las proteínas de la membrana mitocondrial interna y la peroxidación previamente mencionada. Al unirse al citocromo c, la cardiolipina aumenta la permeabilidad de membrana cooperando en la salida del citocromo c al citosol, el cual se une al APAF-1 y al ATP, activando diversas procaspasas que ayudarán en el proceso de apoptosis, que es la muerte celular programada frente a señales internas y/o externas para mantener la homeostasis celular.

El objetivo del trabajo será reunir información acerca del complejo citocromo c - cardiolipina en la apoptosis celular y ahondar en las mutaciones naturales que este tiene y su traducción clínica.

PALABRAS CLAVE:

Citocromo C, Cardiolipina, Actividad peroxidasa, Apoptosis, Mutaciones

1. Introducción

El citocromo C (Cyt C) es una hemoproteína globular, monomérica, soluble, de 13 kDa, con 94 a 114 residuos de aminoácidos (1), cargada positivamente a PH fisiológico (2), localizada en la mitocondria.

Este organelo celular (**Figura 1**) está formado por dos membranas; una externa permeable a moléculas pequeñas e iones, que se mueven libremente a través de canales transmembrana, denominados porinas y una membrana interna que es altamente selectiva, donde el pasaje de moléculas es facilitado por transportadores específicos, siendo en la parte externa de la misma donde está situado el Cyt C (3). Su unión a la membrana mitocondrial se da mediante interacciones electrostáticas gracias a su carga positiva, que es atraída hacia la negatividad de la bicapa lipídica (3).

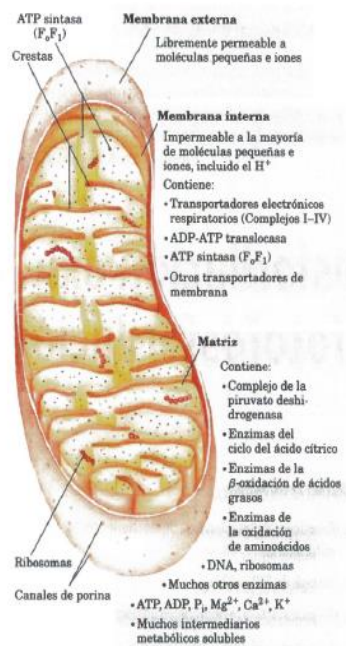


Figura 1: Anatomía bioquímica de la mitocondria. Extraído de Nelson DL et al (3).

La matriz mitocondrial se encuentra delimitada por la membrana mitocondrial interna, esta matriz contiene el complejo piruvato deshidrogenasa, enzimas del ciclo del ácido cítrico, de la beta oxidación, de la oxidación de aminoácidos y todas las rutas de oxidación de combustibles, a excepción de la glucólisis, que ocurre en el citosol mitocondrial (3).

1.1 Citocromo C

Pertenece a una extensa y diversa familia de metaloproteínas por tener un ion metálico como cofactor (2, 4). Se encuentra dentro del grupo de las proteínas encargadas de almacenamiento y transporte. Otros ejemplos de este grupo son la hemoglobina y la mioglobina ambas transportadoras de oxígeno y la ceruloplasmina encargada del transporte de hierro (3).

Su estructura consiste en 5 alfa hélices de diferente longitud interconectadas por extensos bucles omega, además de dos hojas beta antiparalelas (2) . Presenta un grupo prostético hemo que contiene hierro, que muestra una intensa absorción de luz mediante la utilización de espectrofotometría (3).

El grupo hemo contiene cuatro anillos penta-atómicos nitrogenados, formando una estructura cíclica denominada porfirina. Los cuatro átomos de nitrógeno están coordinados con un ion hierro central. Este anillo de la porfirina posee un sistema de dobles enlaces conjugados lo que explica la absorción de luz visible por estos grupos hemo. El anillo de porfirina es plano y posee un sistema de electrones altamente deslocalizados, existiendo cierta transición de electrones en lugares libres u ocupados y esto determina la presencia de bandas espectrales características (3). Según el espectro de absorción del hemo, los citocromos se clasifican en tipo *a, b, c, d, e, f* y *o*. Estas letras representan la absorbancia máxima en el espectro de absorción UV cuando el hemo del hierro coordinado con piridina se encuentra en estado ferroso (5). En los mamíferos se encuentran las formas *a, b* y *c* (6). Cada tipo de citocromo en su estado reducido tiene 3 bandas de absorción: alfa, beta y gama. La banda gama es denominada Banda de Soret (**Figura 2**) (7) que representa el estado de energía más alta de la proteína.

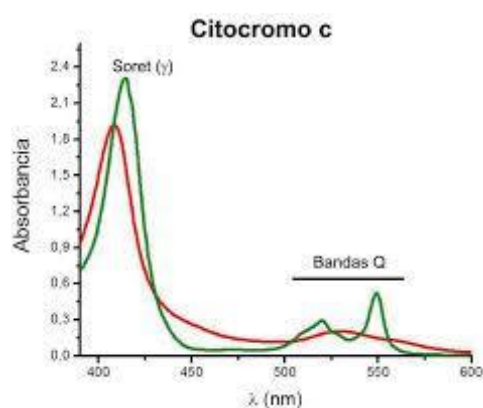


Figura 2: Distintos espectros de absorción del Cyt C, se muestra su forma reducida en color verde y oxidada en color rojo. La banda gama, denominada Banda de Soret, representa el estado máximo de energía de la proteína. Extraído de Parra Y. et al (7).

El grupo hemo, está ubicado en el centro de la proteína, rodeado por residuos hidrofóbicos y unido covalentemente mediante enlaces tioéter vinilo a dos residuos de cisteína: cisteína 14 (Cys 14) y cisteína 17 (Cys 17). El hemo se encuentra hexa-coordinado a nivel proximal por la Histidina 18 (His18) en la posición 5 y a nivel distal por la Metionina 80 (Met80) en la posición 6 (**Figura 3**), esta coordinación le proporciona el potencial redox adecuado a la proteína para la transferencia de electrones en la cadena respiratoria (1-3, 6), siendo esta una de sus principales funciones.

Los citocromos son proteínas con intensa absorción de la luz, por tener un grupo prostético hemo que contiene hierro. Cada grupo prostético está formado por cuatro anillos penta-atómicos nitrogenados, formando una estructura cíclica denominada porfirina (3). En la mitocondria de los mamíferos, existen tres tipos de citocromos a, b y c, en base a la banda alfa de su espectro de absorción y al tipo de grupo hemo unido a la proteína (6).

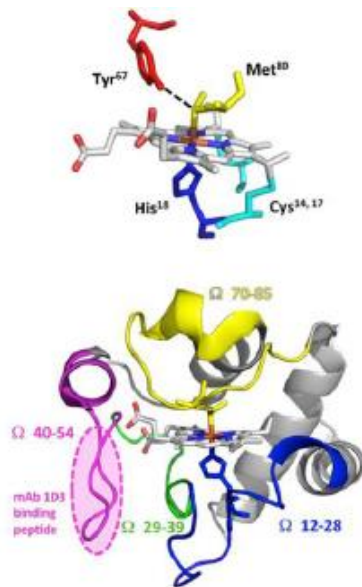


Figura 3: Estructura del Cyt C. La imagen superior muestra los residuos axiales Met80 y His18, unidos a Cys14 y Cys17 mediante unión tioéter, y el residuo Tyr67 formando un enlace de Hidrógeno, con el Met80 unido al Hierro. La imagen inferior detalla la estructura tridimensional. Extraído de Hannibal L. et al(1).

1.2. Funciones del Citocromo C

En presencia de oxígeno la cadena de transporte electrónico (una secuencia de reacciones de oxido-reducción) convierte equivalentes de reducción en energía utilizable en forma de ATP, mediante el proceso de fosforilación oxidativa. La misma da lugar a 1,5 – 2,5 moles de ATP por mol de equivalente de reducción transferido al oxígeno a partir de la oxidación completa de nucleótidos de flavina (FADH_2) y nucleótidos de nicotinamida (NADH), siendo estos aceptores universales de electrones. Además de estos hay otros tres tipos de moléculas transportadoras de electrones que actúan en la cadena respiratoria: la ubiquinona y dos tipos diferentes de proteínas que contienen hierro (citocromos y proteínas ferrosulfuradas). Hay tres tipos de transferencias electrónicas en la fosforilación oxidativa: 1) transferencia directa de electrones Fe^{3+} a Fe^{2+} , 2) transferencia de un átomo de hidrógeno ($\text{H}^+ + \text{e}^-$) y 3) transferencia de un ion hidruro (H^-) (3).

Los transportadores están agrupados en 4 complejos enzimáticos (**Figura 4**): NADH-ubiquinona oxidorreductasa (complejo I), succinato deshidrogenasa (complejo II), ubiquinona: citocromo c oxidorreductasa (complejo III), citocromo c oxidasa (complejo IV) (6).

El citocromo c es el encargado de transportar los electrones desde el complejo III (ubiquinona a citocromo c) al complejo IV (citocromo oxidasa), este último paso culmina con la reducción del oxígeno molecular y su posterior transformación en H_2O , gracias a los electrones cedidos por el NADH y FADH_2 (3).

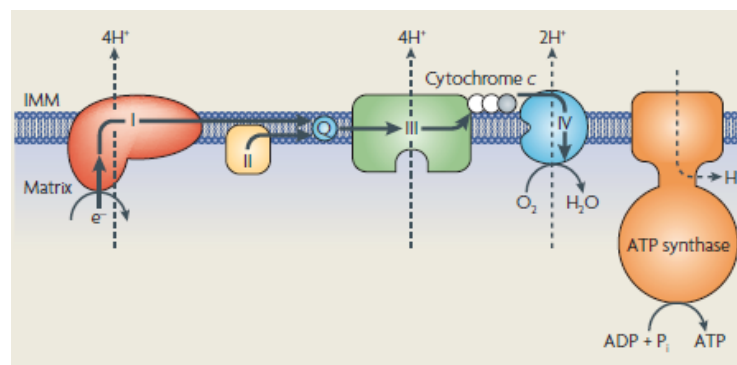


Figura 4: Rol del Cyt C en la cadena respiratoria. El Cyt C es el encargado de transportar los electrones desde el complejo III ubiquinona al complejo IV citocromo oxidasa. Extraído de Ow Y - LP et al (8).

Otra actividad conocida del Cyt C es la actividad peroxidasa, donde el mismo se une a diversos lípidos de membrana, principalmente la CL (9). La oxidación de la misma es necesaria para la liberación de factores proapoptóticos, lo que gatilla el inicio de la muerte celular programada o apoptosis celular (10), fundamental para la embriogénesis, la eliminación de células no deseadas, el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis y la defensa del sistema inmune. Diferentes alteraciones en la apoptosis pueden llevar a la enfermedad o a la muerte del organismo (3, 6, 8).

1.3 Cardiolipina

La CL fue aislada por primera vez del corazón de ternera por Pangborn, en 1942 (11). Es un componente minoritario de la membrana mitocondrial interna, cargado negativamente, formado por 4 cadenas de ácidos grasos insaturados denominados grupos acil y dos grupos fosfato (12, 13), como se muestra en la **Figura 5**.

Este lípido es sintetizado mediante una secuencia de pasos que incluye la conversión de ácido fosfatídico a citidin 5 difosfato-diacilglicerol, fosfatidilglicerol fosfato, fosfatidilglicerol y finalmente CL. Este último paso, catalizado por la enzima cardiolipina sintasa (14).

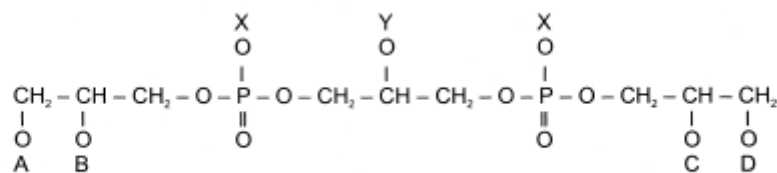


Figura 5: Esquema de estructura lineal de la CL: X e Y son hidrógenos, A, B, C y D son grupos de ácidos grasos. Extraída de Schlame M. et al (15).

Dentro de sus funciones cumple un rol en la activación de los complejos involucrados en la fosforilación oxidativa (13) donde es determinante en el gradiente de protones desde la membrana mitocondrial interna hacia el espacio intermembrana, ayudando además a minimizar los cambios de pH. Para esto es capaz de retener electrones mientras almacena protones para posteriormente cederlos o absorberlos en la cadena respiratoria (16).

2. Metodología

En esta revisión se utilizaron las plataformas Pubmed y Google Académico como herramientas para realizar la búsqueda bibliográfica.

3. Citocromo c y su unión a la cardiolipina

3.1 Cardiolipina y citocromo c

Como nombramos anteriormente la CL es un fosfolípido minoritario de las membranas celulares bacterianas y mitocondriales, que presenta una estructura dimérica, y posee cuatro grupos acilos unidos por un grupo central de glicerol. Está formado por dos cargas negativas lo que le permite unirse con facilidad a proteínas cargadas positivamente, tal es el caso del Cyt C (17, 18).

Este fosfolípido fue hallado por primera vez en el corazón de ternera por Mary Pangborn en 1942, quien demostró experimentalmente mediante una prueba serológica de sífilis en las vacas, que la CL hidrolizada produce ácidos grasos y un fosforil-glicerol fosfato, dejando en evidencia que este producto puede ser obtenido por uno de los pasos de la degradación de la cardiolipina (17).

3.2 Funciones de la cardiolipina

En lo que respecta a sus funciones, podemos decir que dentro de las más importantes se encuentra: el apoyo de la síntesis de membrana, estabilización estructural y la activación de muchas enzimas mitocondriales, especialmente las que participan en la síntesis de ATP y la transducción de energía (1).

Dada su ubicación en la membrana mitocondrial interna participa de forma enérgica en la fosforilación oxidativa, proceso mediante el cual se genera energía en forma de ATP para la célula (18). La CL ha sido encontrada en cristales de complejos mitocondriales tales como el complejo III (Cyt C oxidorreductasa), complejo IV (Cyt C oxidasa) y el transportador ADP-ATP, todos ellos claves en la respiración mitocondrial, lo que sella más aun su rol en dicho proceso (19).

En la fosforilación oxidativa también juega un papel importante en el mantenimiento del gradiente de protones desde la membrana mitocondrial interna hacia el espacio intermembrana y ayuda a minimizar los cambios de pH (16). Esto es gracias a su conformación espacial única, que puede atrapar un protón mientras transporta una carga negativa. Por lo tanto, puede retener electrones mientras almacena protones para cederlos o absorberlos manteniendo así el pH.

Durante el proceso de la apoptosis se dan una serie de reacciones químicas entre la CL y el Cyt C que desencadenan el proceso de la muerte celular (18), el cual se discutirá a continuación.

La reacción más importante consiste en que el Cyt C actúa como una enzima peroxidasa, las peroxidasas son un tipo de enzimas con poder de óxido reducción, es decir, promueven la transferencia de electrones desde una molécula donante a una aceptora, catalizando reacciones de tipo redox utilizando un peróxido como agente oxidante y un segundo sustrato de características reductoras que luego es oxidado por el peróxido (18).

Por lo tanto, el Cyt C en este caso oxida a la molécula de CL. Como resultado de esta reacción la CL se desplaza a la membrana mitocondrial externa donde crea un poro que permite que el Cyt C salga al exterior y a su vez esto provoca la activación de factores proapoptóticos, desplazando el Cyt C al citosol e iniciando el proceso de muerte celular programada (10, 20).

3.3 Síntesis

La ruta de biosíntesis de la CL es similar a otras vías de síntesis de fosfolípidos pasando a través de intermediarios comunes, como lo son el ácido fosfatídico y fosfatidil-CMP (citidina monofosfato). Sólo el último paso de la síntesis de CL es una reacción única, que difiere en procariotas y eucariotas (15).

En cuanto a su síntesis podemos decir que incluye de una serie de pasos donde participan los siguientes productos intermediarios: glicerol 3 fosfato, ácido fosfatídico, citidin 5 difosfato-diacilglicerol, fosfatidilglicerol fosfato (PGP), fosfatidilglicerol y finaliza con la formación de CL, tal como se esquematiza en la **Figura 6**. Este último paso es catalizado por la cardiolipina sintasa (14, 15). Alteraciones en alguno de los pasos de su síntesis puede generar manifestaciones clínicas como el síndrome de Barth, que se detalla a continuación.

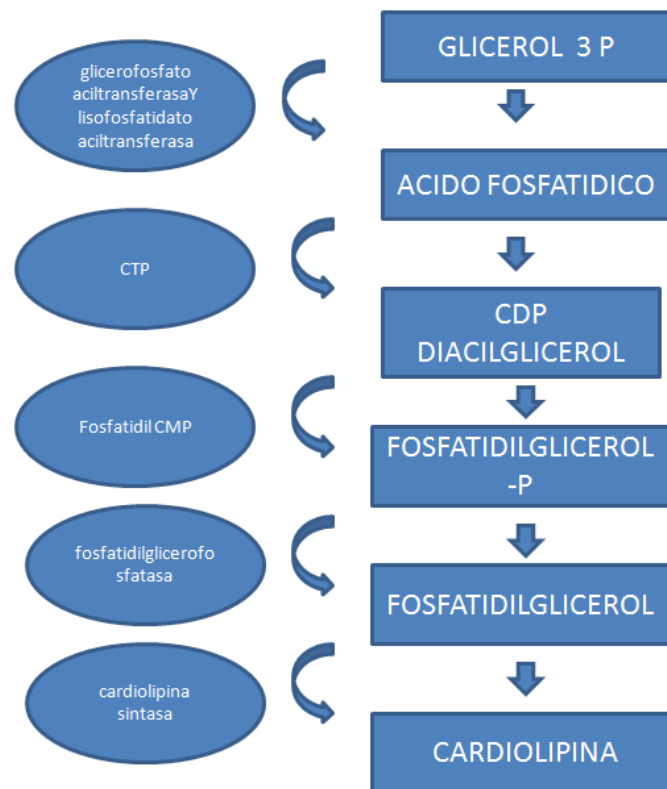


Figura 6: esquema de los pasos que llevan a la síntesis de la CL; CTP: fosfatidato de citidiltransferasa, CDP: glicerofosfato fosfatidiltransferasa.

3.4 Síndrome de Barth

La presencia de una concentración reducida y una composición alterada de CL, recibe el nombre de Síndrome de Barth, el cual es una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X que se produce predominantemente en hombres jóvenes y que a menudo incluye los siguientes síntomas; insuficiencia cardíaca, miopatía, neutropenia y retraso del crecimiento (21).

Este síndrome es causado por mutaciones en el gen que codifica un fosfolípido aciltransferasa involucrado en la modificación específica del grupo acilo de la CL, que promueve la uniformidad estructural y la simetría de la molécula. La inhibición de esta vía por el déficit de este fosfolípido conduce a cambios en la función y la arquitectura mitocondrial (21).

En estos pacientes existe una deficiencia en la enzima fosfatidilglicerofosfato (PGP) sintasa, la cual participa en el primer paso de la biosíntesis de la CL en mamíferos, lo que lleva a una producción de mitocondrias morfológicamente anormales y por ende altera la función de la cadena respiratoria. Las anomalías en la cadena respiratoria en estos pacientes no se limitan a un solo complejo, lo que sugiere que existe una afectación en varias de las enzimas que participan en la respiración (22).

3.5 Interacción citocromo c - cardiolipina

La fuerza en la interacción Cyt C- CL es clave para la función de la célula, ya que esta unión modula la función proteica, determinando sí, el Cyt C va a ser retenido en el espacio intermembrana (actuando como transportador de electrones en la cadena respiratoria), o si será liberado al citosol para participar en la apoptosis celular (23). El Cyt C muestra una gran afinidad por los fosfolípidos ácidos cargados negativamente, lo que le permite asociarse con la membrana mitocondrial interna.

Cerca de 15% de Cyt C está fuertemente unido a la CL (24), el resto está libre o interactúa débilmente con la membrana mitocondrial por medio de interacciones electrostáticas, mientras que el Cyt C libre participa en la transferencia de electrones, inhibiendo la formación de especies reactivas del oxígeno y previniendo el estrés oxidativo (10).

3.6 Sitios de unión

La unión Cyt C-CL causa cambios conformacionales en la cadena polipeptídica del Cyt C (23). Esta unión está basada en las interacciones electrostáticas con los residuos de Lisina (Lys) cargados positivamente en la superficie de la proteína (9).

La unión de la CL al Cyt C ocurre en dos sitios distintos del Cyt C llamados A y C, con distinta afinidad por la CL, en el sitio A la interacción es de tipo electrostática, donde están implicados los residuos cargados positivamente de la proteína y los grupos fosfato cargados negativamente de la CL, mientras que en el sitio C la interacción es de naturaleza hidrofóbica, estabilizada por puentes de hidrógeno entre el residuo asparagina 52 (Asn52) del Cyt C con la CL protonada (25). Aparte de estos, el Cyt C posee un sitio adicional conocido como sitio L, que tiene preferencia por fosfolípidos ácidos y una sensibilidad marcada al pH (13).

Varios estudios sobre la CL revelaron dos sitios de unión distintos en el Cyt C que causan diferentes grados de despliegue de la proteína. Los resultados mostraron la coexistencia de dos conformaciones distintas de Cyt C, una que se asemeja a la estructura nativa de forma compactada y una segunda conformación no nativa parcialmente desplegada (2).

Es importante destacar que existen los sitios 1 y 2, que no representan el sitio A, C o L previamente nombrado, estos corresponden a un nuevo modelo, de dos enlaces que describe las interacciones del Cyt C con la CL. El sitio 1 es un sitio de alta afinidad destinado a mantener el estado nativo del Cyt C, para la transferencia de electrones en la membrana mitocondrial interna. El sitio 2 representa una conformación de Cyt C unido a CL en el que se rompe el enlace axial Fe-Met80, gatillado por la deprotonación del residuo de la Histidina proximal del Cyt C. Esta ruptura impide las reacciones de transferencia de electrones para la respiración celular.

Por otro lado también se describió un sitio adicional de unión a la proteína denominado "N", del cual no se conoce del todo su función, pero se conoce que este sitio no se superpone con los sitios previamente descritos A, C y L (2).

Existen tres modelos principales que explicarían la unión de la CL con el Cyt C de corazón de caballo. El primero propone que la cadena acil del CL entra en la matriz del Cyt C a través de un canal hidrofóbico localizado cerca del residuo Asn52, con respecto a este modelo, el grupo fosfato protonado de la CL puede estar unido por puentes de hidrógeno al residuo Asn52 del Cyt C (26, 27). El segundo modelo sugiere que la CL se une cerca del bucle que contiene Met80 del Cyt C, este sitio de unión sobresale de la matriz proteica entre las cadenas hidrofóbicas formadas por residuos de Lys 67-71 y 82-85. En particular, el grupo fosfato desprotonado de la CL puede estar anclado al residuo Lys 72 del Cyt C mediante interacciones electrostáticas (28). El tercer modelo

hipotético, dice que dos cadenas acil de la CL pueden estar acopladas en dos canales hidrofóbicos que se encuentran en la vecindad del residuo Asn52 y de la región del bucle que contiene el Met-80 (26, 29).

La unión CL – Cyt C tiene dos efectos, por un lado, la CL ancla Cyt C a la membrana y permite la transferencia de electrones en la cadena respiratoria; por otro lado, esta unión promueve la conversión del Cyt C en una peroxidasa, con el consiguiente plegamiento de la proteína en un estado globuloso (**Figura 7**), mediante el cual el H₂O₂ accede al sitio catalítico del hemo y desencadena esta actividad, posteriormente se oxida la CL y se transloca de la membrana mitocondrial interna a la externa, induciendo el inicio de la apoptosis por medio de la generación de hidroperóxidos de CL que participan activamente en la liberación del Cyt C y de otros factores pro apoptóticos de la membrana mitocondrial interna hacia el citosol (1, 10).

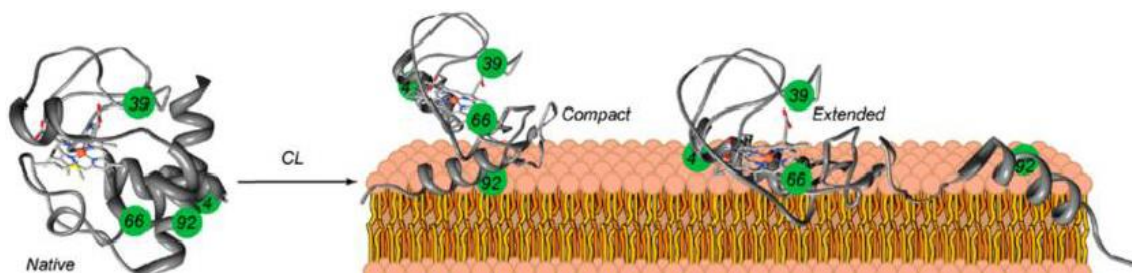


Figura 7: Conformaciones alternativas de Cyt C unido a la CL, en presencia de CL, el Cyt C pasa de un estado nativo a dos conformaciones alternativas que difieren en su grado de compactación. El complejo Cyt C –CL es sensible a la alta fuerza iónica y a la oxidación de la CL, llevando a la disociación de la estructura del lípido. Extraído de Alvarez-Paggi Dn et al (2).

La actividad peroxidasa del Cyt C aumenta con los cambios conformacionales inducidos por la CL a una estructura abierta más extendida a diferentes fuerzas iónicas (30). Los residuos Lys 72 y Lys 79 son esenciales para el reconocimiento de la unión CL - Cyt C y la presencia de los residuos de Lys 72,73 y 79 son necesarios para la actividad peroxidasa del complejo (23, 26, 29).

La interacción del Cyt C con modelos in vivo o in vitro de la membrana mitocondrial está influenciada por el ATP, la fuerza iónica, el pH y la composición de los fosfolípidos ácidos (1).

En cuanto a los efectos del ATP sobre la unión del Cyt C a los liposomas se evidenció que a pH neutro el ATP disocia el Cyt C de las membranas con bajo contenido de fosfolípidos ácido, esta disociación es el resultado de una competencia entre ATP y el grupo fosfato desprotonado de lípidos ácidos (requeridos para la unión al Cyt C) (31).

La interacción de Cyt C con CL a través del sitio A es principalmente de naturaleza electrostática y no genera cambios significativos en la estructura secundaria de la proteína, y puede revertirse por la adición de ATP.

Por el contrario, la interacción con el sitio C genera cambios que incluyen modificaciones en la absorción de la banda Soret, lo que sugiere un cambio conformacional que involucra al hemo y que no puede en este caso ser revertido por la adición de ATP (2). Por lo que podemos decir que la acción del ATP sobre la proteína es específica del sitio A. El ATP a altas concentraciones compite con la CL por uno de los dos sitios de unión, por lo que exhibe una alta afinidad por los polifosfatos (25).

3.7. Efecto de la fuerza iónica

Debido a la naturaleza electrostática de la interacción Cyt C-CL en el sitio A, y a que la misma es sensible a la fuerza iónica, el aumento de esta causa disociación del complejo debido a la adición de NaCl (25).

En un experimento realizado en Cyt C de corazón de caballo y CL de corazón de bovino se investigó la interacción Cyt C-CL en función de la fuerza iónica, agregando CL a las soluciones de proteínas que contenían diferentes concentraciones de sal (24).

Los perfiles que se observan en la **Figura 8**, obtenidos a diferentes concentraciones de NaCl, proporcionan una clara evidencia del papel desempeñado por la interacción electrostática en el proceso de unión: mientras que a 0.1 M de sal aproximadamente el 20% de la proteína interactúa con CL, a 0.12 M de sal el porcentaje cae a aproximadamente 10%, y no se monitoriza ninguna unión en presencia de 0,2 M de sal. Se concluye que a medida que la concentración de sal aumenta en la solución la interacción del complejo va decreciendo (25).

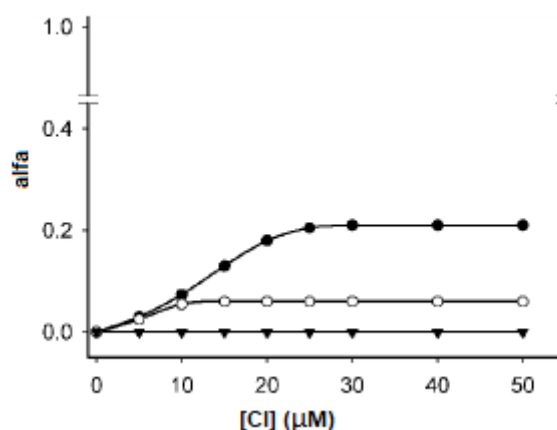


Figura 8: Efecto de la fuerza iónica en la formación del complejo Cyt C-CL. Extraído de Sinibaldi F et al (25).

En conclusión las interacciones que son de naturaleza electrostática, como la unión de CL en el sitio A, se favorecen a baja fuerza iónica, mientras que las interacciones que son de naturaleza hidrófoba (que implican unión de CL en el sitio C) se favorecen a elevadas fuerzas iónicas (25). La fuerza iónica influye significativamente en la estabilidad del complejo, y a su vez juega un rol importante en la célula determinando si el Cyt C quedará retenido en el espacio intermembrana actuando en la cadena respiratoria, o por el contrario, será liberado para dar inicio a la apoptosis.

3.8. Efecto del pH

El pH es otro de los agentes que afecta la estabilidad del complejo, la densidad superficial negativa dada por la concentración de CL en la membrana mitocondrial desplaza el equilibrio hacia la forma protonada de este fosfolípido, favoreciendo la unión Cyt C-CL por medio del sitio C (26). El pH afecta la interacción Cyt C-CL (**Figura 9**); mientras que a pH bajo la unión del complejo se da únicamente a través del sitio C de la proteína, a pH neutro la unión se da en ambos sitios (C y A).

Con un pH cercano a la neutralidad, la fuerza iónica influye en la interacción Cyt C-CL; el complejo se forma espontáneamente a baja fuerza iónica y se disocia a alta fuerza iónica.

Existe también un sitio de unión adicional para fosfolípidos, llamado sitio L, el cual se ve favorecido a pH ácido. Al igual que el sitio A, el sitio L es de naturaleza electrostática, compuesto de un grupo de residuos cargados positivamente (26, 32). El rol del sitio L en la afinidad del Cyt C por la membrana mitocondrial interna está dado por una dependencia del valor de pH, cuando el PH aumenta por encima de 7.4 la afinidad del Cyt C por la membrana la aumenta aún más (32).

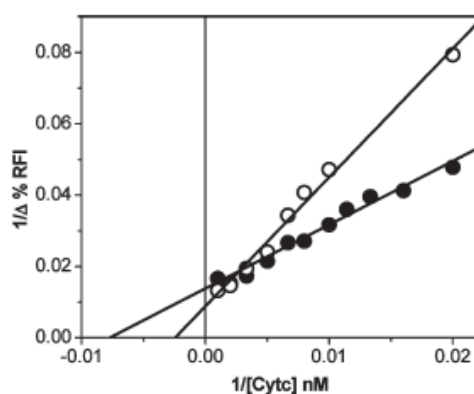


Figura 9: Efecto del pH en la afinidad del Cyt C por la membrana mitocondrial interna, los círculos vacíos corresponden a liposomas marcados con fluorescencia Cyt C nativo de caballo a pH 7,4 y los llenos a pH 6,2. Muestra que a pH 7,4 la afinidad del Cyt c por la membrana mitocondrial interna es mayor que a pH bajo. Extraído de Kawai C et al (32).

4. Apoptosis

El proceso de muerte celular programada, llamado apoptosis, es un proceso fisiológico (33) fundamental para mantener la correcta homeostasis de los tejidos (34).

Es importante la correcta función de este mecanismo para eliminar aquellas células que se encuentran dañadas, lesionadas, infectadas o transformadas (34), un ejemplo de esto son las células neoplásicas. Los mecanismos apoptóticos cumplen diferentes funciones, entre ellas se encuentran: la selección de los linfocitos, eliminando a aquellos que reconocen antígenos propios (33), la eliminación de células infectadas por microorganismos patógenos y la eliminación de células inflamatorias con la consecuente evolución del tejido de granulación a tejido cicatricial, vital en la cicatrización de heridas (35). Además actúa en diferentes etapas del desarrollo donde se han producido células en exceso, como por ejemplo es el caso de los seres humanos, que poseemos 5 dedos, a diferencia de las aves, donde no funcionan los mecanismos apoptóticos y lo que implica que posean membrana interdigital formando sus patas características (33), hecho que no sucede en los humanos gracias al correcto funcionamiento de la apoptosis. Interviene además en los procesos relacionados con el envejecimiento en el adulto, como la atresia folicular del folículo post ovulatorio y la involución de la glándula mamaria luego de la lactancia (35).

La apoptosis tiene que estar estrictamente regulada (35); si la apoptosis es insuficiente, puede tener como consecuencias el desarrollo de enfermedades neoplásicas o enfermedades autoinmunes; y si esta sucede de forma exagerada, podemos estar frente a enfermedades degenerativas crónicas, inmunodeficiencias o infertilidad (36).

Los mecanismos apoptóticos son procesos complejos, que comprenden una serie de eventos moleculares dependientes de energía (35). La presencia de cambios bioquímicos y físicos que involucran al citoplasma, al núcleo, y a la membrana plasmática son especialmente necesarios (37). Estos mecanismos apoptóticos pueden ser activados mediante una inducción negativa, donde ocurre una pérdida de actividad supresora, o falta de factores de crecimiento; o puede activarse a través de una inducción positiva como el resultado de la recepción de señales conflictivas o la unión de un ligando a un receptor (33).

Existen diferentes mecanismos para la generación de la apoptosis celular: una con un receptor externo, llamada vía extrínseca, que comprende la estimulación por fuera de la célula y otra que involucra a la mitocondria, llamada vía intrínseca (38). Ambas convergen en la activación de la cascada de las caspasas (39).

Con respecto a la *vía extrínseca*, es la vía de inicio de la apoptosis donde se encuentran implicados receptores transmembrana. Estos receptores también son llamados “receptores de la muerte” y se encuentran integrados por la superfamilia de genes del receptor de factor de necrosis tumoral (TNF). Estos presentan dominios extracelulares ricos en citosina (una de las cinco bases

nitrogenadas que forman parte de los ácidos nucleicos ADN y ARN) y tienen un dominio citoplásmico de aproximadamente 80 aminoácidos llamado el "dominio de la muerte" el cual juega un papel fundamental en la transmisión de la señal de muerte desde la superficie de la célula a las vías de señalización intracelular. Algunos ejemplos de este tipo de receptores son: FasL / FasR, TNF- α / TNFR1(35).

En esta vía ocurre un agrupamiento de receptores y unión con el ligando homólogo. Tras la unión del ligando, se reclutan proteínas adaptadoras citoplásmicas que exhiben dominios de muerte los cuales se van a unir con los receptores. La unión del ligando Fas a su receptor Fas da como resultado la unión de la proteína adaptadora FADD (FAD asociado al dominio de la muerte) y la unión del ligando TNF al receptor TNF da como resultado la unión de la proteína adaptadora TRADD (TNF asociado al dominio de la muerte) con el reclutamiento de FADD, este último se asocia con procaspasa-8 y se va a formar un complejo de señalización que induce a la muerte lo que resulta en la activación autocatalítica de la procaspasa-8 (35).

Una vez que se activa la caspasa-8 (perteneciente a una familia de enzimas del grupo de las cisteín-proteasas, caracterizadas por presentar un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas (40) , se desencadena la fase de ejecución de la apoptosis.

Como vimos anteriormente, el Cyt C tiene un rol importante en la apoptosis cuando es liberado desde la membrana mitocondrial al citoplasma de las células. Forma parte del inicio de una cascada que termina en la ya nombrada muerte celular programada (**Figura 10**) (9). Así es como actúa en la vía intrínseca de la apoptosis, mientras que también puede ayudar amplificando la vía extrínseca, que fue explicada anteriormente (**Figura 11**) (8, 41). Estos estímulos pueden estar dados por falta de factores de crecimiento, hormonas, exposición a ciertos patógenos, irradiación, drogas utilizadas en la quimioterapia y estrés oxidativo (39, 42), y no están mediados por ningún receptor (35), pero si controlado por la familia de BCL-2 (39). Los estímulos, causan estrés en la mitocondria, que afectan la permeabilidad de la membrana interna, resultando en la apertura de los poros de transición que se encuentran en dicha membrana. Además, hay una pérdida del potencial transmembrana. Todo esto conlleva a la liberación de diversas proteínas proapoptóticas desde el espacio intermembrana al citosol. Es aquí, cuando el Cyt C se libera para el inicio de la apoptosis (35).

La unión del Cyt C con la membrana mitocondrial cataliza la destrucción de la membrana lipídica. Esto está dado porque el Cyt C no es simplemente absorbido en la superficie de las membranas con doble capa lipídica, si no que genera la formación de una nanosfera hidrofóbica que se integra entre estas. Sin embargo, esto no está comprobado que suceda en membranas biológicas (9).

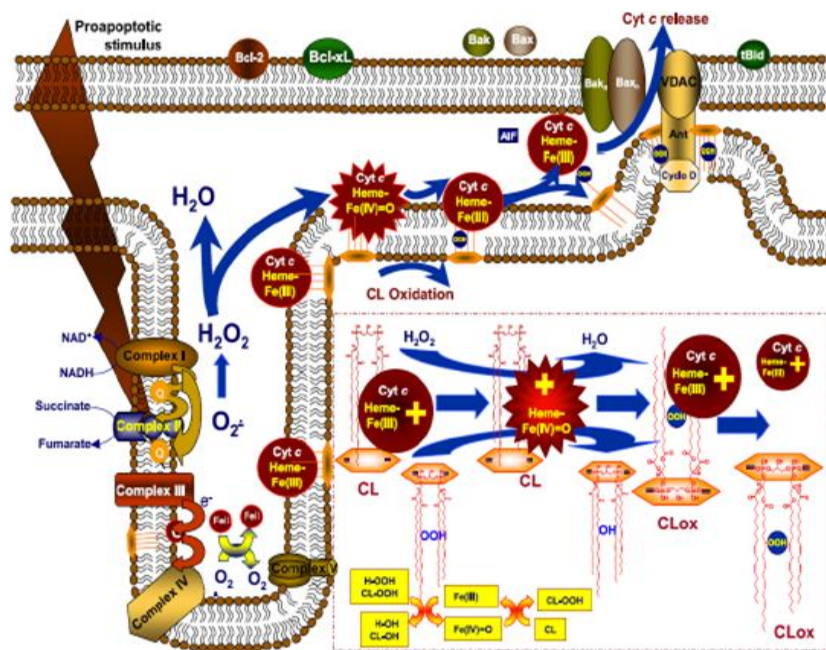


Figura 10: Rol del Cyt C y la CL en la apoptosis celular. Extraído de Kagan, V. E., et al (10).

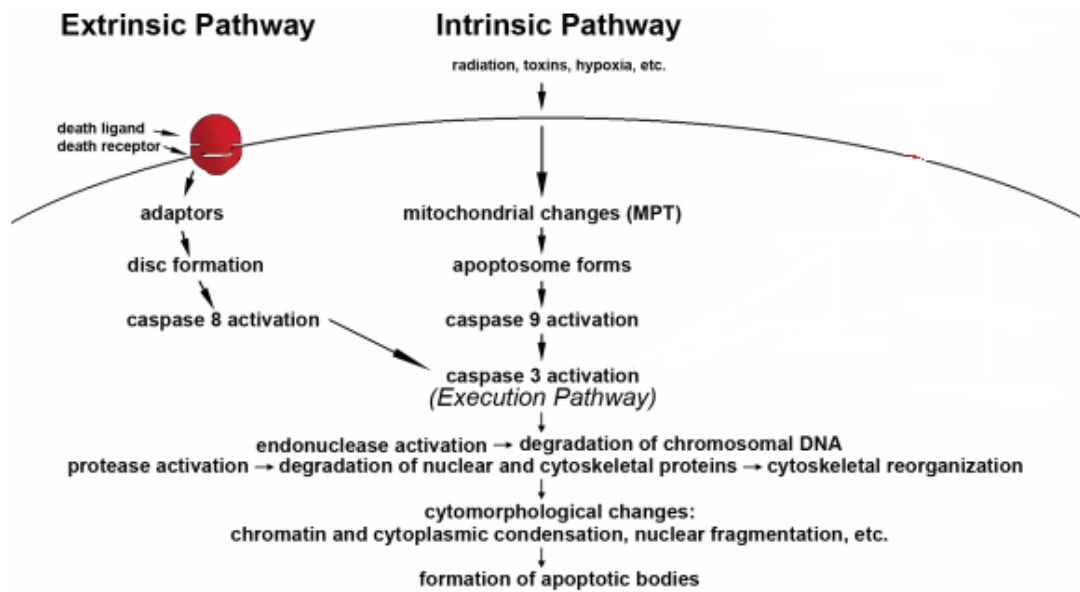


Figura 11: Vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis celular. Imagen adaptada de Elmore S et al (35).

4.1 Oxidación de la cardiolipina en la apoptosis celular

Con la formación de la nanosfera, la hinchazón del Cyt C que se asocia con aumento del volumen en el 50%, y la ruptura del enlace >Fe---S(Met80), existe un desplegamiento de alfa hélices y aparición de la estructura beta. También aumenta la accesibilidad del H₂O₂ al centro activo y aparece la actividad peroxidasa del Cyt C. Todos estos cambios generados en la molécula, llevan a que la membrana interna mitocondrial pierda su capacidad de barrera, hay edema de la matriz, y se forman megaporos en la membrana externa y se facilita la salida del Cyt C al citoplasma (9). Esta permeabilización de la membrana es clave para la salida al citosol de factores pro apoptóticos, como lo es el Cyt C. Este paso determina la vida o muerte de la célula y está controlado por la familia de proteínas BCL-2 (39, 42).

BCL-2 es una familia de proteínas que ha sido agrupada en 3 clases, una clase que inhibe la apoptosis (BCL-2, BCL-XL, BCL-W, BCL-B y MCL1), otra clase que promueve la apoptosis, denominada A1, conocida como BCL-2 A1 (BAX, BAK y BOK), y una tercera clase también proapoptótica BH3 (BAD, BIK, BID, BIM, BMF, NOXA y PUMA) que conserva un dominio BH3 dominante encargada de regular la capacidad anti apoptótica de la primera clase nombrada de BCL-2 (39).

Los miembros BAX y BAK de la familia proapoptótica son cruciales para inducir la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la posterior liberación de las moléculas apoptogénicas, activando las caspasas. Los miembros BCL-XL y BCL-2 inhiben a BAX y BAK. A pesar de esto, la actuación de BH3 promueve de nuevo la apoptosis inhabilitando a BCL-XL y BCL-2 para desinhibir a BAX y BAK (39).

Cuando el Cyt C sale al citosol de la célula desde el espacio intermembrana de la mitocondria, inicia la apoptosis, dada por la formación de un complejo entre APAF-1 y la Caspasa 9. Esta unión es dependiente de la presencia del Cyt C y ATP. Este complejo es denominado Apoptosoma (43) (**Figura 12**).

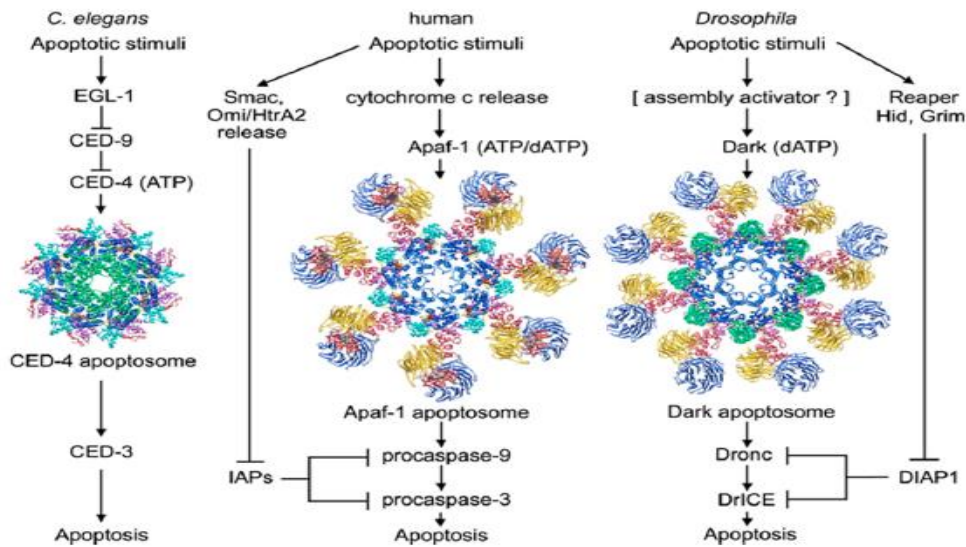


Figura 12: Vía intrínseca de la apoptosis en diferentes especies: *C. Elegans*, *H Sapiens* y *Drosophila*. Extraído de Alvarez-Paggi Dn et al (2).

La hidrólisis del ATP o dATP, mediante APAF-1, junto con la unión del Cyt C, promueve la formación del Apoptosoma. Una vez activado este, la caspasa 9 se disocia del complejo y estando libre es capaz de clivarse y activar otras caspasas, tal como la caspasa 3 (44), punto en el cual convergen la vía intrínseca con la extrínseca (39).

Hay estudios que demuestran que la ausencia de Cyt C en el citosol disminuye la actividad apoptótica y también, el aumento del mismo induce la activación de las caspasas apoptóticas (45).

Una vez iniciada la apoptosis podemos visualizar tres fases:

Fase efectora: en esta etapa ocurre la activación de grupos enzimáticos tales como las endonucleasas, caspasas y proteasas mediada por el aumento de calcio intracelular, generando cambios en el citoesqueleto haciendo que las células reduzcan su tamaño, se abran sus mitocondrias y dejen salir el Cyt C al citosol (34).

Fase degradativa: en esta fase ocurre la degradación de las proteínas y de los ácidos nucleicos, derivando en la formación de cuerpos apoptóticos compuestos por fragmentos celulares rodeados de membrana. Estos son fagocitados por macrófagos evitando la inflamación. Aquí es donde actúan las endonucleasas encargadas de fragmentar el ADN y las caspasas quienes van a degradar las proteínas (34).

Fase de eliminación: los macrófagos fagocitan los cuerpos apoptóticos (46), atraídos por ligandos específicos de la fosfatidilserina, que es un fosfolípido que se expone en la superficie de la cara interna de la membrana y se une a los receptores de estas células (34).

5. Evolución del citocromo c y sus mutaciones

El Cyt C evoluciona lentamente debido a sus funciones esenciales para la vida. Por ejemplo, las levaduras y los mamíferos comparten 45% de aminoácidos y dentro de los mamíferos el ratón y el ornitorrinco comparten el 95.3% (47). Es sometido a una fuerte presión selectiva en contra de la variación de aminoácidos. Sin embargo, se ha reportado recientemente un rápido reemplazo filogenético de aminoácidos en el Cyt C de especies de primates antropoides, pero no en otros linajes de mamíferos (48). Esto se interpreta como una posible respuesta adaptativa a la mayor producción de radicales de oxígeno por respiración mitocondrial debido a dos características fenotípicas de la evolución antropoide: individuos vivos más grandes con cerebro de mayor tamaño que otros (49), causados por la influencia de la evolución de la cadena respiratoria (sobre todo en los complejos III y IV) (47).

Con el objetivo de buscar posibles variantes funcionales del Cyt C, examinaron la base de datos para polimorfismos de nucleótidos individuales (dbSNP), de acceso público en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>, para la codificación de polimorfismos de las secuencias del citocromo humano donde encontraron que su marco abierto de lectura tiene una longitud de 319 bases y hasta 24 codificaciones diferentes de polimorfismos de nucleótidos individuales (cSNP), entre ellos 18 no sinónimos y 6 sinónimos (49). Ninguno de estos supuestos de SNP sobrevivió a la validación experimental mediante la secuenciación del gen Cyt C en un panel de 95 individuos asumidos como referencia estándar de la población humana, concluyendo entonces que el marco abierto de lectura del Cyt C no presenta variantes alélicas, por lo tanto el mismo es monomórfico (49). 21 residuos (20%) se conservan en más de 100 organismos eucariotas y 12 (11%) están sustituidos de forma conservadora (50).

En primates, el 86% de la secuencia codificante se conserva, porcentaje que disminuye en mamíferos (77%) y vertebrados (57%). Considerando también las sustituciones conservadoras los porcentajes se elevan a 93%, 89% y 76% respectivamente. El 100% de los polimorfismos de nucleótidos individuales anteriormente mencionados ocurren en regiones altamente conservadas dentro de primates y mamíferos, mientras que dentro de los vertebrados este porcentaje baja a 87% (49, 51); muchas de estas mutaciones del Cyt C involucran residuos importantes en la estabilización del núcleo proteico y su solvatación, y en el mantenimiento de la integridad conformacional de la molécula y de la superficie involucrada en las interacciones proteína-proteína (51).

5.1 Mutaciones y clínica

Se han documentado numerosas variantes naturales de la proteína en humanos, localizadas en el bucle omega que incluye los residuos 40-58 (50), entre ellas se encuentran la sustitución de una Glicina (Gly) por una Serina (Ser) en la posición 41 (G41S), Tirosina (Tyr) por Histidina (His) en la posición 48 (Y48H), y Alanina (Ala) por Valina (Val) en la posición 51 (A51V) (2). Debido al rol central de sus funciones para la vida y el papel que desempeña en la apoptosis, ya mencionado anteriormente, podríamos preguntarnos si estas mutaciones del Cyt C implican cambios fisiológicos determinantes para el desarrollo de los individuos. Sin embargo, estas variantes resultan no ser letales pero sí patológicas, causando una forma autosómica dominante de Trombocitopenia (THC4) (2).

5.1.1 Mutación G41S

Esta mutación fue la primera en ser reportada, en una familia de Nueva Zelanda (**Figura 13**), en la cual el recuento promedio de plaquetas en 29 individuos afectados fue de $109 \times 10^9/L$ de sangre (el rango fue de 73 – 167, con un intervalo de referencia de 150 – 430), con morfología y volumen plaquetario normal, a diferencia de la mayoría de otros tipos de trombocitopenias hereditarias no sindrómicas, que se caracterizan por la presencia de plaquetas de mayor tamaño (52). Las manifestaciones clínicas de su enfermedad estaban ausentes o eran leves, y no asociaban alteraciones en otros sistemas(53).

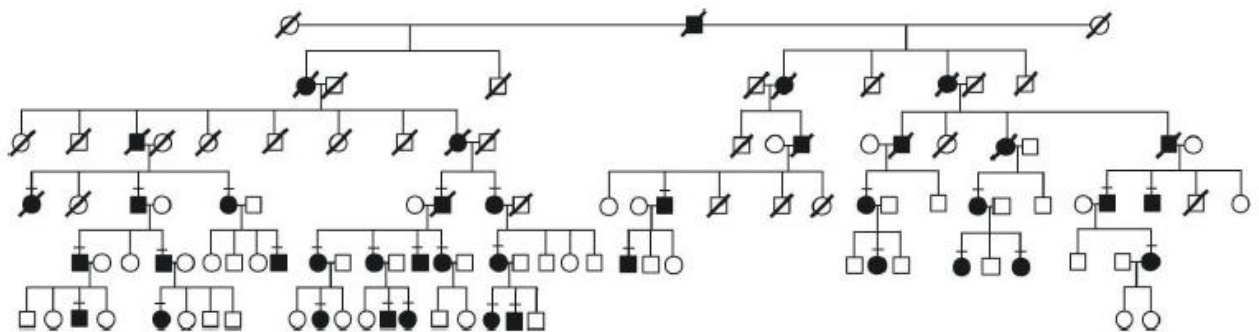


Figura 13: En este familiograma se aprecia la transmisión autosómica dominante de la Trombocitopenia, en una familia de Nueva Zelanda. Extraído de Morison IM et al (53).

La base molecular de esta mutación está dada por una transición de Guanina por Adenina en el nucleótido 132 del exón 2 perteneciente a la región cromosómica 7p15.2 del gen codificante para el Cyt C, causando la sustitución de Gly por Ser en el residuo 41 (53), invariante en 113 especies eucariotas (50). Estructuralmente, esta mutación no causa grandes alteraciones (**Figura 14**) (53).

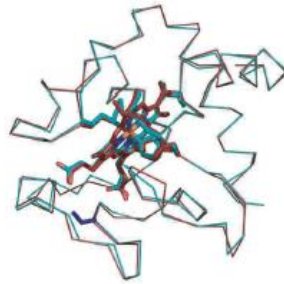


Figura 14: Caracterización estructural del G41S. Se muestra la superposición de la variante de Cyt C y el Cyt C wild-type. La estructura del G41S humano reducido se muestra en azul claro y el Cyt C reducido de atún se muestra en rojo. Adaptado de Morison IM et al (53).

Para entender la causa que subyace en esta patología, fue estudiada la formación de las plaquetas en la médula ósea y la muerte prematura de las mismas en la circulación, midiendo la fracción de plaquetas inmaduras (53). Respecto a lo primero, la evaluación de la megacariopoyesis demostró estar desregulada por la presencia de liberación prematura de plaquetas al espacio medular en lugar de dirigirse hacia los sinusoides, mientras que en sangre periférica los miembros de la familia afectados mantenían la misma proporción de plaquetas inmaduras que la población no afectada, indicando que no existe disminución en la esperanza de vida de estas (53). No obstante, el número absoluto de plaquetas inmaduras era menor, lo cual sugiere que la producción se encuentra disminuida (**Figura 15**). Al estudiar la misma, se pudo observar que existía un número de plaquetas las cuales eran producidas tempranamente al sexto día, cuándo sería esperable que esto ocurra entre el décimo y el doceavo día. Esta producción temprana y potenciada es rara y es consistente con que la trombocitopenia es causada por la fuerte activación de la maquinaria apoptótica (53).

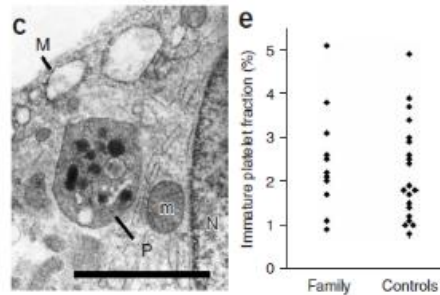


Figura 14: Formación plaquetaria defectuosa, pero con expectativa de vida normal. A la izquierda podemos observar una plaqueta fagocitada en un macrófago (M) medular, confirmando la liberación intramedular. En la gráfica ubicada a la derecha, se muestra el porcentaje de plaquetas inmaduras de 11 miembros de la familia comparado con 20 controles. Adaptado de Morison IM et al (53).

La variante G41S (**Figura 16**) presentó la misma tasa de consumo de oxígeno que el Cyt C wild type, lo que sugiere que su función en la respiración mitocondrial se encuentra incambiada, además su potencial redox y la actividad peroxidasa es similar en ambas proteínas (53). De todas formas, Liptak y colaboradores demostraron que la variante G41S altera la estructura electrónica del hemo y aumenta el grado de intercambio de electrones, lo que lleva a pensar que este cambio en el hemo puede ser responsable del efecto proapoptótico de la mutación (54) por acelerar la producción de la forma oxidada del Cyt C (55).

La Gly 41 se encuentra cercana a la Gly 39, residuo involucrado en la superficie de unión del Cyt C y Apaf-1, incrementando considerablemente el clivaje de la caspasa-3 y en consecuencia la apoptosis, dejando en evidencia que la formación de las plaquetas es particularmente sensible a los cambios en la activación de la vía intrínseca de la muerte celular programada (53). Esta es la primera mutación identificada que aumenta la actividad apoptótica del Cyt C, en contraste a otras mutaciones que no afectan o que disminuyen dicha actividad (40). Además, los efectos de esta variante sobre la interacción del Cyt C con Apaf-1 son específicas de cada especie (56).

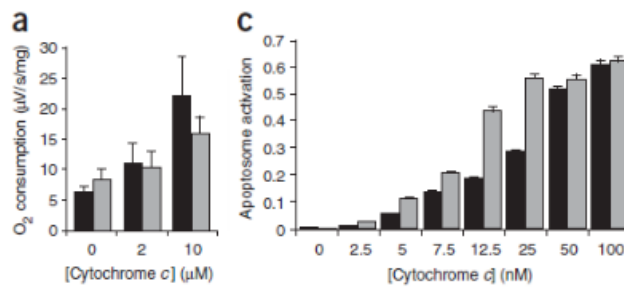


Figura 16: La variante G41S del Cyt C potenció la actividad pro apoptótica, pero mantuvo la actividad redox normal. En A se observa el consumo relativo de oxígeno por los mitoplastos sin Cyt C endógeno en la presencia del Cyt C WT (barras negras) o G41S (barras grises). En C, se muestra la activación del apoptosoma, derivado del nivel de clivaje de DEVD-AMC, por el Cyt C WT (barras negras) y G41S (barras grises) a través del rango de concentraciones del Cyt C. Adaptado de Morison IM et al (53).

5.1.2 Mutación Y48H

La segunda variante descrita del Cyt C, Y48H, fue identificada en una familia Italiana (**Figura 17**), donde cuatro miembros de la misma presentaron Trombocitopenia, con un recuento de plaquetas bajo (73 a 135 x 10⁹/L), pero de morfología y tamaño normal, sin presencia de episodios de sangrado prolongado (55) similar a la variante detallada anteriormente. Esto podría estar dado por la similitud en el plegado de la proteína, ya que, la Tyr 48 se encuentra cercana a Gly 41 en el gen del Cyt C (55).

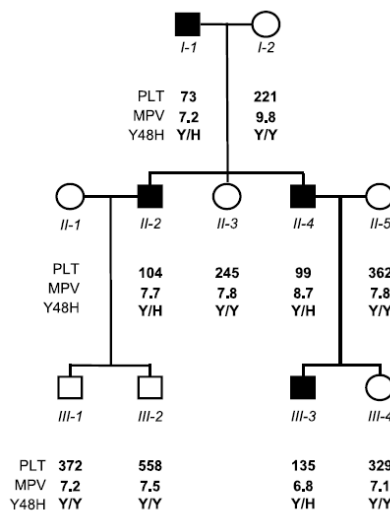


Figura 17: Este familiograma muestra los miembros afectados por la mutación Y48H del Cyt C, el número de plaquetas y el volumen plaquetario medio. Extraído de De Rocco et al (55).

Esta variante presentó una disminución en el consumo de oxígeno y un aumento de la actividad apoptótica en comparación al wild type (55). Así como un cambio en el potencial redox (57). Hipotéticamente, los pacientes que presenten ambas mutaciones, G41S y T48H, tendrían una liberación de pro plaquetas prematuras, resultando en la producción inefectiva de plaquetas (53, 55), apoyado por la presencia de estructuras similares a plaquetas en la médula ósea de los pacientes con Trombocitopenia (58). Estas estructuras similares a las plaquetas se liberan en el espacio medular por un mecanismo independiente de la formación de pro plaquetas y carecen de la cola microtubular que es característica de las plaquetas circulantes (58). Este fenotipo fue, en un primer instante, atribuido a la actividad apoptótica aumentada de los mutantes del Cyt C (53, 58), pero esta hipótesis fue descartada por la ausencia de pruebas sobre la existencia de megacariocitos apoptóticos en la médula ósea (58).

El mecanismo de la liberación plaquetaria sin la formación de pro-plaquetas aún se desconoce. In vitro los megacariocitos de los pacientes con Trombocitopenia están capacitados para producir plaquetas normalmente, liberando las plaquetas con la cola microtubular normal (58).

5.1.3 Mutación A51V

Recientemente, se estudiaron 18 miembros de una familia con Trombocitopenia en los que 3 de ellos tienen Trombocitopenia causada por otra mutación en el Cyt C, la A51V(58), pero aún no hay información sobre la estructura y la función de la misma (2).

5.1.4 Mutaciones sin traducción clínica

Existen también otras mutaciones en el Cyt C (**Figura 18**) sin consecuencias conocidas, en las que no se conoce si existe connotación patológica (59).

	cyt c mutant	allele frequency ($\times 10^{-6}$)	origin of population
1	Gly1Asp	8.546	South Asian
2	Ile11Phe	8.356	African
3	Met12Ile	75.09	Latino
4	Thr28Ala	8.268	European
5	His33Tyr	8.263	European
6	Arg38Trp	8.265	European
7	Ser47Ala	24.80	South Asian
8	Ser47Phe	49.61	South Asian
9	Ala50Thr	8.267	Latino
10	Ala50Val	8.267	European
11	Ala51Thr	8.268	European
12	Asn52Ser	24.80	European
13	Ile57Val	16.54	European
14	Asn70Ser	8.279	European
15	Ile75Val	16.58	African
16	Ile81Asn	8.317	European
17	Val83Ile	8.327	European
18	Asp93Asn	8.393	European
19	Thr102Ala	17.05	European

⁶⁷Data were taken from the Exome Aggregation Consortium (ExAC).⁷⁶⁷

Figura 18: Otras mutaciones encontradas en el Cyt C. Extraído de Lek M et al(59).

6. Conclusiones

En este trabajo se realizó una revisión bibliográfica sobre las funciones del Cyt C, observando su importancia en múltiples procesos esenciales para el correcto mantenimiento de la homeostasis celular, incluyendo la muerte celular programada, proceso que se encuentra estrictamente regulado y cuya alteración puede llevar a la afectación de los diferentes sistemas derivando en diversas manifestaciones clínicas.

Dentro de las funciones e interacciones del Cyt C relevantes en su rol en la apoptosis se destaca la unión con la CL, lípido presente en la membrana interna mitocondrial, cuya unión con el Cyt C depende de numerosos factores tales como el pH, la fuerza iónica y la presencia de ATP. Esta unión activa la función peroxidasa de la proteína, promoviendo la liberación de factores proapoptóticos, gracias a la permeabilización de la membrana mitocondrial mediada en parte por la familia de factores proapoptóticos tales como BAX y BAK, iniciando la vía intrínseca de la apoptosis.

Por otra parte, se revisó la estabilidad evolutiva de esta proteína la cual es llamativa. La estructura del Cyt C se ha mantenido casi constante a lo largo del tiempo y pequeños cambios como mutaciones que ocurren naturalmente en humanos, entre ellas G41S, Y48H y A51V son causantes de una forma autosómica dominante de Trombocitopenia.

Gracias a este trabajo, además de ahondar en los diferentes roles del Cyt C, comprendimos la importancia de realizar búsquedas bibliográficas a través de diferentes plataformas y la lectura crítica de artículos científicos. Mediante este ejercicio aprendimos a elaborar una síntesis actualizada de los temas más relevantes adquiriendo herramientas que permitirán la generación de trabajos en diferentes temáticas científicas.

7. Bibliografía

1. Hannibal L, Tomasina F, Capdevila DA, Demicheli Vn, Tórtora Vn, Alvarez-Paggi Dn, et al. Alternative conformations of cytochrome c: structure, function, and detection. *Biochemistry*. 2016;55(3):407-28.
2. Alvarez-Paggi Dn, Hannibal L, Castro MA, Oviedo-Rouco S, Demicheli V, Tórtora V, et al. Multifunctional cytochrome c: learning new tricks from an old dog. *Chemical reviews*. 2017;117(21):13382-460.
3. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger: principios de bioquímica* 2015.
4. Atkins P, Overton T. Shriver and Atkins' inorganic chemistry: Oxford University Press, USA; 2010.
5. Liu J, Chakraborty S, Hosseinzadeh P, Yu Y, Tian S, Petrik I, et al. Metalloproteins containing cytochrome, iron-sulfur, or copper redox centers. *Chemical reviews*. 2014;114(8):4366-469.
6. Devlin TM. *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas*: Reverté; 2004.
7. Parra Y, Ferrer RE, Montero K, Martínez M. Espectroscopía de las interacciones de drogas quinolónicas antimaláricas con Fe (III) PPIX. *Química Viva*. 2011;10(3).
8. Ow Y-LP, Green DR, Hao Z, Mak TW. Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(7):nrm2434.
9. Vladimirov YA, Proskurnina E, Alekseev A. Molecular mechanisms of apoptosis. Structure of cytochrome c-cardiolipin complex. *Biochemistry (Moscow)*. 2013;78(10):1086-97.
10. Kagan VE, Tyurin VA, Jiang J, Tyurina YY, Ritov VB, Amoscato AA, et al. Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nature chemical biology*. 2005;1(4):223.
11. Pangborn MC. The composition of cardiolipin. *Journal of Biological Chemistry*. 1947;168(1):351-61.
12. Beales PA, Bergstrom CL, Geerts N, Groves JT, Vanderlick TK. Single Vesicle Observations of the Cardiolipin- Cytochrome c Interaction: Induction of Membrane Morphology Changes. *Langmuir*. 2011;27(10):6107-15.
13. Sathappa M, Alder NN. The ionization properties of cardiolipin and its variants in model bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2016;1858(6):1362-72.
14. Choi S, Gonzalez F, Jenkins G, Slomianny C, Chretien D, Arnoult D, et al. Cardiolipin deficiency releases cytochrome c from the inner mitochondrial membrane and accelerates stimuli-elicited apoptosis. *Cell death and differentiation*. 2007;14(3):597.
15. Schlame M, Rua D, Greenberg ML. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Progress in lipid research*. 2000;39(3):257-88.
16. Chicco AJ, Sparagna GC. Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2007;292(1):C33-C44.
17. LeCocq J, Ballou CE. On the structure of cardiolipin. *Biochemistry*. 1964;3(7):976-80.
18. Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*: Macmillan; 2008.
19. Darnell JE, Lodish HF, Baltimore D. *Molecular cell biology*: Scientific American Books New York; 1990.
20. Kagan VE, Chu CT, Tyurina YY, Cheikhi A, Bayir H. Cardiolipin asymmetry, oxidation and signaling. *Chemistry and physics of lipids*. 2014;179:64-9.
21. Schlame M, Ren M. Barth syndrome, a human disorder of cardiolipin metabolism. *FEBS letters*. 2006;580(23):5450-5.
22. Vreken P, Valianpour F, Nijtmans LG, Grivell LA, Plecko B, Wanders RJ, et al. Defective remodeling of cardiolipin and phosphatidylglycerol in Barth syndrome. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;279(2):378-82.
23. Sinibaldi F, Howes BD, Droghetti E, Polticelli F, Piro MC, Di Pierro D, et al. Role of lysines in cytochrome c-cardiolipin interaction. *Biochemistry*. 2013;52(26):4578-88.

24. Sinibaldi F, Milazzo L, Howes BD, Piro MC, Fiorucci L, Polticelli F, et al. The key role played by charge in the interaction of cytochrome c with cardiolipin. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2017;22(1):19-29.
25. Sinibaldi F, Fiorucci L, Patriarca A, Lauceri R, Ferri T, Coletta M, et al. Insights into cytochrome c– cardiolipin interaction. Role played by ionic strength. *Biochemistry*. 2008;47(26):6928-35.
26. Rytömaa M, Kinnunen PK. Reversibility of the Binding of Cytochrome c to Liposomes IMPLICATIONS FOR LIPID-PROTEIN INTERACTIONS. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(7):3197-202.
27. Tuominen EK, Wallace CJ, Kinnunen PK. Phospholipid-cytochrome c interaction evidence for the extended lipid anchorage. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(11):8822-6.
28. Kalanxhi E, Wallace CJ. Cytochrome c impaled: investigation of the extended lipid anchorage of a soluble protein to mitochondrial membrane models. *Biochemical Journal*. 2007;407(2):179-87.
29. Sinibaldi F, Howes BD, Piro MC, Polticelli F, Bombelli C, Ferri T, et al. Extended cardiolipin anchorage to cytochrome c: a model for protein–mitochondrial membrane binding. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2010;15(5):689-700.
30. Hanske J, Toffey JR, Morenz AM, Bonilla AJ, Schiavoni KH, Pletneva EV. Conformational properties of cardiolipin-bound cytochrome c. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(1):125-30.
31. Tuominen EK, Zhu K, Wallace CJ, Clark-Lewis I, Craig DB, Rytömaa M, et al. ATP induces a conformational change in lipid bound cytochrome C. *Journal of Biological Chemistry*. 2001.
32. Kawai C, Pessoto FS, Rodrigues T, Mugnol KC, Tórtora V, Castro L, et al. pH-sensitive binding of cytochrome c to the inner mitochondrial membrane. Implications for the participation of the protein in cell respiration and apoptosis. *Biochemistry*. 2009;48(35):8335-42.
33. Jordán J. Apoptosis: muerte celular programada. *Offarm*. 2003;22(6):100-6.
34. Angosto MC, editor. Bases moleculares de la apoptosis. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*; 2003.
35. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007;35(4):495-516.
36. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell*. 2004;116(2):205-19.
37. Ly JD, Grubb D, Lawen A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in apoptosis; an update. *Apoptosis*. 2003;8(2):115-28.
38. Nuñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*. 1998;17(25):3237.
39. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(1):47.
40. Elinos-Báez CM, Maldonado V, Zajgla JM. Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gaceta médica de México*. 2003;139(5):493-9.
41. Kulikov A, Shilov E, Mufazalov I, Gogvadze V, Nedospasov S, Zhivotovsky B. Cytochrome c: the Achilles' heel in apoptosis. *Cellular and molecular life sciences*. 2012;69(11):1787-97.
42. Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Molecular cell*. 2010;37(3):299-310.
43. Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends in biochemical sciences*. 2001;26(6):390-7.
44. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1· cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(17):11549-56.
45. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 1996;86(1):147-57.

46. Camarena-Gutiérrez G. Muerte celular programada como respuesta al estrés ambiental. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 2006;12(2).
47. Pierron D, Opazo JC, Heiske M, Papper Z, Uddin M, Chand G, et al. Silencing, positive selection and parallel evolution: busy history of primate cytochromes c. *PLoS One*. 2011;6(10):e26269.
48. Schmidt TR, Wildman DE, Uddin M, Opazo JC, Goodman M, Grossman LI. Rapid electrostatic evolution at the binding site for cytochrome c on cytochrome c oxidase in anthropoid primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(18):6379-84.
49. Bertini I, Grassi E, Luchinat C, Quattrone A, Saccenti E. Monomorphism of human cytochrome c. *Genomics*. 2006;88(5):669-72.
50. Banci L, Bertini I, Rosato A, Varani G. Mitochondrial cytochromes c: a comparative analysis. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 1999;4(6):824-37.
51. Pelletier H, Kraut J. Crystal structure of a complex between electron transfer partners, cytochrome c peroxidase and cytochrome c. *Science*. 1992;258(5089):1748-55.
52. Pecci A. Diagnosis and treatment of inherited thrombocytopenias. *Clinical genetics*. 2016;89(2):141-53.
53. Morison IM, Bordé EMC, Cheesman EJ, Cheong PL, Holyoake AJ, Fichelson S, et al. A mutation of human cytochrome c enhances the intrinsic apoptotic pathway but causes only thrombocytopenia. *Nature genetics*. 2008;40(4):387.
54. Liptak MD, Fagerlund RD, Ledgerwood EC, Wilbanks SM, Bren KL. The proapoptotic G41S mutation to human cytochrome c alters the heme electronic structure and increases the electron self-exchange rate. *Journal of the American Chemical Society*. 2010;133(5):1153-5.
55. De Rocco D, Cerqua C, Goffrini P, Russo G, Pastore A, Meloni F, et al. Mutations of cytochrome c identified in patients with thrombocytopenia THC4 affect both apoptosis and cellular bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2014;1842(2):269-74.
56. Josephs TM, Hibbs ME, Ong L, Morison IM, Ledgerwood EC. Interspecies variation in the functional consequences of mutation of cytochrome c. *PLoS One*. 2015;10(6):e0130292.
57. Lett CM, Guillemette JG. Increasing the redox potential of isoform 1 of yeast cytochrome c through the modification of select haem interactions. *Biochemical Journal*. 2002;362(2):281-7.
58. Ong L, Morison IM, Ledgerwood EC. Megakaryocytes from CYCS mutation-associated thrombocytopenia release platelets by both proplatelet-dependent and-independent processes. *British journal of haematology*. 2017;176(2):268-79.
59. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016;536(7616):285.