

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS  
(PEDECIBA)**

**TESIS DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(OPCIÓN NEUROCIENCIAS)**

**Estudio de los mecanismos de muerte celular inducida  
por peróxido de hidrógeno  
y de la protección por la quercetina en células PC12.**

**Lic. Laura Lafon**

Departamento de Neuroquímica- IIBCE, Laboratorio de Neurogénesis- UFRJ

Orientador: Dr. F. Dajas

Tribunal: Dra. M. Paulino, Dra. M. Brauer, Dr. D. Rodríguez-Iturralde.

Montevideo, Abril del 2003

***Dedicatoria***

- ◆ *Dedico este trabajo a los que han sufrido y a los que sufren.*
- ◆ *Creo profundamente en la capacidad de las Comunidades Humanas, en particular la Comunidad Científica, para solucionar problemas y mejorar la calidad de vida. Esa es mi fe. Por eso dedico este trabajo también a las personas que día a día se esfuerzan para que funcionemos como Comunidad, a las personas que consideran que el avance de las investigaciones está por delante de sus propios intereses, a las personas que donde hay límites tienden puentes.*
- ◆ *Finalmente, dedico este trabajo a los niños, que son alegría y esperanza.*

## Agradecimientos

A mis padres, que me enseñaron a luchar.

A mis hermanos, Sandra y Santiago, que creen en mí.

A Alejandro, mi esposo, compañero fiel e inseparable en todo este camino y en todos mis caminos, sin el cual no hubiese tenido fuerzas para llegar hasta aquí.

A mis suegros que me apoyaron, particularmente para que viajara.

A "mis tíos de Buenos Aires", Nelly y Pablo, gracias a quienes estudié inglés, que ha sido además de un gusto, una herramienta imprescindible para trabajar.

A mis amigos, que me han dado ánimo siempre; particularmente, a Verónica y a Mariana, que han compartido hasta los mínimos detalles todo lo que ocurría y lo que sentía.

A la gente del depto. de Biofísica, de Citogenética Humana, de la Comisión de Visitas Escolares y de la portería, gracias a quienes no abandoné el Instituto en los momentos más difíciles.

A Andrés Abín por haber sido sincero.

A Patricia por haber aprontado todo el material del cuarto de cultivo.

A mis compañeros de Neuroquímica, cuestionadores incansables, que fueron los primeros en exigir una demostración de que la quercetina no reaccionaba directamente con el  $H_2O_2$ .

Al Dr. Dajas, por haber corregido los manuscritos del proyecto y de la tesis, y por haberme dado en el marco de la tesis total libertad en los experimentos a realizar.

A Wilner Martínez y Andrés Abín por haber leído el manuscrito completo sin tener obligación y haber hecho correcciones y sugerencias que me fueron de gran utilidad.

A Anahí Fernández y Fernanda Blassina por haberme introducido a las técnicas de cultivo celular y de medición de viabilidad con MTT.

A Julio Siciliano por haberme sugerido usar EGTA, cuando yo todavía no tenía idea de que fuese más específico por el  $Ca^{2+}$  que el EDTA.

A Hugo Peluffo y Andrés Abín, cuyas sugerencias me ayudaron a ajustar la técnica de la LDH.

A Wilner Martínez por habernos enseñado la técnica y los principios del ensayo cometa.

A Florencia Arredondo porque fue bueno el tiempo en que trabajamos juntas; por haber realizado los experimentos con apigenina y chrysin, así como conteos en todos los experimentos del ensayo cometa, y por haber intentado junto conmigo realizar estudios de espectrometría de flavonoides en presencia de cationes bivalentes.

A Carlos Kremer por haber estudiado en condiciones controladas los espectros de absorción de la quercetina en presencia y ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$ , a pedido nuestro, y habernos brindado los datos generosamente.

A Leonel Ferrando y Horacio Heinzein por habernos provisto de quercetina.

A la gente del grupo de Modelado Biomolecular y Farmacología Molecular del Depto de Físico-química y Matemáticas de la Facultad de Química- Ana, Federico, Elena y Margot Paulino- por haberme recibido con alegría, haberme enseñado algunos principios y la utilización del programa HYPERCHEM, y por haberse interesado en los mecanismos de acción de los flavonoides.

A Juan Benech, por haber realizado el experimento gracias al cual tenemos datos preliminares de que la quercetina afecta la carga de  $\text{Ca}^{2+}$  al núcleo celular.

A Ana Denicola que colaboró en el préstamo y el manejo del fluorímetro para realizar mediciones que se incluyen en esta tesis, y otras que no fueron incluidas.

Al depto de Citogenética que me dio acceso al densitómetro.

A los deptos. De Citogenética Humana y de Neuroanatomía, que nos prestaron su microscopio de fluorescencia.

A Patricia Curbelo y a Lizet de León por todo lo que compartimos.

A toda la gente del laboratorio de Neurogénesis de la UFRJ, en particular al Dr. Linden por haberme recibido en su laboratorio y haber colaborado en el diseño de experimentos y la discusión de resultados.

A Cynthia Guimaraes por haber diseñado conmigo experimentos farmacológicos varios (entre ellos, con 3-MA) y por haber medido la actividad de caspasas.

A la abuela de Cynthia (ella sabe por qué).

A Rodrigo Martins y a Mariana Silveira con quienes aprendí la técnica de Western blots y que trabajaron conmigo parte del tiempo, por su apoyo incondicional.

A Rodrigo por aquello de que "Não vale a pena chorar pela leite derramada" (o algo así).

A Mariana y su esposo, así como a Ciça y a Lucianna por haberme abierto las puertas y haber transformado mi segunda estadía en Río en una experiencia singularmente rica.

## Resumen

La muerte celular que involucra estrés oxidativo (EO) está en la base de patologías neurodegenerativas y cerebrovasculares. Por este motivo, tanto el estrés oxidativo como las sustancias con capacidad antioxidante, que serían potencialmente neuroprotectoras, son actualmente motivos de intensa investigación.

A los efectos de estudiar los mecanismos de muerte celular inducidos por el estrés oxidativo y la capacidad citoprotectora de ciertos compuestos, en el presente trabajo de Tesis se analizó la muerte celular inducida por el  $H_2O_2$  en células PC12. Utilizando una variedad de técnicas (reducción de la sal de tetrazolio MTT, ensayo cometa y técnica de la lactato deshidrogenasa) se mostró que el  $H_2O_2$  disminuyó la viabilidad celular e indujo daño en el ADN, sin haber producido ruptura temprana de la membrana plasmática. Estos cambios fueron interpretados como indicadores de que la muerte celular no fue necrótica; habría sido de tipo programada.

Considerando la marcada variabilidad en la sensibilidad al  $H_2O_2$  mostrada por diferentes tipos celulares, y teniendo en cuenta la antigüedad de la línea celular PC12, se comparó la sensibilidad al  $H_2O_2$  en dos cepas de células PC12 (PC12 "I" y PC12 "U"), encontrándose que una cepa (PC12 "U") era unas 6 veces más sensible que la otra. Se observó que en la que presentó menor sensibilidad al  $H_2O_2$  (PC12 "U"), la muerte celular fue bloqueable por inhibidores específicos de las caspasas -3, -6 y -9 y por 3-metiladenina mientras que en la cepa más sensible al  $H_2O_2$  (PC12 "I") ninguno de los inhibidores citados tuvo efecto a la dosis testada, y un estudio de la actividad de las caspasas -3 y -6 mostró que el tratamiento con  $H_2O_2$  las disminuía.

Entre varios antioxidantes de amplio espectro estudiados, de diferente naturaleza química, se encontró que solamente uno, el flavonoide quercetina, protegió de la muerte celular inducida por  $H_2O_2$ . Un estudio de estructura-actividad de flavonoides mostró que en ambos clones la presencia del catecol del anillo B y del doble enlace en conjugación con la función oxo del anillo C son requerimientos estructurales para la actividad protectora. Los determinantes estructurales fueron los mismos para brindar la protección celular, y para disminuir el daño en el ADN de acuerdo al ensayo cometa.

Con el fin de avanzar en los mecanismos que subyacen a la protección por quercetina se utilizaron técnicas espectrométricas, se realizaron experimentos farmacológicos, Western blots y

mediciones de la actividad de caspasas. Los resultados permiten afirmar: (1) que la quercetina no interactúa directamente con el  $H_2O_2$ ; (2) que no hay correspondencia entre la capacidad secuestradora de ROS o la capacidad quelante de  $Fe^{2+}$  y la capacidad protectora celular; (3) que no participaron mecanismos estrogénicos en la protección celular; (4) que la fosforilación de ERK por  $H_2O_2$  no fue revertida por la quercetina y (5) que la activación de NF- $\kappa$ B ocurrió independientemente del tratamiento. Se mostró también que (6) la quercetina alteraría la dinámica del  $Ca^{2+}$  intracelular, pero no por formación de un complejo de coordinación con el mismo. Por otra parte, los resultados mostraron que (7) la fosforilación de CREB, que disminuyó en presencia de  $H_2O_2$ , volvió al nivel control en presencia de la quercetina.

Estos estudios muestran por primera vez que podrían estar participando mecanismos autofágicos en la muerte celular por  $H_2O_2$ . Asimismo, se mostró que las actividades de la quercetina como secuestradora de ROS o como quelante de  $Fe^{2+}$  no serían claves para la protección celular y que la quercetina no se coordina con el  $Ca^{2+}$  intracelular para ejercer su rol protector. Finalmente, se observó que el factor de transcripción CREB podría estar involucrado en la protección celular, abriendo así nuevas posibilidades de investigación.

La evidencia acumulada respecto a los flavonoides sugiere que éstos constituyen un pool natural de moléculas que afectan las vías de señalización celular involucradas en la supervivencia, la diferenciación y la muerte celular. Muchos de sus efectos son altamente específicos y dicha especificidad es la que daría sentido a que las plantas sinteticen un pool tan amplio de compuestos (unos 4000). Cuanto más aprendamos acerca de sus efectos, más probable será que puedan ser utilizados preventivamente o como agentes terapéuticos.

Sin duda, el problema de la localización subcelular de estos compuestos es el de más urgente resolución a los efectos de comprender sus mecanismos de acción.

# INDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
I.1. PATOLOGÍAS NEURODEGENERATIVAS Y CEREBROVASCULARES: PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA MUERTE CELULAR. ....	11
I.2. LOS RADICALES LIBRES Y LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO Y DEL NITRÓGENO .....	13
<i>I.2.1. Definición de radicales libres, restricción de spin, papel de los metales de transición</i>	<i>13</i>
<i>I.2.2. Generación, difusión, reactividad y efectos de algunas especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno .....</i>	<i>14</i>
I.3. PROCESOS VINCULADOS AL EO.....	16
<i>I.3.1. La muerte celular .....</i>	<i>16</i>
<i>I.3.2. La alteración de señales intracelulares y sus efectos .....</i>	<i>18</i>
I.3.2.1. Alteración de los niveles de Ca <sup>2+</sup> .....	19
I.3.2.2. La transición de permeabilidad mitocondrial .....	21
I.3.2.3. Las MAP kinasas.....	21
I.3.2.3.1. ERK.....	22
I.3.2.4. Regulación de la transcripción por ROS .....	23
I.3.2.5. Modificación de la activación y la actividad de caspasas .....	25
I.4. DEFENSAS FRENTE AL EO .....	27
<i>I.4.1. Los antioxidantes.....</i>	<i>28</i>
<i>I.4.2. Los flavonoides.....</i>	<i>29</i>
I.4.2.1. Generalidades .....	29
I.4.2.2. La quercetina .....	31
I.4.2.2.1. Algunas señales intracelulares involucradas en la protección de la quercetina frente al H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en cultivos celulares.....	36
I.5. LA QUERCETINA COMO SUSTANCIA PROTECTORA FRENTE AL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> EN CÉLULAS PC12.....	38
I.5.1. Las células PC12.....	38
I.5.2. El modelo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	38
I.5.3. Efectos del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en células PC12.....	40
I.5.4. Antecedentes particulares e hipótesis.....	40

<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>43</b>
<b>III. DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>44</b>
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS. ....</b>	<b>47</b>
IV.1. ORIGEN DE LAS CÉLULAS PC12.....	47
IV.2. CULTIVO CELULAR .....	47
IV.3. TRATAMIENTOS CON H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	47
IV.4. ESTUDIOS DE PROTECCIÓN FRENTE AL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	47
IV.5. ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD .....	48
IV.6. ESTUDIOS DE BLOQUEO DE LA PROTECCIÓN PRODUCIDA POR LA QUERCETINA_ .....	48
IV.7. ENSAYO DE REDUCCIÓN DEL MTT .....	48
IV.8. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA LACTATO DESHIDROGENASA (LDH) LIBRE .....	49
IV.9. ENSAYO COMETA .....	49
IV.10. ESPECTROMETRÍA DE EMISIÓN. ....	51
IV.11. ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN. ....	51
IV.12. WESTERN BLOTS .....	51
IV.13. ACTIVIDAD DE CASPASAS .....	53
IV.14. CÁLCULOS DE ENERGÍA MOLECULAR, OPTIMIZACIÓN DE ESTRUCTURAS Y CÁLCULOS DE CARGAS LOCALES. ....	54
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>55</b>
V.I. CARACTERÍSTICAS DE LA TOXICIDAD POR H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	55
V.I.1. <i>Características generales de la toxicidad por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las células PC12 "I"</i> .....	55
V.I.2. <i>Características generales de la toxicidad por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las PC12 "U"</i> .....	59
V.I.3. <i>Experimentos farmacológicos y medidas de actividad enzimática indicarían que el papel de las caspasas-3,-6 y-9 sería diferente en las PC12 "I" y en las "U"</i> .....	60
V.I.4. <i>Exploración en ambas cepas de la participación de mecanismos autofágicos de muerte celular</i> .....	63
V.I.5. <i>Caracterización de la muerte celular en las células PC12 de ambos clones</i> .....	64
V.II: CITOTOXICIDAD DE LA QUERCETINA .....	65
V.III: CARACTERIZACIÓN DE LA PROTECCIÓN POR QUERCETINA. ....	66



<i>V.III.1. El pretratamiento con quercetina aumentó la viabilidad de las células PC12 expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> .....</i>	66
<i>V.III.2. El pretratamiento con quercetina disminuyó el daño al ADN de manera dosis-dependiente .....</i>	68
V.IV: ESTUDIO DE ALGUNOS MECANISMOS DE TOXICIDAD DEL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Y DE PROTECCIÓN POR LA QUERCETINA.....	70
<i>1ª PARTE: Relaciones estructura-actividad.....</i>	70
V.IV.1. Relaciones de estructura-actividad en nuestro modelo .....	70
V.IV.2. En las PC12 "U", protegieron los mismos flavonoides que en las PC12 "I" .....	73
V.IV.3. Propiedades estructurales de la quercetina y comparación con otros flavonoides .	74
<i>2ª PARTE: Exploración de posibles mecanismos de protección por quercetina .....</i>	79
V.IV.4. Reacción directa de la quercetina con el H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	79
V.IV.5. Capacidad secuestradora de radicales libres en general y de ROS en particular ...	80
V.IV.6. Coordinación con cationes bivalentes .....	81
V.IV.6.1. <i>Quelación de Fe<sup>2+</sup></i> .....	81
V.IV.6.2. <i>El espectro de absorción de la quercetina no cambió en presencia de Ca<sup>2+</sup></i> .	83
V.IV.6.3. Efectos del EGTA. ....	84
V.IV.7. Exploración de la activación en PC12 IIBCE de vías vinculadas al EO.....	85
V.IV.7.1 El H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> indujo la fosforilación del complejo quinasa ERK y la quercetina no la evitó	85
V.IV.7.2.El H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> indujo disminución de la fosforilación de CREB. Este efecto fue retrasado por la quercetina .....	87
V.IV.7.3. Ocurrió fosforilación de IKB, independientemente del tratamiento aplicado .	89
V.IV.8. Exploración de mecanismos estrogénicos .....	90
V.IV.9. Mecanismos de protección por la quercetina .....	92
V.V. CONSIDERACIONES FINALES .....	94
<b>VI. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>98</b>
VI.1. <i>RELACIÓN ENTRE LA MUERTE CELULAR Y EL DAÑO AL ADN.</i> .....	98
VI.2.PARTICIPACIÓN DE LA AUTOFAGIA EN LA MUERTE CELULAR EN LAS PC12 "U" .....	98
VI.3. <i>PAPEL DE CREB EN LA MUERTE CELULAR Y EN LA PROTECCIÓN POR QUERCETINA EN CÉLULAS PC12 "I".</i> .....	99

*VI.4. PAPEL DE LA ALTERACIÓN DE LA DINÁMICA DEL  $Ca^{2+}$  POR LA QUERCETINA EN LA PROTECCIÓN CELULAR.* ..... 99

*VI.5. LOCALIZACIÓN DE LA QUERCETINA*..... 100

*VI.6. QUERCETINA: CROSS-LINKING AGENT?* ..... 100

*VI.7. POR QUÉ CONTINUAR ESTUDIANDO LOS EFECTOS DE LOS FLAVONOIDES.*..... 101

**VII. BIBLIOGRAFÍA** ..... **102**

# I. Introducción

## I.1. Patologías neurodegenerativas y cerebrovasculares: papel del estrés oxidativo en la muerte celular.

Conforme aumenta la edad promedio de muchas poblaciones humanas, aumenta la prevalencia de ciertas patologías degenerativas y vasculares del sistema nervioso vinculadas al envejecimiento, tales como la enfermedad de Parkinson que se caracteriza por afectar predominantemente el tracto nigro-estriatal, la enfermedad de Alzheimer en la cual la degeneración afecta principalmente áreas corticales asociativas y límbicas (Kandel y cols., 2000), y los accidentes cerebrovasculares, para las cuales aún no existen tratamientos satisfactorios. Estudios realizados en el año 1992 en los Estados Unidos, mostraron que 1 a 5 habitantes de cada 1000 presentaban enfermedad de Parkinson, 1 a 6 de cada 100 habitantes mayores de 65 años presentaban enfermedad de Alzheimer (Farreras y Rozman, 1997) y la prevalencia de accidentes cerebrovasculares era de 5 casos cada 1000 habitantes.

En la base de las patologías citadas se encuentra el fenómeno de muerte prematura de un elevado porcentaje de neuronas en las regiones cerebrales afectadas. La comprensión de los mecanismos que provocan dicha muerte es crítica para explorar posibles intervenciones terapéuticas. La muerte neuronal puede ocurrir por una variedad de causas, tales como la falta de factores tróficos, la alteración en el metabolismo energético, la citotoxicidad (ej: por  $\beta$ -amiloide ) y/o la excitotoxicidad. El estrés oxidativo (EO), que implica un aumento en la concentración de radicales libres particularmente dentro de la célula y se genera como consecuencia de un desequilibrio entre la producción y el consumo de radicales libres, no sólo puede desencadenar muerte neuronal por sí mismo sino que aparece siempre asociado a la muerte producida por las demás causas (Halliwell y Gutteridge, 1999; Miranda y cols., 2000). Por este motivo, el papel del EO en la génesis de las patologías neurodegenerativas y cerebrovasculares es motivo de intensa investigación. Por otra parte, se han producido avances en la caracterización de sustancias con capacidad antioxidante en el marco de la hipótesis de que éstas serían potencialmente neuroprotectoras. Si bien el empleo de modelos *in vivo* y *ex vivo* ha aportado valiosa información en este campo, el empleo de modelos *in vitro* en los cuales las variables están más controladas,

facilita tanto el screening de sustancias como el estudio de sus mecanismos de acción. La línea celular PC12 comparte con algunas neuronas características fenotípicas -ya que sintetiza, libera, y posee receptores para algunos neurotransmisores-, y su origen embrionario -ya que proviene células de la médula suprarrenal del ratón que comparten sus progenitoras con las neuronas simpáticas-. Por lo tanto, aparece como un modelo relativamente simple, poco costoso, que provee material de trabajo abundante y homogéneo (ventajoso, en este sentido, frente a un cultivo primario) lo que la hace muy útil para caracterizar los mecanismos que subyacen a la muerte celular por EO y la acción protectora de ciertos compuestos antioxidantes. Por otra parte, si bien es posible generar estrés oxidativo mediante numerosas manipulaciones tales como el bloqueo de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasas, catalasas, peroxidasas), el aumento de actividad de enzimas prooxidantes (sintetasa de óxido nítrico), el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, o la administración de dadores de radicales libres, -como se comprenderá al leer la próxima sección-, la administración de  $H_2O_2$  es un método sencillo que ha sido ampliamente utilizado con este fin.

En el marco descrito, en el presente trabajo de tesis se ha avanzado en el estudio de los mecanismos de muerte por  $H_2O_2$  y de protección por un antioxidante en particular, el flavonoide quercetina, en el modelo de células PC12.

## I.2. Los radicales libres y las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno

### I.2.1. Definición de radicales libres, restricción de spin, papel de los metales de transición

Los radicales libres son especies químicas capaces de existir independientemente y que contienen uno o más electrones desapareados (Halliwell, 1992). En la tabla 1 se muestran algunos ejemplos.

TIPO DE RADICAL	EJEMPLO	FORMULA
centrado en el hidrógeno	átomo de hidrógeno	H <sup>·</sup>
centrado en el carbono	triclorometilo	CCl <sub>3</sub> <sup>·</sup>
centrado en el azufre	tioglutación	GS <sup>·</sup>
centrado en el oxígeno	superóxido hidroxilo lipoperoxilo	O <sub>2</sub> <sup>·-</sup> ·OH lípido-O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>
delocalizado	óxido nítrico	NO <sup>·</sup>

*Tabla 1 ·  
Algunos tipos de  
radicales libres·*

La mayoría de los radicales libres son muy reactivos. La molécula de oxígeno diatómico (O<sub>2</sub>) posee dos electrones desapareados con el mismo spin; por lo tanto es un radical libre, pero su reactividad está limitada por la restricción de spin: sólo podría oxidar una molécula directamente, aceptando un par de electrones de ésta, si la molécula dadora tuviera dos electrones desapareados con spines paralelos y opuestos al del O<sub>2</sub>. Es por este motivo que el O<sub>2</sub> reacciona con radicales que tengan un electrón desapareado, como los citados en la tabla 1, o con metales de transición (Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>). Los metales de transición juegan un papel clave al convertir especies poco reactivas en otras más reactivas (Halliwell, 1992). En la tabla 2 se muestran algunos ejemplos.

reactivo	producto en presencia de Fe o Cu (*)
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	·OH
lípido-OOH	lípido-O <sub>2</sub> <sup>·-</sup> , lípido-O <sup>·</sup> , aldehídos citotóxicos
RSH	O <sub>2</sub> <sup>·-</sup> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , RS <sup>·</sup> , ·OH
ácido ascórbico	Radical semihidroascorbato, ·OH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
catecolaminas y otras moléculas "autooxidables"	O <sub>2</sub> <sup>·-</sup> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , ·OH, semiquinonas

*Tabla 2· A la  
izquierda los  
reactivos y a la  
derecha, los*

## I.2.2. Generación, difusión, reactividad y efectos de algunas especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  no es un radical libre, dado que no tiene electrones desapareados, pero se incluye dentro del grupo de “especies reactivas del oxígeno” (ROS). Por otra parte, se agrupan los radicales que contienen nitrógeno bajo la denominación de especies reactivas del nitrógeno (RNS). La figura 1 muestra algunas de las vías de generación, interconversión y eliminación de ROS y RNS.

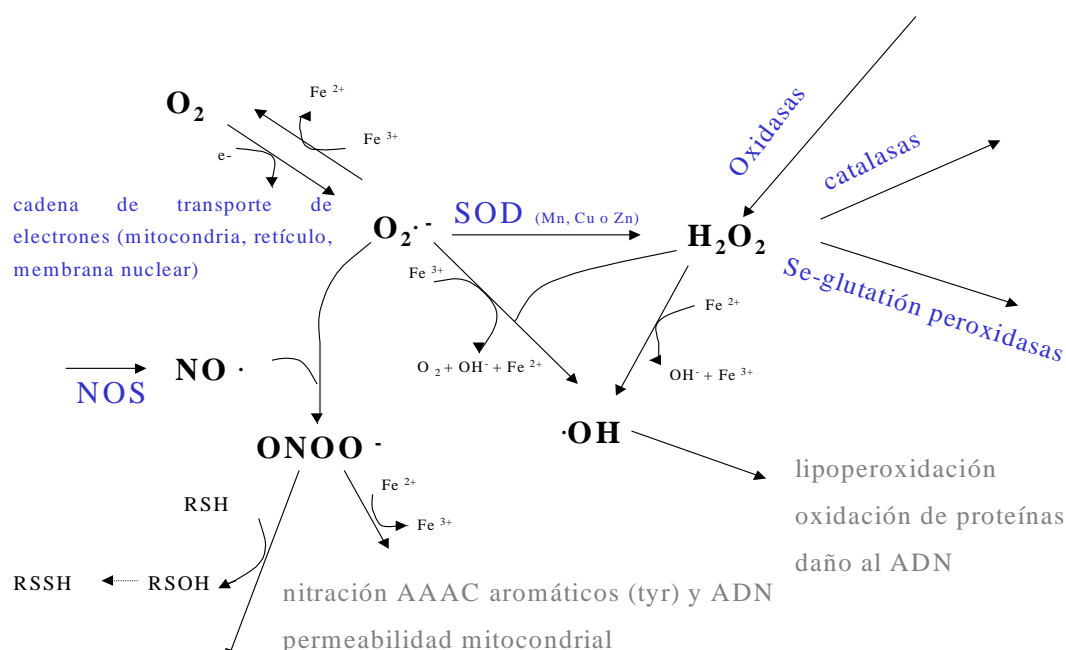


Fig 1. Generación, reacciones químicas, efectos y remoción enzimática de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. Obsérvese particularmente que para afectar componentes celulares por oxidación se requiere casi siempre la presencia de un metal de transición ( $\text{Fe}^{2+}$ ) libre y que los

El funcionamiento de las cadenas de transporte de electrones (en particular, la cadena respiratoria) origina normalmente radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), el cual no tiene blancos celulares conocidos y puede ser sustrato de la superóxido dismutasa (SOD) dando  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o combinarse con el óxido nítrico ( $\text{NO}^{\cdot}$ ) sintetizado por la NOS dando peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ )

El  $\text{ONOO}^-$  a su vez promueve la formación de enlaces disulfuro y en presencia de  $\text{Fe}^{2+}$  afecta a los lípidos, las proteínas y el ADN y promueve el aumento de la permeabilidad

mitocondrial. En particular provoca la nitración de tirosinas, que podría bloquear su fosforilación, alterando así las vías de señalización intracelular (Halliwell y Gutteridge, 1999).

En presencia de  $\text{Fe}^{2+}$  también se originan radicales hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ), de existencia muy breve porque reaccionan inmediatamente con lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN.

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  se genera como producto secundario de varias actividades enzimáticas; entre ellas, la monoaminooxidasa (MAO) y la SOD. Difunde libremente en medios acuosos y lipídicos (Halliwell y Gutteridge, 1999). Como se observa en la fig 1 no es muy reactivo *per se*, pero en presencia de  $\text{Fe}^{2+}$  libre origina radicales  $\text{OH}^\cdot$ . Adicionalmente se ha descrito que existe inhibición por producto de las SOD (Hearn y cols., 1999; Salo y cols., 1988) y activación de NOS por  $\text{O}_2^\cdot$  (McPherson y cols., 2002), por lo cual un exceso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  podría favorecer la formación de  $\text{ONOO}^\cdot$ .

De las cinco especies reactivas mencionadas, el  $\text{OH}^\cdot$  y el  $\text{ONOO}^\cdot$  son las más reactivas y se consideran nocivas particularmente en presencia de metales de transición. Por su parte el  $\text{NO}^\cdot$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  son menos reactivas, tienen grandes radios de difusión y se ha propuesto que tendrían roles fisiológicos. El  $\text{NO}^\cdot$ , inicialmente identificado como un agente responsable de la dilatación vascular, participa en el control de la presión arterial, en la inhibición de la agregación plaquetaria y en la muerte de microorganismos foráneos/patógenos. En el sistema nervioso, es modulador de la respuesta a aminoácidos excitatorios y se ha propuesto que también actúa como neurotransmisor y como regulador de la plasticidad. Por su parte, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  participaría en la defensa frente a bacterias patógenas llevada a cabo por los glóbulos blancos y en la señalización inter e intra-celular (Atkins y Sweat, 1999; Jin y cols., 2000; Jones y Morice, 2000; Miller y Brittigan, 1997; Samanta y cols., 1998). Además de estos roles fisiológicos, estas sustancias podrían ejercer acciones negativas dependiendo de su concentración. En este sentido, Davies y cols. (Davies, 1999) han mostrado en fibroblastos de mamíferos que las dosis muy bajas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  causan una respuesta mitogénica, las dosis medias causan una detención temporal e incluso total del crecimiento, y las dosis altas o muy altas provocan la muerte celular.

En resumen, las ROS y las RNS fueron inicialmente consideradas especies exclusivamente nocivas para las células, pero ahora se reconoce que la regulación redox que las involucra es clave para la modulación de ciertas funciones celulares críticas. Sin importar cómo o cuándo sean generados, un incremento de los oxidantes intracelulares puede resultar tanto en

daño a varios componentes celulares como en la modulación de vías de señalización específicas, conduciendo así al funcionamiento celular apropiado o a la muerte celular (Scandalios, 2002).

### **I.3. Procesos vinculados al EO**

Generalmente el EO severo resulta en muerte celular. El EO moderado altera vías de señalización intracelular, conduciendo a la adaptación -que puede incluso protegerlas de un EO más severo- o al daño celular, que en algún punto puede ser irreversible de modo que las señales conduzcan también a la muerte celular (Halliwell y Gutteridge, 1999).

#### **I.3.1. La muerte celular**

La muerte celular (fig. 2) se clasifica en necrótica y programada.

La necrosis típica, que es muerte celular patológica provocada por insultos externos a las células, involucra desagregación de la cromatina en masas indefinidas, dilatación de los organelos, emergencia de bloques densos en la matriz mitocondrial, lisis de la membrana plasmática y liberación del contenido celular (Kerr y Harmon, 1991).

La muerte celular programada (MCP) puede ocurrir de manera fisiológica, particularmente durante el desarrollo embrionario, y puede producirse por estímulos externos. A diferencia de la necrosis, la MCP involucra la participación activa del metabolismo celular y ocurre sin ruptura temprana de la membrana plasmática. Se distinguen dos tipos de MCP.

La apoptosis o MCP tipo I se caracteriza desde el punto de vista morfológico por la desintegración del citoesqueleto, la compactación y fragmentación de la cromatina, la condensación citoplásmica, la fragmentación nuclear y el fenómeno de aparición de dilataciones globulares ("*blebbing*"), conduciendo a la formación de cuerpos apoptóticos los cuales son fagocitados y digeridos por células adyacentes (Kerr y Harmon, 1991). Desde el punto de vista bioquímico, se caracteriza en la mayoría de los casos por la presencia de rupturas de doble cadena internucleosómicas y por la activación de caspasas (proteasas aspartato-específicas, cisteína-dependientes) (Mc Conkey y cols., 1988; Torriglia y cols., 2000). En la apoptosis dependiente de caspasas, éstas cumplen un rol crítico y característico (Kang y cols., 1999), como se detallará más adelante, por lo cual existe acuerdo de que la muerte celular dependiente de caspasas se clasifica como apoptótica (Bredesen, 2000; Budihardjo y cols., 1999; Cohen, 1997; Mc Conkey y cols.,



1988; Torriglia y cols., 2000; Zimmermann y Green, 2001). Sin embargo, la independencia de la activación de caspasas no permite descartar la ocurrencia de un proceso apoptótico porque se ha descrito muerte celular apoptótica independiente de caspasas (Toriglia y cols., 2000).

La autofagocitosis es un proceso normal que permite eliminar componentes celulares, particularmente organelos, para renovarlos. La autofagia (MCP tipo II) consiste en la aceleración de la autofagocitosis, de modo que los componentes celulares son degradados a una velocidad que es mayor a la velocidad de síntesis de nuevos componentes. Porciones de citoplasma son secuestradas por una vacuola con doble membrana (el autofagosoma), que se fusiona con lisosomas, endosomas o el aparato de Golgi para transformarse en un autolisosoma (Dunn, 1994). Durante este proceso, el citoesqueleto es conservado (Bursch y cols., 2000). Farmacológicamente, la 3-metiladenina (3-MA), que previene la formación de los autofagosomas bloqueando la muerte (Punnonen y Reunanen, 1990; Telbisz y Kovacs, 2000), es generalmente utilizada como una herramienta para definir si la autofagia está involucrada en el proceso de muerte celular (Caro y cols., 1988; Sandvig y van Deurs, 1992; Uchiyama, 2001).


<u>Muerte celular (MTT)</u>	
<p><b>Necrótica</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-provocada por injurias de elevada intensidad</li> <li>-lisis de la membrana plasmática con liberación del contenido citoplásmico (LDH+).</li> </ul>  <ul style="list-style-type: none"> <li>-desagregación de la cromatina</li> <li>-dilatación de los organelos</li> <li>-aparición de bloques densos en la matriz mitocondrial</li> </ul>	<p><b>Programada</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-ocurre en situaciones fisiológicas; puede ser inducida por estímulos externos</li> <li>-sin liberación del contenido citosólico (LDH-)</li> </ul> <p><b>Apoptótica</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-condensación citoplásmica</li> <li>-fragmentación nuclear</li> <li>-activación de <b>caspasas</b> (no necesario pero sí suficiente), cuya inhibición (DEVD, VEID, LEHD) bloquea la muerte</li> <li>-compactación y fragmentación de la cromatina; degradación del ADN por determinados sitios</li> <li>-desensamblaje del citoesqueleto</li> <li>-formación de cuerpos apoptóticos que son fagocitados por células adyacentes</li> </ul>
	<p><b>Autofágica</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-presencia de autofagosomas y autolisosomas; se digieren partes de citoplasma y organelos</li> <li>-Inhibidor: <b>3-MA</b>. Previene formación de autofagosomas sin afectar los niveles de ATP</li> </ul>

Figura 2: Tipos de muerte celular y marcadores que se utilizaron para caracterizar la muerte por  $H_2O_2$ . Debe tenerse en cuenta que también existen muertes con características mixtas. En rojo se indican los marcadores que se utilizaron en este trabajo. MTT: a partir de esta sal de tetrazolio se produce formazan en las células que están vivas que puede medirse

No siempre la muerte celular observada en determinado modelo se ajusta perfectamente a esta clasificación. Por ejemplo la presencia o ausencia de fragmentación internucleosómica no es suficiente para definir el tipo de muerte celular, dado que puede ocurrir muerte de tipo apoptótica en ausencia de fragmentación internucleosómica, o muerte necrótica en presencia de la misma, debida al ataque de radicales libres a las regiones más expuestas del ADN (Halliwell y Gutteridge, 1999; Martin y cols., 1998). Asimismo, algunos autores han descrito superposición entre ambos tipos de muerte programada: en neuronas simpáticas (Xue y cols., 1999) se ha probado que la apoptosis y la autofagia pueden ser procesos que ocurren en una misma célula y comparten vías de señalización.

Se ha descrito que un mismo estímulo oxidativo puede desencadenar apoptosis o necrosis dependiendo de su intensidad y duración y del tipo celular (Halliwell y Gutteridge, 1999). Por ejemplo, en fibroblastos de mamíferos, el  $H_2O_2$  induce apoptosis o provoca necrosis si es agregado a alta o a muy alta concentración respectivamente (Davies, 1999) y las células PC12 son mucho más sensibles al  $H_2O_2$  que las Neuro2a (Calderón y cols., 1999). Las relaciones entre el EO y la muerte celular autofágica no han sido estudiadas aún.

### **I.3.2. La alteración de señales intracelulares y sus efectos**

Como se mencionara anteriormente, un incremento de los oxidantes intracelulares puede resultar en daño a varios componentes celulares y en modulación de vías de señalización específicas, influyendo en los procesos celulares y conduciendo al funcionamiento celular apropiado o a la muerte celular (Scandalios, 2002). En particular, el EO puede afectar las concentraciones citoplásmicas de  $Ca^{2+}$ , las cuales alteran actividades enzimáticas y promueven la apertura de los poros mitocondriales, fenómeno que a su vez desencadena la activación de señales pro-apoptóticas. Asimismo, puede afectar la actividad de algunas kinasas -entre ellas, las MAPK- y la actividad de algunos factores reguladores de la transcripción.

A continuación se describen algunos de esos procesos.

### I.3.2.1. Alteración de los niveles de $\text{Ca}^{2+}$

La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico es de orden nanomolar (100 nM) y unas 10.000 veces menor que la extracelular. El mantenimiento de este gradiente requiere una inversión energética considerable y se interpreta que su objetivo es lograr que pequeñas variaciones locales en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  sean percibidas como una señal (Carafoli, 1997). Los aumentos de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  ocurren generalmente por apertura de canales; un caso particular es la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  asociados a receptores NMDA, en presencia de glutamato y depolarización de la membrana celular (Albert y cols., 1992). Por ello, un exceso de glutamato provoca excitotoxicidad (Kandel y cols., 2000) en células que responden a dicho neurotransmisor. Los mecanismos de regulación de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  involucran (fig 3) (Carafoli, 1997) proteínas de membrana (intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , uniporters y ATPasas), y proteínas solubles (familia de la calmodulina, y las anexinas) que son capaces de quelarlo, constituyendo reservorios de concentraciones de orden  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ . En el caso de que ocurra un aumento desmesurado de  $\text{Ca}^{2+}$ , la última barrera al aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  es su precipitación por reacción con fosfatos en la matriz mitocondrial.

La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  está cuidadosamente controlada no sólo en el citoplasma sino también en el nucleoplasma. El espacio perinuclear presenta ATPasas idénticas a la del retículo endoplásmico y canales de calcio modulados por inositol trifosfato (IP3) y ADP ribosa cíclica (cADPr). En el núcleo ocurren reacciones que son moduladas por  $\text{Ca}^{2+}$ ; por ejemplo, la transcripción de algunos genes y posiblemente también pasos esenciales en el proceso de muerte programada (Carafoli, 1997).

El EO altera la permeabilidad de las membranas al  $\text{Ca}^{2+}$  debido a la oxidación de tioles de las bombas y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y a la lipoperoxidación (fig. 3). Como consecuencia ocurre aumento de la concentración basal y modificaciones de la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  (Wang y Joseph, 1999).

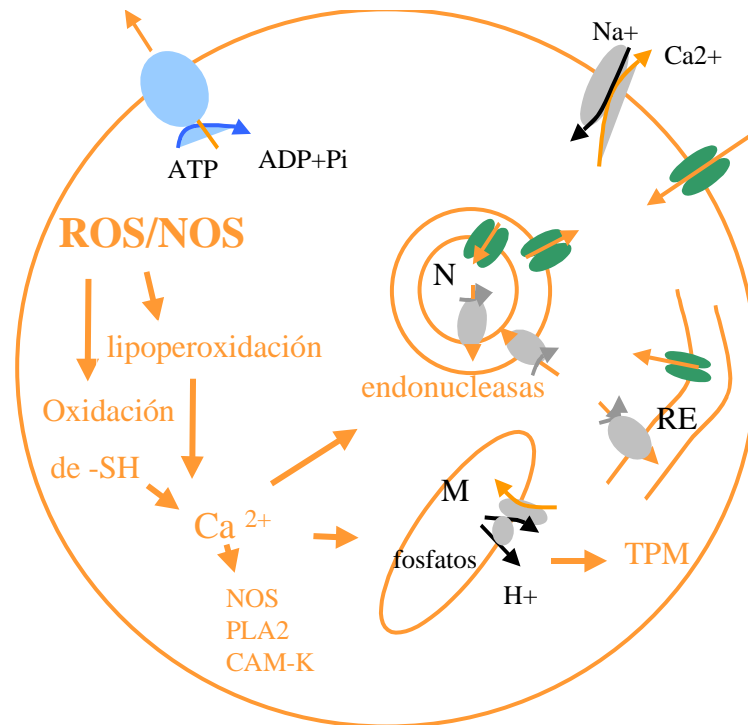


Fig. 3 Los ROS y NOS, al promover la lipoperoxidación y/o la oxidación de tioles (-SH) afectan en particular las permeabilidades al  $\text{Ca}^{2+}$ . Se representan estos efectos, que pueden afectar la membrana plasmática, el retículo endoplásmico (RE), el núcleo (N) y las mitocondrias (M). El

El  $\text{Ca}^{2+}$  a su vez regula la actividad de numerosas enzimas, entre ellas la proteína-kinasa A (PKA), la  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina kinasa, la NOS, la fosfolipasa A2 y endonucleasas que fragmentan el ADN nuclear durante la apoptosis. Por otra parte, es uno de los promotores de la apertura de los poros mitocondriales, proceso que también es denominado transición de permeabilidad mitocondrial (TPM). Así, grandes aumentos de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden efectivamente destruir la función mitocondrial y promover tanto la muerte celular de tipo programada como la necrótica. Una consecuencia común del  $\text{Ca}^{2+}$  excesivo ( $>5\mu\text{M}$ ) es que ocurra "blebbing" por disrupción del citoesqueleto (Halliwell y Gutteridge, 1999).

### **1.3.2.2. La transición de permeabilidad mitocondrial**

La transición de permeabilidad mitocondrial se desencadena por la apertura de los MPTP (mitochondrial permeability transition pore), poros de la membrana interna mitocondrial permeables a cualquier molécula de menos de 1,5 kD. En dicha apertura participarían diferentes agentes promotores, tales como altos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ , peróxidos orgánicos y agentes que oxiden grupos  $-\text{SH}$ , ya que la unión oxidativa de 2 cisteínas juega un rol clave (Halestrap y cols., 2002). Por otra parte, existen reguladores positivos y negativos de esta apertura, tales como los miembros de la familia Bcl-2. Se ha descrito interacción directa entre Bcl-2 propiamente dicho, que es un regulador negativo de esta apertura, y proteínas de los poros mitocondriales (Loeffler y Kroemer, 2000; Tsujimoto y Shimizu, 2002).

A consecuencia de la TPM los solutos, incluyendo el  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, escapan desde la matriz a través de los poros, ocurre un desbalance osmótico y la mitocondria sufre un proceso de hinchamiento (Halliwell y Gutteridge, 1999). Asimismo, se liberan proteínas incluyendo caspasas, activadores de caspasas (cyt c, hsp 10), así como el efector de muerte celular independiente de caspasas, AIF (Loeffler y Kroemer, 2000). Por lo tanto, los reguladores negativos de esta apertura, como Bcl-2, son considerados protectores celulares.

### **1.3.2.3. Las MAP kinasas**

Las MAPK (mitogen-activated protein kinases) fueron inicialmente identificadas como serina/treonina kinasas estimuladas por insulina, que fosforilaban la proteína MAP2 (microtubule-associated protein) y la proteína básica de la mielina. Constituyen una familia conservada en eucariotas e involucrada en la regulación de la proliferación celular, la diferenciación, el movimiento y la muerte celular que incluye ERK (extracellular-regulated kinase), p38 MAPK y JNK (kinasa de c-jun). Cada una de ellas (fig. 4) es activada por una vía que involucra una kinasa de la MAPK (MAPK-K) y una kinasa de la MAPK-K (MAPKK-K) que a su vez es activada por interacción con GTPasas o con otras kinasas (Fukunaga y Eishichi, 1998; Garrington y Johnson, 1999).

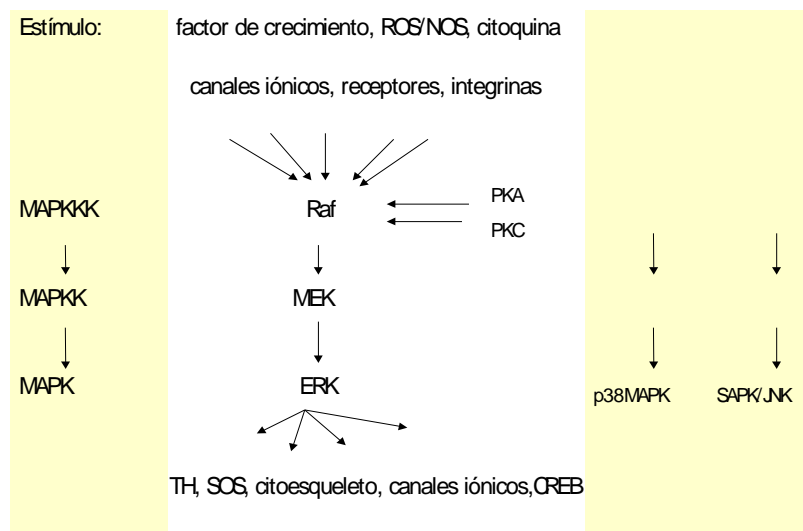


Fig. 4 A la izquierda se representa un esquema general de la activación de una MAPK. Existen 3 MAPK, que son ERK, p38MAPK y JNK. Cada una posee su MAPKK y su MAPKKK. En el centro se representa la vía de ERK, destacándose que numerosos estímulos

### I.3.2.3.1.ERK

En particular la cascada de ERK (fig. 4) puede ser activada por canales iónicos, receptores con actividad tyr-kinasa o integrinas. En cultivos de hipocampo, se activa por estimulación de receptores glutamatérgicos y por factores tróficos (BDNF, GF) (Fukunaga y Eishichi, 1998). ERK es vista generalmente como una kinasa anti-apoptótica. Sin embargo, participa en la inducción de apoptosis por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ishikawa y Kitamura, 2000). Se ha propuesto la hipótesis de que la cascada de la MAPK (ERK) en la cual convergen señales provenientes de diversos receptores ionotrópicos y metabotrópicos es un integrador, un detector de efectos sinérgicos (Sweatt, 2001).

La kinasa de ERK se llama MEK y la MAPKK-K se llama c-Raf (Garrington y Johnson, 1999). En la regulación de la actividad de c-Raf participan la proteína-kinasa Ca<sup>2+</sup>-dependiente y la kinasa dependiente del AMPc (Lewis, 1998).

ERK es abundantemente expresado por neuronas del SNC, y se ha detectado activación de ERK durante condiciones patológicas como isquemia y epilepsia (Fukunaga y Eishichi, 1998). Uno de los efectos que puede tener la activación de ERK es la activación indirecta del factor de transcripción CREB (cyclic AMP response element binding protein).



AP-1 (fig. 5), que puede ser un homodímero de c-Jun o un heterodímero c-Jun/c-Fos, se une a un elemento de respuesta en cis llamado TRE (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-response element) e inicia la transcripción de genes blanco (Ishikawa y Kitamura, 2000).

CREB (fig. 5) se activa por fosforilación en la Ser 133 y se une al elemento de respuesta al cAMP (CRE).

Tanto la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por canales voltaje-dependientes, como señales extracelulares (neurotransmisores, hormonas, factores de crecimiento, factores neurotróficos) activan alguna de las quinasas que fosforila CREB. Dichas quinasas incluyen p90RSK que es activada por ERK, o por otras vías, entre ellas p38MAPK, kinasa dependiente de calmodulina (CAMK-II) y PKA. Por lo tanto, la inhibición de cualquiera de dichas quinasas podría disminuir la actividad de CREB.

La secuencia de CRE es muy similar a la de TRE y se ha propuesto (Sassone y cols., 1990) que existiría modulación cruzada entre CREB y AP-1. Se ha estudiado que el EO puede inhibir la fosforilación de CREB debida al tratamiento con factores tróficos (Zhang y Jope, 1999) y que disminuye la unión de CREB y de AP-1 al ADN en neuronas en tanto que la aumenta en glías de rata (Iwata y cols., 1997). Por otra parte, CREB puede aumentar la transcripción de c-fos (Fukunaga y Eishichi, 1998; Sweatt, 2001). Dado que se ha encontrado activación de AP-1 e inhibición de CREB por EO y que los promotores TRE y CRE son muy similares, otra posibilidad sería que lo importante sea la relación AP-1: CREB activos.

Uno de los efectos que puede promover pCREB es inducir la transcripción temprana de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Freeland y cols., 2001), que impide la ocurrencia de la transición de permeabilidad mitocondrial.

NF- $\kappa$ B (fig. 5) cuando está unido a I $\kappa$ B (inhibidor de  $\kappa$ B) tiene enmascarada su región de localización nuclear por lo cual permanece retenido en el citoplasma celular. La fosforilación de I $\kappa$ B por la I $\kappa$ B kinasa (IKK) y su consiguiente degradación habilita la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo donde actúa como factor de transcripción en el promotor  $\kappa$ B. Se ha demostrado que varias quinasas, entre ellas MEK y la kinasa inductora de NF- $\kappa$ B, pueden inducir la fosforilación de IKK, activándola (Howe y cols., 2002).

La activación de NF- $\kappa$ B se corresponde con la adaptación al estrés y la supervivencia celular en un modelo, y con la muerte celular en otro modelo (Nakai y cols., 1999).

NF- $\kappa$ B puede inducir la expresión de IAP, un inhibidor de las caspasas 3, 7 y 9 (Bonni, 1999; Datta, 1999).



### I.3.2.5. Modificación de la activación y la actividad de caspasas

Las caspasas son cisteín-proteasas aspartato-específicas que se sintetizan como procaspasas, se activan mediante clivaje y pueden ser desactivadas por un inhibidor natural ya presente en la célula (por ejemplo, el inhibidor de proteasas activadas IAP) o por el agregado de péptidos inhibidores artificiales. Su actividad proteolítica causa la activación de otras caspasas. Asimismo, activa proteínas mediadoras de la inflamación (Torriglia y cols., 2000), favorece la degradación de proteínas del citoesqueleto (ej: actina) que forma parte del fenómeno de "blebbing" y la inactivación de proteínas vinculadas a la reparación del ADN, al procesamiento del ARN y al mantenimiento de la estructura nuclear (Kang y cols., 1999). Finalmente, favorece la degradación internucleosómica del ADN (Torriglia y cols., 2000) debido a que provoca la degradación de proteínas (ICADs) que inhiben las DNAsas activadas por caspasas (CADs).

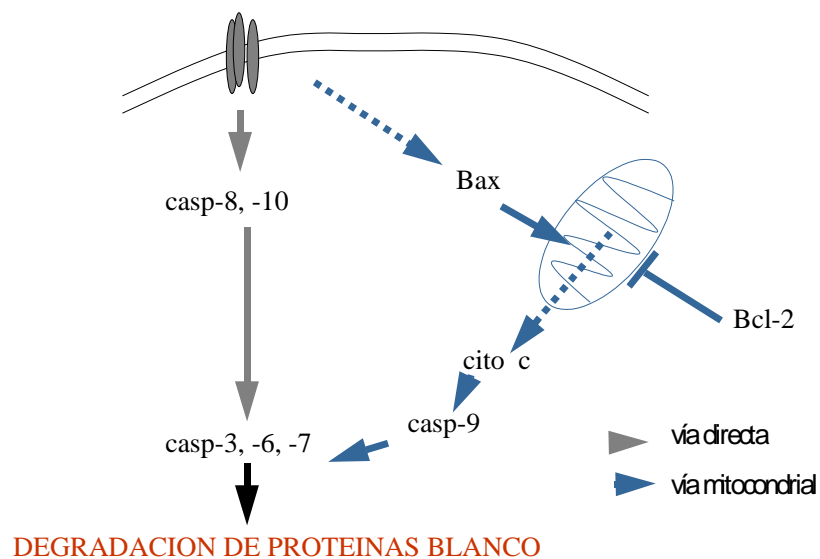


Fig 6. Las 2 principales vías apoptóticas caspasa-dependientes, la vía directa y la vía mitocondrial, convergen en las caspasas-3, -6 o -7, tradicionalmente clasificadas como ejecutoras que degradan las proteínas blanco alterando el citoesqueleto y el ADN.

Se distinguen esencialmente dos vías de activación de caspasas: la vía directa (en la cual no hay intervención de las mitocondrias) y la vía mitocondrial (fig. 6). Esta última, que puede ser bloqueada por factores como Bcl-2, implica que ocurra la transición de permeabilidad de la membrana mitocondrial (MPT), que conlleva la liberación de citocromo c y la consiguiente activación de la caspasa-9. Ambas vías convergen en la activación de las caspasas 3, 6 o 7 (Torriglia y cols., 2000).

Inicialmente se distinguían las caspasas propagadoras (que clivan otras caspasas) de las ejecutoras (que tienen otros blancos celulares). Sin embargo, se ha visto que una misma caspasa puede cumplir ambos roles. En particular, la caspasa-3, que fue clasificada inicialmente como ejecutora, puede tener un importante rol en la de la cascada de activación de caspasas (Slee y cols., 1999a). De hecho, se ha encontrado activación jerárquica de caspasas incluyendo una vía caspasa-9, caspasa-3 y finalmente caspasa-6 (Granville y cols., 2001; Slee y cols., 1999b).

Se ha descrito muerte por EO tanto dependiente (DiPietrantonio y cols., 1999; Yamakawa y cols., 2000) como independiente de la activación de caspasas (Jiang y cols., 2001; Kim y cols., 2000). Recientemente se ha descrito también inhibición de la activación (Lee y Shacter, 2000) o la actividad (Borutaite y Brown, 2001) de caspasas debida al EO.

#### I.4. Defensas frente al EO

Se ha visto que el EO en general y un aumento de ROS y NOS en particular pueden oxidar componentes celulares a la vez que desencadenar cascadas de efectos y de señales intracelulares. Así, la oxidación de lípidos altera la permeabilidad de las membranas y desencadena señales por segundos mensajeros como el inositol trifosfato y el diacilglicerol; la oxidación de proteínas altera los puentes disulfuro modificando su estructura y su funcionamiento ya sea como canal, como enzima, como señal de inflamación, como factor de transcripción; finalmente, la oxidación del ADN es uno de los motivos que puede conducir a su clivaje y a la muerte celular. Aún no se sabe si existen receptores para alguno de los ROS o NOS, en particular el  $\text{NO}^{\cdot}$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  que difunden grandes distancias; si existieran, podría ocurrir la alteración de las señales intracelulares por alosterismo, sin la oxidación de componente celular alguno. Por ahora se considera al menos desde el punto de vista teórico, que existirían dos maneras de combatir el EO: evitar la oxidación de blancos celulares, e interferir las vías de señalización desencadenadas (fig. 7). Los antioxidantes, como veremos a continuación, son sustancias que tendrían la capacidad de combatir el EO evitando la oxidación de blancos celulares.

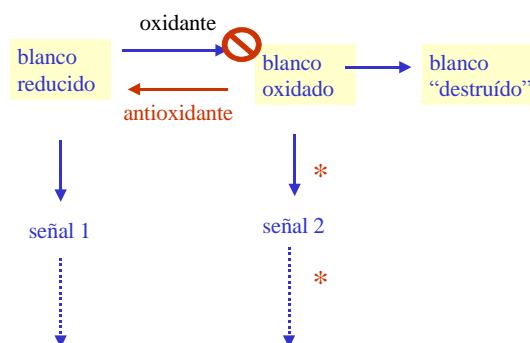


Fig 7. Un oxidante oxida blancos celulares (proteínas, lípidos, etc) que pueden simplemente degradarse o enviar una señal. Los antioxidantes bloquean ( ) o revierten ( ) la

### I.4.1. Los antioxidantes

Un antioxidante es cualquier sustancia que, presente a bajas concentraciones en comparación con el sustrato oxidable, previene o demora significativamente la oxidación de dicho sustrato. Cualquier tipo de molécula es un sustrato oxidable. La capacidad antioxidante de las sustancias depende de las moléculas blanco y de las condiciones en las que éstas se encuentren. Por ejemplo, el ascorbato protege a los lípidos pero no a las proteínas del daño oxidativo causado por el humo de cigarrillo.

Las defensas antioxidantes comprenden (Halliwell y Gutteridge, 1999) :

- enzimas que destruyen radicales libres y otras especies reactivas (superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa, antioxidantes tiol-específicos);
- proteínas que minimizan la disponibilidad de pro-oxidantes como iones de cobre y de hierro y el grupo hemo (transferrinas, etc.);
- proteínas que protegen a las biomoléculas del daño, incluyendo el daño oxidativo, por otros mecanismos (ej: proteínas *heat-shock*);
- agentes de bajo peso molecular, muchos de ellos provenientes de la dieta (glutación,  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico, fenoles en general, polifenoles y dentro de éstos en particular los compuestos flavonoides).

Los agentes de bajo peso molecular pueden presentar, entre otras, acción secuestradora o quelante. Los secuestradores de especies reactivas son moléculas a las que la especie reactiva (ej: oxígeno singulete) transfiere su energía de excitación. Un agente quelante es un compuesto que contiene por lo menos 2 átomos donantes que pueden combinarse mediante enlaces de coordinación con un ion metálico ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) para formar una estructura cíclica llamada complejo de quelación o quelato (Sax y Lewis, 1993).

Dentro de los antioxidantes naturales, los flavonoides constituyen un grupo particularmente interesante porque la mayor parte de las plantas los sintetizan en grandes cantidades y por su gran variabilidad en torno a una estructura básica común, dada por variaciones en los sustituyentes (son unos 4.000 compuestos).

## I.4.2. Los flavonoides

### I.4.2.1. Generalidades

Los flavonoides son polifenoles de estructura básica C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (fig 8).

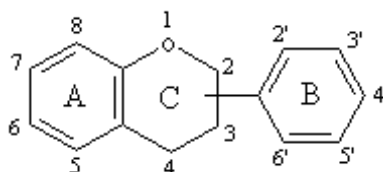


Fig 8. Estructura básica de un

La clasificación de los flavonoides se basa en los patrones de sustitución y el estado de oxidación del anillo heterocíclico (C) y la posición del anillo B. En la figura 9 se esquematizan los principales grupos:

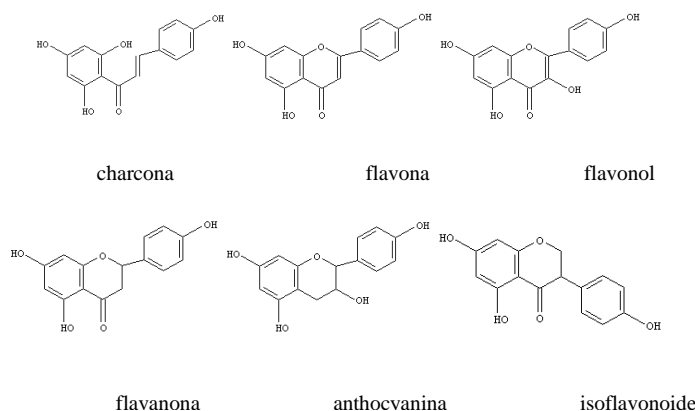


Fig. 9. Clasificación de los flavonoides. En las plantas todos son sintetizados a partir de las charconas. Posteriormente pueden sufrir modificaciones (alcosilación, metilación, etc.)

En la naturaleza, los flavonoides son sintetizados como productos del metabolismo secundario de las plantas y son responsables de propiedades de color, sabor y textura de frutas, verduras, té, café y vinos. La mayoría constituyen derivados conjugados con azúcares, ácidos orgánicos y otras moléculas, si bien algunos, como la catequina, están frecuentemente polimerizados (Williamson y cols., 1999). Son reguladores del crecimiento, la diferenciación y/o la muerte celular de algunas bacterias y hongos, de las propias plantas y de algunos animales

(Formica y Regelson, 1995; Harborne y Williams, 2000; Oberdörster y cols., 2001; Srivastava y cols., 1999).

En los mamíferos se les han adjudicado numerosos efectos tales como antioxidante y prooxidante, neuroprotector, antihipertensivo, antiviral (HIV), antiaterosclerótico, antiinflamatorio, anticarcinogénico y mutagénico (Formica y Regelson, 1995). Estos efectos podrían explicarse en parte por su capacidad de secuestrar radicales libres, de quelar iones metálicos, de alterar la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$ , de alterar la permeabilidad de las membranas y de alterar numerosas actividades enzimáticas (fig. 10).

1. Kinases vs ATP, GTP	19-Hydroxysteroid Dehydrogenase
2. Phospholipase A2	20. Catechol-O-methyltransferase
3. ATPases.....vs ATP	21. Aldose Reductase
4. Lipoxygenases	22. Monoamine Oxidase (FAD-Containing)
5. Cyclooxygenases	23. Aldo-Keto-Reductase Family of Enzymes
6. Phospholipase C	24. Hyaluronidase
7. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase	25. Histidine Decarboxylase and DOPA Decarboxylase
8. Adenylate Cyclase	26. Malate Dehydrogenase
9. Reverse Transcriptase	27. Lactic Dehydrogenase and Pyruvate Kinase
10 HIV-1 Proteinase	28. Aldehyde and Alcohol Dehydrogenases
11. HIV-1 Integrase	29. Amylase
12. Ornithine Decarboxylase	30. RNA and DNA Polimerases
13. Topoisomerase	31. Human DNA Ligase I
14. Glutathione S-Transferase	32. Ribonuclease
15. Epoxide Hydrolase	33. Sialidase
16. Glyoxalase	34. Cytochrome P450 Systems
17. Xanthine Oxidase	35. Elastase
18. Aromatase	36. Nitric-Oxide Synthase

Fig 10. Algunas enzimas de mamíferos cuya actividad cambia (generalmente, se inhibe)

### 1.4.2.2. La quercetina

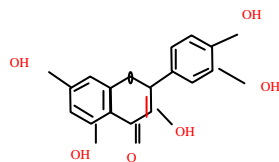


Fig. 11. Estructura de la quercetina

La quercetina (fig. 11) es un flavonol que se encuentra en la cáscara de manzana, en las cebollas, la lechuga, el brócoli, el té, las aceitunas y el vino tinto, así como en muchas semillas, nodos, flores, tallos y hojas. También se halla en algunas plantas medicinales, como Ginkgo biloba y marcela (*Achyrocline sp.*). El consumo humano promedio diario es de 25 mg/ persona (NTP 1992). Su absorción luego de administración oral podría alcanzar el 50% (Graefe y col, 1999). Suele estar unida a azúcares mediante un enlace glicosídico; no se ha descrito que exista en forma polimérica (Williamson y cols., 1999).

Sus efectos biológicos incluyen inhibición de la lipoperoxidación en sistemas químicos y en cultivos celulares (Kuhlmann y cols., 1998) y protección de lipoproteínas de baja densidad (LDL) de la oxidación, por lo que podría prevenir la formación de placas ateroscleróticas (Formica y Regelson, 1995). Previene la agregación plaquetaria *ex vivo* (Pace y cols. 1995) y modula la relajación del músculo liso (Formica y Regelson, 1995). Modifica asimismo la síntesis de eicosanoides, presentando actividad anti-inflamatoria y presenta actividad anti-viral (Kaul y cols., 1985). *In vitro* inhibe el crecimiento de *Helicobacter pylori*. Se ha descrito que presenta actividad mutagénica, carcinogénica y/o carcinostática (Formica y Regelson, 1995). En estudios en ratas suplementando la dieta con quercetina, los grupos de machos desarrollaron tumores del epitelio tubular renal pero no los de hembras, sugiriendo influencia hormonal. Por otra parte, la quercetina aumentó la expectativa de vida de ratones P-388 con leucemia e inhibió la proliferación de algunas líneas tumorales *in vitro* (Avila y cols., 1994; Scambia y cols., 1990; Yoshida y cols., 1990).

Se han propuesto varios mecanismos por los cuales la quercetina podría ejercer sus efectos, entre ellos su capacidad secuestradora-en particular, de ROS o NOS-, su capacidad

quelante de cationes bivalentes, la formación de un complejo con el  $\text{Ca}^{2+}$ , y la alteración de vías de señalización celular. La quercetina inhibe numerosas actividades enzimáticas (fig. 10) pero en la mayoría de los modelos, se desconoce el mecanismo por el cual lo hace. Podría tratarse de mecanismos de inhibición directa, alostérica o por competencia con el sustrato; de quelación de cationes que funcionen como cofactores; de la formación de un complejo con  $\text{Ca}^{2+}$  que funciona como segundo mensajero y altera cascadas de señales intracelulares; de alteraciones de la permeabilidad de las membranas y la homeostasis de iones.

En el ensayo TEAC (Trolox equivalent activity), las sustancias se comparan al Trolox en su habilidad para suprimir el radical catiónico ABTS en solución acuosa. Se considera que estos valores reflejan la capacidad del flavonoide como secuestrador de radicales libres en solución acuosa. En la tabla 4 tomada de Ishige y cols. (2001), se muestran los valores para algunos flavonoides. La quercetina presenta la mayor capacidad antioxidante en este sistema, seguida de la catequina.

SUSTANCIA	TEAC	Secuestrador de ROS
quercetina	4.84 ± 0.45	+
myricetina	3.08 ± 0.46	ND
fisetina	2.8 ± 0.23	+
luteolina	2.48 ± 0.23	+
kaempferol	1.45 ± 0.08	+
taxifolina	3.09 ± 0.58	ND
catequina	3.42 ± 0.43	ND
rutina	2.67 ± 0.24	ND
apigenina	2.8 ± 0.50	ND

*Tabla 4. Capacidad scavenger en solución acuosa y scavenger de ROS de flavonoides [Ishige,*

Los mismos autores (Ishige y cols., 2001) midieron acumulación de ROS en las células mediante el ensayo de la dichlorofluoresceína y citometría de flujo, y describen que la quercetina, así como la fisetina y el kaempferol, tienen capacidad secuestradora de ROS.



Ya se habían realizado estudios orientados a determinar específicamente la capacidad secuestradora de  $O_2^{\cdot -}$  y de  $OH^{\cdot}$ . Inicialmente se interpretó que la quercetina atrapaba ambos ROS y se determinó que dos características de su estructura eran importantes para esta acción: el catecol del anillo B y el doble enlace 2,3 en conjugación con la función oxo del anillo C (Bors y cols., 1995). Posteriormente, Hanasaki y col (Hanasaki y cols., 1994) trabajaron en un sistema de tipo Fenton en el cual encontraron que algunos flavonoides no tienen efecto, otros funcionan como secuestradoras de  $OH^{\cdot}$  y otros, entre ellos la quercetina, aumentan la producción de  $OH^{\cdot}$  (tabla 5) probablemente por autooxidación. Este resultado concuerda con el de Cao y cols (1997) que demuestran que la quercetina *in vitro* es antioxidante frente a radicales libres pero en presencia de  $Cu^{2+}$  o  $Fe^{2+}$  libres se transforma en prooxidante.

	$OH^{\cdot}$ (Fenton)
Quercetina	aumenta $.OH$
Myricetina	aumenta $.OH$
fisetina	sin efecto
Kaempferol	sin efecto
Chrysin	sin efecto
Apigenina	sin efecto
Catequina	secuestrador
rutina	secuestrador

Tabla 5. Efectos de los flavonoides en un sistema de tipo Fenton [Hanasaki, 1994 #82]

Se ha observado que la quercetina y otros flavonoides inhiben la producción de  $O_2^{\cdot -}$  en el sistema xantín-oxidasa/xantín-deshidrogenasa (XO/XH). En este último, se destaca que es difícil distinguir entre efectos del secuestro del  $O_2^{\cdot -}$  y la inhibición de la actividad enzimática (Hanasaki y cols., 1994). Esta disyuntiva es retomada por Selloum y col (Selloum y cols., 2001) que demuestran que si bien la quercetina, la myricetina y el kaempferol inhiben la formación de ácido úrico por la actividad XO, solamente la myricetina presenta efecto secuestrador del  $O_2^{\cdot -}$ ; la quercetina inhibiría la actividad XO por otro mecanismo.

Choi y cols (2002) testaron la capacidad secuestradora de  $ONOO^{\cdot -}$  de 31 flavonoides. El más activo fue la quercetina, con  $IC_{50}$  de  $0.93 \mu M$ .

En resumen, la quercetina es secuestradora de radicales libres en medio acuoso, funciona como secuestrador de ROS, puede funcionar como secuestradora o como productora de OH $\cdot$  y no puede secuestrar O $_2$ ; puede secuestrar ONOO $^-$  y pequeños cambios en su estructura producen grandes cambios de actividad.

Su estructura podría permitirle también funcionar como quelante, en particular de Cu $^{2+}$ , y Fe $^{2+}$  (Ferrali y cols., 1997). Algunos autores han estudiado mediante espectrometría la formación de quelatos flavonoide-metales de transición. La quercetina y otros flavonoides similares quelan Fe $^{2+}$  (Van Acker y cols., 1996) con potencia similar (tabla 6). Socynska y col (Soczynska-Kordala y cols., 2001) estudiaron las constantes cinéticas y la energía de formación de quelatos flavonoide-metal de transición (Fe $^{2+}$  y Cu $^{2+}$ ) en medios conteniendo membrana liposomal de fosfatidilcolina o metanol, describiendo que tanto la quercetina como la rutina son quelantes efectivos en ambos medios. Romanova y col (Romanova y cols., 2001) hicieron estudios en condiciones menos controladas (sin evitar oxidaciones), describiendo que los espectros de la quercetina y la luteolina cambian en presencia de Fe $^{2+}$ , pero no el de la apigenina.

-	+/-	+	++
naringina	catecol	quercetina	fisetina
		luteolina	taxifolina
		kaempferol	apigenina
		rutina	

*Tabla 6. Propiedades de quelación de Fe $^{2+}$  de flavonoides. Los flavonoides que consiguieron liberar Fe $^{2+}$  del complejo Fe $^{2+}$ -EDTA fueron considerados buenos quelantes (++) , y los que no lo consiguieron pero quelaron se clasificaron en quelantes moderados (+) a débiles (+/-), dependiendo de la cantidad de complejo formado. Los que no quelaron se indican como -. Van Acker y col 1996*

En diversos tipos celulares se ha visto que la quercetina reduce la concentración del inositol trifosfato (Prajda y cols., 1995) e inhibe actividades enzimáticas, por ejemplo: tirosín-kinasa del receptor del factor de crecimiento epitelial y otras kinasas (Huang y cols., 1999) , proteína-kinasa C (PKC), citocromo P450 aromatasa (Fiorelli y cols., 1999) y otras aromatasas

(fig. 10). Por otra parte, se ha visto que inhibe la síntesis proteica y como la inhibición está asociada a la fosforilación de la subunidad alfa del factor de iniciación eucariótico (eIFa  $\alpha$ ), se ha postulado que la quercetina activa las kinasas que lo fosforilan (PKR, HRI, PERK/PEK) (Ito y cols., 1999).

Si bien tiene numerosos efectos, se desconocen sus blancos de acción directa. Los estudios realizados *in vitro* hasta el momento sugieren que la quercetina, de entrar a la célula podría tener al menos tres tipos de proteínas blanco: proteínas con sitios de unión a estrógenos, kinasas y ATPasas (fig. 11). Asimismo, inhibe la fosfodiesterasa de cAMP (Beretz;A, 1978)

### 1. Proteínas con sitios de unión a estrógenos

*Inhibe y es sustrato de la sulfotransferasa de estrógenos, que controla los niveles de estrógenos en la sangre* (Otake et al., 2000)

*Se une a sitios de unión a estrógenos de tipo II (EBS-II) del ovario* (Ranelletti et al., 1992; Scambia et al., 1990; Yamashita et al., 1999)

*Inhibe P450 aromatasa (síntesis de estrógenos a partir de testosterona)* (Fiorelli et al., 1999; Masimirembwa et al., 1999)

*Inhibe transcripción dependiente de Nod D- (homólogo de ER en Rhizobium)* (Srivastava et al., 1999)

*Se une a receptores de estrógenos de tipo  $\alpha$  y  $\beta$*  (Kuiper et al., 1998)

### 2. Kinasas

*Bloquea incorporación de  $P^{32}$  al sustrato (ej: receptor de insulina, MLCK, PKA, PKC, CKI y II)* (Hagiwara et al., 1988)

Fig. 11. Estudios *in vitro* sugieren que la quercetina podría tener efecto sobre proteínas de tres

Los estrógenos (en particular, el 17- $\beta$ -estradiol) han mostrado actividad neuroprotectora en numerosos modelos y en particular en modelos de EO (García-Segura y cols., 2001; Inestrosa y cols., 1998; Pan y cols., 1999). Los mecanismos por los cuales confieren protección son variados, incluyendo su capacidad antioxidante y la regulación de la transcripción por medio de receptores de tipo  $\alpha$  y  $\beta$  (ER- $\alpha$  y ER- $\beta$ ). Los compuestos fenólicos provenientes de las plantas que exhiben actividad de tipo estrogénica se denominan fitoestrógenos. La quercetina es un fitoestrógeno y se une, aunque con baja afinidad, a ER- $\alpha$  y ER- $\beta$  (Rosselli y cols., 2000). Por lo tanto tiene sentido preguntarse si la quercetina puede proteger por mecanismos estrogénicos.

Algunos flavonoides pueden unirse a receptores de estrógenos de tipo  $\alpha$  y  $\beta$  (tabla 7) con diferente afinidad, medida ésta como porcentaje de IC50 de desplazamiento del radioligando. La actividad no es proporcional al binding, pero en términos generales, los más activos son los que presentan mayor binding (Kuiper y cols., 1998).

	Afinidad en fase sólida		Afinidad solubilizado		Transactivación (luciferasa)	
	ER- $\alpha$	ER- $\beta$	ER- $\alpha$	ER- $\beta$	ER- $\alpha$	ER- $\beta$
17-b-estradiol	100	100	100	100	100	100
Genisteína	4	87	0.7	13	198	182
Apigenina	0.3	6	nd	2	50	49
Chrysin	<0.01	<0.01	nd	nd	1	2
Kaempferol	0.1	3	nd	2	35	53
quercetina	0.01	0.04	nd	nd	3	2

Tabla 7. Afinidad y actividad en ensayo de transactivación, de flavonoides sobre receptores de estrógenos.

#### 1.4.2.2.1. Algunas señales intracelulares involucradas en la protección de la quercetina frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cultivos celulares

Varios autores han descrito efectos citoprotectores de la quercetina frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en diversos sistemas celulares (Duthie y Dobson, 1999; Ishikawa y Kitamura, 2000; Kitamura y Ishikawa, 1999; Nakayama y cols., 1993; Sanderson y cols., 1999) incluso si éste se genera intracelularmente (Pignatelli y cols., 2000). Asimismo se ha descrito que la quercetina protege el

ADN del daño inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Duthie y Dobson, 1999; Musonda y Chipman, 1998; Noroozi y cols., 1998; O'Brien y cols., 2000). Sin embargo, ninguno de los trabajos abarca en un mismo modelo el tipo de muerte celular involucrada, el estado del ADN, los requerimientos estructurales para la protección, el análisis de la correspondencia de dichos requerimientos con requerimientos referidos a capacidades como secuestrador, como quelante u otros, y un estudio de señales intracelulares involucradas.

En relación a las señales intracelulares involucradas en la protección, se ha comprobado que en células mesangiales del glomérulo la quercetina (Ishikawa y Kitamura, 2000; Kitamura y Ishikawa, 1999) evita la activación de las 3 MAPK y suprime la activación de c-Jun/AP-1 en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Yokoo y Kitamura, 1997) en tanto que en células HepG2 y en linfocitos la quercetina inhibe la actividad del factor de transcripción NF-κB (Musonda y Chipman, 1998; Noroozi y cols., 1998).

## **I.5. La quercetina como sustancia protectora frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células PC12**

### **I.5.1. Las células PC12**

Las células PC12 (Greene y Tischler, 1976) son una línea proveniente de un feocromocitoma de la médula suprarrenal del ratón. Sintetizan y liberan dopamina, noradrenalina y acetilcolina (Shafer y Atchinson, 1991). Poseen receptores glutamatérgicos, incluso NMDA. Poseen receptores de estrógenos de tipos  $\alpha$  y  $\beta$  (Chae y cols., 2001; Nilsen y cols., 1998)

Tienen la particularidad de diferenciarse en un fenotipo similar al neuronal en presencia de factor de crecimiento neural (NGF), desarrollando neuritas y cambiando sus propiedades intrínsecas (Shafer y Atchinson, 1991). Este fenómeno observado *in vitro* simula la diferenciación en neuronas simpáticas de células provenientes de la cresta neural, que son precursoras de células de la médula suprarrenal y de neuronas simpáticas.

En condiciones de privación de suero (Ohsawa y cols., 1998), las células PC12 presentan apoptosis por activación de la vía mitocondrial: se libera el citocromo c y se activan la caspasa-9 y la caspasa-3. Cuando se trata con 3-MA, las células son protegidas de la apoptosis. Se ha probado que en este caso la autofagia es inducida en las células antes que los cambios nucleares típicos (Uchiyama, 2001).

### **I.5.2. El modelo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

El agregado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracelular, que induce muerte celular de manera dosis-dependiente, ha sido propuesto como un modelo para estudiar las consecuencias del EO *in vitro* (Hoyt y cols., 1997; Janero y cols., 1991; Kuhlmann y cols., 1998; Whittemore y cols., 1994). Se ha descrito que la sensibilidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> depende del tipo celular (Aherne y O'Brien, 2000; Calderón y cols., 1999). Por otra parte, en un mismo tipo celular, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce apoptosis o provoca necrosis si es agregado a alta o a muy alta concentración respectivamente (Davies, 1999). Aún no se ha explorado si el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede o no inducir muerte celular autofágica.

En células mesangiales del glomérulo (Ishikawa y Kitamura, 2000; Kitamura y Ishikawa, 1999; Yokoo y Kitamura, 1997), la exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoca fosforilación de las MAPK (JNK, ERK y p38). La inhibición selectiva de p38MAPK o la transfección con un alelo p38 dominante negativo no evita la apoptosis, en tanto que la transfección con dominantes negativos de ERK o de JNK la evita. La inhibición de ERK suprime la inducción de c-fos, conduciendo a la

atenuación de la respuesta de AP-1 al  $H_2O_2$ . En este modelo, la apoptosis inducida por  $H_2O_2$  depende de c-jun/AP-1 pero no de NF- $\kappa$ B. En cambio, en linfocitos T humanos (Howe y cols., 2002), el  $H_2O_2$  induce fosforilación de I $\kappa$ B y la consiguiente activación de NF- $\kappa$ B.

El agregado de  $H_2O_2$  a células de mamíferos produce un aumento en el número de rupturas de las cadenas del ADN, antes de que sean detectables la lipoperoxidación o la oxidación de carbonilos de las proteínas (Halliwell y Gutteridge, 1999). El  $H_2O_2$ , al igual que el  $O_2^{\cdot -}$ , no daña el ADN directamente. Se ha descrito un patrón químico del daño (aumento de los niveles de múltiples productos de oxidación de las 4 bases) consistente con un ataque por  $\cdot OH$ . Ha habido mucho interés en la generación de  $\cdot OH$  a partir de  $H_2O_2$  catalizada por metales de transición porque si esta reacción ocurriese en el núcleo, muy cerca del ADN, los radicales  $\cdot OH$  podrían dañar el ADN.

El pretratamiento de células con quelantes de metales puede prevenir el daño al ADN inducido por  $H_2O_2$ . Este dato fue inicialmente interpretado como una prueba en favor de la teoría de los hidroxilos recién expuesta; sin embargo, recientemente se ha demostrado que la deferoxamina y otros dos quelantes de  $Fe^{2+}$  previenen la apoptosis inducida por el EO en correlación con su habilidad de aumentar la unión del complejo ATF-1/CREB a un elemento de respuesta a la hipoxia -lo que promovería la transcripción de genes protectores- y que el cloruro de cobalto, que es activador de ATF-1/CREB, también la previene (Zaman y cols., 1999).

De hecho, el daño al ADN causado por el EO no necesariamente involucra ataque directo al ADN por ROS/NOS. Los cambios en la concentración de  $Ca^{2+}$  o la activación de caspasas pueden activar endonucleasas, que fragmentan el ADN. Este daño no está acompañado de cambios químicos en las bases, por lo cual puede ser distinguido experimentalmente (Halliwell y Gutteridge, 1999).

En varios modelos se ha descrito la activación de caspasas, en particular caspasa-3, inducida por  $H_2O_2$ . Algunos autores afirman que la activación de la caspasa 3 es responsable de la muerte celular inducida por  $H_2O_2$  (DiPietrantonio y cols., 1999; Yamakawa y cols., 2000); otros, que la inhibición de la caspasa-3 no es suficiente para aumentar la supervivencia celular (Jiang y cols., 2001) o que la muerte por  $H_2O_2$  puede ocurrir sin activación de caspasas (Kim y cols., 2000). Se ha demostrado que el  $H_2O_2$  puede incluso inhibir la activación (Lee y Shacter, 2000) o la actividad (Borutaite y Brown, 2001) de dicha caspasa.

### **I.5.3. Efectos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células PC12**

Las células PC12 son bastante sensibles al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> si se las compara con las Neuro2a (Calderón y cols., 1999). Estas diferencias podrían deberse a diferencias en la actividad de enzimas antioxidantes, o a la sensibilidad de los blancos moleculares vulnerables (Halliwell y Gutteridge, 1999).

En 1993, Hinshaw y cols. mostraron que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce depolimerización de microtúbulos y posterior lisis celular (Hinshaw y cols., 1993) que pueden ser reproducidos mediante la aplicación de ionomicina, un ionóforo de Ca<sup>2+</sup>, lo que sugirió que los efectos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eran mediados por Ca<sup>2+</sup>. En 1999 Wang y Joseph confirmaron que los efectos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre células PC12 involucran cambios en la dinámica del Ca<sup>2+</sup> y se asocian con niveles basales de Ca<sup>2+</sup> intracelular elevados, disminución de los aumentos transitorios de la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular provocados por depolarización con K<sup>+</sup> y recuperación post-estimulación más lenta (Wang y Joseph, 1999).

En células PC12 (Zhang y Jope, 1999) sometidas a privación de suero, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 25 µM provoca fosforilación de ERK y si se aumenta la concentración (100 o 200 µM) induce también fosforilación de p38MAPK, sin alteración de CREB, que ya está fosforilado en el control. Por otra parte, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> impide que aumenten los niveles de CREB fosforilado al agregar factores tróficos (EGF o NGF) o frente a un aumento de cAMP inducido por forskolina. Los efectos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la fosforilación de ERK y CREB células PC12 no sometidas a privación de suero no han sido estudiados aún.

Entre los eventos degenerativos provocados por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se han descrito la pérdida de la transición de permeabilidad mitocondrial, con liberación de citocromo c (inhibible por Bcl-2) y consecuente activación de caspasa-9 y caspasa-3 (Yamakawa y cols., 2000).

### **I.5.4. Antecedentes particulares e hipótesis.**

Dado que el EO conduce a la muerte neuronal, los compuestos con actividad antioxidante podrían ser neuroprotectores. Por ello, se midió la capacidad antioxidante de un grupo de compuestos y se probó si resultaban protectores en un modelo de EO por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células PC12 en cultivo. En condiciones en que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mataba el 50% de las células, los resultados mostraron que compuestos que eran potentes antioxidantes (ej: vitamina C, vitamina



E, melatonina), no protegían de la muerte celular (datos no publicados del laboratorio de Neuroquímica).

Estos resultados concuerdan con los datos presentados por otros autores, quienes han probado que la protección contra el  $H_2O_2$  mediante antioxidantes no se explica totalmente por su capacidad antioxidante medida en ensayos *in vitro* (ORAC; TBARS, etc). Por ejemplo, el  $\alpha$ -tocoferol, la vitamina E soluble en agua (trolox) y el beta-caroteno, reconocidos como potentes antioxidantes, no protegen a los linfocitos humanos del daño al ADN inducido por  $H_2O_2$  (Duthie y Dobson, 1999) y el trolox o el n-tert-butyl-alpha-phenylnitronone no protegen a las células PC12 de la alteración de los niveles de  $Ca^{2+}$  inducida por  $H_2O_2$  (Wang y Joseph, 1999).

La vitamina E es simplemente un inhibidor de la reacción en cadena de la lipoperoxidación, y el  $H_2O_2$  desencadena rupturas del ADN y oxidación de proteínas antes que lipoperoxidación; esto podría explicar por qué la vitamina E no protegió. Sin embargo, tanto la melatonina como la vitamina C están caracterizadas como secuestradores de amplio espectro, con efectos *in vitro* e *in vivo*: la melatonina atrapa varias ROS y NOS incluyendo  $OH^\cdot$ ,  $H_2O_2$ ,  $NO^\cdot$  y  $ONOO^-$  (Reiter y cols., 2002; Tan y cols., 2002) y la vitamina C (ascorbato) inactiva radicales  $O_2^\cdot$ ,  $HO_2^\cdot$ ,  $OH^\cdot$ , peroxilo, oxisulfuro, ácido hipocloroso, ácido peroxinítrico, agentes nitrosilantes y radicales nitróxido (Halliwell, 1992).

En el modelo de muerte celular moderada con  $H_2O_2$ , una sustancia en particular, la quercetina, protegió de la muerte celular por  $H_2O_2$ . Ya existía un estudio de la protección otorgada por flavonoides frente al  $H_2O_2$  en células PC12, centrado en evaluar la dinámica del  $Ca^{2+}$ . La quercetina (y no otros flavonoides de estructura similar, como el kaempferol, y la catequina) protege a las células PC12 de la alteración de la dinámica del  $Ca^{2+}$  producida por  $H_2O_2$  (Wang y Joseph, 1999), en tanto que la taxifolina brinda protección parcial (tabla 3). Los autores discuten los requerimientos estructurales para la protección, particularmente en relación a la capacidad antioxidante de los flavonoides, y muestran que las diferencias en actividad de los flavonoides estudiados no se explican por diferencias en su hidrofobicidad.

compuesto	Brinda protección?	log P
quercetina	si	$1.36 \pm 0.02$
kaempferol	no	$1.60 \pm 0.07$
catequina	no	$0.21 \pm 0.03$
taxifolina	parcialmente	$1.30 \pm 0.06$

La quercetina protegió en un modelo en el cual varios antioxidantes potentes y en particular la melatonina y la vitamina C, que son secuestradores de amplio espectro, no lo hicieron. Esto podría significar que para proteger se requiere una capacidad antioxidante específica, que evite la oxidación de algún componente celular que no es protegido por los otros antioxidantes, o que ser antioxidante no es suficiente para proteger; que se requiere intervenir en vías de señalización celular. Por este motivo, el presente trabajo se inició bajo las siguientes hipótesis de trabajo:

1. La muerte de células PC12 por  $H_2O_2$  en nuestras condiciones experimentales es de tipo programado, dependiendo de la activación de vías de señalización intracelular.
2. La protección por quercetina no se debe exclusivamente a su capacidad antioxidante (particularmente, al secuestro de  $H_2O_2$  u otras ROS, o a la quelación de  $Fe^{2+}$ ).
3. La acción protectora de la quercetina involucra modificación de señales intracelulares (tales como movilización de pools de  $Ca^{2+}$ , fosforilación de ERK, fosforilación de CREB, fosforilación de NF-kB, activación de receptores de estrógenos) de manera que ocurra interferencia con las señales intracelulares activadas por el  $H_2O_2$ .

Por otra parte, dado que se ha descrito que la sensibilidad al  $H_2O_2$  varía con el tipo celular, y que la línea celular PC12 ya tiene años de existencia, se planteó como otra hipótesis:

4. Tanto la sensibilidad al  $H_2O_2$  como los mecanismos por los cuales éste mata a las células pueden ser diferentes en diferentes cepas de células PC12.

## II. Objetivos

En el marco de la comprensión de los mecanismos de muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas y cerebrovasculares, y de la búsqueda de sustancias neuroprotectoras:

1. Caracterizar el tipo de muerte celular que induce el tratamiento con  $H_2O_2$  en células PC12.
2. Estudiar el grado de protección por quercetina.
3. .Estudiar los mecanismos que subyacen a la protección de la quercetina frente al  $H_2O_2$

### III. Diseño experimental

Con el objetivo de caracterizar la muerte celular por  $H_2O_2$ :

- 1.1 Se determinó la sensibilidad de las células PC12 al  $H_2O_2$  mediante la técnica del MTT.
- 1.2 Se evaluó el grado de rupturas del ADN mediante el ensayo cometa.
- 1.3. Se evaluó si la muerte celular se acompaña de lisis de la membrana plasmática, por la técnica de la lactato deshidrogenasa.
- 1.4. Para estudiar la participación de las caspasas -3,-6 y-9 en el proceso de muerte celular, se realizaron experimentos farmacológicos con bloqueantes específicos. Asimismo, se midió la actividad de las caspasas-3 y -6.
- 1.5. Para explorar si la muerte celular tuvo un componente autofágico, se utilizó el inhibidor de autofagia. 3-MA.
- 1.6. Dado que los efectos del  $H_2O_2$  dependen del tipo celular, y que la línea celular PC12 podría presentar una divergencia considerable, se estudió si dos cepas de células PC12 presentaban la misma sensibilidad al  $H_2O_2$  y como se encontró que presentaban sensibilidades muy diferentes, se exploró si morían por mecanismos similares o diferentes, realizando casi todos los experimentos citados (1.1 a 1.5) para la segunda cepa.

Con el objetivo de caracterizar la protección celular por la quercetina:

- 2.1. Previamente a los demás estudios, se evaluó la citotoxicidad de la quercetina, con MTT.
- 2.2. Se determinó el patrón temporal de protección por quercetina frente al  $H_2O_2$ , agregándola 2 hs antes, inmediatamente antes, o después del  $H_2O_2$ ,y evaluando con MTT.
- 2.3. Se investigó si la quercetina disminuía el daño producido en el ADN por el  $H_2O_2$  mediante el ensayo cometa.

Finalmente, para estudiar los mecanismos que subyacen a la protección de la quercetina frente al  $H_2O_2$ :

- 3.1. Se determinaron los requerimientos estructurales de la molécula de quercetina para brindar protección celular y para disminuir el daño al ADN inducido por el  $H_2O_2$ . Para ello se estudió en las PC12 IIBCE la capacidad protectora celular y la capacidad de disminuir el daño al ADN para 6 flavonoides de estructura similar a la quercetina (fig. 12), y para otros flavonoides (fig. 13), solamente se estudió la capacidad protectora celular. Además, se comparó la relación estructura-actividad en las dos cepas de células PC12 (las del IIBCE y las de la UFRJ).
- 3.2. Se analizaron de acuerdo a consideraciones energéticas las propiedades estructurales de la quercetina incluyendo la estabilidad, la flexibilidad, y la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares, así como la forma del anillo C. También se analizó el efecto de un sustituyente sobre la distribución de la carga.
- 3.3. Se estudió si la quercetina puede reaccionar directamente con el  $H_2O_2$  analizando los espectros de absorción y de emisión de la quercetina en ausencia y presencia de  $H_2O_2$ .
- 3.4. Se analizó si la protección por quercetina podría explicarse por su capacidad secuestradora de ciertos radicales libres. Para ello se analizó si el patrón de estructura-actividad para la protección celular por flavonoides obtenido experimentalmente se correspondía con el patrón de estructura-actividad para su capacidad como secuestradores de radicales libres en general, de ROS, de OH en un sistema de tipo Fenton, y de  $O_2$  en un sistema XO/XD (Hanasaki y cols., 1994; Ishige y cols., 2001; Selloum y cols., 2001).
- 3.5. Se analizó si la protección por quercetina podría explicarse por su capacidad quelante de  $Fe^{2+}$ : se estudió el espectro de la quercetina en ausencia y presencia de  $Fe^{2+}$  y también se analizó si el patrón de estructura-actividad para la protección celular por flavonoides se corresponde con el patrón de estructura-actividad para su capacidad como quelantes de  $Fe^{2+}$  (Romanova y cols., 2001; Soczynska-Kordala y cols., 2001; Van Acker y cols., 1996).
- 3.6. Se estudió si la protección por quercetina podía deberse a la formación de complejos de coordinación con el  $Ca^{2+}$ . Para ello se estudió el espectro de la quercetina en ausencia y presencia de  $Ca^{2+}$  y si el EGTA brindaba protección frente al  $H_2O_2$ .

- 3.7. Se exploró en las PC12 IIBCE si la actividad de ERK y de los factores de transcripción NF-kB y CREB se alteraron en correspondencia con la inducción de muerte celular por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de protección frente al mismo por la quercetina. Para ello se realizaron extracciones de proteínas a los 10 y a los 60 min, de poblaciones control, tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y quercetina, y se realizaron Western blots con anticuerpos anti- pERK, pCREB y pIKB.
- 3.8. Se evaluó si la protección por quercetina podía deberse a la activación de receptores de estrógenos mediante la utilización de antagonistas estrogénicos para ver si bloqueaban la protección por quercetina y de agonistas para ver si la simulaban. Adicionalmente, se analizó si hay correspondencia entre la relación estructura-actividad descrita para activación de receptores estrogénicos (Kuiper y cols., 1998), y la relación estructura-actividad en este modelo para la protección celular.

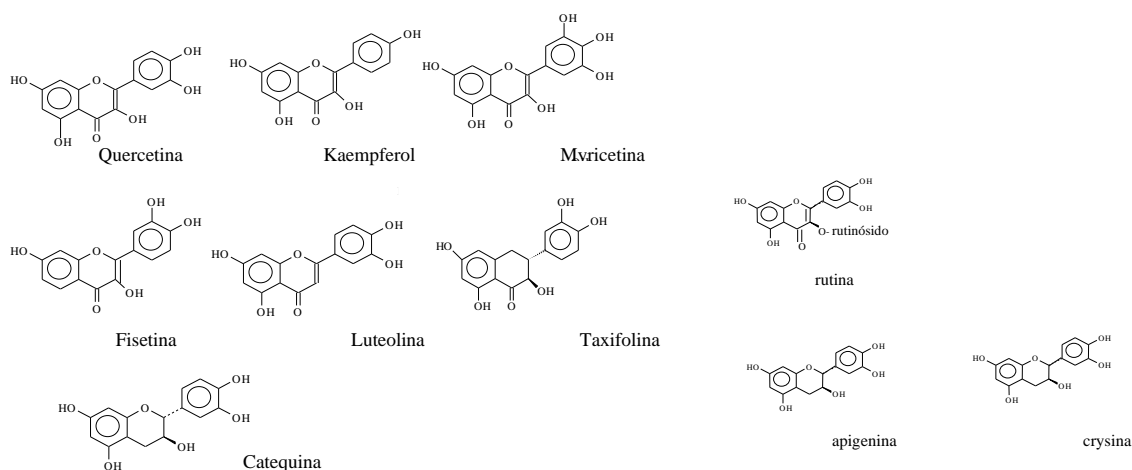


Fig. 12. Estructura de los flavonoides para los cuales se estudió la capacidad protectora celular

Fig. 13. Estructura de los flavonoides para los cuales se estudió solamente la

## **IV. Materiales y métodos.**

### **IV.1. Origen de las células PC12**

La línea celular continua PC12 (feocromocitoma de ratón) utilizada en los experimentos, fue establecida por Green (Greene y Tischler, 1976). Se utilizaron dos clones: el del IIBCE (que llamaremos PC12 I) y otro que proviene indirectamente de ATCC y se está cultivando en la Universidad Federal de Río de Janeiro (PC12 U).

### **IV.2. Cultivo celular**

Las células PC12 fueron sembradas sobre una matriz de colágeno (extraído de colas de ratas) en cajas de petri de plástico (94 mm de diámetro) en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 5% de suero fetal bovino (GIBCO), 10% de suero de caballo inactivado (GIBCO), 75 mg/l penicilina-G- sódica (Biochemie) y 50 mg/l de estreptomycin (GIBCO) y mantenidas a 37<sup>a</sup> C en una incubadora con 5% CO<sub>2</sub>. Fueron subcultivadas una vez por semana (1:5) hasta 25 pasajes y el medio se cambió 2 veces por semana. Para realizar los experimentos con matriz, las células se sembraron (100 u 800 células/μl) sobre poli-D-lisina (Sigma; 0.2 mg/ml), generalmente en placas de plástico de 94 pocillos. Para realizar el ensayo cometa y las extracciones de proteínas se trabajó sin matriz, sembrando las células en cajas de petri de plástico (94 mm de diámetro). Todos los experimentos se realizaron 24 hs después de la siembra.

### **IV.3. Tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Se prepararon diluciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fluka) 20 x en agua. Se realizaron curvas de sensibilidad a un tratamiento de 30 min y se trabajó habitualmente con concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> susceptibles de producir una reducción de viabilidad cercana al 50 % a los 120 min de finalizado el tratamiento.

### **IV.4. Estudios de protección frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Cada sustancia de interés fue preparada en diluciones 40 x, en dimetilsulfóxido (DMSO; Mallinkrodt) al 1,25 % final excepto si se indica un solvente diferente. La quercetina

(proporcionada por H. Heinzein o de Great Dragon Enterprises Co.; CA/3383) se agregó 2 hs antes (en un protocolo fue removida mediante un lavado y en otro estaba presente durante el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), inmediatamente antes, y 2 hs después del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los otros flavonoides (apigenina, chysina y rutina de H.Heinzein; myricetina, luteolina, fisetina, kaempferol, taxifolina y catequina, de Sigma) se agregaron inmediatamente antes del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los inhibidores de caspasas -6, -9 y -3 (Peptide Institute, Inc. Japan) que fueron respectivamente **VEID** (acetyl-L-valyl-L-glutamyl-L-isoleucyl-L-aspart-1-al), **LEHD** (acetyl-L-leucyl-L-glutamyl-L-histidyl-L-aspart-1-al) y **DEVD**, (acetyl-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-aspart-1-al), así como los agonistas estrogénicos 17-β-estradiol, benzoato estradiol, estriol, tamoxifeno y raloxifeno (cedidos por A. Abín), la 3-methyladenina (3-MA; SIGMA, disuelta en medio de cultivo) y el EGTA (en agua) se agregaron 30 min antes del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se evaluó viabilidad con MTT y para los flavonoides, también se utilizó el ensayo cometa.

#### **IV.5. Estudios de citotoxicidad**

Las células PC12 fueron expuestas a concentraciones crecientes de quercetina durante 30 min y se evaluó con MTT.

#### **IV.6. Estudios de bloqueo de la protección producida por la quercetina.**

Los antagonistas estrogénicos (tamoxifeno y raloxifeno) fueron agregados 30 min antes del tratamiento con quercetina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La evaluación se realizó por el método del MTT

#### **IV.7. Ensayo de reducción del MTT**

Este ensayo mide la reducción del 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenil bromuro de tetrazolio (MTT; Sigma) a formazan (azul) que ocurre en células metabólicamente activas (Liu et al 1997, Abe et al 1998). Al finalizar el tratamiento, se aspiró el sobrenadante y se agregó medio completo con MTT (0.5 g/ml). Luego de una incubación (120 min), el sobrenadante fue aspirado y se agregó DMSO. Se midió la absorbancia (570-630 nm) en un lector de placas (DYNEX TECHNOLOGY MRX-II.) ( Mosmann 1983 y Denizot y Lang 1986).



En todos los casos, el procesamiento primario de los datos consistió en una estadística descriptiva por experimento. Posteriormente, los datos se expresaron como porcentaje de viabilidad respecto a la media del control  $\pm$  error estándar. La significancia se estudió por ANOVA paramétrico y test de Dunnet. Cuando no se cumplieron los supuestos de homogeneidad de varianzas, se utilizó el ANOVA no paramétrico equivalente, de Kruskal-Wallis, y el test de comparaciones múltiples de Dunn. Se utilizó el programa GraphPad InStat-v2 (1990-94).

#### **IV.8. Medición de la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) libre**

El protocolo para medir LDH liberada al medio, que es un indicador de lisis de la membrana plasmática (Koh y Choi, 1987), fue adaptado a volúmenes pequeños. Luego del tratamiento (2 hs), se mezclaron 80  $\mu$ l del medio de las células tratadas con 120  $\mu$ l de buffer LDH (buffer fosfato 0.1 M pH 7,5 a 37°C conteniendo  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH; Sigma) 300  $\mu$ M y piruvato (Sigma) 240  $\mu$ M) y se midió la absorbancia de NADH (a 340 nm durante 1 min con intervalos de 10 segundos) en un lector de placas (DYNEX TECHNOLOGY MRX-II). La pendiente de consumo de NADH fue calculada automáticamente (por el programa "Revelation" v 4.02 de DYNEX TECHNOLOGIES, INC). Se calibró lisando las células con Tritón-X-100 (Sigma) al 0.2 %. La significación de la tendencia lineal de la curva de calibración fue testada por ANOVA.

#### **IV.9. Ensayo cometa**

La versión alcalina de este ensayo permite evaluar el daño al ADN, detectando rupturas de simple y doble cadena del ADN así como sitios álcali-lábiles (Klaude y cols., 1996; Tice y cols., 1990).

*Preparación de las muestras.* La superficie de los portaobjetos fue pretratada con agarosa de punto de fusión normal (Sigma) al 0.1 % en PBS y expuesta al aire para su secado. Las células se colectaron mecánicamente (120 min después del tratamiento), se centrifugaron, se resuspendieron en medio de cultivo (500  $\mu$ l). Se mezclaron 20  $\mu$ l de suspensión celular con 80  $\mu$ l de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma) al 0.75 % en PBS a 37°C. Inmediatamente, un volumen de 80  $\mu$ l de la suspensión se colocó sobre un portaobjetos, se cubrió con parafilm y se mantuvo a 4°C (5 min).

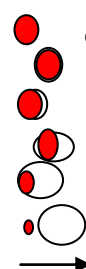
El parafilm fue removido y el portaobjetos fue sumergido en buffer de lisis frío (NaCl 2.5 M, EDTA 100mM, Tris-HCl 10mM y 8 g de NaOH/ 890 ml. de agua, ajustado a pH 10, al que se agregó una hora antes de usarlo 1 % de Tritón-X-100 y 10 % de DMSO) y se matuvo a 4°C (de 1 h a 15 días). El resto del procedimiento se realizó bajo luz de seguridad fotográfica.

Electroforesis. Los portaobjetos fueron colocados en la cuba de electroforesis y cubiertos con buffer de electroforesis frío durante 20 min (NaOH 300 mM y EDTA 1 mM a pH13 preparado mezclando diluciones stock una hora antes). La electroforesis se realizó a 25 V durante 20 min. El volumen de buffer se ajustó para lograr una intensidad de corriente en el rango de 250 a 300 mA.

Neutralización. Cada portaobjetos se lavó con buffer de neutralización (tris-HCl 0.4 M, pH 7.5) 3 veces (5 min c/u). Luego se lavó con agua destilada.

Tinción Los preparados se tiñeron con 50 µl de bromuro de etidio (20 µg/ml) y se cubrieron con cubreobjetos.

Análisis. El ADN de células individuales se observó (a 20x) bajo un microscopio de fluorescencia (ZEISS modelo II) y se clasificó de acuerdo al grado de daño en 5 categorías: de 1 a 5 ( $\alpha$ =grado de daño). Los siguientes criterios se utilizaron para evaluar el grado de daño. 1: sin daño e intacto o con un halo rodeando el núcleo;. 2: poco daño (el ADN se distribuye en un óvalo); .3: el eje ántero-posterior del cometa mide el doble que el diámetro; 4: el ADN compacto se ha reducido y aparece una gran nube de ADN (larga cola del cometa); 5: La cola está separada del resto de ADN compacto.



Se realizó un conteo doble-ciego de 100 células. Se calculó un índice de daño (DDI) como:

$$DDI = \sum (n. \alpha)$$

donde  $\alpha$  (que puede ir de 1 a 5) expresa el grado de daño y n es el número de células con grado de daño  $\alpha$ . También se calculó el porcentaje de células dañadas (grados 2 a 5 de daño).

Estadística Se utilizó un ANOVA paramétrico y un test de significación de Tukey para el índice de daño y de Bonferroni para el porcentaje de células dañadas.

#### IV.10. Espectrometría de emisión.

Se obtuvieron registros del espectro de emisión de la quercetina (25  $\mu\text{M}$  en DMSO al 50 %) en un fluorímetro (AMINCO-BOWMAN, SERIES 2) excitándola a 370 nm en ausencia y presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (200 y 400  $\mu\text{M}$ ).

#### IV.11. Espectrometría de absorción.

Los flavonoides presentan espectros característicos (Mabry y cols., 1970).

Se compararon los espectros de absorción (200 a 500 nm) de la quercetina (50  $\mu\text{M}$  en metanol 50 %) en presencia y ausencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (200  $\mu\text{M}$ ).

Se midieron los espectros de absorción (220 a 500nm) de la quercetina (100  $\mu\text{M}$ ) en NaCl 0.15 M, a 37 °C y en atmósfera inerte (burbujeando con argón), variando el pH (de 2 a 11) en ausencia y presencia de  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ó  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en relación 1:2 y 1:1 respecto a la quercetina: El stock de quercetina se preparó en agua en medio ácido (pH 2), al límite de saturación.

#### IV.12. Western blots

Los estudios de fosforilación de proteínas requieren trabajar a alta densidad celular. Se utilizó una dosis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1400  $\mu\text{M}$ ) que indujese la muerte del 50 % de las células. Se realizaron 2 experimentos independientes (EXP1 y EXP2). Cada uno incluyó un grupo de placas (control, tratada con  $\text{H}_2\text{O}_2$  y tratada con quercetina y  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) del cual se extrajeron proteínas a los 10 min y otro del cual se extrajeron a los 60 min.

*Extracción de proteínas* Se recogió el medio de cultivo con las células en suspensión de cada placa de Petri y se centrifugó (10 min a 2000 RPM). Simultáneamente, las células adheridas al sustrato fueron mantenidas a 4°C con 5 ml de PBS con el fin de despegarlas del mismo. Posteriormente, se descartó el sobrenadante del tubo que contenía las células en suspensión y se agregaron las células mantenidas en PBS. Se resuspendió el pellet y se centrifugó (10 min a 2000 RPM). Se descartó el sobrenadante y se agregó 200  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis pH 7,4 [Tris-HCl 20 mM, sacarosa (Reagen) 250 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma) 0.1%, tritón (Sigma)1%, inhibidores de proteasas -10  $\mu\text{g/ml}$  de leupeptina (Sigma), 1 mM PMSF (Sigma) y 0.04 mg/ $\mu\text{l}$  de cocktail (Boehringer-Manheim)-, e inhibidores de fosfatasas - $\text{Na}_3\text{VO}_3$  (Alomone labs) 1mM, pirofosfato de Na 5 mM, glicerolfosfato de Na 10 mM y fluorato de Na (Alomone

labs) 50 mM-]. Se dejó actuar 10 min. Se transfirió a tubos Eppendorf y se centrifugó (10 min a 13000 RPM a 4°C). El sobrenadante fue transferido a tubos Eppendorf y se desnaturalizó mediante calor. Se cuantificaron las proteínas por el método de Lowry o por el método de Bradford (Stoscheck, 1990). Se agregó buffer Laemmli 2 x [Tris 0.4M pH 7,5, 20% de glicerol (USB), SDS (Invitrogen) 4%, 0.5 µl/ml azul bromofenol (SIGMA) y 10% β-mercaptoetanol] y se conservaron alícuotas a -20°C.

Preparación de las muestras A las muestras se les agregó buffer de muestra (Tris-HCl 50 mM pH 6,8; DTT 100mM, SDS 2 %, azul de bromofenol 0.1% y 10% de glicerol) calculando que se cargarían 30 µg de proteína en un volumen de 25 µl /pocillo.

Electroforesis y transferencia. Se utilizaron geles de poliacrilamida de concentración-separación (4% y 12% respectivamente), conteniendo SDS (SDS-PAGE) en buffer (Tris 25 mM, glicina 190mM, SDS 0.1%). Luego de la primera electroforesis (45 min a 200V, con 60 mA/gel al inicio), las proteínas fueron transferidas eléctricamente a una membrana de nitrocelulosa (Hybond TM ECL TM cat N° RPN303D) en buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 190 mM, etanol 20%) a 4 °C (a 250 mA por 90 min). Se utilizó rojo de Ponceau al 0.1 % en agua para verificar la eficiencia de la transferencia y la cantidad de proteínas.

Detección de proteínas La membrana fue lavada (5 min) en buffer TBS-T (NaCl 100 mM, Tris – HCl 10 mM; Tween 20 0.1%) e incubada (90 min) en tampón de bloqueo (TBS-T-BSA al 5%). Posteriormente fue incubada en anticuerpo primario (Cell signalling) en solución de bloqueo (tabla 8). Al final de la incubación fue lavada (3 x 15 min) en buffer TBS-T. Luego fue incubada con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa (2 hs en solución de bloqueo) y posteriormente lavada (3 x 15 min). El revelado siguió el protocolo del kit (ECL+ Plus Western blotting detection system; RPN 2132 de Amersham) y la membrana fue entonces expuesta al film de rayos X (X OMAT-K-XK-1 Kodak cat N° 6497895) por períodos variados. Luego del revelado, la membrana fue lavada en TBS-T y para el control de carga, la membrana fue reutilizada luego de un "stripping" (Tris-HCl a 62,5 mM pH 6,8; SDS 2% y β-mercaptoetanol 100 mM) por 30 min a 56 °C.

	Condiciones del anticuerpo	Tiempo de exposición
anti-p44/42 MAPK (pERK) (thr 202, tyr 204;#9101)	1:3000, overnight a 4°C+ 1h a temp amb	10 a 15 min
anti-pCREB (ser 133;9191)	1:1000 overnight a 4°C+ 1h a temp amb	15 min
anti-pIKB (ser 32;#9241)	1:1000 overnight a 4°C+ 1h a temp amb	15 min
ERK 2	1:3000,4hs a temp amb ó 1:4000 overnight	1 a 3 seg
anti-conejo, de cabra/HRP	1:8000	---

Tabla 8. Condiciones de utilización de cada anticuerpo.

**Densitometría.** Se realizó una densitometría de las imágenes de las placas utilizando rectángulos del mismo tamaño para todos los pocillos. Se calculó el cociente del valor de la fosfoproteína estudiada respecto al control de carga.

**NOTAS** 1. La superposición de las placas radiológicas para pCREB y para ERK2, según los bordes de la membrana y el marcador de peso molecular, permitió verificar que la banda de ERK2 (de 42 kD) se sitúa a nivel del espacio que queda entre la banda de mayor peso molecular y la siguiente. Por lo tanto, la banda correspondiente a pCREB es la superior.

2. Los anticuerpos anti-pIKB  $\alpha$  de Cell Signalling detectan 2 bandas, de las cuales la de menor peso molecular aparente es la de interés y la de mayor peso aparente es una banda de intensidad constante, débil. La fig. 45 muestra que se detectó a los 10 min. solamente una banda, que es la de mayor peso molecular aparente y por lo tanto no es IKB.

#### IV.13. Actividad de caspasas

**Extracción de proteínas** Las células se recogieron igual que en la extracción para Western blots y fueron cococadas en hielo y resuspendidas en 50  $\mu$ l de buffer A (NaCl 150 mM, Tris 20 mM pH 7,5; Tritón X-100 al 1%; 10ug/ml de leupeptina, 5  $\mu$ g/ml de aprotinina; PMSF 100  $\mu$ M). Luego de 10 min de incubación, se agregaron 50  $\mu$ l del buffer B (Hepes 100 mM, pH 7,4; NaCl 150

mM; CHAPS 0.2 % y 4 mM de DTT). Las muestras se centrifugaron (5 min a 15000g a 4<sup>a</sup>), se retiró una alícuota para determinar la concentración proteica y el pellet se guardó a -70°C.

Medición de actividad. Las muestras proteicas (300µg ) se incubaron a 37°C por 24 hs con Ac-VEID-pNA o Ac-DEVD-pNA (Calbiochem) (200 µM en buffer B) y la hidrólisis del sustrato se midió como la absorbancia de la muestra a 405 nm (Microplate Reader 3550-UV, Bio-Rad). Solución stock de los péptidos:DMSO.

#### IV.14. Cálculos de energía molecular, optimización de estructuras y cálculos de cargas locales.

Se puede caracterizar a las moléculas desde el punto de vista de sus electrones (Química Cuántica) o de sus protones (Mecánica Molecular). Se realizaron cálculos de energía con el método químico cuántico semi-empírico AM-1 utilizando el programa HYPERCHEM 6.01 para Windows (2000). Los métodos semiempíricos realizan simplificaciones, entre ellas: tienen en cuenta solamente los electrones de valencia, desprecian algunas interacciones y utilizan parámetros derivados experimentalmente. El método AM-1 es el más eficiente; calcula propiedades electrónicas, geometrías optimizadas (en el vacío), energía total y calor de formación de moléculas pequeñas que no contengan metales de transición.

La energía libre tiene un componente de entropía y uno de entalpía. Para estos cálculos se asume que existe un background de entropía común y se trabaja solamente con la entalpía. A su vez, ésta posee un componente cinético que se considera constante porque no se varía la temperatura, y un componente potencial, que es el que efectivamente se calcula.

En resumen, los cálculos de energía realizados son exclusivamente de la entalpía potencial, están centrados en la distribución de la nube de electrones de valencia, y se refieren a una simulación en el vacío.

#### IV.15. Expresión de resultados

Casi todos los resultados se expresaron en forma de gráficos de barras, en los cuales la significación estadística se indicó con asteriscos. \*:p<0.05; \*\*:p<0.01; \*\*\*:p<0.001.

## V. Resultados y discusión

### V.I. Características de la toxicidad por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### V.I.1. Características generales de la toxicidad por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las células PC12 "I"

El tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min indujo muerte celular dosis-dependiente de células PC12 sembradas a una densidad de 100 células/ $\mu$ l, de acuerdo a la evaluación realizada a las 2 hs con MTT (fig. 14). A una concentración de 200  $\mu$ M, la viabilidad fue próxima al 50%. Esta condición fue seleccionada para los estudios siguientes.

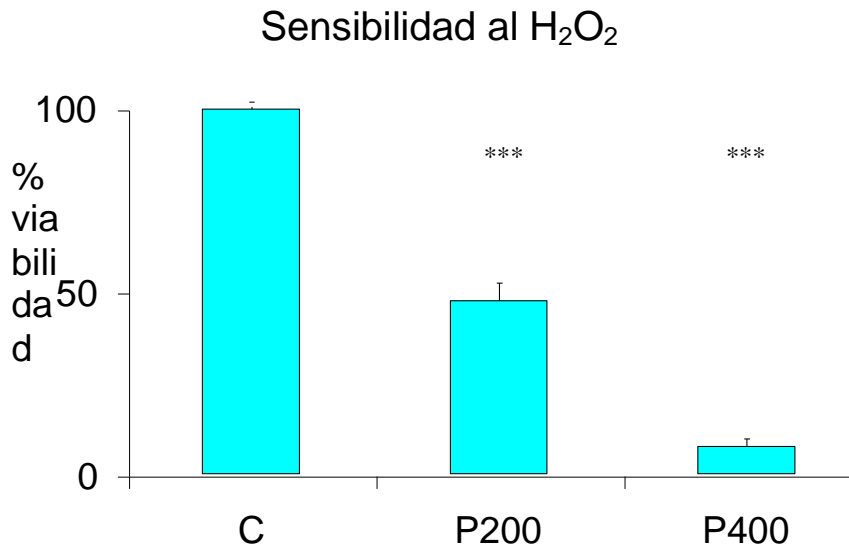


Fig. 14. Sensibilidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de células PC12-1 a una densidad de 100 células/ $\mu$ l. Se midió la viabilidad por el método del MTT. Los datos son la media del porcentaje de viabilidad celular  $\pm$  el error estándar de acuerdo a la técnica del MTT. *n* = 3 experimentos.

Experimentos realizados en paralelo a la medición de viabilidad con MTT mostraron que ésta disminuyó al 50 % sin que se liberase la lactato deshidrogenasa al medio de cultivo. Se realizaron medidas al finalizar el tratamiento de 30 min y 2 hs más tarde (fig. 15) Comparando con la curva de calibración se aprecia claramente que el porcentaje de células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que liberaron LDH fue muy bajo, y fue igual en las poblaciones control que en las tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

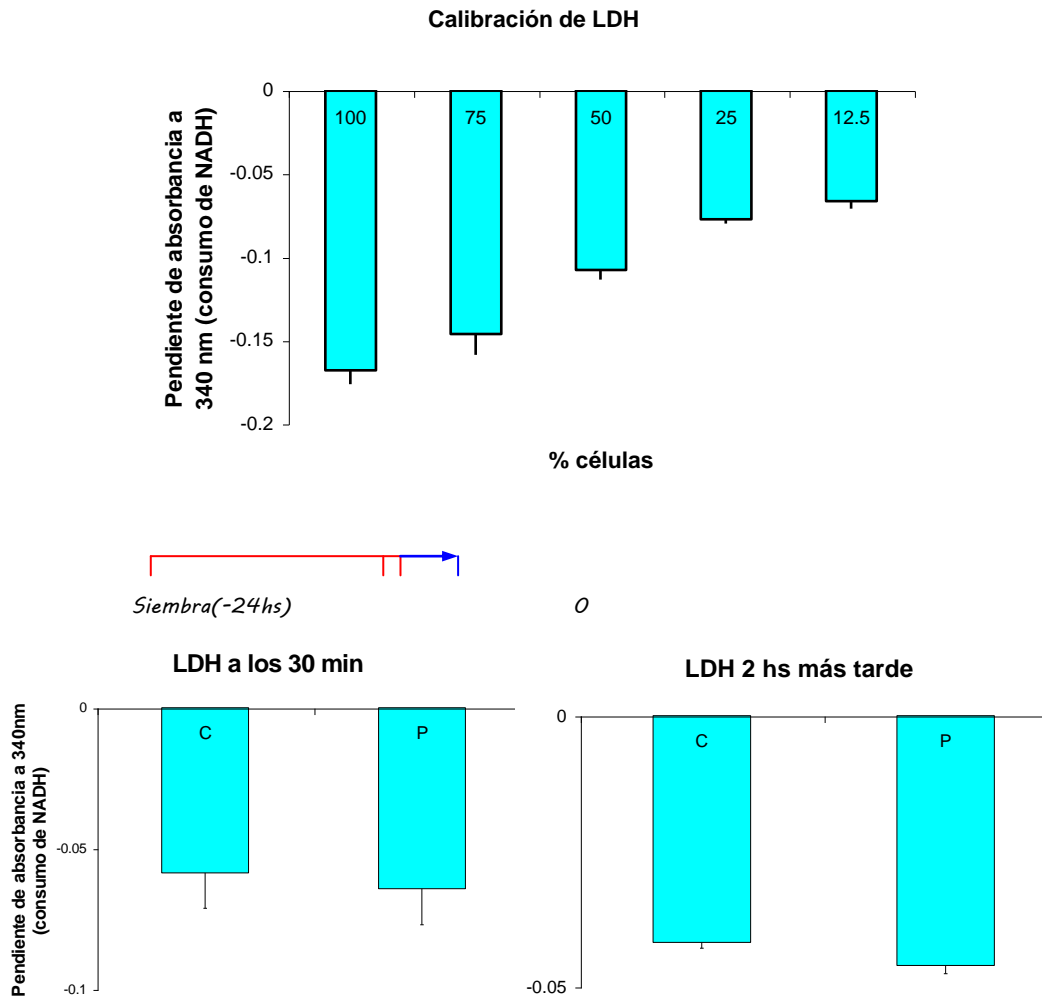


Fig. 15. Evaluación de LDH libre en PC12 "I" a baja densidad, expresada como pendiente de la aborbancia a 340nm, que representa el consumo de NADH. Se muestra la curva de calibración y los datos de 2 medidas (ver esquema inserto): una realizada al cambiar el medio para finalizar el tratamiento (representada en rojo) y otra realizada al final del



La lactato deshidrogenasa es una enzima citosólica de expresión constitutiva que se libera al medio si la membrana celular se lisa (Koh y Choi, 1987). Por lo tanto, los datos indican que no hubo lisis temprana de la membrana plasmática provocada por el tratamiento con  $H_2O_2$ .

El ensayo cometa realizado en condiciones alcalinas, que detecta rupturas de simple y doble cadena del ADN en células individuales; así como sitios álcali-lábiles, se está utilizando cada vez más para estudios de toxicidad y una de sus ventajas es que brinda datos no sólo cualitativos sino cuantitativos del daño al ADN, ya que permite analizar células individuales (Klaude y cols., 1996; Tice y cols., 1990). En la población control, la mayoría de las células (80 a 90%) no mostró daño en el ADN y fue clasificada como de grado 1, en tanto que en la población tratada con  $H_2O_2$ , 2 hs después del tratamiento un 90% de las presentaron grados de daño de 2 a 5 y en particular aproximadamente un 60 % de las células presentaron grado de daño 4 ó 5 (fig. 16 A). Esto se tradujo en un cambio del índice de daño, cuyo valor pasó de 100 a 400 aproximadamente.

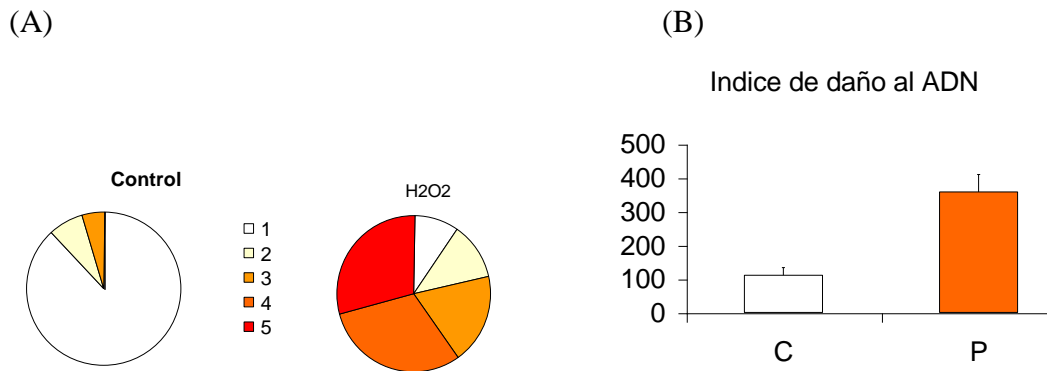


Fig. 16. Un pulso de  $H_2O_2$  que indujo muerte del 50 % de las células, provocó daños al ADN de acuerdo al ensayo cometa. Se muestra (A) la distribución del daño en poblaciones de células control y tratadas 2hrs después del tratamiento. (B) Promedio

Se ha descrito que el tratamiento con  $H_2O_2$  induce mayoritariamente verdaderas rupturas del ADN y no sitios álcali-lábiles (Fernandez y cols., 2001; Horvathova y cols., 1999). Si bien es cierto que pueden existir algunas rupturas debidas a procesos de reparación del ADN (Halliwell y Gutteridge, 1999), cuando éstas son muchas y ocurren en un contexto de muerte celular, se interpretan como nocivas. Además, en condiciones en las que la reparación del ADN se bloquea (a  $4^\circ C$ ), el  $H_2O_2$  también induce fragmentación del ADN (Tice y cols., 1990).

El porcentaje de células con ADN muy fragmentado (de grado 4 o 5) fue similar al de pérdida de viabilidad metabólica.

Las células que están comenzando un proceso apoptótico generan imágenes de cometas, por lo cual las imágenes obtenidas por esta técnica no pueden ser interpretadas como indicadores de genotoxicidad si hay riesgo de que ocurra apoptosis (Choucron y cols., 2001; Li y cols., 1999). Es decir que las imágenes de células cuyo ADN está muy fragmentado son compatibles tanto con un proceso genotóxico como con un proceso apoptótico. Un trabajo reciente (Barbouti y cols., 2002) muestra que el  $H_2O_2$  induce fragmentación del ADN tanto si es aplicado como una dosis única o en forma continua, pero funciona como un inductor de apoptosis en el primer caso y como un bloqueante de apoptosis en el último.

El conjunto de los datos presentados (figs. 14, 15 y 16) mostró que en este modelo la pérdida de capacidad metabólica y la generación de rupturas al ADN ocurrieron sin ruptura temprana de la membrana plasmática, lo que permitió descartar que la muerte celular hubiera ocurrido por un proceso de tipo necrótico. Los datos obtenidos sugirieron que ocurrió un proceso de muerte celular programada.

### V.I.2. Características generales de la toxicidad por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las PC12 "U"

Dado que se ha observado variabilidad en la sensibilidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre diversos tipos celulares, surgió la duda de si habría variabilidad entre diferentes cepas de una misma línea celular. Por ese motivo se comparó la sensibilidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de las células PC12 que se estaban utilizando en el Depto. de Neuroquímica del IIBCE (PC12 "I") y las que se estaban utilizando en un laboratorio de la Universidad Federal de Río de Janeiro (PC12 "U"). Sometidas a las mismas condiciones de cultivo, las células "U" presentaron menor sensibilidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (fig 17). Como en las PC12 "I", la muerte del 50 % de las células se acompañó de un aumento de rupturas del ADN, de modo que el índice de daño cambió de 140 a 430 aproximadamente, y ocurrió sin liberación temprana de lactato deshidrogenasa.

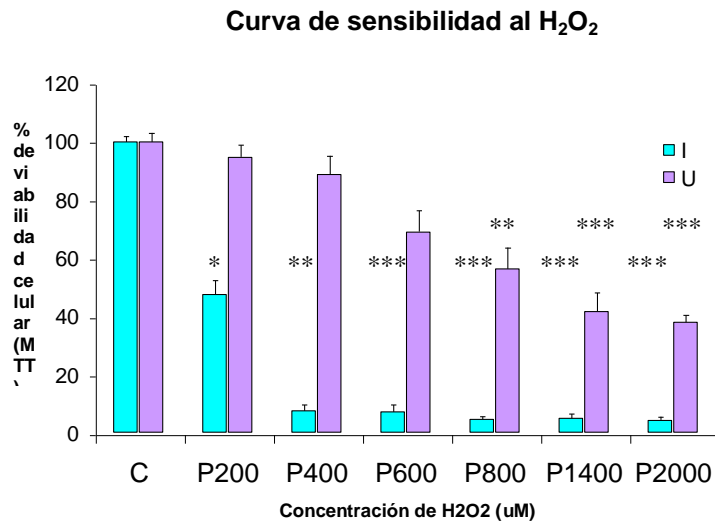


Fig. 17. Las células PC12 "U" fueron menos sensibles a un tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min que las células PC12 "I". Los datos son la media del porcentaje de viabilidad celular +/- el error estándar de acuerdo a la técnica del MTT. 6 < n < 16, 3 experimentos independientes. ANOVA no paramétrico y Dunn. Se indican las

### V.I.3. Experimentos farmacológicos y medidas de actividad enzimática indicarían que el papel de las caspasas-3,-6 y-9 sería diferente en las PC12 "I" y en las "U"

En experimentos farmacológicos, la preincubación con DEVD, VEID o LEHD, péptidos inhibidores de las caspasas -3,-6 y-9 respectivamente, bloqueó la muerte inducida por  $H_2O_2$  en las PC12"U" (fig 18).

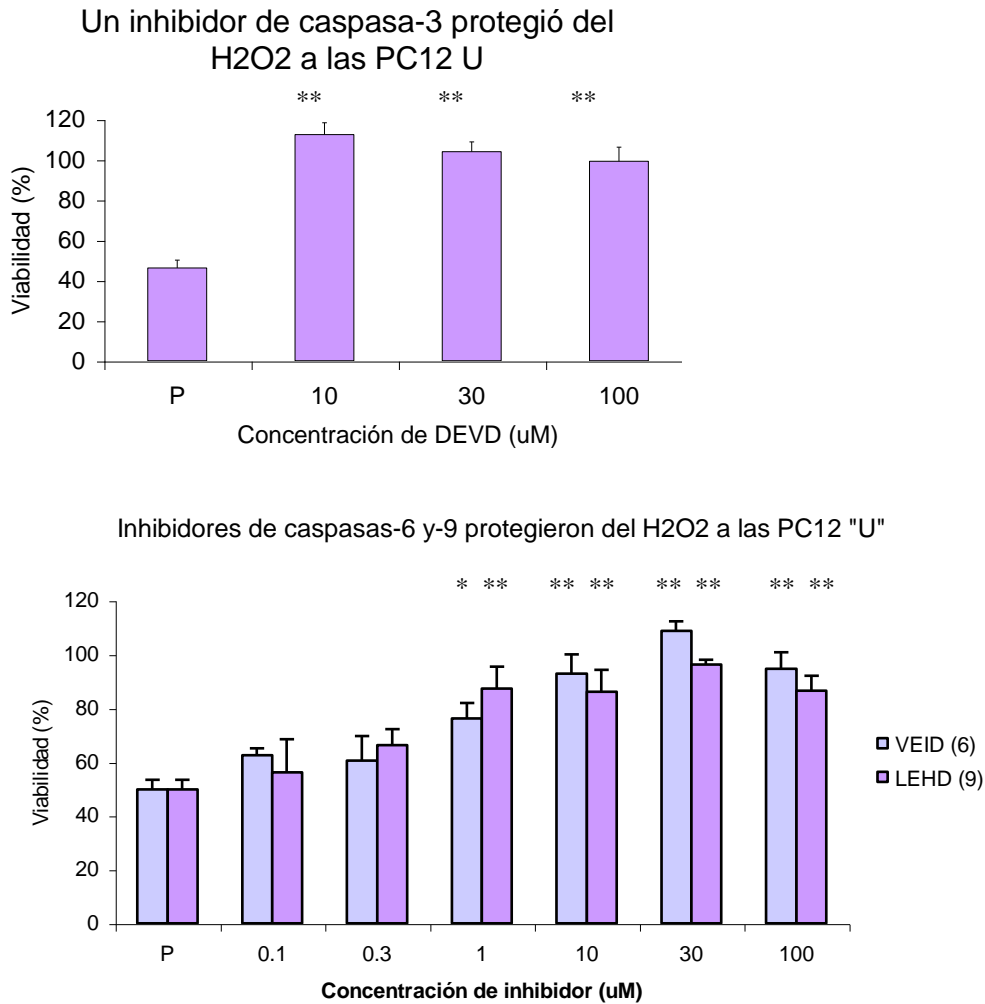
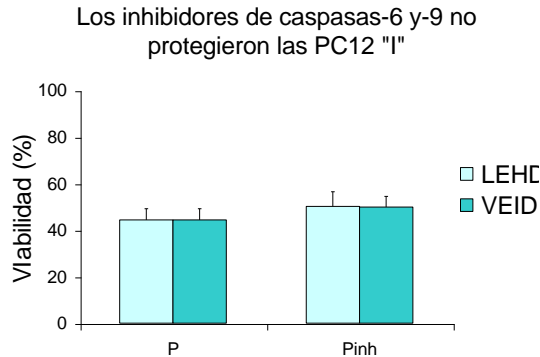


Fig. 18. Los inhibidores de caspasas 3, 6 y 9 bloquean la muerte celular por  $H_2O_2$  en las PC12 "U". Células pretratadas con los inhibidores de caspasas fueron expuestas al  $H_2O_2$  durante 30 minutos. Datos expresados como porcentaje del control que representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. El n total es

Existe consenso en cuanto a que si las caspasas están involucradas, la muerte celular programada se clasifica como apoptótica (Bredesen, 2000; Budihardjo y cols., 1999; Cohen, 1997; Zimmermann y Green, 2001). Hasta donde sabemos se ha descrito inhibición cruzada para inhibidores naturales (Snipas y cols., 2001) pero no para los sintéticos. Por lo tanto nuestros resultados sugieren que en condiciones bien definidas, al exponer a las PC12 "U" a un tratamiento moderado con  $H_2O_2$ , ocurrió muerte celular apoptótica y las tres caspasas estaban sobre la misma ruta bioquímica. Estos resultados concuerdan con los de Yamakawa y col (Yamakawa y cols., 2000) que sugieren que el citocromo c y la caspasa -9 inician la activación de la caspasa-3 en células PC12 tratadas con  $H_2O_2$ , y que Bcl-2 inhibe la liberación del citocromo c. En el mismo sentido, se ha encontrado activación jerárquica de caspasas incluyendo una vía caspasa-9, caspasa-3 y finalmente caspasa-6 (Granville y cols., 2001; Slee y cols., 1999b) que podría ser la que se activa en este caso.

En experimentos paralelos a éstos y a la misma densidad celular con las células PC12 "I", ni VEID ni LEHD consiguieron proteger del  $H_2O_2$  (fig. 19). Además, la actividad de las caspasas -3 y -6 no sólo no aumentó, sino que disminuyó en las PC12 "I" por efecto del  $H_2O_2$  (fig. 20).



*Fig.19. Los inhibidores de caspasas 6 y 9 (25  $\mu$ M) no bloquearon la muerte celular por  $H_2O_2$  en PC12 "I". Datos expresados como porcentaje del control que representan la media*

La interpretación más simple de éstos resultados sería que en las PC12 "U" la muerte celular depende de la activación en serie o "jerárquica" de las caspasas-9,-3 y -6, tal vez en ese orden como ha sido descrito (Granville y cols., 2001; Slee y cols., 1999b), en

tanto que en las PC12 "I" el  $H_2O_2$  inhibiría la actividad de estas caspasas y la muerte celular se produciría por alguna otra vía que presentaría mayor sensibilidad al  $H_2O_2$ . Sin embargo, no se puede descartar que exista una diferencia de sensibilidad a los inhibidores de caspasas entre ambas cepas, de modo que queda abierta la posibilidad de probar otras dosis. Por otra parte, dado que, si bien se tiende a pensar que la medida de actividad enzimática de caspasas *in vitro* refleja lo que estaba ocurriendo en las células, puede ocurrir (Kottke y cols., 2002) que las caspasas estén clivadas (y por lo tanto activadas), pero estén agregadas y sean secuestradas en una fracción no citosólica que es descartada a los efectos de realizar el ensayo de actividad. Por estos motivos los datos sugieren, pero no permiten asegurar, que la muerte de las PC12 "I" no depende de la activación de las caspasas mencionadas.

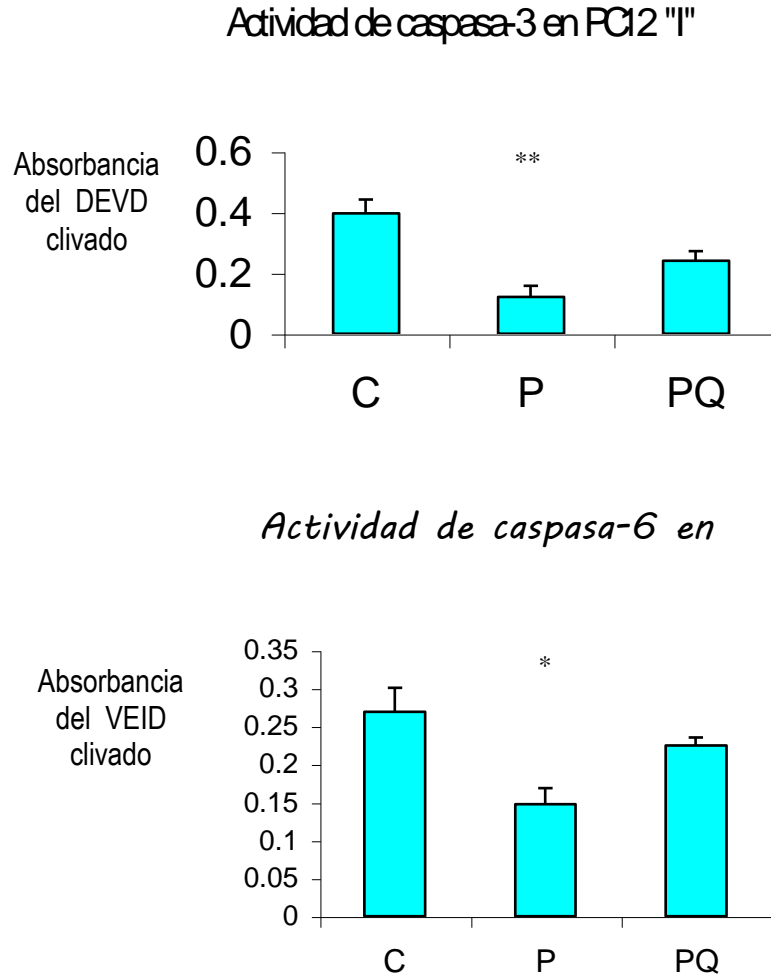


Fig. 20. El  $H_2O_2$  disminuyó la actividad de las caspasas -3 y -6 en las PC12 "I". Los datos son medias  $\pm$  error estándar de medidas por duplicado de c/u de 2 exp

#### V.I.4. Exploración en ambas cepas de la participación de mecanismos autofágicos de muerte celular

La preincubación con 3-MA bloqueó la muerte celular inducida por  $H_2O_2$  en las PC12 "U" (fig. 21) pero no tuvo efecto en las PC12 "I" (fig. 22).

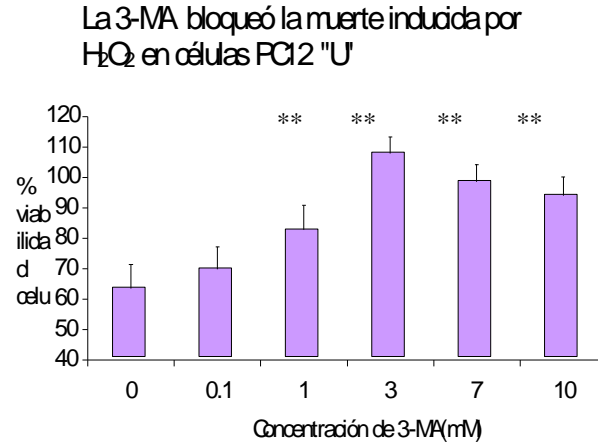


Fig.21. La 3-MA bloqueó la muerte celular por  $H_2O_2$  en PC12 "U" Células pretratadas con 3-MA expuestas a  $H_2O_2$  durante 30 minutos. Datos expresados como porcentaje del control que representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. El n total

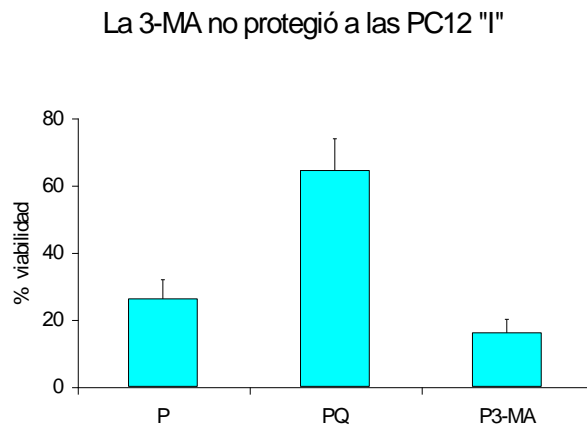


Fig 22. La 3-MA (3 mM) no tuvo efecto en las PC12 "I". Media  $\pm$  SEM de 4

Dado que la 3-MA previene la formación de los autofagosomas (Punnonen y Reunanen, 1990; Telbisz y Kovacs, 2000) es generalmente utilizada como un inhibidor de la autofagia y como una herramienta para definir si la autofagia está involucrada en el proceso de muerte celular (Caro y cols., 1988; Sandvig y van Deurs, 1992; Uchiyama, 2001).

### V.I.5. Caracterización de la muerte celular en las células PC12 de ambos clones

El agregado de  $H_2O_2$  extracelular es un modelo aceptado para estudiar el EO (Hoyt y cols., 1997; Janero y cols., 1991; Kuhlmann y cols., 1998; Whittemore y cols., 1994). Se ha descrito que sus efectos dependen del tipo celular (Calderón y cols., 1999) y de la dosis (Davies, 1999). En el presente trabajo se muestra que pueden existir diferencias de sensibilidad al  $H_2O_2$  entre cepas de una misma línea celular: la concentración de  $H_2O_2$  necesaria para inducir la muerte de aproximadamente el 50% de las células PC12, fue diferente para las células PC12 "I" (200  $\mu M$ ) y para las PC12 "U" (800  $\mu M$ ), sugiriendo que tal vez hubiese diferencias entre ambas cepas en el mecanismo de acción del  $H_2O_2$ .

En ambos subtipos de células PC12 la pérdida de capacidad metabólica y la fragmentación del ADN ocurrieron sin ruptura temprana de la membrana plasmática, lo que permitió descartar que la muerte celular hubiera ocurrido por un proceso de tipo necrótico y sugirió que había ocurrido muerte celular programada.

Los efectos del  $H_2O_2$  en las células PC12 "I" a baja o alta densidad no fueron alterados por inhibidores específicos de caspasas-6 o-9, y la actividad de las caspasas-3 y-6 disminuyó en presencia de  $H_2O_2$ . Estos datos sugirieron que en estas células no estaría ocurriendo apoptosis dependiente de las caspasas de la vía mitocondrial.

Las PC12 "U" sí fueron protegidas tanto por inhibidores de las caspasas -3,-6 y-9 de la vía de apoptosis mitocondrial como por el inhibidor de autofagia, la 3-MA. Los resultados mostraron por primera vez que la 3-MA inhibió la muerte celular inducida por  $H_2O_2$ . Se considera que la participación de caspasas es característica de la apoptosis y que la 3-MA es un criterio bioquímico válido para diagnosticar muerte por autofagia. De acuerdo con estos criterios, los datos obtenidos señalarían que en esta cepa celular estarían involucrados ambos procesos. Por lo tanto podría tratarse de muerte apoptótica bloqueable por 3-MA, muerte autofágica caspasa-dependiente o un proceso híbrido, "apo-autofágico". La similitud de este proceso con la muerte celular inducida en células PC12 por privación de suero y en neuronas simpáticas por privación de NGF, que han sido estudiadas morfológicamente, sugiere que probablemente la autofagia se haya inducido antes que los cambios nucleares típicos (Ohsawa y cols., 1998) y que la 3-MA actuaría antes de la liberación del citocromo c y de la consecuente activación de las caspasas (Xue y cols., 1999).



## V.II: Citotoxicidad de la quercetina

En nuestros estudios, la quercetina mostró toxicidad a una concentración de 250  $\mu\text{M}$ , de acuerdo al ensayo del MTT (fig. 23).

Numerosos autores han demostrado que a altas concentraciones la quercetina posee efectos tóxicos, consistentes en la inhibición de la multiplicación celular (Iwao y Tsukamoto, 1999; Larocca y cols., 1991) y la inducción de muerte celular. Su posible efecto genotóxico, en el caso de que accediera al núcleo celular, podría explicarse por oxidación y generación de rupturas al ADN (Rahman y cols., 1990; Yamashita y cols., 1999). Por otra parte, en experimentos *in vitro* se ha descrito que la quercetina puede unirse a la albúmina bovina (BSA) e inducir su fragmentación y se ha sugerido que el mismo fenómeno podría ocurrir con otras proteínas (Ahmed y cols., 1994).

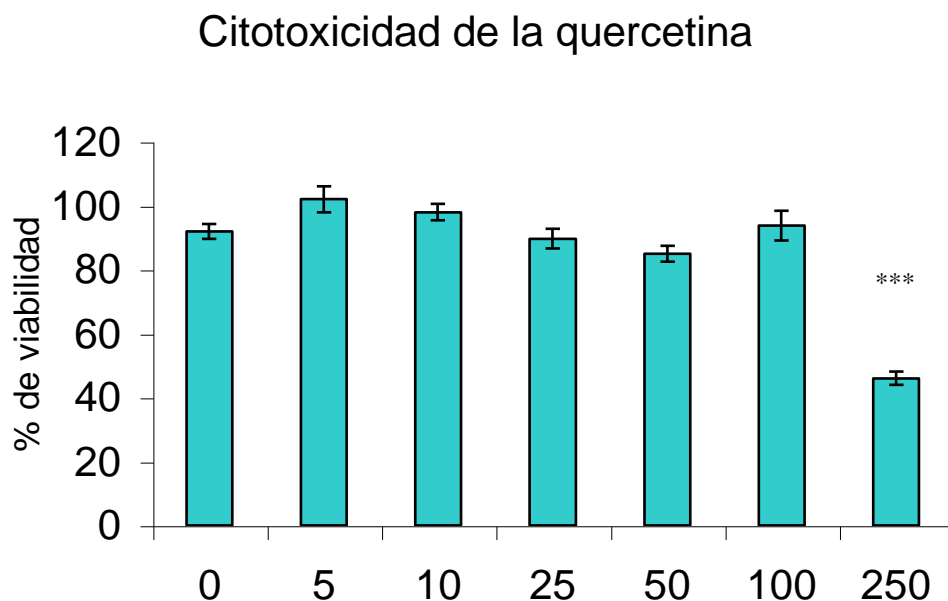


Fig. 23. Estudio de la citotoxicidad de la quercetina. Se realizó un tratamiento de 30 min y se midió 2 hs más tarde. Varios experimentos independientes, con  $n > 70$  excepto

A los efectos de proteger frente al  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se utilizaron concentraciones de quercetina no citotóxicas.

### V.III: Caracterización de la protección por quercetina.

#### V.III.1. El pretratamiento con quercetina aumentó la viabilidad de las células PC12 expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

El pretratamiento con quercetina fue efectivo para aumentar la viabilidad en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; fue igualmente efectivo agregar la quercetina 2 hs antes o inmediatamente antes del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cuando la quercetina se agregó y se lavó cambiando el medio, protegió un 30% menos de la población celular. El postratamiento con quercetina no produjo efectos a las mismas dosis. En conjunto, esta información indica que para proteger, la quercetina debía estar presente en el cultivo en el momento en el cual se agregaba el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En ninguno de los protocolos mencionados se detectó un efecto significativo del vehículo en el que se disuelve la quercetina (DMSO a concentración final 1,25 %); la viabilidad del control fue siempre similar a la del control con vehículo y la del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue siempre similar a la del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + vehículo (PV).

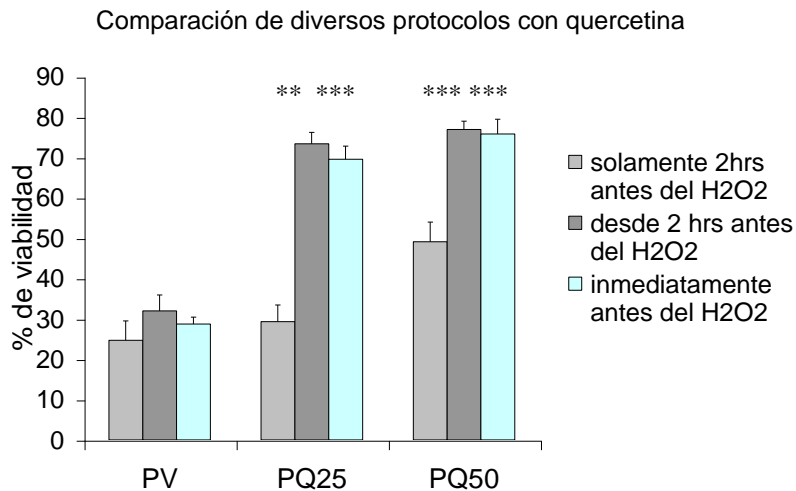


Fig. 24. La quercetina protegió siendo agregada 2 hrs antes o inmediatamente antes del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y mostró tendencia a proteger si se agregaba 2 hrs antes y se cambiaba el medio antes de adicionar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. · PV: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + vehículo (DMSO 1,25%); PQ25: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + quercetina 25 uM; PQ50: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + quercetina 50 uM 4 experimentos independientes,

Las poblaciones celulares se mostraron estables entre las 2 y las 6 hs posteriores al tratamiento con  $H_2O_2$ . En ese tiempo no se agudizaron los efectos del mismo ni disminuyeron los efectos de la quercetina (fig. 25). Aparentemente, la quercetina no retardaría sino que impediría la muerte celular por  $H_2O_2$ .

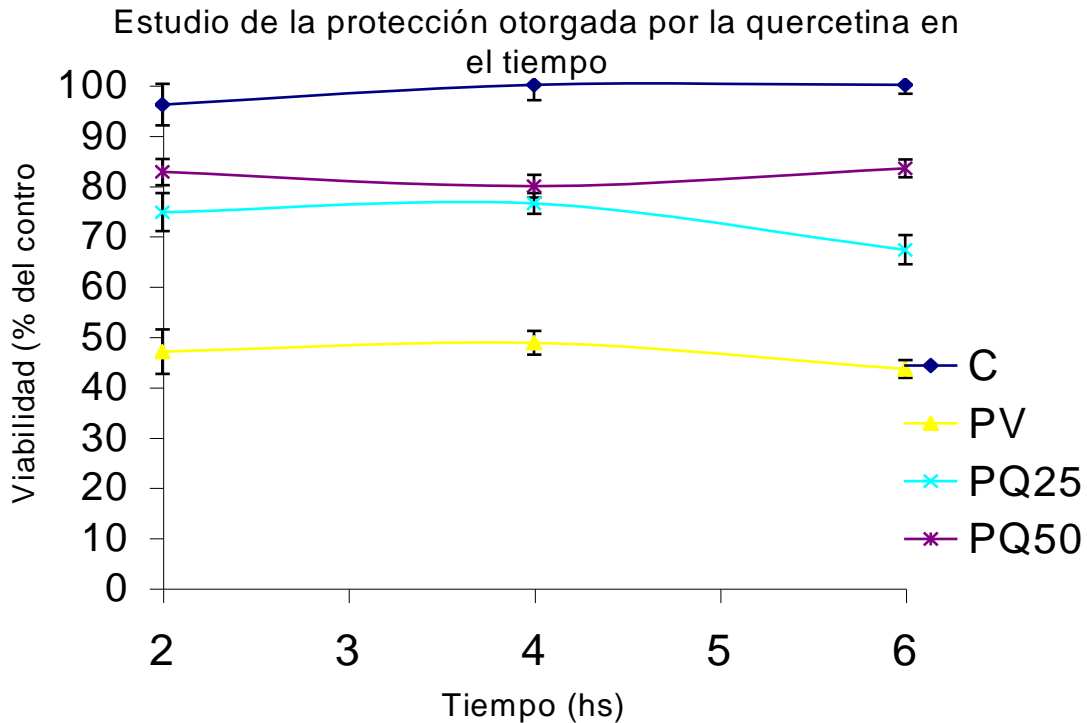


Fig 25. El estudio en una ventana temporal de 6 hs muestra que la quercetina efectivamente protege y no retarda la muerte celular por  $H_2O_2$ . Son 2 exp, con  $n > 22$  para cada punto.

Varios autores han descrito efectos citoprotectores de la quercetina frente al  $H_2O_2$  en diversos sistemas celulares (Duthie y Dobson, 1999; Ishikawa y Kitamura, 2000; Kitamura y Ishikawa, 1999; Nakayama y cols., 1993; Sanderson y cols., 1999) incluso si éste se genera intracelularmente (Pignatelli y cols., 2000). Los resultados del presente estudio demuestran por primera vez este fenómeno en células PC12.

**V.III.2. El pretratamiento con quercetina disminuyó el daño al ADN de manera dosis-dependiente**

El índice de daño al ADN disminuyó en presencia del vehículo, que no había aumentado la viabilidad celular (fig. 26 A). Sin embargo, el vehículo no disminuyó significativamente el porcentaje de células que presentaron rupturas al ADN (fig. 26 B).

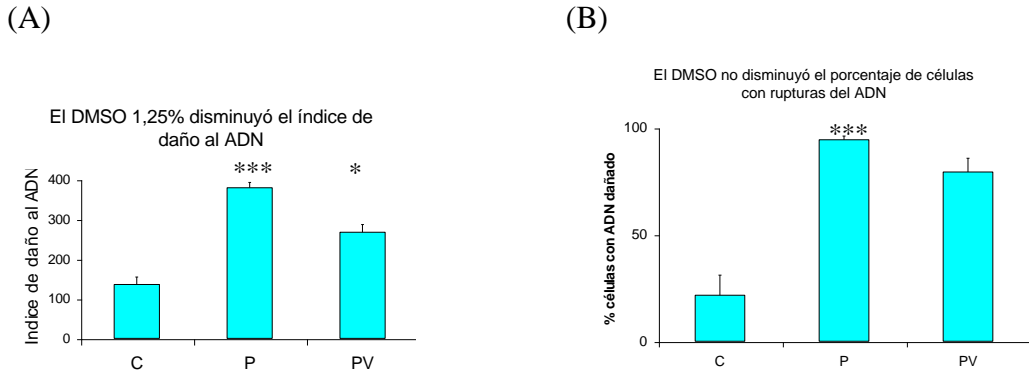


Fig. 26. Efecto del pretratamiento con vehículo (DMSO 1,25%) sobre las rupturas al ADN según el ensayo cometa. 6 experimentos independientes, n>16 Los resultados se expresan: (A) como índice de daño al ADN ± error estándar. ANOVA paramétrico y Tukey. P es significativamente diferente de C o PV de D. (B): como porcentaje de

Para visualizar mejor su efecto, se muestra la distribución de las células según su grado de daño al ADN (fig.27). Se puede apreciar que el vehículo suavizó el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre el ADN. El efecto de la quercetina fue más pronunciado, ya que cambió la distribución de los grados de daño en la población (fig. 27C), disminuyendo no sólo el índice de daño (fig. 28 A), sino el porcentaje de células que presentaron el ADN dañado (fig. 28 B).

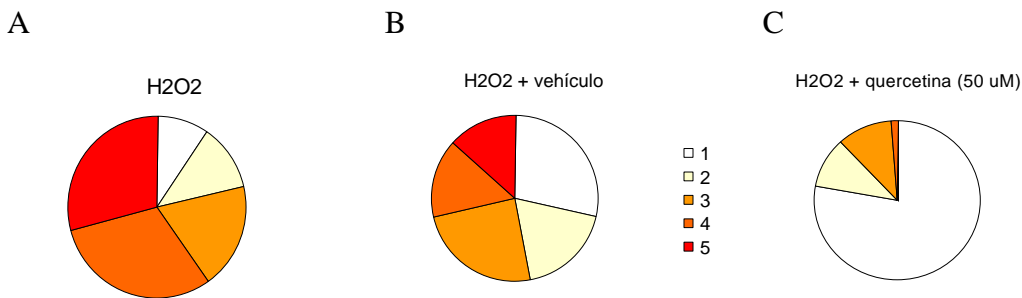


Fig. 27. Comparación de la distribución del grado de rupturas del ADN en poblaciones celulares tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u vehículo (B) o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u

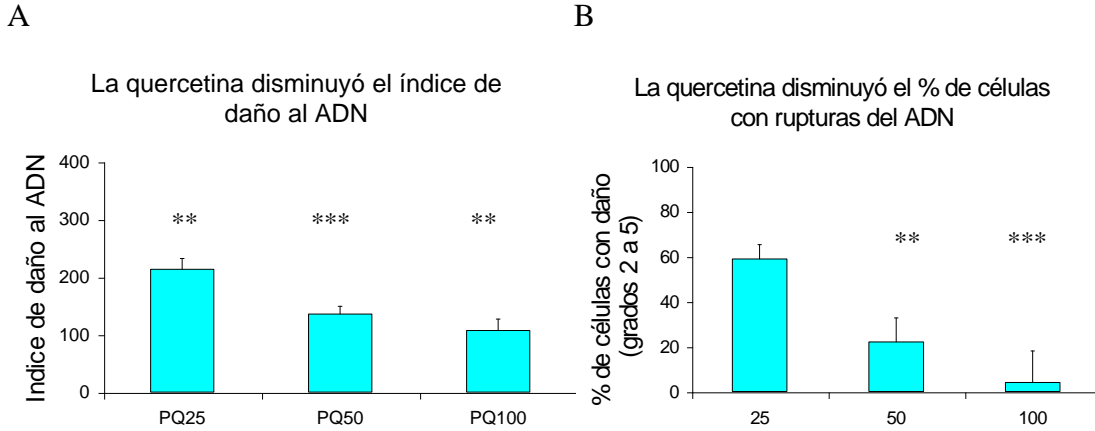


Fig. 28. Efecto dosis-dependiente del pretratamiento con quercetina sobre las rupturas al ADN según el ensayo cometa. 2 a 4 experimentos independientes. Para PQ25,  $n=8$ ; PQ50:  $n=4$ ; PQ100:  $n=2$ . Los resultados se expresan:

(A) como índice de daño al ADN  $\pm$  error estándar. ANOVA paramétrico y Tukey

(B) como porcentaje de células que presentaron daño. Error estándar. ANOVA

Los resultados del cometa se interpretan esquemáticamente en la fig. 29: el vehículo cambió ligeramente la distribución del daño inducido por  $H_2O_2$ , y la quercetina la cambió de forma mucho más pronunciada. Dado que el vehículo es DMSO, un antioxidante que puede reaccionar con el  $H_2O_2$ , es posible proponer que su presencia disminuya los niveles de  $H_2O_2$  lo suficiente como para proteger ligeramente el ADN, pero no como para disminuir el número de células con rupturas del ADN o como para aumentar la viabilidad celular.

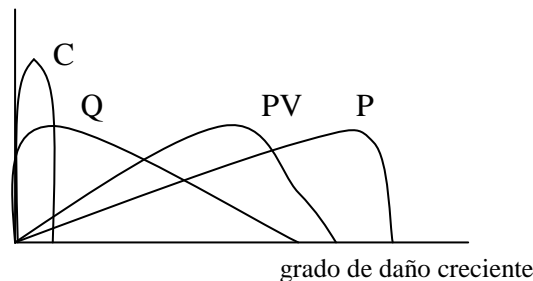


Fig. 29. Esquema de las distribuciones del daño al ADN en relación a los tratamientos. interpretativo de los datos del

Se ha descrito que la quercetina protege el ADN de varios tipos celulares del daño inducido por  $H_2O_2$  (Duthie y Dobson, 1999; Musonda y Chipman, 1998; Noroozi y cols., 1998; O'Brien y cols., 2000), pero nuestros resultados son los primeros en células PC12.

## V.IV: Estudio de algunos mecanismos de toxicidad del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de protección por la quercetina

### 1ª PARTE: Relaciones estructura-actividad

#### V.IV.1. Relaciones de estructura-actividad en nuestro modelo

Se administraron varios flavonoides de estructura similar a la quercetina inmediatamente antes del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Algunos de ellos brindaron protección, aumentando la viabilidad (fig. 30, izquierda) y disminuyendo el índice de daño al ADN y el porcentaje de células cuyo ADN presentaba daño (fig. 31, izquierda).y otros no mostraron efecto a las concentraciones usadas (figs. 30 y 31, derecha). Otro grupo de flavonoides, que incluyó la apigenina, la crisina la rutina fueron testados solamente en el ensayo de viabilidad, y ninguno de ellos mostró protección frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

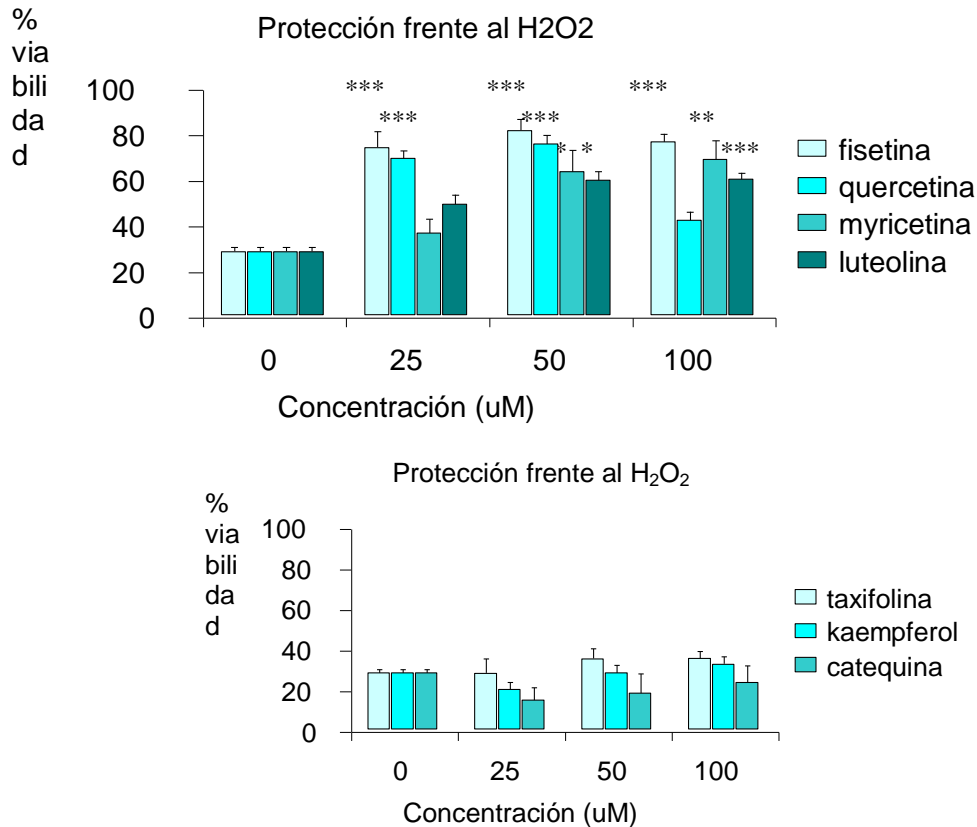


Fig 30. Viabilidad de células PC12 "I" tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de diversos flavonoides, de acuerdo al ensayo del MTT. Se muestra la media del % de viabilidad ± el error estándar. Se realizaron 3 experimentos independientes. Total n>120 para C, P y O:

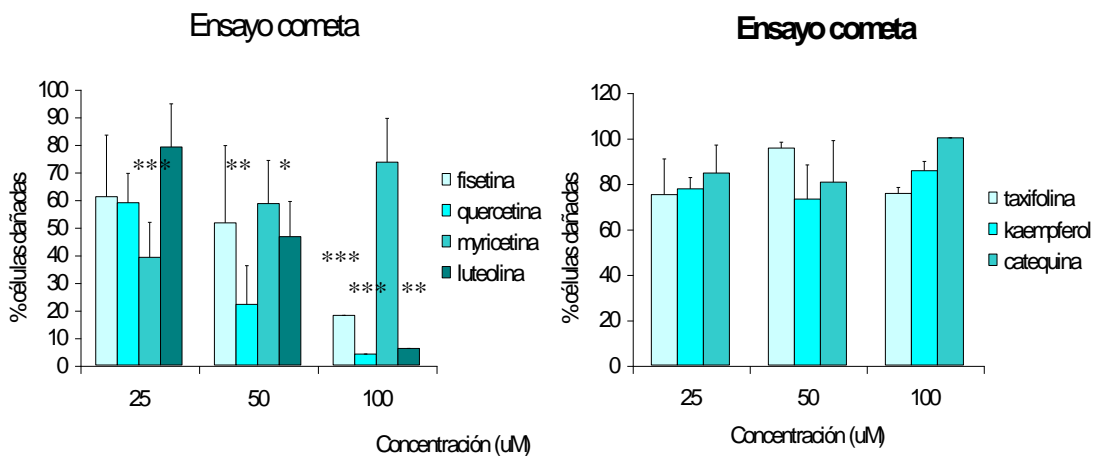


Fig. 31. Algunos flavonoides protegieron del daño al ADN por  $H_2O_2$ . Por lo menos 2 experimentos independientes,  $n > 2$ . Los resultados se expresan como porcentaje de células dañadas. Los flavonoides protectores se expresan en verde y los no protectores en rojo.

Se compararon los efectos de la quercetina y de flavonoides similares a dosis similares. En una ventana de 0 a 100  $\mu\text{M}$ , resultaron protectores celulares según el ensayo del MTT y disminuyeron las rupturas al ADN y el porcentaje de células con daño al ADN la quercetina, la fisetina, la luteolina y la myricetina, en tanto que el kaempferol, la taxifolina y la catequina no tuvieron efecto. Otros flavonoides (rutina, apigenina, chrysin) se estudiaron solamente en el ensayo de MTT, en el cual no resultaron protectores.

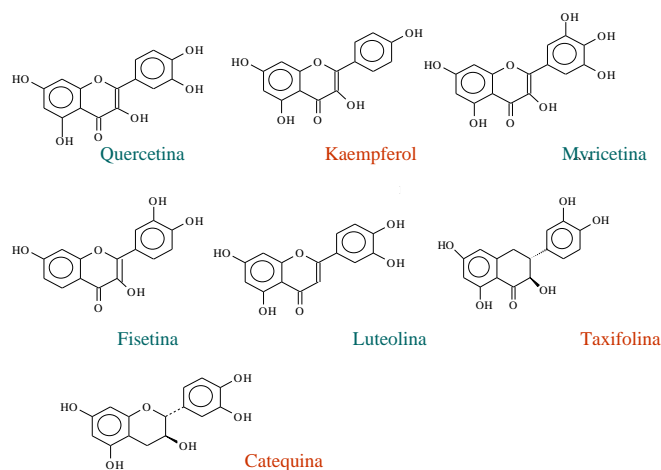


Fig. 32. Los requerimientos estructurales para la protección celular son los mismos que los requerimientos para disminuir el porcentaje de imágenes de cometa. Se representan con su nombre escrito en verde los flavonoides protectores y en rojo los no protectores. De su comparación se deduce que son esenciales el catecol del anillo B

La capacidad protectora se perdió si faltaba el catecol del anillo B (ver kaempferol), o si faltaba el doble enlace en conjugación con la función oxo del anillo C (ver taxifolina y catequina, así como apigenina y crisina). Estos requerimientos estructurales son los mismos que destacan Wang y Joseph (Wang y Joseph, 1999) como necesarios para antagonizar la desregulación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{H}_2\text{O}_2$  en células PC12. Por otra parte, nuestros datos indicaron que la falta de los hidroxilos 3 del anillo C y 5 del anillo A, no afectó la capacidad protectora (ver luteolina y fisetina) en tanto que un rutinósido en posición la posición 3 del anillo C provocó pérdida de la misma, sugiriendo que un rutinósido en dicha posición podría constituir un impedimento estérico.

En varios tipos celulares se han encontrado resultados concordantes con los que aquí se presentan. Ishige y cols (2001) encontraron en una línea celular de hipocampo (HT-22) que la quercetina, la luteolina y la fisetina bloquean casi completamente la toxicidad del  $\text{H}_2\text{O}_2$  evaluada por MTT, en tanto que la catequina y la crisina no son efectivas. Asimismo, se han encontrado efectos citoprotectores y protectores del ADN de la quercetina y la myricetina pero no del kaempferol en células Caco-2 y HepG2 (Duthie y Dobson, 1999; O'Brien y cols., 2000). También existen modelos con requerimientos estructurales diferentes; por ejemplo, en células V79 de hámster chino, tanto la quercetina como el kaempferol, en dosis bajas, suprimen la citotoxicidad del  $\text{H}_2\text{O}_2$  de acuerdo a un ensayo de formación de colonias (Nakayama y cols., 1993).

Otro aspecto que interesa destacar es que en los datos de los flavonoides protectores no siempre hubo concordancia en términos de dosis-respuesta entre la capacidad protectora celular y la capacidad protectora del ADN de acuerdo al ensayo cometa. Así, la quercetina 100  $\mu\text{M}$ , que no es citoprotectora, disminuiría las rupturas en el ADN, en tanto que la myricetina a concentraciones 50 o 100  $\mu\text{M}$  es protectora celular y no disminuyó las rupturas del ADN. Esta discrepancia, que no era el resultado esperado, podría explicarse si los flavonoides tuviesen acceso al núcleo celular, dado que la quercetina es un agente intercalante del ADN (Solimani, 1996; Yamashita y cols., 1990) y se ha descrito que agentes intercalantes pueden tanto promover la hipercondensación de la cromatina mediante cross-links (lo que explicaría el efecto de la quercetina) como inducir rupturas del ADN (lo que podría explicar el efecto de la myricetina) (Henderson y cols., 1998; Jesson y cols., 1989; Liu y Bao, 1996; Stallings y cols., 1984).



Por el momento, se puede concluir que los requerimientos estructurales de los flavonoides para proteger frente al  $H_2O_2$  coincidieron con los requerimientos para disminuir los cometidos observados, y que esto último podría significar que verdaderamente están protegiendo el ADN, o que están estableciendo puentes (cross-links) entre las hebras de ADN, de modo que aunque estén rotas, no se separan.

#### V.IV.2. En las PC12 "U", protegieron los mismos flavonoides que en las PC12 "I"

En las células PC12 "U" a concentración  $50 \mu M$ , aumentaron la viabilidad en presencia de  $H_2O_2$  la fisetina, la myricetina y la luteolina, en tanto que el kaempferol, la catequina y la taxifolina no presentaron efecto.

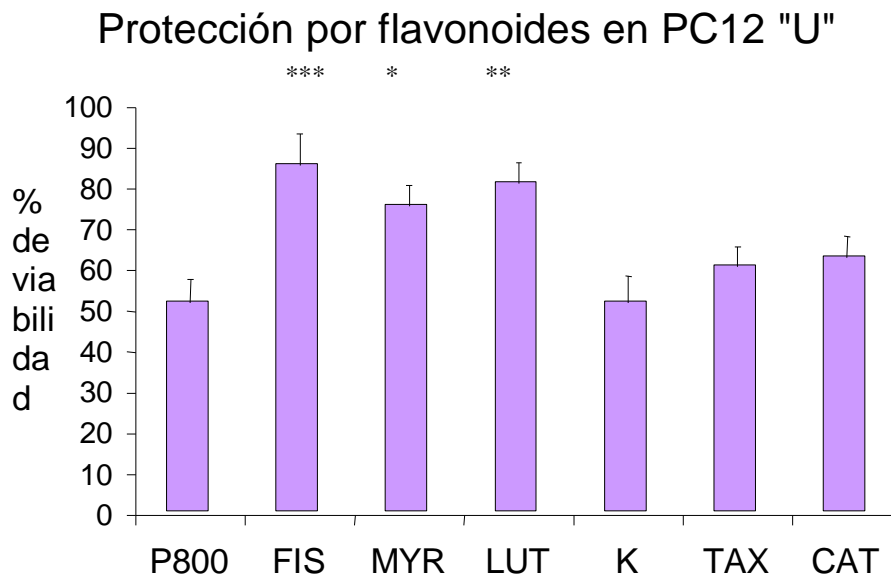


Fig. 33. En las PC12 "U", resultaron protectores a  $50 \mu M$  los mismos flavonoides que en PC12 IIBCE. 2 exp,  $n=14$ . ANOVA PARAMETRICO y Dunn

### V.IV.3. Propiedades estructurales de la quercetina y comparación con otros flavonoides

Como se aprecia en la fig. 34, si bien la conformación plana de la quercetina es la más estable, la energía necesaria para la rotación en torno a un diedro es muy baja; por lo tanto la molécula se considera flexible; su estabilidad varía más según la presencia o ausencia de enlaces de hidrógeno intramoleculares, que según el valor de dicho diedro.

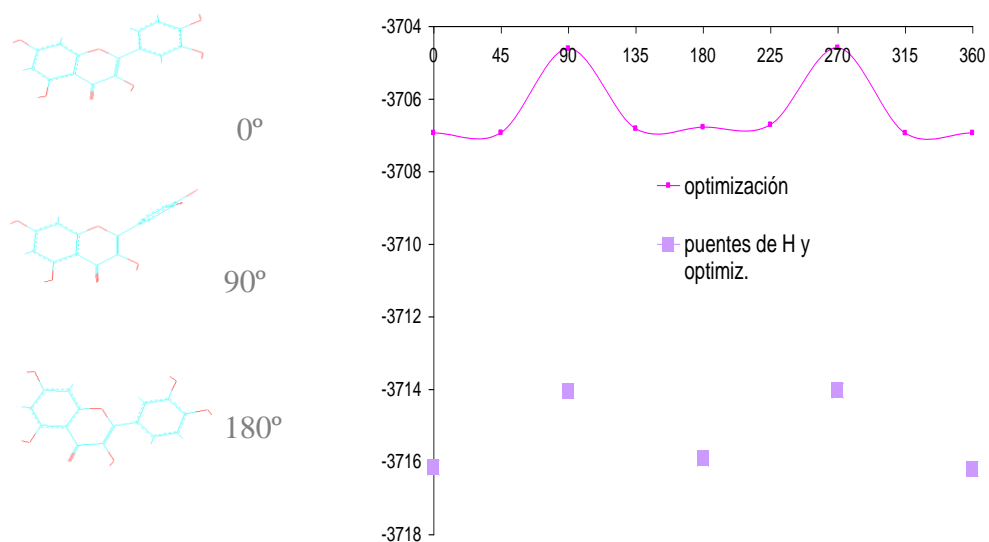
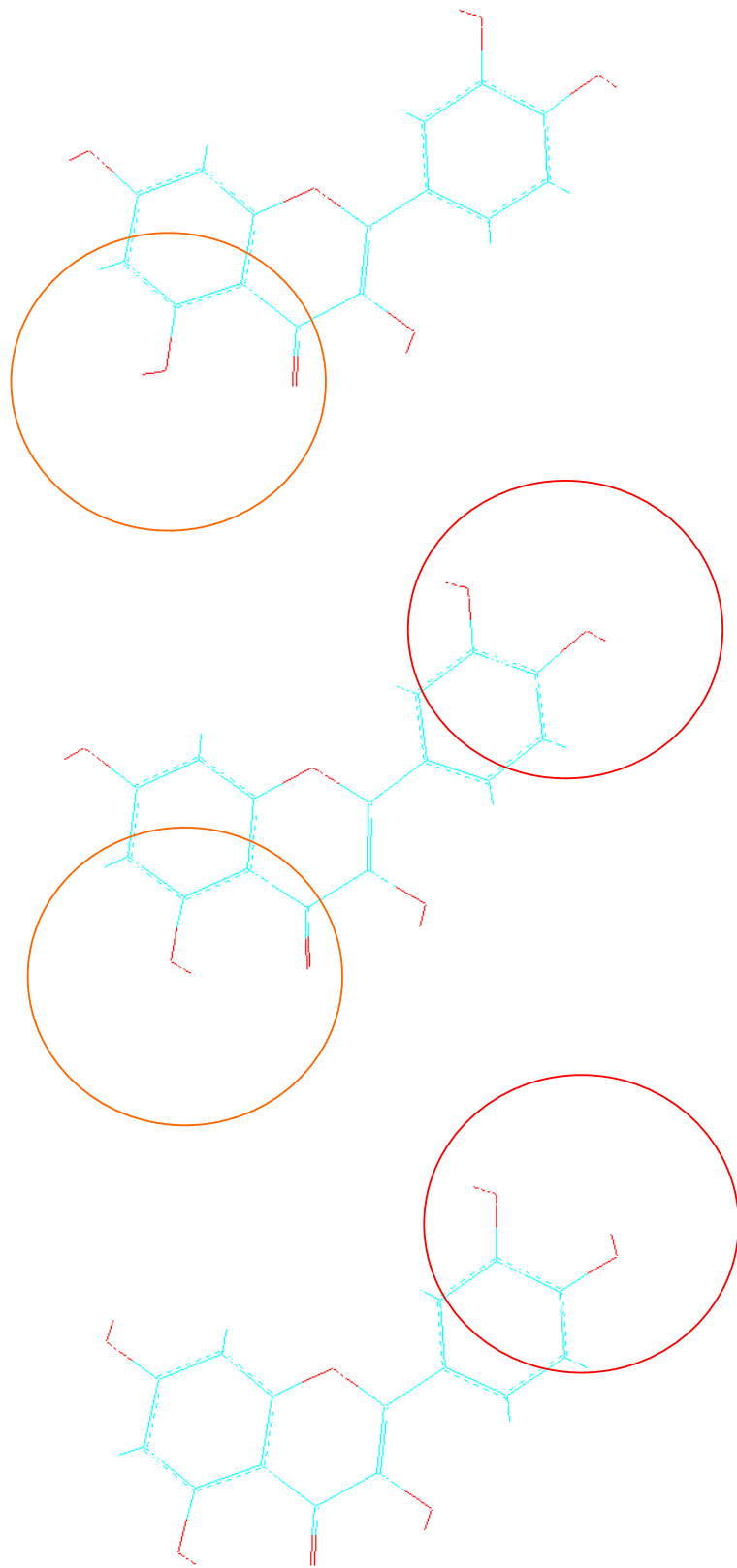
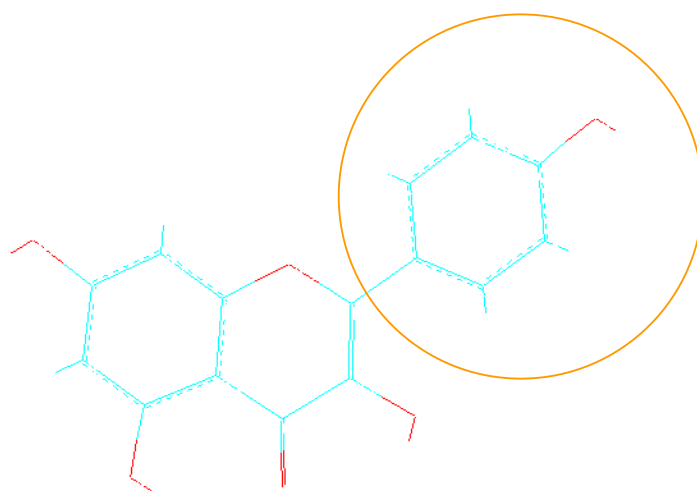


Fig. 34. Variaciones de la energía libre de la quercetina en función del diedro  $b$  y de la presencia / ausencia de enlaces de hidrógeno intramoleculares.

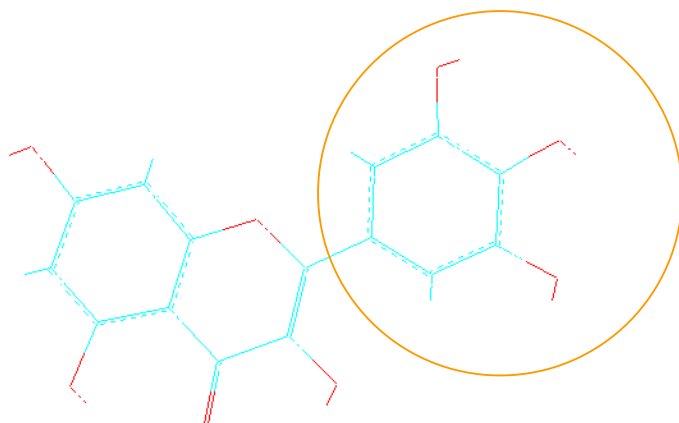
Las cargas parciales sobre los átomos no son afectadas por la rotación (no se muestra), y sólo son afectadas localmente por la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares (fig. 35).

Comparando la quercetina con otros flavonoides, se ve que la presencia /ausencia de hidroxilos también afecta solamente las cargas locales (fig. 36) La forma plana del anillo C depende de la presencia del doble enlace 2-3 que la taxifolina y la catequina no tienen (fig. 37).

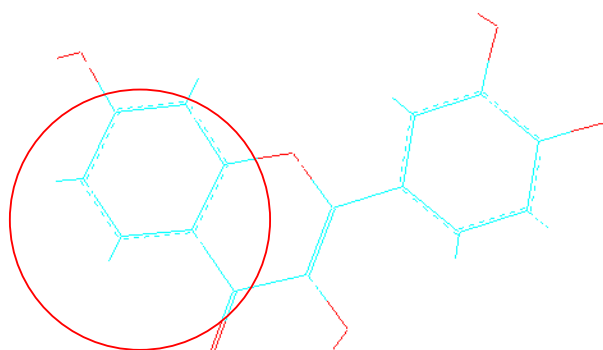




KAEMPFEROL

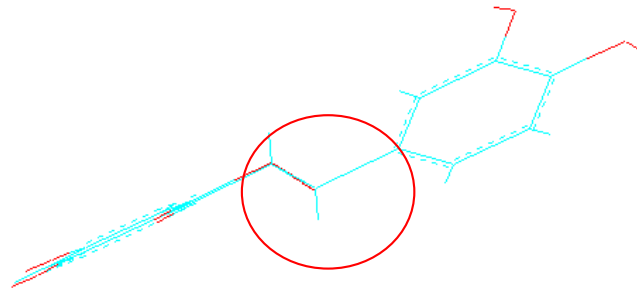


MYRICETINA

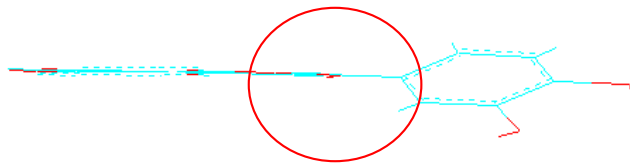


FISETINA

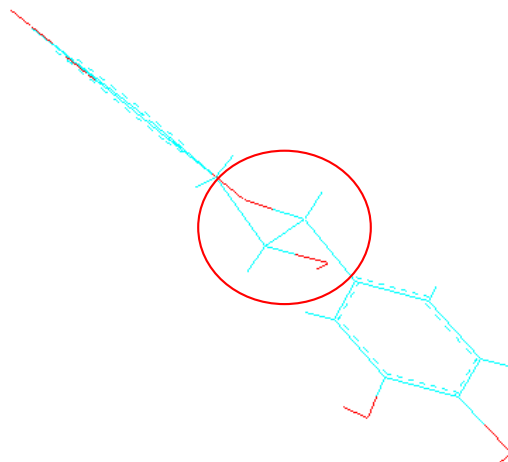
Fig. 35. Las cargas parciales de los átomos de la quercetina son afectados por los puentes de hidrógeno intramoleculares sólo localmente (las circunferencias encierran los átomos que sufren cambios).



TAXIFOLINA



QUERCETINA



CATEQUINA

Fig. 37. La falta del doble enlace altera la geometría del anillo C.

Wang y Joseph (Wang y Joseph, 1999) ya mostraron que las diferencias en capacidad protectora no pueden explicarse por diferencias en la hidrofobicidad de los flavonoides. Aquí se muestra que si bien se considera habitualmente que la presencia del doble enlace 2-3 mantiene la molécula plana, la energía de rotación es baja y por lo tanto el anillo B rota libremente; que la distribución de cargas sólo varía localmente con los sustituyentes y que la forma de la molécula es diferente en el anillo C para la catequina y la taxifolina, pero no para el kaempferol. En conjunto, este análisis sugiere que el catecol del anillo B es importante porque modifica las cargas locales en tanto que el doble enlace en conjugación con la función oxo del anillo C podría ser importante por motivos de carga local o de forma del anillo C.

Algunas implicancias de las relaciones de estructura-actividad que se han presentado, serán discutidas más adelante. Bajo el supuesto de que los flavonoides que protegen lo hacen por el mismo mecanismo de acción, tiene sentido comparar estas relaciones con relaciones de estructura-actividad de capacidad secuestradora, quelación del  $\text{Fe}^{2+}$ , actividad estrogénica, etc., como las que se han descrito en la introducción del presente trabajo, para inferir si esas actividades podrían o no ser claves para la protección.

## 2ª PARTE: Exploración de posibles mecanismos de protección por quercetina

### V.IV.4. Reacción directa de la quercetina con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Como se muestra a continuación, los espectros de absorción y de emisión de la quercetina (figs. 38 y 39) no cambiaron en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se probó el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a concentraciones en las cuales induce muerte celular, y la quercetina a concentraciones protectoras.

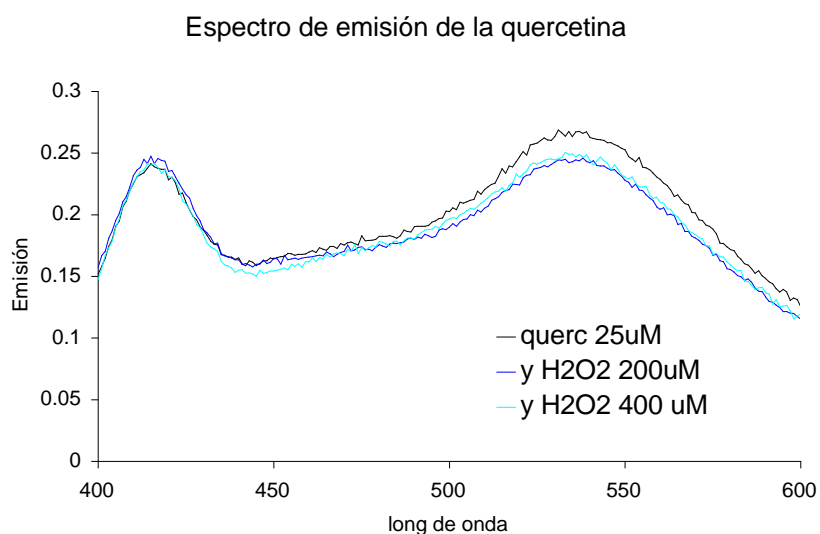


Fig. 38. Espectro de emisión de la quercetina en DMSO-agua, excitando a 370 nm, que no cambió significativamente en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

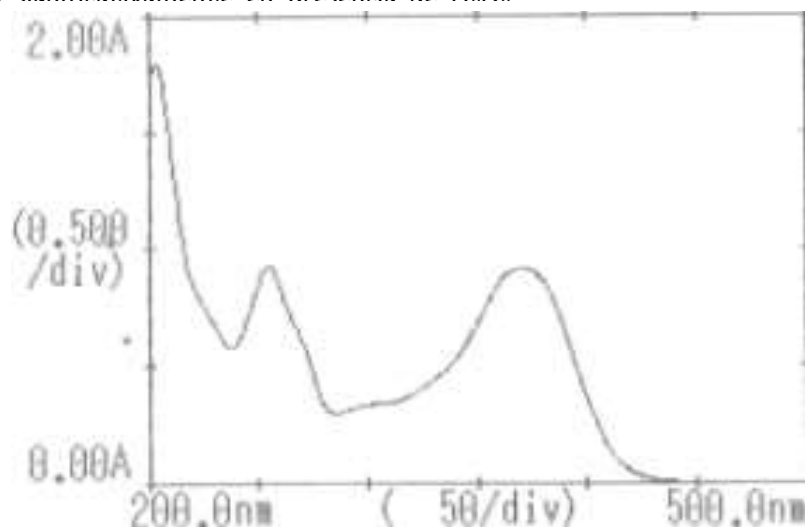


Fig. 39. Espectro de absorción de la quercetina 50  $\mu$ M en metanol 50%, que no cambió en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Ya existían indicios de que la quercetina no reaccionaría con el  $H_2O_2$ . Hanasaki y cols. (Hanasaki y cols., 1994) informaron que ni la quercetina ni otros flavonoides funcionaron como secuestradores de  $H_2O_2$  en un sistema de tipo Fenton. Por otra parte, en un ensayo muy sensible que mide la concentración de  $H_2O_2$  a través del consumo de escopolitina (molécula fluorescente que pierde dicha propiedad al oxidarse por el  $H_2O_2$  en presencia de peroxidasa) no se detectó una disminución significativa de la concentración de  $H_2O_2$  en presencia de quercetina, estando éstos en relación molar 2:1 (Freitas, 2000).

Los resultados del presente trabajo conducen a descartar la hipótesis de que la quercetina proteja por interacción directa con el  $H_2O_2$ , dado que:

- (1) para trabajar con células PC12 "I" a alta densidad celular o con las células PC12 "U" se aumentó la concentración de  $H_2O_2$  de 4 a 6 veces, pero la concentración protectora de quercetina fue la misma;
- (2) los espectros de absorción y de emisión del  $H_2O_2$  no cambiaron en presencia de quercetina.

#### **V.IV.5. Capacidad secuestradora de radicales libres en general y de ROS en particular**

El orden de potencia secuestradora en el ensayo de TEAC (Ishige y cols., 2001), que refleja la capacidad del flavonoide como quencher de radicales libres "cualesquiera" en solución acuosa, es quercetina > catequina > taxifolina = myricetina > kaempferol (ver tabla 4). Si la clave para la protección celular en nuestro modelo fuera la capacidad secuestradora, la taxifolina debería proteger tanto como la myricetina, y la catequina debería proteger más que ambos, lo que no ocurre.

En cuanto a la capacidad secuestradora de ROS, los mismos autores informaron que es similar para la quercetina y el kaempferol (tabla 4), por lo cual tampoco se correlaciona con la capacidad protectora de los compuestos en nuestro sistema.

Se han presentado datos de capacidad secuestradora aún más específica. Con relación a los radicales  $OH\cdot$  se ha demostrado (tabla 5) que la quercetina no sólo no disminuye, sino que aumenta la producción de los mismos en un sistema de tipo Fenton (Hanasaki y cols., 1994) probablemente por autooxidación. Por otra parte, con relación a



radicales  $O_2^{\cdot-}$ , se ha demostrado que la quercetina no es secuestradora de los mismos. (Selloum y cols., 2001).

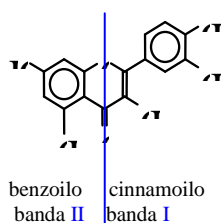
Tomando en cuenta los resultados experimentales que aquí se presentaron, los resultados de capacidad secuestradora de radicales de los flavonoides disponibles en la literatura que se han citado, y consideraciones de estructura-actividad, se concluye que ni la capacidad secuestradora en general, ni la capacidad secuestradora de ROS explicarían la protección por quercetina.

#### V.IV.6. Coordinación con cationes bivalentes

Se ha postulado que uno de los efectos de la quercetina puede ser formar complejos con cationes bivalentes. Se eligió estudiar la interacción con el  $Ca^{2+}$  y el  $Fe^{2+}$ .

##### V.IV.6.1. *Quelación de $Fe^{2+}$*

El estudio de la capacidad de quelación del  $Fe^{2+}$  se realizó en condiciones de tonicidad similares a las intracelulares, con alto  $Na^+$  y bajo  $K^+$ , y en presencia de argón para evitar que ocurriesen reacciones de óxido-reducción. El espectro de absorción de la quercetina (fig. 40 A) cambió en presencia de  $Fe^{2+}$ . La interacción se detectó incluso a pH



bajos, en los cuales se espera que sea menor debido a la competencia del catión bivalente con los protones. Cuando se enfrentaron  $Fe^{2+}$  y quercetina en relación 1:1 (fig. 40 B), se observó un pequeño desplazamiento de la curva. Pero al enfrentar solamente 1  $Fe^{2+}$  cada 2 moléculas de quercetina (fig. 40 C), el desplazamiento de la curva aumentó: desapareció el pico correspondiente al cinnamoilo y aumentó la resonancia electrónica del benzoilo. Al colocar 1  $Fe^{2+}$  cada 3 moléculas de quercetina (no se muestra), no se observaron más cambios, lo que indicaría que probablemente se formó un complejo de coordinación involucrando 2 moléculas de quercetina coordinadas con cada una de  $Fe^{2+}$ .

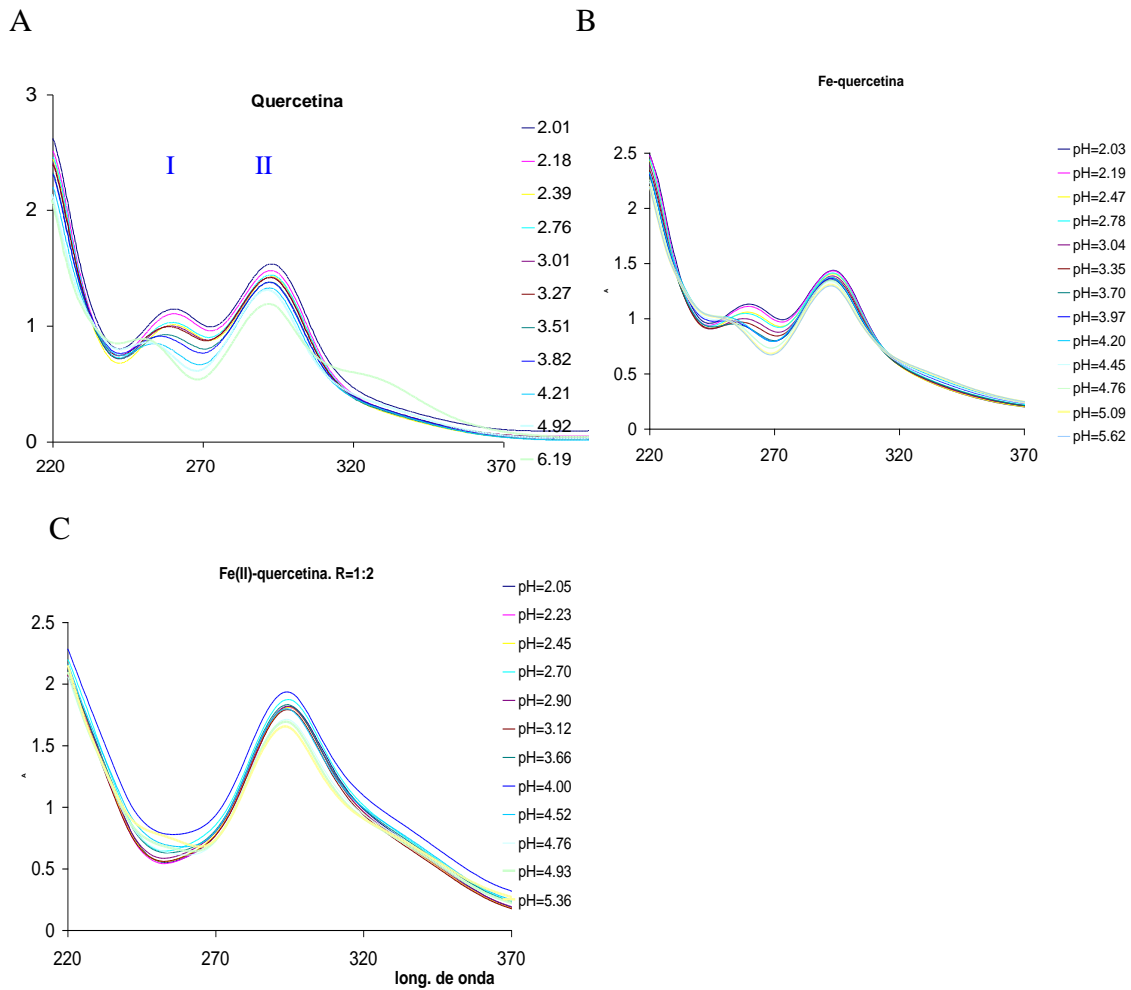


Fig 40. Quelación del  $Fe^{2+}$  por la quercetina.

(A): Quercetina sola; (B): en presencia de  $Fe^{2+}$  en relación 1:1; (C): con la mitad

El resultado de formación de un quelato con el  $Fe^{2+}$  coincide con los datos de otros 3 autores que estudiaron relaciones estructura-actividad para la quelación. Van Acker y col (Van Acker y cols., 1996) realizaron un estudio de varios flavonoides en condiciones controladas, concluyendo (tabla 6) que la taxifolina y la apigenina son quelantes mejores que la quercetina y (de acuerdo con Soczynska y col (Soczynska-Kordala y cols., 2001)) que la rutina y el kaempferol son tan buenos quelantes como la quercetina, tanto en metanol como en una bicapa lipídica. Si la protección dependiera de la quelación de  $Fe^{2+}$ , dichos flavonoides deberían proteger, y en nuestro modelo no protegieron. Por lo tanto los resultados sugieren que si el mecanismo de quelación de  $Fe^{2+}$  participa en la protección frente al  $H_2O_2$  en células PC12, no alcanza para explicar los resultados observados.

### V.IV.6.2. El espectro de absorción de la quercetina no cambió en presencia de $\text{Ca}^{2+}$

Como se muestra en la fig. 41, el espectro de absorción de la quercetina no cambió en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  ni siquiera a pH altos que favorecerían la interacción.

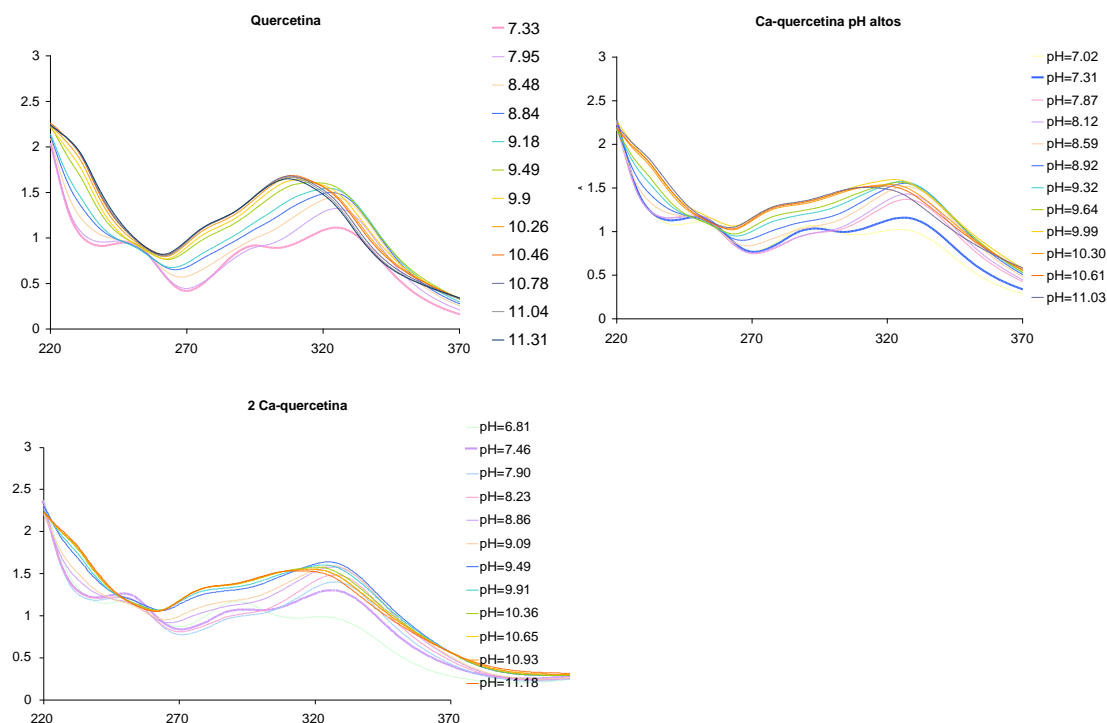


Fig. 41. La quercetina no se coordinaría con el  $\text{Ca}^{2+}$  (A): Quercetina sólo; (B): en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en relación 1:1; (C) con la mitad de  $\text{Ca}^{2+}$

La capacidad de formar un complejo de coordinación con el  $\text{Ca}^{2+}$  se estudió en condiciones similares a las del  $\text{Fe}^{2+}$ , en proporciones Q:  $\text{Ca}^{2+}$  de 1:1, 2:1 y 3:1, con concentraciones fisiológicas de  $\text{Na}^+$  y los resultados son extrapolables a otro sistema en tanto que las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  no superen por mucho a las de quercetina. Dado que la quercetina protegió a dosis 25-50  $\mu\text{M}$ , que las concentraciones fisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular son de orden nanomolar y que un aumento inusual del  $\text{Ca}^{2+}$  lo lleva hasta 5  $\mu\text{M}$ , el resultado sugiere que la formación de un complejo con el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular no sería un mecanismo de protección por quercetina.

### V.IV.6.3. Efectos del EGTA.

Dado que el único estudio realizado en células PC12 de protección por flavonoides frente al  $H_2O_2$  se refiere a las modificaciones en la dinámica del  $Ca^{2+}$  (Wang y Joseph, 1999), se estudiaron los efectos del quelante EGTA. Los resultados mostraron que éste no presentó efectos a baja concentración (1mM), y que a alta concentración (5mM) fue tóxico, no protegió del  $H_2O_2$  y en cambio protegió de la quercetina 250  $\mu M$  (fig.42). Este resultado es de difícil interpretación, pero apoya la idea de que la quercetina interfiere con la dinámica del  $Ca^{2+}$  y de que su toxicidad podría explicarse por un aumento de los niveles de  $Ca^{2+}$  libre.

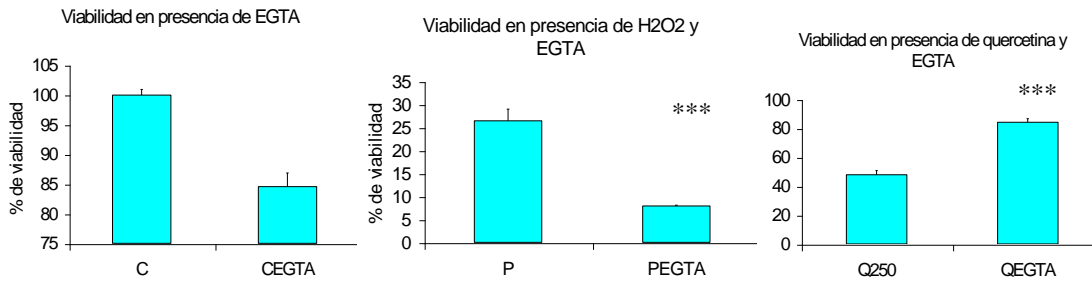


Fig. 42. Efectos del EGTA <5mM. Se mostró tóxico y no protegió a las células PC12 del  $H_2O_2$ . Sin embargo, protegió a las células PC12 de la toxicidad de la quercetina.2

### V.IV.7. Exploración de la activación en PC12 IIBCE de vías vinculadas al EO

#### V.IV.7.1 El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indujo la fosforilación del complejo quinasa ERK y la quercetina no la evitó<sup>1</sup>

La fig. 43 muestra los resultados de Western blots con anticuerpos anti-pERK 1 y -pERK2, con los controles de carga correspondientes.

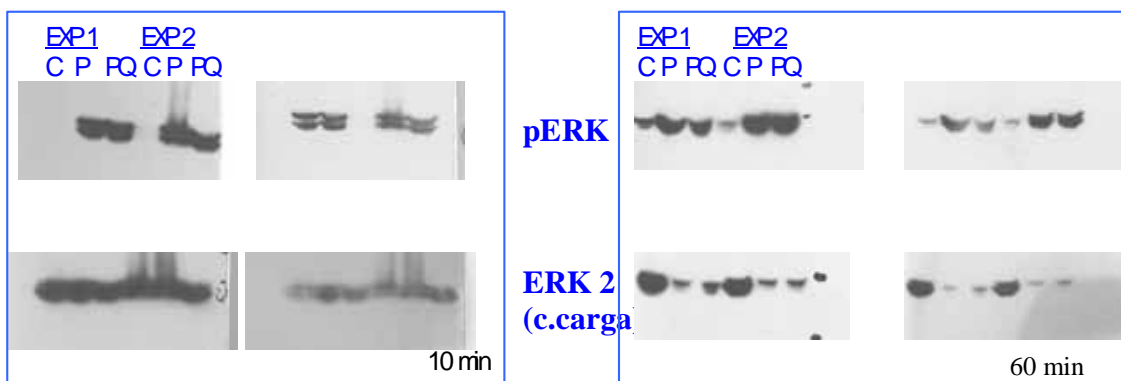


Fig. 43. Efectos de los tratamientos sobre la fosforilación de ERK: Se corrieron en el mismo gel muestras de 2 experimentos independientes (EXP1, EXP2). En el cuadro de la izquierda se presentan los resultados a los 10 min. de tratamiento y en el de la derecha, a los 60 min. Arriba están las imágenes correspondientes a ERK fosforilado y abajo los

<sup>1</sup> Al aumentar la densidad celular, fue necesario aumentar la dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a 1400 μM para conseguir inducir muerte del 50 % de las células, que ocurrió sin liberación de lactato deshidrogenasa. Sin embargo, no fue necesario aumentar la dosis de quercetina para observar la protección. La quercetina 50 μM aumentó la viabilidad celular y disminuyó el índice de daño al ADN. Al igual que a baja densidad, ni el inhibidor de caspasa-9 LEHD 25 μM, ni la 3-MA 3 mM protegieron del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a las células PC12 IIBCE.

El tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indujo la fosforilación de ERK1 y ERK2 (de 44 y 42 pb respectivamente) al menos entre los 10 y los 60 min de iniciado el tratamiento. La comparación de las intensidades de las bandas fosforiladas respecto a los controles de carga (tabla 9), realizada visualmente o con ayuda de un densitómetro, permite concluir que en los tiempos empleados durante el presente estudio, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indujo fosforilación de ERK que no fue alterada por la quercetina.

pERK 1/2	C	P	PQ
10 min	+	+++	+++
60 min	+	+++	+++

Tabla 9. Efecto del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la fosforilación de ERK

El agregado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracelular provocó la fosforilación de ERK. Este resultado concuerda con los resultados de Zhang y Jope (Zhang y Jope, 1999). Inicialmente la activación de ERK fue identificada como una señal de supervivencia (Fukunaga y Eishichi, 1998), y después se vio que también se activa en condiciones de estrés y que es necesaria para que ocurra muerte celular por apoptosis (Ishikawa y Kitamura, 2000).

Hasta donde se sabe, solamente MEK activa ERK y lo hace si ha sido a su vez fosforilada por c-Raf, por lo cual cualquier especulación acerca de cómo podría haberse activado ERK se transforma en cómo se habría activado c-Raf. La activación de c-Raf responde a señales provenientes de receptores ionotrópicos o metabotrópicos y es modulada por numerosos factores (por ejemplo, el Ca<sup>2+</sup>, así como el cAMP).

Lo expuesto puede resumirse diciendo que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alteró en nuestro modelo un sistema, una vía de MAPK, que tiene múltiples entradas y múltiples salidas o efectos.

La fosforilación de ERK por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no fue alterada por la quercetina. Desde el punto de vista de sus mecanismos de acción, esto solamente significa que la quercetina no actuó corriente arriba de ERK; podría haber impedido las consecuencias de ERK actuando corriente abajo del mismo, o activando alguna otra vía que bloquease sus efectos. También podría no haber alterado los efectos de la activación de ERK. Como la quercetina protegió de la muerte celular, si esta última hipótesis fuera cierta, estaría nuevamente cuestionado el papel de ERK.

### V.IV.7.2.El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indujo disminución de la fosforilación de CREB. Este efecto fue retrasado por la quercetina

Los anticuerpos de Cell Signalling para pCREB (de 43 kD) reconocen también otra proteína (pATF-1), de menor peso molecular. En los resultados obtenidos se insinúa la presencia de una tercera banda. La banda correspondiente a pCREB es la superior.

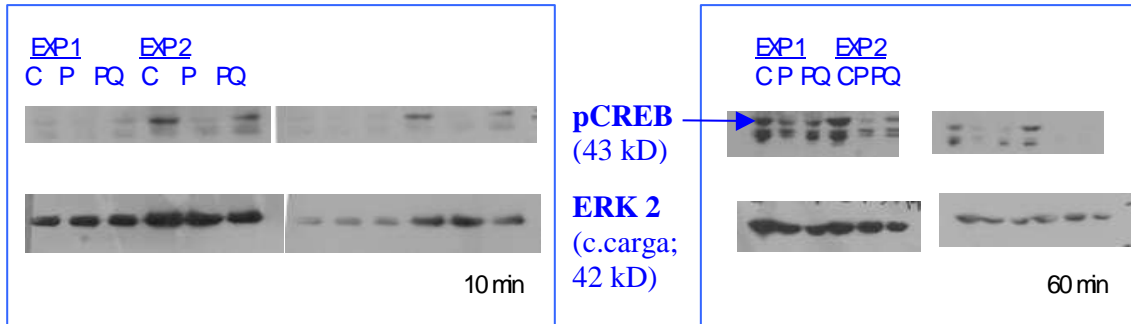


Fig. 44. Efectos de los tratamientos sobre la fosforilación de CREB: Se corrieron en el mismo gel muestras de 2 experimentos independientes (EXP1, EXP2). En el cuadro de la izquierda se presentan los resultados a los 10 min. de tratamiento y en el de la derecha, a los 60 min. Arriba están las imágenes correspondientes a CREB fosforilado y abajo los

A los 10 min de iniciado el tratamiento (fig. 44, tabla 10) el nivel de pCREB era alto en la población de células control, bajo en la tratada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y similar al control en la tratada con quercetina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A los 60 min, el patrón cambió, siendo los niveles altos en el control y bajos en las poblaciones tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y quercetina. Por lo tanto, en esta ventana temporal se observa que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuyó la fosforilación de CREB, y que dicho efecto fue demorado por el pretratamiento con quercetina.

pCREB	C	P	PQ
10 min	++	+	++
60 min	++	+	+

Tabla 10. Efecto de los tratamientos sobre la fosforilación de CREB.

Zhang-Jope (1999) demuestran que el  $H_2O_2$  no afecta la fosforilación basal de CREB en PC12 en condiciones de privación de suero, pero impide que aumenten (al doble) los niveles de pCREB en presencia de factores tróficos. O sea que los niveles de pCREB que dichos autores detectan en presencia de factores tróficos son el doble que en condiciones de privación de suero y/o estimulación con  $H_2O_2$ . En este sentido, como nuestros experimentos fueron realizados en presencia de factores tróficos aportados por los sueros, la disminución de la fosforilación de CREB por el  $H_2O_2$  era un resultado esperado.

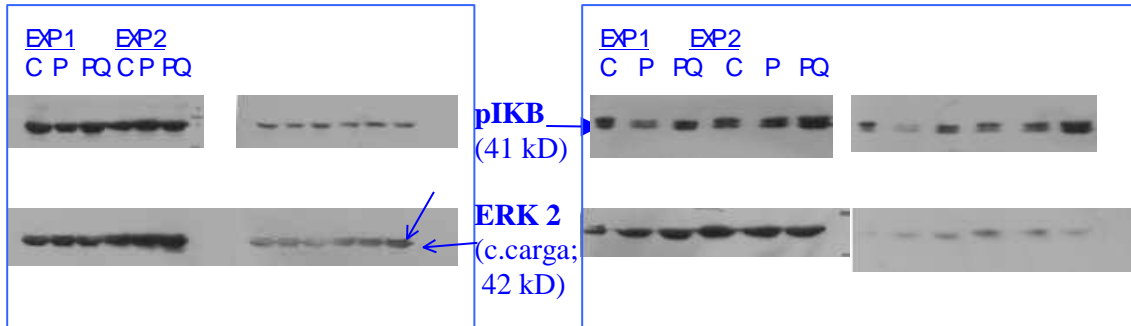
La quercetina retrasó la disminución de la fosforilación de CREB inducida por el  $H_2O_2$ . La correspondencia de esta observación con los efectos de los mismos tratamientos sobre la viabilidad y sobre el ADN, no necesariamente significa que CREB sea "el" o un factor de transcripción clave; para saber eso sería necesario bloquear la actividad de CREB específicamente. No obstante, es inevitable especular acerca de cómo podrían estar involucrados estos cambios de fosforilación en la muerte o la supervivencia celular. En ese sentido, quedarían abiertas por lo menos dos hipótesis:

- (1) Dado que CREB aumenta la transcripción de c-fos y compite con AP-1 por los sitios TRE y CRE, los cambios en la fosforilación de CREB podrían modular la transcripción dependiente de AP-1 (c-jun/c-fos), y
- (2) La fosforilación de CREB en Ser 133 podría estar regulando positivamente la transcripción temprana de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Freeland y cols., 2001). Como ésta impide la ocurrencia de la transición de permeabilidad mitocondrial con lo cual evita la liberación de caspasas y del factor inductor de apoptosis AIF (Loeffler y Kroemer, 2000; Tsujimoto y Shimizu, 2002), pCREB podría brindar protección celular a través del aumento de los niveles de Bcl-2.



### V.IV.7.3. Ocurrió fosforilación de IKB, independientemente del tratamiento aplicado

IKB  $\alpha$  no estaba fosforilado a los 10 min. y sí lo estaba a los 60 min.



Fia. 45. Fosforilación de IKB.

pIKB	C	P	PQ
10 min	-	-	-
60 min	++	++	++

Tabla 11. Fosforilación de IKB.

Dado que el aumento de la fosforilación de IKB ocurrió en todos los tratamientos, incluso en el control, éste parece ser un efecto inespecífico de la manipulación durante el experimento. Tal vez las células sean ligeramente afectadas por los cambios de temperatura, de medio, de presión de O<sub>2</sub>, a los que son sometidas durante el experimento.

En cualquier caso, la fosforilación de IKB es una de las formas de activación de NF- $\kappa$ B, por lo cual este factor de transcripción habría estado activado al menos una parte del tiempo, en el transcurso del experimento. Es interesante destacar que NF- $\kappa$ B es capaz de activar IAP, que bloquea la actividad de las caspasas ejecutoras -3,-6 y-7.

### V.IV.8. Exploración de mecanismos estrogénicos

Los antagonistas estrogénicos tamoxifeno y raloxifeno no impidieron la protección por quercetina. De cualquier modo, dado que se han descrito efectos antagonistas o agonistas de los mismos dependiendo del modelo, también se probó si estas mismas sustancias o agonistas estrogénicos típicos - benzoato de estradiol 17- $\beta$ -estradiol y estriol- eran capaces de proteger de la muerte por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los resultados fueron negativos (tabla 12).

La única actividad detectada fue un efecto del tamoxifeno que parecía ser bloqueante de la protección por la quercetina. Sin embargo, un estudio de toxicidad mostró que el propio tamoxifeno era tóxico. Por lo tanto, lo que ocurrió fue solamente que la quercetina no disminuyó la toxicidad del tamoxifeno (fig. 46).

SUSTANCIA	CATEGORÍA	CONCENTR (uM)	Bloquea protección?	Protege?
17- $\beta$ -estradiol	Estrógeno	0.3 a 30		NO
Benz estradiol	estrogénico	0.1 a 100		NO
Estriol	estrogénico	0.1 a 50		NO
Tamoxifeno	Antago/ago	0.1 a 10//25 y 50	NO//tóxico	NO
Raloxifeno	Antago/ago	0.1 a 50	NO	NO

Tabla 12. Estudio de los efectos de agonistas estrogénicos como protectores celulares y de antagonistas como bloqueantes de la protección otorgada por la quercetina.

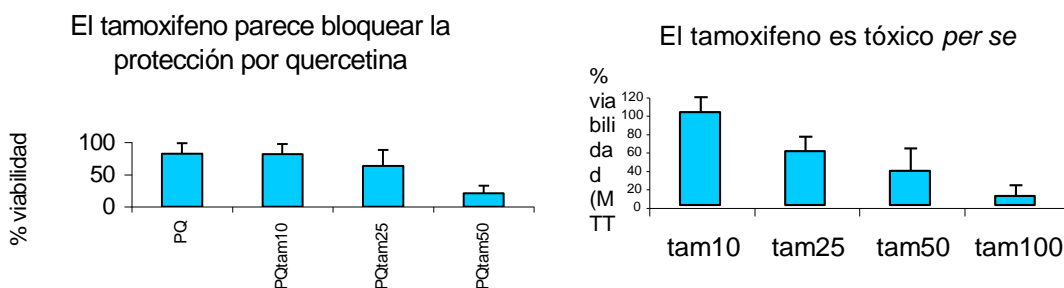


Fig. 46. El tamoxifeno parece bloquear la protección por quercetina, pero en realidad

Los resultados muestran que utilizando un pool de sustancias que incluía agonistas y antagonistas estrogénicos, no se detectó participación de mecanismos estrogénicos de protección de las células PC12 frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por otra parte, si se comparan las relaciones estructura-actividad de potencia estrogénica de flavonoides de acuerdo a Kuiper y col (tabla 7) con las relaciones estructura-actividad para la protección celular en nuestro modelo por los mismos flavonoides (fig. 32), se ve que si la protección se hubiese debido a mecanismos estrogénicos el kaempferol y la apigenina, que tienen mayor afinidad que la quercetina por los receptores de estrógenos de tipo  $\alpha$  y  $\beta$ , y mayor actividad en un ensayo de transactivación, deberían haber resultado más efectivos para proteger que la propia quercetina, y en nuestro modelo no protegieron. Por lo tanto, el análisis de relaciones de estructura-actividad también indica que la protección otorgada por los flavonoides en nuestro modelo no es por interacción con receptores de estrógenos.

#### V.IV.9. Mecanismos de protección por la quercetina

El análisis de relaciones de estructura-actividad, la realización de experimentos *in vitro*, los estudios farmacológicos y los estudios de fosforilación de proteínas, tomados en conjunto, permiten afirmar que

- la quercetina no protegió por interacción con el  $H_2O_2$
- no hubo correspondencia entre la capacidad secuestradora en general -ni en particular, de ROS- y la capacidad protectora celular
- no hubo correspondencia entre la capacidad quelante de  $Fe^{2+}$  y la capacidad protectora celular
- la quercetina no protegió por quelación de  $Ca^{2+}$  intracelular
- no habrían participado de manera significativa mecanismos estrogénicos en la protección celular
- la fosforilación de ERK por  $H_2O_2$  no fue revertida por la quercetina
- la activación de NF-kB ocurrió independientemente del tratamiento efectuado.

*O sea que esencialmente, la mayoría de las hipótesis que se analizaron respecto a la protección por quercetina de los efectos del  $H_2O_2$  no encontraron apoyo.*

Varias evidencias sugieren que la quercetina puede alterar los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$ : se sabe que puede inhibir ATPasas del retículo endoplásmico (Thiyagarajah y cols., 1991) y el EGTA bloqueó su toxicidad (fig. 42). No se puede descartar que pequeñas alteraciones de los niveles de  $Ca^{2+}$  puedan resultar beneficiosas para el mantenimiento de la vida celular en alguna situación en particular. De hecho, Wang y Joseph (Wang y Joseph, 1999) demostraron que la quercetina protege células PC12 de la alteración de la homeostasis del  $Ca^{2+}$  por  $H_2O_2$  con los mismos requerimientos estructurales que se describen aquí para aumentar la viabilidad celular. Por lo tanto, es posible que el  $Ca^{2+}$  esté jugando un papel importante en la protección por quercetina, y esto merece ser estudiado con mayor profundidad.

Entre los mecanismos estudiados y las múltiples señales intracelulares, se encontró un resultado positivo: pCREB disminuyó en presencia de  $H_2O_2$  y aumentó en presencia de la quercetina. Si bien esta correspondencia con los efectos sobre la viabilidad y sobre el ADN no demuestra que CREB haya sido un factor de transcripción clave para la muerte y

la protección celular, permite generar nuevas hipótesis de trabajo referentes al papel del inhibidor de la transición de permeabilidad mitocondrial Bcl-2 y al papel del complejo de transcripción AP-1 en este proceso.

## V.V. Consideraciones finales

Los estudios realizados en el presente trabajo usaron como modelo el EO inducido por el  $H_2O_2$  sobre las células PC12, utilizándose en concentraciones que resultasen moderadamente tóxicas, induciendo la muerte de aproximadamente el 50% de las células.

Considerando que existe una alta variabilidad en la respuesta al EO en diferentes tipos celulares, y que podría existir diferencia entre clones de un mismo tipo celular, se trabajó con dos clones de células PC12. En ambos, la pérdida de capacidad metabólica y la fragmentación del ADN ocurrieron sin ruptura temprana de la membrana plasmática, lo que permitió descartar que la muerte celular inducida por el  $H_2O_2$  hubiera ocurrido por un proceso de tipo necrótico y sugirió que había ocurrido muerte celular programada. Por otra parte, la diferencia observada entre estas dos cepas en la sensibilidad al  $H_2O_2$ , en la participación de las caspasas y en la protección por la 3-MA sugirió que los mecanismos moleculares de muerte celular habrían sido diferentes en ambas cepas.

Las células PC12 "U", fueron protegidas por inhibidores de las caspasas -3,-6 y-9 de la vía de apoptosis mitocondrial. Asimismo, se determinó por primera vez que la 3-MA inhibió la muerte celular inducida por  $H_2O_2$ . De acuerdo con los criterios vigentes de interpretación de estos datos bioquímicos, éstos resultados indicarían que en esta cepa celular estarían involucrados ambos procesos. Por lo tanto podría tratarse de muerte apoptótica bloqueable por 3-MA, muerte autofágica caspasa-dependiente o un proceso híbrido, "apo-autofágico". Para definir este punto se requerirán estudios morfológicos. Es interesante destacar que en modelos de enfermedades cerebrovasculares (Harrison y cols., 2001; Krajewski y cols., 2002; Namura y cols., 1998) y en estudios post-mortem de pacientes con enfermedades neurodegenerativas (Jellinger y Stadelmann, 2000) se ha detectado la activación de las mismas caspasas, se ha observado prevención de la pérdida neuronal por péptidos inhibidores de las mismas (Chen y cols., 2001; Robertson y cols., 2000) y la existencia de muerte programada con características mixtas, de apoptosis y de autofagia (Anglade y cols., 1997).

Las células PC12 "I", en cambio, no fueron protegidas por los inhibidores de caspasas citados ni por la 3-MA. Adicionalmente, se detectó un aumento de la actividad de las caspasas-3 y-6. Estos datos sugirieron que en estas células no estaría ocurriendo apoptosis dependiente de las caspasas de la vía mitocondrial. Si bien los datos no permiten

descartar completamente esta posibilidad, obligan a subrayar la importancia de caracterizar hasta donde sea posible cada modelo que se utiliza. En estas células, la activación inespecífica de NF- $\kappa$ B que se detectó podría promover la transcripción de IAP, que bloquearía la actividad de las caspasas-3 y-6. Como la caspasa-9 no funciona como ejecutora, esto bastaría para explicar al menos parcialmente que ninguno de los 3 inhibidores de caspasas haya protegido: al estar bloqueadas esas caspasas, la muerte celular procedería por otra vía, que no existiría en las PC12 "U" y que es de mayor sensibilidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Alternativamente, se podría pensar que las PC12 "I" tienen una vía de muerte celular más sensible que ésta, independientemente de los efectos de NF- $\kappa$ B.

La muerte celular en las PC12 "I" se correlacionó con un aumento de ERK activado. Se ha detectado activación de ERK durante condiciones patológicas como isquemia y epilepsia (Fukunaga-Miyamoto 1998).

En el presente trabajo se mostró que la quercetina protegió de la muerte celular programada inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la misma concentración y con la misma relación estructura-actividad a ambas cepas de células PC12.

El análisis de los requerimientos estructurales para la protección coincide con los destacados por Wang y Joseph como requerimientos para la protección frente a las alteraciones de los niveles de Ca<sup>2+</sup> inducidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células PC12: fueron esenciales el catecol del anillo B y el doble enlace 2-3 del anillo C. Nuestros estudios sugirieron que el primero alteraría las cargas locales, en tanto que el último alteraría las cargas locales y la forma del anillo C. Dado que la falta del hidroxilo en posición 3 no impide la protección en tanto que el agregado de un sustituyente la bloquea, parece ser que en esta región la alteración de cargas locales es menos importante que las alteraciones estéricas.

Tomados en conjunto, el análisis de relaciones de estructura-actividad, la realización de experimentos *in vitro*, los estudios farmacológicos y los estudios de fosforilación de proteínas, permitieron afirmar que la quercetina no protegió por interacción directa con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mostraron que no hubo correspondencia entre la capacidad secuestradora en general - ni en particular, de ROS- y la capacidad protectora celular y que tampoco hubo correspondencia entre la capacidad quelante de Fe<sup>2+</sup> y la capacidad protectora celular, con lo cual se descartó que estos mecanismos de acción antioxidante fuesen los fundamentales

para la protección celular. Asimismo, permitieron descartar la participación de mecanismos estrogénicos en la protección celular, mostraron que la fosforilación de ERK por  $H_2O_2$  no es revertida por la quercetina y que la activación de NF- $\kappa$ B es independiente del tratamiento efectuado.

Es interesante señalar que Zaman y cols (1999) descubrieron que la deferroxamina, quelante de  $Fe^{2+}$ , previene la apoptosis inducida por EO en correlación con su habilidad de aumentar la unión del complejo ATF-1/CREB a un elemento de respuesta a la hipoxia, promoviendo así la transcripción de genes protectores, lo cual puede haber conducido a interpretaciones erróneas acerca del papel del  $Fe^{2+}$  en la muerte celular en algunos casos.

La quercetina no forma complejos de coordinación con el  $Ca^{2+}$  intracelular, pero podría estar regulando los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$  por algún otro mecanismo; así se podría explicar su toxicidad a altas concentraciones y eventualmente su capacidad protectora a bajas concentraciones. Por lo tanto, esta posibilidad merece ser estudiada en mayor detalle.

La fosforilación de CREB disminuyó por el tratamiento con  $H_2O_2$  y fue similar al control al aplicar además la quercetina. Por lo tanto, la fosforilación de CREB no dependió de ERK sino de alguna otra kinasa, y se correlacionó con la viabilidad celular. Esta correspondencia con los efectos sobre la viabilidad no necesariamente significa que CREB sea "el" o un factor de transcripción clave; para determinar este punto será necesario bloquear la actividad de CREB específicamente. CREB podría haber activado la transcripción del factor protector celular Bcl-2, así como haber alterado la actividad AP-1, porque compite con el mismo por el promotor TRE.

El análisis de requerimientos temporales para la protección por quercetina indica que ésta para proteger debe estar presente cuando aumentan los niveles de  $H_2O_2$ . Durante experimentos de isquemia-reperfusión, se registra un aumento en el  $H_2O_2$  (Simonson y cols 1993); un estudio temporal muestra que en la isquemia global el período de latencia para ese aumento medido en el estriado es de aproximadamente 15 min. (Hyslop y cols., 1995) y es posible que en la isquemia focal sea algo mayor. Por lo tanto, cualesquiera que sean los mecanismos de acción por los cuales la quercetina protege del  $H_2O_2$ , se esperaría que pudiera ser efectiva si llegara al cerebro, administrada antes de la isquemia o en una ventana temporal muy próxima al insulto. Existe un trabajo que muestra que la



administración de té por vía oral durante 3 semanas previas a la operación reduce el volumen del infarto, la concentración de eicosanoides, los niveles de  $H_2O_2$ , los productos de lipoperoxidación y el número de células apoptóticas en un modelo de isquemia cerebral focal por oclusión de la arteria cerebral media (Hong y cols., 2000). El té es rico en flavonoides y particularmente en quercetina; la neuroprotección podría deberse a su presencia. De hecho, estudios realizados en nuestro laboratorio en ese mismo modelo muestran que en condiciones en las cuales llega al cerebro (por ejemplo utilizando liposomas como vehículo de inyección), la quercetina administrada 30 min después de la oclusión arterial, es capaz de aumentar la tinción *ex-vivo* con el colorante vital TTC, de disminuir el edema (cuantificado como volumen de la lesión) y posiblemente, de aumentar la supervivencia neuronal (Rivera y cols., 2002).

La comparación de los resultados disponibles en modelos *in vivo* y en cultivos celulares, en particular de células PC12, descubre la existencia de numerosos puntos en común, que incluyen los niveles de  $H_2O_2$  que resultan tóxicos, algunas señales involucradas, y relaciones estructura-actividad para cito- y neuroprotección. El conjunto de los datos disponibles sugiere que por lo menos una parte de los mecanismos involucrados en los procesos de muerte y de protección celular no requieren la interacción entre diversos tipos celulares (neuronas, glía) y son reproducibles en cultivos celulares. Por esta razón, éstos modelos simples seguirán siendo utilizados como valiosos generadores de hipótesis a ser testadas *in vivo*.

## **VI. Perspectivas**

La realización del presente trabajo de tesis ha conducido a plantear una serie de interrogantes que sería posible responder mediante la aplicación de diferentes abordajes metodológicos o el desarrollo de potenciales líneas de investigación.

### ***VI.1. Relación entre la muerte celular y el daño al ADN.***

Diversos autores han descrito que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce rupturas de simple cadena (Fernandez y cols., 2001; Horvathova y cols., 1999) compatibles con un patrón de daño oxidativo, y también que conduce a la formación de rupturas de doble cadena (Davies, 1999; Gardner y cols., 1997) que serían compatibles tanto con daño genotóxico oxidativo, como con un efecto de endonucleasas en un contexto apoptótico. Hemos mostrado que la pérdida de capacidad metabólica en nuestros modelos de células PC12 se correspondió con un aumento en el daño al ADN, pero no hemos estudiado si el daño observado consistió en rupturas de simple o doble cadena, ni si ocurrió antes o después de la pérdida de capacidad metabólica. Estas dudas podrían responderse realizando por una parte estudios más profundos del tipo de daño en el ADN implicado (ensayo cometa en condiciones neutras, extracción de ADN y electroforesis clásica, medición del estado de oxidación de las bases) y por otra parte estudios de viabilidad con una técnica que permita realizar mediciones en tiempos más cortos, por ejemplo utilizando una tríada de colorantes (Hoechst 33342, yoduro de propidio que sólo accede al núcleo si la célula ya no es viable y fluoresceína diacetato que tiñe el citoplasma). Adicionalmente, podrían combinarse estas técnicas con tratamientos farmacológicos y así ver, por ejemplo, si los mismos inhibidores de caspasas que bloquean la muerte celular en las PC12 "U", impiden que ocurra daño en el ADN de éstas células. Asimismo podría estudiarse si un pan-inhibidor de caspasas bloquea la muerte celular y disminuye el daño en el ADN en las células PC12 "I".

### ***VI.2. Participación de la autofagia en la muerte celular en las PC12 "U"***

Los resultados obtenidos en esta tesis señalan que la 3-MA bloqueó la muerte celular en las células PC12 "I". Hasta donde tenemos conocimiento, no ha descrito muerte

celular no autofágica inhibible por 3-MA. De cualquier modo, corresponde caracterizar la muerte celular morfológicamente, lo que puede realizarse mediante microscopía electrónica y/o mediante la utilización de un colorante específico para teñir los autofagosomas.

### ***VI.3. Papel de CREB en la muerte celular y en la protección por quercetina en células PC12 "T".***

La fosforilación de CREB mostró correspondencia con la viabilidad celular. Por lo tanto, CREB es un factor de transcripción candidato a ser considerado protector en este modelo. Para confirmarlo, habría que inhibir CREB específicamente y ver si así se bloquea la protección. Por otra parte, se podría estudiar si el agregado de Bcl-2 (o su sobreexpresión) inhibe la muerte celular, si ocurre liberación de AIF, y si ocurren alteraciones de la transcripción dependientes del promotor CRE o del TRE.

### ***VI.4. Papel de la alteración de la dinámica del $Ca^{2+}$ por la quercetina en la protección celular.***

La quercetina puede alterar los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$ . Wang y Joseph (1999) demostraron que la quercetina protege a las células PC12 de la alteración de la homeostasis del  $Ca^{2+}$  por  $H_2O_2$ , y los requerimientos estructurales para ello son los mismos que se describieron en el presente trabajo para aumentar la viabilidad celular. Además, el EGTA bloqueó la toxicidad de la quercetina. No se puede descartar que pequeñas alteraciones de los niveles de  $Ca^{2+}$  puedan resultar beneficiosas para el mantenimiento de la vida celular en alguna situación en particular. Por lo tanto, es posible que el  $Ca^{2+}$  esté jugando un papel importante en la protección por quercetina, y ésto merece ser estudiado con mayor profundidad. En este sentido, existe un estudio que muestra que la quercetina puede inhibir ATPasas del retículo endoplásmico del hígado (Thiyagarajah y cols., 1991) y resultados preliminares (J. Benech, comunicación personal) mostraron que en núcleos aislados, la quercetina disminuyó la carga de  $^{45}Ca^{2+}$  al espacio perinuclear en un tiempo de 15 min, lo que podría explicarse por un aumento de la permeabilidad de membrana o por inhibición de las ATPasas de dicho espacio.

No se puede descartar que la asociación de la quercetina con cualquiera de las ATPasas pueda evitar la oxidación de sus tioles, evitando así una pérdida de función duradera. Por otra parte, la inhibición de ATPasas del retículo conduciría a un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico y la consiguiente alteración de actividades enzimáticas, señales, y eventualmente a la muerte celular; sin embargo, la inhibición de ATPasas del espacio perinuclear podría tener consecuencias impredecibles, dado que disminuiría la tasa de transcripción génica, lo cual podría ser beneficioso en el caso de que se estuvieran transcribiendo genes pro-apoptóticos.

Por todo lo expuesto, valdría la pena realizar experimentos para ver si se confirma que la quercetina puede bloquear las ATPasas del espacio perinuclear si tiene acceso a ellas.

#### ***VI.5. Localización de la quercetina***

Aún no se conoce la localización subcelular de la quercetina, que permitiría esencialmente clasificar los posibles sitios de acción al menos en "accesibles" o "inaccesibles" para esta molécula en determinada concentración y en determinado tiempo. La quercetina podría quedar unida a la membrana plasmática o a algún receptor de la misma, entrar al citoplasma e incluso llegar al núcleo celular. Saber dónde se localiza podría dar fuerza a algunas hipótesis de cómo actúa y permitiría descartar otras. Por este motivo se sugiere realizar un marcaje radiactivo y visualizar su localización subcelular por autoradiografía y microscopía electrónica (Bozzola y Russell, 1992).<sup>2</sup>

#### ***VI.6. Quercetina: cross-linking agent?***

Los resultados del ensayo cometa aquí presentados, conjuntamente con el dato de que la quercetina es un agente intercalante de ADN (Solimani, 1996), sugieren que la quercetina podría estar actuando como un "cross-linking agent". Para analizar esta posibilidad se podría repetir los experimentos realizando los tratamientos bajo luz de seguridad fotográfica, ya que la formación de cross-links ocurre en presencia de luz. Por otra parte, se podría estudiar si el agregado de un agente inductor de cross-links aumenta o

no el efecto condensador del ADN de la quercetina. Es interesante señalar que demostrar que la quercetina actúa como un agente intercalante sería una manera indirecta de mostrar que ésta tiene acceso al núcleo celular.

#### ***VI.7. Por qué continuar estudiando los efectos de los flavonoides.***

La evidencia acumulada respecto a los flavonoides sugiere que éstos constituyen un pool natural de moléculas que afectan las vías de señalización celular involucradas en la supervivencia, la diferenciación y la muerte celular. Muchos de sus efectos son altamente específicos y dicha especificidad es la que daría sentido a que las plantas sinteticen un pool tan amplio de compuestos (unos 4000). Cuanto más aprendamos acerca de sus efectos, más probable será que puedan ser utilizados para prevenir diferentes patologías o como agentes terapéuticos.

---

<sup>2</sup> Existiría una técnica alternativa (Saslowsky y Winkel-Shirley, 2001).

## VII. Bibliografía

- Agullo, G., Gamet, L., Manenti, S., Viala, C., Rémesy, C., Chap, H., and Payrastre, B. (1997). Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition, *Biochemical Pharmacology* 53, 1649-1657.
- Aherne, S., y O'Brien, N. (2000). Lack of effect of the flavonoids, myricetin, quercetin, and rutin, on repair of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced DNA single-strand breaks in Caco-2, Hep G2, and V79 cells, *Nutrition and Cancer* 38, 106-115.
- Ahmed, M., Ainley, K., Parish, J., y Hadi, S. (1994). Free radical-induced fragmentation of proteins by quercetin, *Carcinogenesis* 15, 1627-1630.
- Albert, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Watson, J. (1992). *Biología molecular de la célula*, 2ª edn (Barcelona, Ediciones Omega).
- Anglade, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M., Michel, P., Marquez, J., Mouatt-Pringent, A., Ruberg, M., Hirsch, E., y Agid, Y. (1997). Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease, *Histology and histopathology* 12, 25-31.
- Atkins, C., y Sweat, J. (1999). Reactive oxygen species mediate activity-dependent neuron-glia signalling in output fibers of the hippocampus, *Journal of Neuroscience* 19, 7241-7248.
- Avila, M., Velasco, J., Cansado, J., y Notario, V. (1994). Quercetin mediates the downregulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468, *Cancer Research* 54, 2424-8.
- Barbouti, A., Doulias, P., Nouis, L., Tenepolou, M., y Galaris, D. (2002). DNA damage and apoptosis in hydrogen peroxide-exposed Jurkat cells: bolus addition vs continuous generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *Free Radic Biol Med* 33, 691-702.
- Bonni, A. (1999). Cell survival promoted by the Ras-MAPK signalling pathway by transcription-dependent and independent mechanisms, *Science* 286, 1358-1362.

- Bors, W., Michel, C., y Schikora, S. (1995). Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potential: a pulse radiolysis study, *Free Radic Biol Med* 19, 45-52.
- Borutaite, V., y Brown, G. (2001). Caspases are reversibly inactivated by hydrogen peroxide, *FEBS Lett* 500, 114-118.
- Bozzola, J., y Russell, L. (1992). CH11. Autoradiography and radioautography. In *Electron Microscopy. Principles and techniques for biologists*. (Sudbury, Massachusetts, Jones & Barlett. Boston-London-Singapore), pp. 272-276.
- Bredesen, D. (2000). Apoptosis: overview and signal transduction pathways, *J Neurotrauma* 17, 801-810.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., y Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis, *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 269-290.
- Bursch, W., Hochegger, K., Torok, L., Marian, B., Ellinger, A., y Hermann, r. (2000). Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments, *Journal of Cell Science* 113, 1189-1198.
- Calderón, F., Bonnefont, A., Muñoz, F., Fernández, V., Videla, L., y Inestrosa, N. (1999). PC12 and Neuron 2a cells have different susceptibilities to acetylcholinesterase-amyloid complexes, amyloid 25-35 fragment, glutamate, and hydrogen peroxide, *Journal of Neuroscience Research* 56, 620-631.
- Cantley, L., and Hammes, G. (1976). Characterization of sulfhydryl groups on chloroplast coupling factor 1 exposed by heat activation, *Biochemistry* 15, 9-14.
- Cao, G., Sofic, E., y Prior, R. (1997). Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure - activity relationships, *Free Radical Biology and Medicine* 22, 749-760.
- Carafoli, E. (1997). Regulation of calcium signalling in cells. In *Calcium and cellular metabolism: transport and regulation*, C. Sotelo, y J. Benesch, eds. (New York, Plenum Press), pp. 1-15.
- Caro, L., Plomp, P., Wolvetang, E., Kerkhof, C., y Meijer, A. (1988). 3-methyladenine, an inhibitor of autophagy, has multiple effects on metabolism, *Eur J Biochem* 175, 325-329.
- Chae, H., Bach, J., Lee, M., Kim, H., Kim, Y., Choo, K., Choi, S., Park, S., Lee, S., Suh, Y., y cols. (2001). Estrogen attenuates cell death induced by carboxy-terminal

- fragment of amyloid precursor protein in PC12 through a receptor-dependent pathway, *J Neurosci Res* 65, 403-7.
- Chen, T., Yang, F., Cole, G., y Chan, S. (2001). Inhibition of caspase-3-like-activity reduces glutamate induced cell death in adult rat retina, *Brain Res* 904, 177-188.
- Choi, J., Chung, H., Kang, S., Jung, M., Kim, J., No, J., y Jung, H. (2002). The structure-activity relationship of flavonoids as scavengers of peroxynitrite, *Phytotherapy Research* 16, 232-235.
- Choucron, P., Gillet, D., Dorange, G., Sawiki, B., y Dewitte, J. (2001). Comet assay and early apoptosis, *Mutat Res* 478, 89-96.
- Cohen, G. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis, *Biochemical J* 326, 1-16.
- Datta, S. (1999). Cellular survival: a play in three Akts, *Genes Dev* 13, 2905-2927.
- Davies, K. (1999). The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress, *Life* 48, 41-47.
- DiPietrantonio, A., Hsieh, T., y Wu, J. (1999). Activation of caspase 3 in HL-60 cells exposed to hydrogen peroxide, *Biochem Biophys Res Commun* 255, 477-82.
- Dunn, W. (1994). Autophagy y related mechanisms of lysosome -mediated protein degradation., *Trens in Cell Biology* 4, 139-143.
- Duthie, S., y Dobson, V. (1999). Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro, *Eur J Nutr* 38, 28-34.
- Farreras, y Rozman (1997). *Medicina Interna*, 13 edn, Harcourt- Brace).
- Fernandez, J., Vazquez-Gundin, F., Rivero, M., Genesca, A., Gosalvez, J., y Goyanes, V. (2001). DBD-fish on neutral comets: simultaneous analysis of DNA single and doble-strand breaks in individual cells, *Exp Cell Res* 15, 102-9.
- Ferrali, M., Signorini, C., Caciotti, B., Sugherini, L., Ciccoli, L., Giachetti, D., y Comporti, M. (1997). Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity, *FEBS Letters* 416, 123-129.
- Fiorelli, G., Picariello, L., Martinetti, V., Toneli, F., y Brandi, M. (1999). Estrogen synthesis in human colon cancer epithelial cells, *Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 71, 223-230.



- Formica, J., y Regelson, W. (1995). Review of the biology of quercetin and related bio flavonoids, *Food Chemical Toxicology* 33, 1061-1080.
- Freeland, K., Boxer, L., y Latchman, D. (2001). The cyclic AMP response element in the Bcl-2 promoter confers inducibility by hypoxia in neuronal cells, *Brain Research Mol Brain Res* 92, 98-106.
- Freitas, A. (2000) Inhibidores da funcao tireóidea e seu possível papel fisiológico, Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Fukunaga, K., y Eishichi, M. (1998). Role of MAP kinase in neurons, *Molecular Neurobiology* 16, 79-95.
- García-Segura, L., Azcoitia, I., y DonCarlos, L. (2001). Neuroprotection by estradiol, *Progress in Neurobiology* 63, 29-60.
- Gardner, A., Xu, F., Fady, C., Jacoby, F., Duffley, D., Tu, Y., y Lichtenstein, A. (1997). Apoptotic vs nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide, *Free Radic Biol Med* 22, 73-83.
- Garrington, T., y Johnson, G. (1999). Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signalling pathways, *Current Opinion in Cell Biology* 11, 211-218.
- Gasch, A., Spellman, P., Kao, C., Carmen-Harel, O., Eisen, M., Stroz, G., Botstein, D., y Brown, P. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes, *Molecular Biology of the cell* 11, 4241-4257.
- Graefe, E., Derendorf, H., y Veit, M. (1999). Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in humans, *Int J of Clin Pharmacol and Therap* 37 (5), 219-233.
- Granville, D., Cassidy, B., Ruehlmann, D., Choy, J., Brenner, C., Kroemer, G., van Breemen, C., Margaron, P., Hunt, D., y McManus, B. (2001). Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor and cytochrome c during smooth muscle cell apoptosis, *Am J Pathol* 159, 305-311.
- Greene, L., y Tischler, A. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor, *Proceedings of the Natural Academy of Science, USA* 73, 2424-2428.
- Hagiwara, M., Inowe, S., Tanaka, T., Nunoki, K., Ito, M., and Hidaka, H. (1988). Differential effects of flavonoids as inhibitors of tyrosine protein kinases and serine/threonine protein kinases, *Biochemical Pharmacology* 37, 2987-2992.

- Halestrap, A., McStay, G., y Clarke, S. (2002). The permeability transition pore complex: another view, *Biochimie* 84, 153-166.
- Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system, *J Neurochemistry* 59, 1609-23.
- Halliwell, B., y Gutteridge, J. (1999). Free radicals in biology and medicine, 3rd edn (New York, Oxford University Press).
- Hanasaki, Y., Ogawa, S., y Fukui, S. (1994). The correlation between active oxygens scavenging y antioxidant effects of flavonoids, *Free Radical Biology and Medicine* 16, 845-850.
- Harborne, J., y Williams, D. (2000). Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry* 55, 481-504.
- Harrison, D., Davis, R., Bond, B., Campbell, C., James, M., Parsons, A., y Philpott, K. (2001). Caspase mRNA expression in a rat model of focal cerebral ischemia, *Molecular Brain Research* 89, 133-146.
- Hearn, A., Tu, C., Nick, H., y Silverman, D. (1999). Characterization of the product-inhibited complex in catalysis by human manganese superoxide dismutase, *J Biol Chem* 273, 24457-60.
- Henderson, L., Wolfreys, A., Fredyk, I., Bourner, C., y Windebank, S. (1998). The ability of the comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins, *Mutagenesis* 13, 89-94.
- Hinshaw, D., Miller, M., Omann, G., Beals, T., y Hyslop, P. (1993). A cellular model of oxidant-mediated neuronal injure, *Brain Research* 615, 13-26.
- Hong, J., Ryu, S., Kim, J., Lee, J., Lee, S., Kim, D., Yun, Y., Ryu, J., Lee, B., y Kim, P. (2000). Neuroprotective effect of green tea extract in experimental ischemia-reperfusion brain injury, *Brain Res Bull* 53, 743-9.
- Horvathova, E., Slamenova, D., y Gabelova, A. (1999). Use of single cell gel electrophoresis (comet assay) modifications for analysis of DNA damage, *Gen Physiol Biophys* 18, 70-4.
- Howe, C., LaHair, M., Maxwell, J., Lee, J., Robinson, P., Rodriguez-Mora, O., Cubrey, J., y Franklin, R. (2002). Participation of the calcium / calmodulin- dependent kinases

- in hydrogen peroxide-induced IKB phosphorylation in human T Lymphocytes, *The Journal of Biological Chemistry* 277, 30469-30476.
- Hoyt, K., Gallager, A., Hastings, T., y Reynolds, I. (1997). Characterization of hydrogen peroxide toxicity in cultured rat forebrain neurons, *Neurochemical Research* 22, 333-340.
- Huang, Y., Hwang, J., Lee, P., Ke, F., Huang, J., Huang, C., Kandaswami, C., Middleton, E., y Lee, M. (1999). Effects of luteolin y quercetin, inhibitors of tyrosine kinase, on cell growth y metastasis-associated properties in A431 cells overexpressing epidermal growth factor receptor, *British Journal of Pharmacology* 128, 999-1010.
- Hyslop, P., Zhang, Z., Pearson, D., y Phebus, L. (1995). Measurement of striatal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by microdialysis following global forebrain ischemia and reperfusion in the rat: correlation with the cytotoxic potential of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in vitro, *Brain Research* 671, 181-186.
- Inestrosa, N., Marzolo, M., y Bonnefont, A. (1998). Cellular and molecular basis of estrogen's neuroprotection, *Molecular Neurobiology* 17, 73-86.
- Ishige, K., Schubert, D., y Sagara, Y. (2001). Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms, *Free Radical Biology and Medicine* 30, 433-446.
- Ishikawa, Y., y Kitamura, M. (2000). Anti-apoptotic affect of quercetin: intervention in the JNK and ERK-mediated apoptotic pathways, *Kidney International* 58, 1078-1087.
- Ito, T., Warnken, S., y Stratford May, W. (1999). Protein synthesis inhibition by flavonoids: rooles of eukariontic initiation factor 2 alpha kinases, *Biochemical y Biophysical Research Communications* 265, 589-594.
- Iwao, K., y Tsukamoto, I. (1999). Quercetin inhibited DNA synthesis and induced apoptosis associated with increase in c-fos mRNA level and the upregulation of p21 WAF1/CIP1 mRNA and protein expression during liver regeneration after partial hepatectomy, *Biochimica et Biophysica Acta* 1427, 112-120.
- Iwata, E., Asanuma, M., Nishibayashi, S., Y, y Ogawa, N. (1997). Different effects of oxidative stress on activation of transcription factors in primary cultured rat neuronal and glial cells, *Brain Research Mol Brain Res* 50, 213-20.

- Janero, D., Hreniuk, D., y Shariff, H. (1991). Hydrogen peroxide induced oxidative stress to the mammalian heart muscle cell (cardiomyocyte): lethal prooxidative membrane injury, *Journal of Cellular Physiology* 149, 347-364.
- Jellinger, K., y Stadelmann, C. (2000). The enigma of cell death on neurodegenerative disorders, *J Neural Transm Suppl* 60, 21-36.
- Jesson, M., Johnston, J., Robotham, E., y Begleiter, A. (1989). Characterization of the DNA-DNA cross-linking activity of 3'-(3-cyano-4-morpholinyl)-3'-deaminoadriamycin, *Cancer Research* 49, 7031-6.
- Jiang, D., Jha, N., Boonplueang, R., y Andersen, J. (2001). Caspase 3 inhibition attenuates hydrogen peroxide-induced DNA fragmentation but not cell death in neuronal PC12 cells, *Journal of Neurochemistry* 76, 1745-1755.
- Jin, N., Hatton, N., Harrington, M., Xia, X., Larsen, S., y Rhoades, R. (2000). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - induced egr-1, fra-1 and c-jun gene expression is mediated by tyrosine kinase in aortic smooth muscle cells, *Free Radical Biology and Medicine* 29, 736-746.
- Jones, R., y Morice, A. (2000). Hydrogen peroxide - an intracellular signal in the pulmonary circulation: involvement in hypoxic pulmonary vasoconstriction, *Pharmacology and Therapeutics* 88, 153-161.
- Kandel, E., Schwartz, J., y Jessell, T. (2000). Principles of neural science, 4th edn (N York, St Louis, S Francisco, Auckland, Bogotá, Caracas, Lisboa, London, Madrid, Mexico City, Milan, Montreal, New Delhi, S Juan, Singapore, Sydney, Tokyo, Toronto., Mc Graw Hill).
- Kang, S., Schaber, M., Srinivasula, S., Alnemri, E., Litwack, G., Hall, D., y Bjornsti, M. (1999). Cascades of mammalian caspase activation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *The Journal of Biological Chemistry* 274, 3189-3198.
- Kaul, T., Middleton, E., y Ogra, P. (1985). Antiviral effect of flavonoids on human viruses, *J Med Virol* 15, 71-9.
- Kerr, J., y Harmon, B. (1991). Definition y incidence of apoptosis: an historical perspective. In *Apoptosis: the molecular bases of cell death*, L. Tomei, y F. Cope, eds. (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Kim, D., Cho, E., y Um, H. (2000). Caspase-dependent y -independent events in apoptosis induced by hydrogen peroxide, *Exp Cell Res* 257, 82-88.

- Kitamura, M., y Ishikawa, Y. (1999). Oxidant-induced apoptosis of glomerular cells: intracellular signaling and its intervention by bioflavonoid, *Kidney International* 56, 1223-1229.
- Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J., y Ahnström, G. (1996). The comet assay: mechanisms and technical considerations, *Mutation Research* 363, 89-96.
- Koh, J., y Choi, D. (1987). Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay, *Journal of Neuroscience Methods* 20, 83-90.
- Kottke, T., Blajeski, A., Meng, X., Svingen, P., Ruchaud, S., Mesner, P., Boerner, S., Samejima, K., Henriquez, N., Chilcote, T., y cols. (2002). Lack of correlation between caspase activation y caspase activity assays in paclitaxel-treated MCF-7 breast cancer cells, *J Biol Chem* 277, 804-15.
- Krajewski, S., Krajewska, M., Ellerby, L., Welsh, K., Xie, Z., Deveraux, Q., Salvesen, G., Bredesen; d, Rosenthal, R., Fiskum, G., y Reed, J. (2002). Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia, *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA* 96, 5752-5757.
- Kuhlmann, M., Burkhardt, G., Horsch, E., Wagner, M., y Köller, H. (1998). Inhibition of oxidant-induced lipid peroxidation in cultured renal tubular epithelial cells (LLC-PK1) by quercetin, *Free Radical Research* 29, 451-460.
- Kuiper, G., Lemmen, J., Carlsson, B., Corton, J., Safe, S., Van der Saag, P., Van der Burg, B., y Gustafsson, J. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor betha., *Endocrinology* 139, 4252-4263.
- Larocca, L., Teofili, L., Leone, G., Sica, S., Pierelli, L., Menichella, G., Scambia, G., Benedetti, P., Ricci, R., Piantelli, M., y Ranelletti, F. (1991). Antiproliferative activity of quercetin on normal bone marrow y leukaemic progenitors, *British Journal of Haematology* 79, 562-566.
- Lee, Y., and Shacter, E. (2000). Hydrogen peroxide inhibits activation, not activity, of cellular caspase-3 in vivo, *Free Radic Biol Med* 29, 684-692.
- Lewis, T. (1998). Signal transduction through MAP kinase cascades, *Adv Cancer Res* 74, 49-139.

- Li, R., Heng, Z., y Zhang, Z. (1999). Detection of apoptotic cells by the comet assay, *Wei Sheng Yan Jiu* 28, 83-5.
- Liu, X., y Bao, D. (1996). The mechanism of a new anthracycline antitumor agent: 1,4-bis(2-(2,2-dimethyl-oxazoloidin-3-yl) ethylamino)-1,4-didehydroxy-eta pyrromycinone (AD-89)), *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* 27, 383-7.
- Loeffler, M., y Kroemer, G. (2000). The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita., *Exp Cell Res* 256, 19-26.
- Mabry, T., Markham, K., y Thomas, M. (1970). Reagents and procedures for the systematic identification of flavonoids. In *The systematic identification of flavonoids* (New York-Heidelberg-Berlín, Springer-Verlag).
- Martin, L., Abdulla, N., Brambrink, A., y Kirsch, J. (1998). Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis, *Brain Research Bulletin* 46, 281-309.
- Masimirembwa, C., Otter, C., Berg, M., Jönsson, M., Leidvik, B., Jonsson, E., Johansson, T., Bäckman, A., Edlund, A., and Andersson, T. (1999). Heterologous expression and kinetic characterization of human cytochromes P450: validation of a pharmaceutical tool for drug metabolism research, *Drug Metabolism and Disposition* 27, 1117-1122.
- Mc Conkey, D., Hartzell, P., Duddy, S., Hakansson, H., y Orrenius, S. (1988). 2,3,7,8-tetracholodibenzo-p-dioxin kills immature thymocytes by calcium-mediated endonuclease activation, *Science*, 242-256.
- McPherson, D., Kilker, R., y Foley, T. (2002). Superoxide activates constitutive nitric oxide synthase in a brain particulate fraction, *Biochem Biophys Res Commun* 296, 413-18.
- Miller, R., y Brittigan, B. (1997). Role of oxidants in microbial pathophysiology, *Clinical Microbiology Reviews* 10, 1-18.
- Miranda, S., Opazo, C., Larrondo, L., Muñoz, F., Ruiz, F., Leighton, F., y Inestrosa, N. (2000). The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid  $\beta$ -peptide in Alzheimer's disease, *Progress in Neurobiology* 62, 633-648.

- Musonda, C., y Chipman, J. (1998). Quercetin inhibits hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)- induced NFKappaB DNA binding activity y DNA damage in HepG2 cells, *Carcinogenesis* *19*, 1583-1589.
- Nakai, M., Qin, Z., Wang, Y., y Chase, T. (1999). Free radical scavenger OPC-14117 attenuates quinolo acid-induced NFKappaB activation y apoptosis in rat striatum, *Molecular Brain Research* *64*, 59-68.
- Nakayama, T., Yamada, M., Osawa, T., y Kawakishi, S. (1993). Supression of active oxygen-induced toxicity by flavonoids, *Biochem Pharmacol* *45*, 265-7.
- Namura, S., Zhu, J., Fink, K., Endres, M., Srinivassan, A., Tomaselli, K., Yuan, J., y Moskowitz, M. (1998). Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia, *The Journal of Neuroscience* *18*, 3659-3668.
- Nilsen, J., Mor, G., y Naftolin, F. (1998). Raloxifene induces neurite outgrowth in estrogen receptor positive PC12 cells, *Menopause* *5*, 211-6.
- Noroozi, M., Angerson, W., y Lean, M. (1998). Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes, *American Journal of Clinical Nutrition* *67*, 1210-1218.
- Oberdörster, E., Clay, M., Cottam, D., Wilmont, F., McLachlan, J., y Milner, M. (2001). Common pythochemicals are ecdysteroid agonists y antagonits: a possible evolutionary link between vertebrate and invertebrate steroid hormones., *Journal of steroid biochemistry and molecular biology* *77*, 229-238.
- O'Brien, N., Woods, J., Aherne, S., y O'Callaghan, Y. (2000). Cytotoxicitu, genotoxicity and oxidative reactions in cell-culture moddels: modulatory effects of phytochemicals, *Biochem Soc Trans* *28*, 22-6.
- Ohsawa, Y., Isahara, K., Kanamori, S., Shibata, M., Kamataka, S., Gotow, T., Watanabe, T., Kominami, E., y Uchiyama, Y. (1998). An ultrastructutal and immunohistochemical study of PC12 cells during apoptosis induced by serum deprivation with special reference to autophagy and lysosomal cathepsins, *Arch Histol Cytol* *61*, 395-403.
- Otake, Y., Nolan, A., Walle, U., and Walle, T. (2000). Quercetin and reverastrol potently reduce estrogen sulfotransferase activity in normal human mammary epithelial cells, *Journal of Steroid Biochemisty and Molecular Biology* *73*, 265-270

- Pan, Y., Anthony, M., y Clarkson, T. (1999). Evidence for up-regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA by soy phytoestrogens in the frontal cortex of retired breeder female rats, *Neuroscience Letters* 261, 17-20.
- Peet, G., and Li, J. (1999). IKB kinases alpha and betha show a random sequential kinetic mechanism and are inhibited by staurosporin and quercetin, *The Journal of Biological Chemistry* 274, 32655-32661.
- Pignatelli, P., Pulcinelli, F., Celestini, A., Lenti, L., Ghiselli, A., Gazzaniga, P., y Violi, F. (2000). The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide, *Am J Clin Nutr* 72, 1150-5.
- Prajda, N., Singhai, R., Yeh, Y., Olah, E., Look, K., y Weber, G. (1995). Linkage of reduction in 1-phosphatidylinositol 4- kinase activity and inositol 1,4,5-triphosphate concentration in human ovarian carcinoma cells treated with quercetin, *Life Sciences* 56, 1587-1593.
- Punnonen, E., y Reunanen, H. (1990). Effects of vinblastine, leucine, and histidine, and 3-methyladenine on autophagy in Ehrlich ascites cells, *Exp Mol Pathol* 52, 87-97.
- Rahman, A., Shaabuddin, Hadi, S., y Parish, J. (1990). Complexes involving quercetin, DNA y Cu(II), *Carcinogenesis* 11, 2001-2003.
- Ranelletti, F., Ricci, R., Larocca, L., Maggiano, N., Capelli, A., Scambia, G., Benedetti, P., Mancuso, S., Rumi, C., and Piantelli, M. (1992). Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type-II estrogen-binding sites in human colon-cancer cell lines and primary colorectal tumors, *International Journal of Cancer* 50, 486-492.
- Reiter, R., Tan, D., y Burkhardt, S. (2002). Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin, *Mech Ageing Dev* 123, 1007-19.
- Rivera, F., Urbanavicius, J., Abin, A., Morquío, A., Heinzein, H., y Dajas, F. (2002). Una preparación de quercetina con lecitina reduce el daño isquémico en un modelo de isquemia focal (en preparación).
- Robertson, G., Crocker, S., Nicholson, D., y Schultz, J. (2000). Neuroprotection by the inhibition of apoptosis, *Brain Pathol* 10, 283-292.



- Romanova, D., Vacháalkova, A., Cipak, L., Ovesna, Z., y Rauko, P. (2001). Study of antioxidant effect of apigenin, luteolin and quercetin by DNA protective method, *Neoplasma* 48, 104-107.
- Rosselli, M., Reinhart, K., Imthurn, B., Keller, P., y Dubey, R. (2000). Cellular and biochemical mechanisms by which environmental oestrogens influence reproductive function, *Human Reproduction Update* 6, 332-350.
- Salo, D., Lin, S., Pacifici, R., y Davies, K. (1988). Superoxide dismutase is preferentially degraded by a proteolytic system from red blood cells following oxidative modification by hydrogen peroxide, *Free Radic Biol Med* 5, 335-9.
- Samanta, S., Perkinson, M., Morgan, M., y Williams, R. (1998). Hydrogen peroxide enhances signal-responsive arachidonic acid release from neurons: role of mitogen-activated protein kinase, *Journal of Neurochemistry* 70, 2082-2090.
- Sanderson, J., McLauchan, W., y Williamson, G. (1999). Quercetin inhibits hydrogen peroxide-induced oxidation in rat lens, *Free Radic Biol Med* 5, 639-45.
- Sandvig, K., y van Deurs, B. (1992). Toxin-induced cell lysis: protection by 3-methyladenine and cycloheximide, *Exp Cell Res* 200, 253-262.
- Saslowsky, D., y Winkel-Shirley, B. (2001). Localization of flavonoid enzymes in *Arabidopsis* roots, *Plant J* 27, 37-48.
- Sassone, P., Ransone, L., y Verma, I. (1990). Cross-talk in signal transduction:TPA-inducible factor c-jun/AP-1 activates cAMP-responsive enhancer elements, *Oncogene* 5, 427-31.
- Sax, N., y Lewis, R. (1993). *Diccionario de química de Hawley* (Barcelona, España, Omega).
- Scambia, G., Ranelletti, F., Benedetti, P., Piantelli, M., Bonanno, G., De Vincenzo, R., Ferrandina, G., Rumi, C., Larocca, L., y Mancuso, S. (1990). Inhibitory effect of quercetin on OVCA 433 cells and presence of type II estrogen binding sites in primary ovarian tumours and cultured cells, *British Journal of Cancer* 62, 942-946.
- Scandalios, J. (2002). Oxidative stress responses-what have genome-scale studies taught us?, *Genome Biology* 3, 1019.1-1019.6.

- Selloum, L., Reichl, S., Muller, M., Sebihi, L., and Arnhold, J. (2001). Effects of flavonols on the generation of superoxide anion radicals by xanthine oxidase and stimulated neutrophils, *Arch Biochem Biophys* 395, 49-56.
- Shafer, T., and Atchinson, W. (1991). Transmitter, ion channel and receptor properties of pheochromocytoma (PC12) cells: a model for neurotoxicological studies, *Neurotoxicology* 12, 473-492.
- Shoshan, V., and MacLennan, D. (1981). Quercetin interaction with the (Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup>)-ATPase of sarcoplasmic reticulum, *The Journal of Biological Chemistry* 256, 887-892.
- Slee, E., Adrain, C., y Martin, S. (1999a). Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis, *Cell Death Differ* 6, 1067-1074.
- Slee, E., Harte, M., Kluck, R., Wolf, B., Casiano, C., Newmeyer, D., Wang, H., Reed, J., Nicholson, D., Alnemri, E., y cols. (1999b). 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, 281-292.
- Snipas, S., Stennicke, H., Riedl, S., Potempa, J., Travis, J., Barret, A., y Salvessen, G. (2001). Inhibition of distant caspase homologues by natural caspase inhibitors, *Biochem J* 357, 575-580.
- Soczynska-Kordala, M., Bakowska, A., Oszmianski, J., y Gabrielska, J. (2001). Metal ion-flavonoids associatoin in bilayer phospholipid membranes, *Cell Mol Biol Lett* 6, 277-81.
- Solimani, R. (1996). Quercetin y DNA in solution: analysis of the dynamics of their interaction with a linear dichroism study, *International Journal of Biol Macromol* 18, 287-95.
- Srivastava, P., Sharma, P., y Dogra, R. (1999). Inducers of nod genes of *Rhizobium ciceri*, *Microbiological Research* 154, 49-55.
- Stallings, W., Glusker, J., Carrell, H., Bogucka, M., Ledochowski, A., y Stenowski, J. (1984). Intercalation model for DNA-cross linking in a 1-nitro-9-aminoacridine derivative, an analog of the antitumor agent "ledakrin"., *J Bimol Struct Dyn* 2, 511-24.

- Stoscheck, C. (1990). Quantitation of protein. In *Guide to protein purification*, M. Deutscher, ed. (San Diego, New York, Berkeley, Boston, London; Sydney, Tokyo, Toronto, Academic Press), pp. 57-63.
- Sweatt, J. (2001). The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory, *Journal of Neurochemistry* *76*, 1-10.
- Tan, D., Reiter, R., Manchester, L., Yan, M., El-Sawi, M., Sainz, R., Mayo, J., Kohen, R., Allegra, M., y Hardeland, R. (2002). Chemical y physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger., *Current Top Med Chem* *2*, 181-97.
- Telbisz, A., y Kovacs, A. (2000). Intracellular protein degradation y autophagy in isolated pancreatic acini of the rat, *Cell Biochem Funct* *18*, 29-40.
- Thiyagarajah, P., Kuttan, S., Lim, S., Teo, T., y Das, N. (1991). Effect of myricetin and other flavonoids on the liver plasma membrane  $Ca^{2+}$  pump. Kinetics and structure-function relationships, *Biochemical Pharmacology* *41*, 669-675.
- Tice, R., Andrews, P., y Singh, N. (1990). The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage y repair. In *DNA damage and repair in human tissues*, B. Sutherland, and A. Woodhead, eds. (New York, Plenum Press), pp. 291-301.
- Torriglia, A., Perani, P., Brossas, J., Altairac, S., Zeggai, S., Martin, E., Tréton, J., Courtois, Y., y Counis, M. (2000). A caspase-independent cell clearance program. The LEI/L-DNAse II pathway, *Annals New York Academy of Sciences* *926*, 192-203.
- Tsujimoto, Y., y Shimizu, S. (2002). The voltage-dependent anion channel: an essential player in apoptosis, *Biochimie* *84*, 187-93.
- Uchiyama, Y. (2001). Autophagic cell death y its execution by lysosomal cathepsins, *Histol Cytol* *64*, 233-246.
- Van Acker, S., Van der Berg, D., Tromp, M., Griffioen, D., van Bennekom, W., van der Vigh, W., y Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids, *Free Radic Biol Med* *20*, 331-342.

- Wang, H., y Joseph, J. (1999). Structure-activity relationships of quercetin in antagonizing hydrogen peroxide-induced calcium dysregulation in PC12 cells, *Free Radical Biology y Medicine* 27, 683-694.
- Whittemore, E., Loo, D., y Cotman, C. (1994). Exposure to hydrogen peroxide induces cell death via apoptosis in cultured rat cortical neurons, *Neuropharmacology and Neurotoxicology* 5, 1485-1488.
- Williamson, G., Plub, G., y García Conesa, M. (1999). Glycosilation, esterification and polymerization of flavonoids and hydroxycinnamates: effects on antioxidant properties. In *Chemistry, Biology, pharmacology, Ecology*, G. e. a. K. Academic, ed. (New York, Plenum Publishers), pp. 483-493.
- Xue, L., Fletcher, G., y Tolkovsky, A. (1999). Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution, *Molecular and Cellular Neuroscience* 14, 180-198.
- Yamakawa, H., Ito, Y., Nagakawa, T., Banno, Y., Nakashima, S., Yoshimura, S., Sawada, M., Nishimura, Y., Nozawa, Y., y Sakai, N. (2000). Activation of caspase-9 and -3 during H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis of PC12 cells independent of ceramide formation, *Neurological Research* 22, 556-564.
- Yamashita, N., Tanemura, H., y Kawanishi, S. (1999). Mechanism of oxidative DNA damage induced by quercetin in the presence of Cu(II), *Mutation Research* 425, 107-115.
- Yamashita, Y., Kawada, S., y Nakano, H. (1990). Induction of mammalian topoisomerase II dependent DNA cleavage by nonintercalative flavonoids, genistein and orbol, *Biochem Pharmacol* 39, 737-44.
- Yokoo, T., y Kitamura, M. (1997). Unexpected protection of glomerular mesangial cells from oxidant-triggered apoptosis by bioflavonoid quercetin, *BUSCAR (American Physiological Society) F*, 206-211.
- Yoshida, M., Sakai, T., Hosokawa, N., Marui, N., Matsumoto, K., Fujikoa, A., Nishino, H., y Aoike, A. (1990). The effect of quercetin on cel cycle progression and growth of human gastric cancer cells, *FEBS Lett* 260, 10-13.
- Zaman, K., Ryu, H., Hall, D., O'Donovan, K., Lin, K., Miller, M., Marquis, J., Baraban, J., Semenza, G., y Ratan, R. (1999). Protection from oxidative stress-induced apoptosis

- in neuronal cultures by iron chelators is associated with enhanced DNA binding of hypoxia-inducible factor-1 and ATF-1/CREB and increased expression of glycolytic enzymes, p21 (waf1/cip1), and erythropoietin., *J Neurosci* *19*, 9821-30.
- Zhang, L., y Jope, R. (1999). Oxidative stress differentially modulates phosphorylation of ERK, p38 y CREB induced by NGF or EGF in PC12 cells, *Neurobiology of aging* *20*, 271-278.
- Zimmermann, K., y Green, D. (2001). How cells die: apoptosis pathways, *J Allergy Clin Immunol* *108* (4 suppl), 599-603.