BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

Universidad del País Vasco

Generación de mediadores lipídicos inducida por tert-butilhidroperóxido en hepatocitos de rata

César A. Martín Plágaro

Tesis de Doctorado

Facultad: Medicina y Odontología

Directores: Dra. Mercedes Lacort Garrigós
Dra. María Begoña Ruiz Larrea

2001

eman ta zabal zazu

UNIVERSIDAD DEL PAIS VASCO
EUSKAL HERRIKO UNIBERTSITATEA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

GENERACIÓN DE MEDIADORES LIPÍDICOS INDUCIDA POR *TERT*-BUTILHIDROPERÓXIDO EN HEPATOCITOS DE RATA

CÉSAR MARTÍN PLÁGARO

LEIOA, MARZO DE 2001

eman ta zabal zazu

UNIVERSIDAD DEL PAIS VASCO

EUSKAL HERRIKO UNIBERTSITATEA

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

GENERACIÓN DE MEDIADORES LIPÍDICOS INDUCIDA POR *TERT*-BUTILHIDROPERÓXIDO EN HEPATOCITOS DE RATA

Memoria presentada por CÉSAR MARTÍN PLÁGARO para optar al grado de Doctor en Ciencias.

Leioa, Marzo de 2001

Durante el período de realización de esta Tesis he sido receptor de una beca de Formación de Personal Investigador (AP96) concedida por el Ministerio de Educación y Cultura (M.E.C.). Además, este trabajo ha sido subvencionado por la UPV/EHU y por el Gobierno Vasco en diversos proyectos de Investigación.

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

A mi familia, por todo.

AA:	ácido araquidónico
ADN:	ácido desoxirribonucleico
ARN:	ácido ribonucleico
BSA:	albúmina sérica bovina (*Bovine Serum Albumin*)
$cPLA_2$:	PLA_2 citosólica de 85 kDa
CSF:	factor estimulador de colonias (*Colony Stimulated Factor*)
DAG:	diacilglicerol
DCFH-DA:	diclorofluorescina diacetato
DCF:	diclorofluoresceína
DCFH:	diclorofluorescina
DEM:	dietilmaleimida
DES:	dietilestilbestrol
DF:	desferal
DTT:	ditiotreitol
E_2:	17β-estradiol
EGF:	factor estimulador epidermico (*Epidermal Growth Factor*)
GSH:	glutatión reducido
GSSG:	glutatión oxidado
$HO^{\bullet}$:	radical hidroxilo
IL:	interleukina
IP_3:	inositol 1,4,5-trisfosfato
$iPLA_2$:	PLA_2 independiente de calcio
LPA:	ácido lisofosfatídico (*LysoPhosphatidic Acid*)
LPS:	lipopolisacárido
MAPK:	proteína quinasa activada por mitógeno (*Mitogen Activated Protein Kinase*)
MAPKK:	Proteína quinasa de MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase Kinase*)
MDA:	malondialdehído
O_2^-:	anión superóxido
PA:	ácido fosfatídico (*Phosphatidic Acid*)
PAF:	factor de activación plaquetario (*Platelet Activated Factor*)

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

PAP:	fosfatidato fosfohidrolasa
PC:	fosfatidilcolina
PDGF:	factor de crecimiento derivado de plaquetas (*Platelet Derived Growth Factor*)
PE:	fosfatidiletanolamina
PI:	fosfatidilinositol
PIP_2:	fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PKA:	proteína quinasa A
PKC:	proteína quinasa C
PKG:	proteína quinasa G
PLA_2:	fosfolipasa A_2
PLC:	fosfolipasa C
PLD:	fosfolipasa D
PMA:	forbol miristato acetato
PTK:	tirosina quinasa (*Protein Tyrosine Kinase*)
PTP:	proteína tirosina fosfatasa (*Protein Tyrosine Phosphatase*)
ROS:	especies oxigenadas reactivas (Reactive Oxygen Species)
RTK:	receptor tirosina quinasa
SOD:	superóxido dismutasa
$sPLA_2$:	PLA_2 de secreción o PLA_2 tipo II
STK:	tirosina quinasa soluble (*Soluble Tyrosine Kinase)*
TBA:	ácido tiobarbitúrico
TBARS:	sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico
TBHP:	*tert*-butilhidroperóxido
TGF:	factor de crecimiento tumoral (*Tumor Growth Factor*)
TNF:	factor de necrosis tumoral (*Tumoral Necrosis Factor*)

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN..... 1

1. Mecanismos que inducen la generación de ROS en células.....4
    1. 1. Cadena transportadora de electrones..... 5
    1. 2. Citocromo P450..... 6
    1. 3. NADPH oxidasa..... 7
    1. 4. Xantina deshidrogenasa/xantina oxidasa.....8

2. Mecanismos de defensa frente a ROS..... 8
    2. 1. Sistemas de defensa enzimáticos..... 8
        2. 1. 1. Superóxido dismutasa..... 8
        2. 1. 2. Catalasa y peroxidasa.....9
    2. 2. Sistemas de defensa no enzimáticos.....10
        2. 2. 1. Vitamina E..... 10
        2. 2. 2. Vitamina C..... 11
        2. 2. 3. GSH.....12
        2. 2. 4. Quelantes de hierro..... 13

3. Efectos citotóxicos de los ROS.....13
    3. 1. Modificaciones en la membrana: peroxidación de lípidos..... 14
    3. 2. Modificaciones en proteínas.....15
    3. 3. Modificaciones del ADN..... 16
    3. 4. Modificaciones en la homeostasis del Ca^{2+} 16

4. Señalización celular..... 17

5. Efectos de ROS sobre la transducción de señales.....18
    5. 1. Señalización intracelular mediada por ROS.....18
    5. 2. Procesos de señalización inducidos por ROS..... 19

6. Función de las fosfolipasas en la transducción de señales.....21

7. Tipos de fosfolipasas.....21
    7. 1. Fosfolipasa A_2 22
        7. 1. 1. PLA_2 tipo I o pancreática.....23
        7. 1. 2. PLA_2 tipo II.....24
            7. 1. 2. 1. Regulación.....24
        7. 1. 3. Fosfolipasa A_2 citosólica.....25
            7. 1. 3. 1. Activación del enzima.....26
            7. 1. 3. 2. Activación por proteínas G.....28
            7. 1. 3. 3. Activación de la $cPLA_2$ inducida por oxidantes..... 28

8. Fosfolipasa C..... 30
    8. 1. Fosfolipasa C específica de PI..... 30
        8. 1. 1. Activación de los isoenzimas de PLC..... 30
            8. 1. 1. 1. PLCγ 30
            8. 1. 1. 2. PLCβ 31

8. 1. 1. 3. PLCδ 31
8. 2. Activación de la PLC inducida por oxidantes 32

9. Fosfolipasa D 33
9. 1. Activación de la PLD 34
9. 1. 1. Activación por Ca^{2+} 35
9. 1. 2. Activación por proteínas G de bajo peso molecular 36
9. 1. 3. Activación por tirosina quinasas 36
9. 1. 4. Activación por PIP_2 y fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP_3) 37
9. 1. 5. Activación por oxidantes 37

10. Estrés oxidativo inducido por *tert*-butilhidroperóxido 37

OBJETIVOS 41

Objetivos 43

MATERIALES Y MÉTODOS 45

1. Materiales 47
1. 1. Reactivos 47
1. 2. Equipamiento 49
1. 3. Animales de experimentación 49
2. Métodos 50
2. 1. Obtención de los hepatocitos 50
2. 2. Determinación de la viabilidad celular 50
2. 3. Incubaciones celulares 50
2. 4. Determinación de parámetros citotóxicos 50
2. 4. 1. Determinación de la peroxidación de lípidos 51
2. 4. 2. Cuantificación de los niveles celulares de ATP 51
2. 4. 3. Medida de grupos sulfhidrilo (-SH) proteicos 51
2. 4. 4. Determinación del GSH 52
2. 4. 5. Determinación del NAD(P)H 52
2. 5. Especies oxigenadas reactivas 53
2. 6. Determinación de los niveles intracelulares de DAG-[^{14}C] y AA-[^{14}C] 53
2. 6. 1. Incorporación de AA-[^{14}C] en lípidos celulares 53
2. 6. 2. Extracción y fraccionamiento de lípidos 54
2. 7. Determinación de la actividad PLD 54
2. 8. Estudios inmunoquímicos 55
2. 8. 1. Análisis de $sPLA_2$ 55
2. 8. 1. 1. Extractos celulares 56
2. 8. 1. 2. Detección de $sPLA_2$ por transferencia Western 56
2. 8. 1. Análisis de fosfotirosinas 56
2. 8. 2. 1. Extractos celulares 57
2. 8. 2. 2. Detección de fosfotirosinas por transferencia Western 57
2. 9. Análisis estadístico de los resultados 57

RESULTADOS..... 59

1. Estudio del estrés oxidaivo inducido por TBHP.....61
1. 1. Estudios con TBHP (0,5 mM).....61
1. 2. Efecto de antioxidantes sobre el estrés oxidativo inducido por TBHP.....63
1. 2. 1. Efecto sobre la peroxidación de lípidos..... 63
1. 2. 2. Efecto sobre el GSH y los grupo -SH proteicos..... 65
1. 2. 3. Efecto sobre los nucleótidos de pirimidina..... 66

2. Formación intracelular de ROS inducida por TBHP.....68

3. Estudio del efecto del TBHP sobre la movilización intracelular de AA y DAG de los fosfolípidos de membrana.....72
3. 1. Incorporación de AA-[^{14}C] en los lípidos celulares.....72
3. 2. Efecto del TBHP sobre el acúmulo intracelular de AA-[^{14}C] y DAG-[^{14}C] en hepatocitos.....73
3. 3. Efecto de antioxidantes sobre el acúmulo intracelular de AA-[^{14}C].....74
3. 4. Efecto de antioxidantes sobre el acúmulo intracelular de DAG-[^{14}C].....75

4. Estudio de correlaciones entre los niveles intracelulares de AA-[^{14}C] y DAG-[^{14}C] y parámetros citotóxicos..... 77
4. 1. AA-[^{14}C].....77
4. 2. DAG-[^{14}C].....78

5. Estudio del mecanismo de liberación de AA y DAG..... 80
5. 1. PLA_2 80
5. 2. PLC..... 84
5. 3. PLD..... 86
5. 4. Proteína quinasas.....88
5. 5. MAPK.....90
5. 6. Ca^{2+} intracelular..... 91
5. 7. Tirosina quinasas.....92

DISCUSIÓN..... 95

Discusión 97

CONCLUSIONES..... 107

Conclusiones.....109

BIBLIOGRAFÍA..... 111

Bibliografía.....113

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

En todos los tipos celulares se producen especies oxigenadas reactivas (ROS) como consecuencia del metabolismo celular del oxígeno durante procesos fisiológicos o en respuesta a efectores exógenos. ROS es un término utilizado para referirse tanto a radicales libres oxigenados como a otros derivados del oxígeno no radicalarios con capacidad de generar radicales libres. Entre los ROS que se producen en la células encontramos el anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), el radical hidroxilo ($HO^{\bullet}$), el radical peroxilo ($LOO^{\bullet}$), el radical alcoxilo ($RO^{\bullet}$), y también otras especies no radicalarias (HOCl, H_2O_2, HONOO, $ONOO^-$, ozono, etc...)

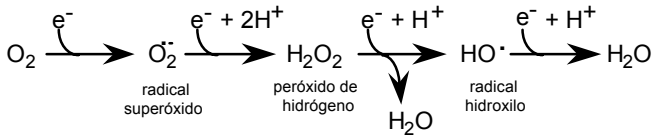
BIBLIOTECA VIRTUAL

La generación celular de ROS empezó a estudiarse en procesos de fagocitosis. Las células fagocíticas producen gran cantidad de $O_2^{\bullet -}$ y de H_2O_2 como sistema de defensa ante agentes invasores patógenos. Además de esta función protectora, se ha demostrado que los ROS pueden modificar gran variedad de funciones celulares. Los oxidantes biológicos pueden tanto activar como inactivar vías de señalización en las que participan tirosina quinasas (PTKs), factores de transcripción, la oxidación de grupos tioles celulares clave y la homeostasis del calcio. Dependiendo de la interacción entre distintas vías de señalización intracelular, la exposición moderada a ciertos oxidantes puede promover la proliferación celular, inducir apoptosis y síntesis de proteínas, activar procesos de secreción, etc...

Los ROS a concentraciones elevadas son tóxicos debido a su alta reactividad. En la célula se han desarrollado distintos mecanismos bioquímicos (enzimas de defensa y antioxidantes) capaces de prevenir los efectos nocivos de los ROS. Cuando hay una sobreproducción de ROS y se desajusta el equilibrio oxidantes/antioxidantes en favor de los primeros, se produce la situación denominada estrés oxidativo, que conduce a lesiones celulares y tisulares. Se ha implicado a los oxidantes en la patofisiología de distintas enfermedades humanas como la arteriosclerosis, procesos inflamatorios, enfermedad de Alzheimer, cáncer,etc...

1. MECANISMOS QUE INDUCEN LA GENERACIÓN DE ROS EN CÉLULAS

La reducción del oxígeno molecular a H_2O durante el metabolismo celular tiene lugar en sucesivas cesiones de un electrón según el siguiente esquema:



Esquema 1: Generación de ROS como consecuencia de la reducción parcial del O_2.

Los distintos tipos de ROS se forman cuando el oxígeno es reducido parcialmente, lo que depende del número de electrones cedidos. El primer producto de la reducción es el $O_2^{\bullet -}$, que en disolución acuosa y a pH neutro o ligeramente ácido es una especie poco reactiva y dismuta a H_2O_2. Esta reacción se produce espontáneamente o está catalizada por el enzima intracelular superóxido dismutasa (SOD). Debido a su baja reactividad el $O_2^{\bullet -}$ puede difundir desde el lugar donde ha sido generado a otros compartimentos celulares (Gus'kova y col., 1984). Sin embargo, a pH ácido se protona formándose el radical hidroperoxilo ($H\ O_2^{\bullet -}$), que es una especie más reactiva.

Cuando el O_2 es reducido parcialmente por dos electrones se forma H_2O_2. El H_2O_2 es una molécula estable que puede difundir por las membranas y provocar efectos en lugares diferentes a donde se produce. La peligrosidad del H_2O_2 radica en su capacidad de formación de otro ROS más reactivo, como el $HO^{\bullet}$. La célula ha desarrollado sistemas de eliminación de esta molécula, siendo la catalasa y la glutatión peroxidasa los exponentes más eficaces. Los iones metálicos tienen un fuerte efecto en la química del dioxígeno y su producto de reducción. Si el Fe^{2+} entra en contacto con el H_2O_2 puede iniciarse la conocida reacción de Fenton que produce el radical $HO^{\bullet}$:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + HO^{\bullet} + HO^{-}$$

Esquema 2: Generación del radical $HO^{\bullet}$ a partir de H_2O_2 en la reacción de Fenton.

Iones de Cu, Co y Ni también pueden participar en una reacción similar. Otra reacción que tiene como resultado la formación del radical $HO^{\bullet}$ es la reacción de Haber-Weiss, en la que el $O_2^{\bullet -}$ reacciona con H_2O_2 en presencia de Fe^{2+} :

$$O_2^{\bullet -} + H_2O_2 \xrightarrow{Fe^{2+}} O_2 + HO^{\bullet} + HO^{-}$$

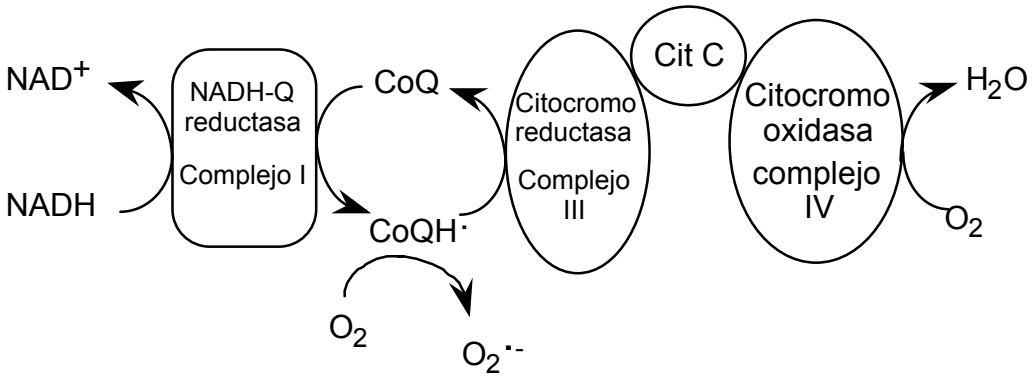
Esquema 3: Generación del radical $HO^{\bullet}$ a partir de H_2O_2 en la reacción de Haber-Weiss.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

El $HO^{\bullet}$ es una especie altamente reactiva que puede reaccionar con prácticamente cualquier molécula presente en la célula. Debido a su inestabilidad reacciona con moléculas orgánicas en el lugar o en lugares cercanos a su formación.

1. 1. CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES

Durante la respiración celular los electrones se tranfieren del NADH al O_2 a través de una cadena de tres grandes complejos proteicos llamados NADH-Q reductasa, citocromo reductasa y citocromo oxidasa (esquema 4). La reducción de O_2 a H_2O se produce en una única etapa catalizada por el complejo citocromo oxidasa. En esta reacción no se liberan ROS, ya que todos los radicales derivados del oxígeno se hallan firmemente ligados al complejo enzimático. Sin embargo, a diferencia de la citocromo oxidasa, otros componentes de la cadena transportadora de electrones, como el coenzima Q, sí dejan escapar electrones hasta el O_2, generando $O_2^{\bullet -}$.



Esquema 4: Reducción del O_2 a H_2O_2 mediada por la cadena de transporte de electrones.

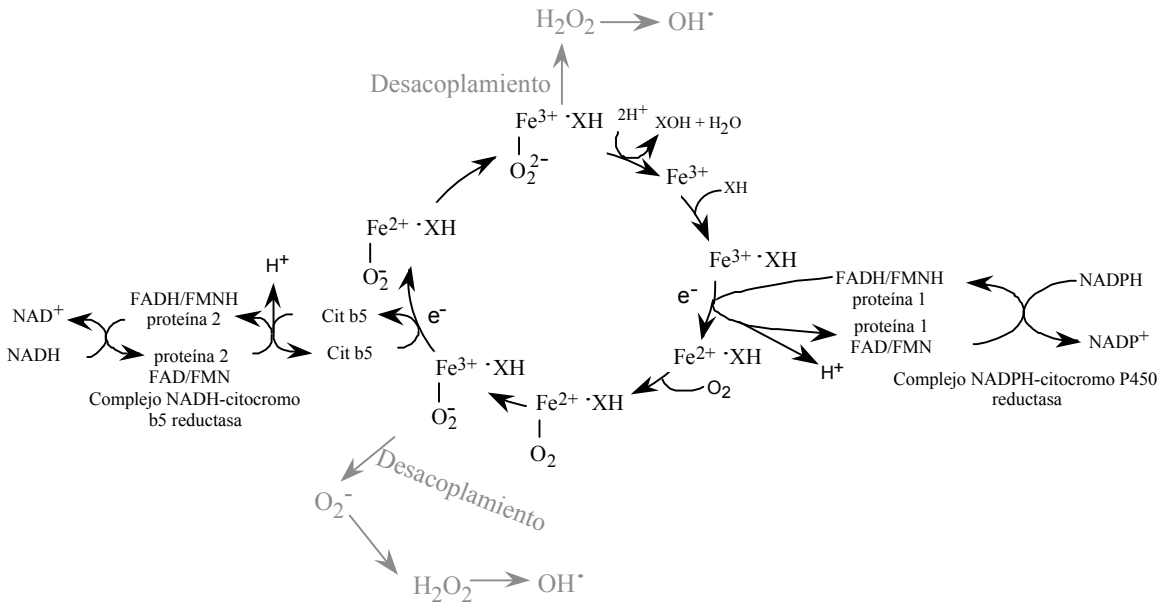
La mitocondria reduce parcialmente entre un 1 y 2% del O_2 consumido ($O_2^{\bullet -}$, H_2O_2 y $HO^{\bullet}$) como consecuencia del escape de electrones de la cadena transportadora durante la respiración (Hassan y Fridovich, 1979). Se estima que a partir del O_2 respirado al año se producen 2 kg de $O_2^{\bullet -}$.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

1. 2. CITOCROMO P450

El citocromo P450 es el componente terminal de una cadena transportadora de electrones que se ha localizado en las mitocondrias de la corteza suprarrenal y en los microsomas hepáticos. Su función es la transformación de sustratos que se oxidan por el O_2. Los sustratos S-H que se transforman en S-OH pueden ser endógenos (ácidos grasos de cadena larga, esteroides, prostaglandinas) o exógenos (xenobióticos). El objetivo de la transformación es convertir los sustratos hidrófobos en hidrófilos para facilitar su excreción y eliminar o disminuir su actividad biológica. La introducción de grupos hidroxilo suministra además centros de conjugación con moléculas muy polares que potencian la solubilidad de la molécula modificada.

En las reacciones mediadas por el citocromo P450 puede producirse $O_2^{\bullet -}$ y H_2O_2 mediante fenómenos de desacoplamiento de la transferencia electrones.



Esquema 5: Transporte electrónico desde los coenzimas de nicotinamida al citocromo P450 y formación de ROS.

La acción del citocromo P450 no siempre resulta beneficiosa. Muchos xenobióticos, como las quinonas, se convierten *in vivo* en una forma químicamente reactiva. Las quinonas (Q) se transforman en hidroquinonas (Q-OH) por reducción con dos electrones. Dichos electrones se pueden adicionar secuencialmente de forma que se generan intermediarios reactivos, los radicales semiquinonas ($SQ^{\bullet}$). Las $SQ^{\bullet}$ ceden electrones al O_2 generando $O_2^{\bullet -}$. Se crea un ciclo en el que se produce una gran cantidad de $O_2^{\bullet -}$.

1. 3. NADPH OXIDASA

La NADPH oxidasa es un complejo multienzimático localizado en la membrana plasmática de células fagocíticas (neutrófilos, monocitos, macrófagos, etc...). Tradicionalmente se le ha asignado un papel de enzima anti-patógeno. Durante la fagocitosis distintos tipos celulares incrementan espectacularmente el consumo de O_2 . El sistema oxida el NADPH y los electrones se usan para reducir el O_2 a $O_2^{\bullet -}$. Debido a su naturaleza destructora, los ROS dañan y eliminan la bacteria, ya que activan enzimas hidrolíticos como las proteasas, que son liberadas en las cercanías de la bacteria.

1. 4. XANTINA DESHIDROGENASA /XANTINA OXIDASA

El complejo enzimático xantina deshidrogenasa/xantina oxidasa (XDH/XO) es la principal fuente citoplásmica de $O_2^{\bullet -}$ y de H_2O_2. La XO cataliza la conversión de hipoxantina a xantina y ácido úrico en la vía catabólica de las purinas y además cataliza la oxidación de gran variedad de sustratos. El enzima existe en dos formas interconvertibles, XDH y XO. La XDH reduce preferentemente NAD^+, mientras que la XO prefiere el O_2. La reducción del O_2 produce $O_2^{\bullet -}$ y H_2O_2, siendo esta capacidad generadora de ROS un factor importante en la patogenia del daño por isquemia-reperfusión.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

2. MECANISMOS DE DEFENSA FRENTE A ROS

Dada la toxicidad potencial de los ROS, en la célula se han desarrollado distintos mecanismos bioquímicos (enzimáticos y no enzimáticos) para evitar lesiones a componentes celulares. Los enzimas de defensa, junto con las sustancias capaces de disminuir los niveles de ROS o prevenir su formación, constituyen un potente tampón de naturaleza reductora que confiere a la célula la capacidad de mitigar la acción de los metabolitos oxigenados reactivos. Los agentes reductores, por lo tanto, constituyen un mecanismo protector que mantiene bajos los niveles intracelulares de ROS.

2. 1. SISTEMAS DE DEFENSA ENZIMÁTICOS

La primera línea de defensa para la eliminación de $O_2^{\bullet -}$ y H_2O_2 la componen los enzimas antioxidantes: SODs, peroxidasas y catalasa.

2. 1. 1. SUPERÓXIDO DISMUTASA

La SOD es el enzima encargado de la eliminación del $O_2^{\bullet -}$ y se encuentra prácticamente en todos los organismos aerobios. Las SODs son una familia de metaloenzimas que convierten el $O_2^{\bullet -}$ en H_2O_2 de la siguiente manera:

$$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} \xrightarrow[\text{SOD}]{2H^+} H_2O_2 + O_2$$

Esquema 6: Reación catalizada por la SOD.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Hay cuatro familias de SOD: Cu-SOD, Cu-Zn-SOD, Mn-SOD y Fe-SOD. El metal de transición del enzima (Cu, Mn o Fe) reacciona con el $O_2^{\bullet -}$ quitándole su electrón. El $O_2^{\bullet -}$ es el único sustrato conocido para la SOD. En la reacción catalizada por la SOD se produce un nuevo elemento oxidante, el H_2O_2, que es posteriormente eliminado mediante la acción de otros enzimas que actúan concertadamente con la SOD.

2. 1. 2. CATALASA Y PEROXIDASA

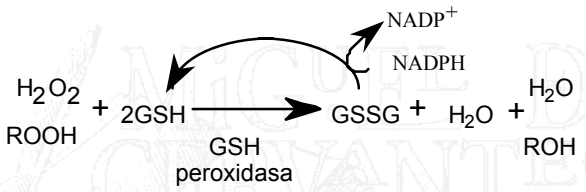
Las catalasas y peroxidasas son los enzimas encargados de descomponer el H_2O_2. Las catalasas y peroxidasas (dependientes de glutatión o tiorredoxina) son proteínas que contienen un grupo hemo. El esquema 7 muestra la reacción catalizada por la catalasa.

$$2H_2O_2 \xrightarrow[\text{catalasa}]{} 2H_2O + O_2$$

Esquema 7: Reacción catalizada por la catalasa.

La catalasa es 10^4 veces mas rápida que la peroxidasa. Ambos enzimas se localizan principalmente en la mitocondria y peroxisomas de casi todas las células animales y vegetales y en microorganismos aerobios.

La actividad de la glutatión peroxidasa es elevada en hígado, siendo el glutatión (GSH) el donador de hidrógenos. En todas las células, la GSH peroxidasa no sólamente elimina el H_2O_2 sino también hidroperóxidos orgánicos convirtiendo el GSH en glutatión oxidado (GSSG) (Meister, 1983). El GSSG se regenera mediante la acción de la GSSG reductasa utilizando como reductor NADPH proveniente de la vía de las pentosas fosfato.



Esquema 8: Reacción catalizada por la GSH peroxidasa.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

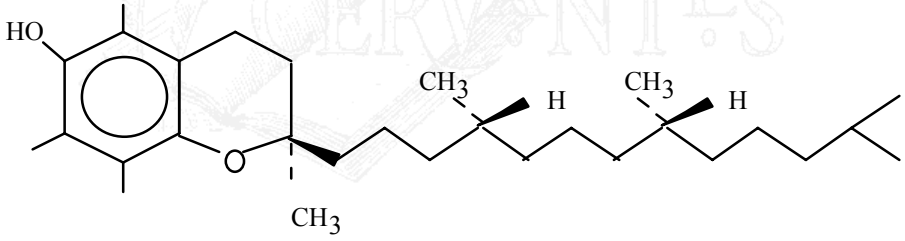
2. 2. SISTEMAS DE DEFENSA NO ENZIMÁTICOS

Las células contienen distintas sustancias que eliminan los ROS. Entre ellas encontramos las siguientes moléculas: vitaminas C y E, β-caroteno, tioles y ubiquinona (Packer y col., 1979; Gutteridge, 1994; Sies, 1997). Además de estos antioxidantes, se conocen otras sustancias con capacidad preventiva. Entre ellas, moléculas con estructura fenólica o catecólica, bien procedentes de la dieta (flavonoides, isoflavonoides, ácidos cinámicos...) o bien moléculas endógenas, como los estrógenos (17β-estradiol, 2-hidroxiestradiol...). Estos compuestos actúan principalmente cediendo un hidrógeno al radical con el que reaccionan, generando así un nuevo radical derivado que quedaría estabilizado por resonancia en la estructura aromática (Halliwel y Gutteridge, 1989; Liu y col., 1992). Se han descrito también otros mecanismos antioxidantes para estos compuestos como su capacidad de formar quelatos inactivos con metales de transición (Afanasév y col., 1988; Pulla y Lokesh, 1992; Weglicki y Mak, 1992) o de reaccionar con radicales $HO^{\bullet}$

(Ruiz-Larrea y col., 1994) o de regenerar o al menos mantener los niveles de α-tocoferol (Mukai y col., 1990; Ruiz-Larrea y col., 2000).

2. 2. 1. VITAMINA E

La vitamina E es el antioxidante de membrana más importante. El término vitamina E agrupa a una serie de compuestos (tocoferoles) que tienen un anillo de cromano y una cadena de fitilo de longitud variable. Los tocoferoles se localizan mayoritariamente en la mitocondria y retículo endoplásmico. La lipofilidad de la molécula es una característica importante para la actividad biológica de los tocoferoles, ya que determina la cinética de su transporte y retención en las membranas (Perly y col., 1985). El grupo cromano es responsable del potencial antioxidante de los tocoferoles y la cadena fitilo es importante para un correcto posicionamiento en las biomembranas (Niki y col., 1985).



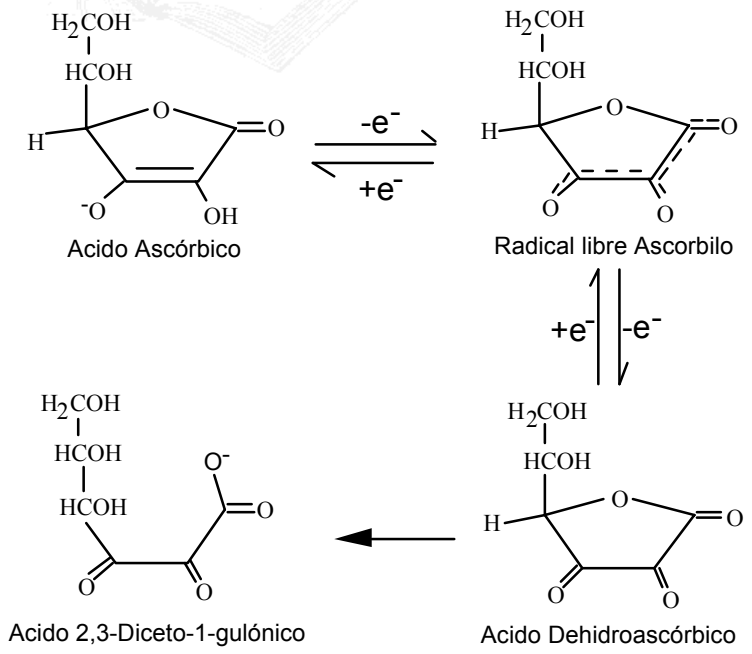
Esquema 9: Estructura de la vitamina E.

La actividad antioxidante de la vitamina E deriva de su capacidad para reaccionar con radicales libres, tanto con los que inician la peroxidación de lípidos, como con los radicales peroxilo, que son los que propagan la oxidación en cadena. Esta propiedad reside en su capacidad de donar sus hidrógenos fenólicos a los radicales libres lipídicos (Burton e Ingold, 1981). Durante estas reacciones el α-tocoferol se transforma en el radical α-tocoferoxilo. Este nuevo radical es bastante estable y no reacciona con los lípidos de membrana debido a que el electrón desapareado del átomo de oxígeno queda deslocalizado en la estructura del anillo aromático, aumentando así su estabilidad.

2. 2. 2. VITAMINA C

La vitamina C protege componentes citosólicos y de membrana del daño oxidativo y actúa como un potente antioxidante soluble en fluídos biológicos. En el citosol la vitamina C actúa como un antioxidante primario que elimina ROS producidos en el metabolismo celular. En las membranas celulares juega un papel antioxidante indirecto al reducir el radical α-tocoferoxilo a α-tocoferol. Además, la vitamina C regenera otras moléculas pequeñas como el GSH, urato y β-caroteno a partir de sus respectivas especies radicalarias.

La vitamina C puede donar 1 ó 2 electrones en reacciones redox. La pérdida de un electrón resulta en la formación del radical libre ascorbilo que se estabiliza por resonancia y no es muy reactivo. La pérdida de un segundo electrón genera el ácido deshidroascórbico, que es inestable y de no ser reducido a ascorbato sufre una rotura irreversible del anillo, formando el ácido 2,3-diceto-1-gulónico.



Esquema 10: Metabolismo redox del ácido ascórbico.

2. 2. 3. GSH

El reductor intracelular más importante es el GSH, un tripéptido formado por glicina, cisteína y ácido glutámico. Es un nucleófilo que interacciona con numerosos electrófilos a los que se une gracias a la GSH transferasa formando conjugados. El GSH tiene gran importancia en procesos redox de activación/inactivación reversible de proteínas con gupos SH en su centro activo. Tiene la capacidad de regenerar el α-tocoferol mediante la cesión de un hidrógeno al radical α-tocoferoxilo.

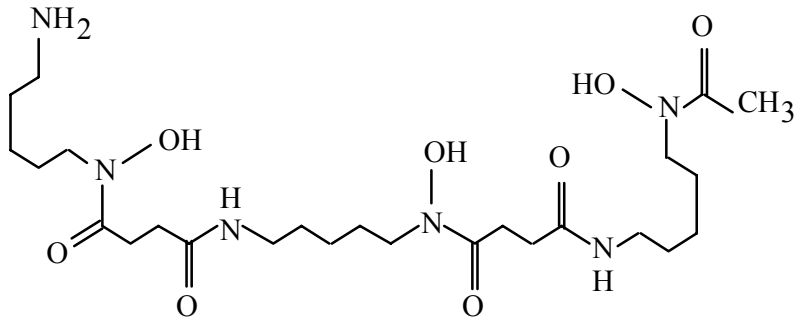
La concentración del GSH en células animales es alta, varía en el rango de 1-10 mM dependiendo de la localización subcelular y del tipo celular (Soboll y col., 1995). La relación media celular de GSH/GSSG varía de 31:1 a 100:1. Sin embargo, en el retículo endoplásmico la relación de GSH frente a su forma oxidada GSSG varía de 1:1 hasta 1:3 (Hwang y col., 1992).

Es de interés señalar que distintos antioxidantes pueden actuar de manera sinérgica; así, la vitamina E es regenerada por la vitamina C (Doba y col., 1985). Los radicales formados en reacciones redox con vitaminas E y C pueden ser reciclados por GSH o ácido dihidrolipoico. Los tioles oxidados (GSH, tiorredoxina o lipoato) son regenerados por enzimas dependientes de NADPH y NADH (Packer y col., 1979, 1995).

2. 2. 4. QUELANTES DE HIERRO

Los metales de transición, especialmente el hierro, tienen la capacidad de generar ROS tanto *in vivo* como *in vitro*. Los iones metálicos contribuyen a la iniciación de la peroxidación de lípidos mediante la descomposición de hidroperóxidos y/o peróxido de hidrógeno, generando radicales alcoxilo, peroxilo e hidroxilo.

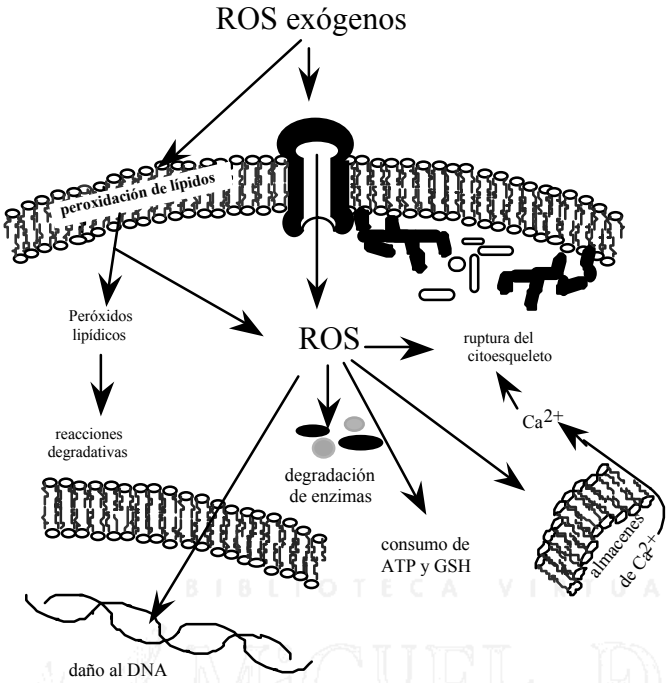
Los quelantes de metales pueden modificar el potencial redox del complejo metálico o afectar a la eficacia de unión a la molécula diana. La formación del $HO^{\bullet}$ mediante la reacción de Haber-Weiss se previene con quelantes de hierro como el desferal.



Esquema 11: Estructura del desferal.

3. EFECTOS CITOTÓXICOS DE LOS ROS

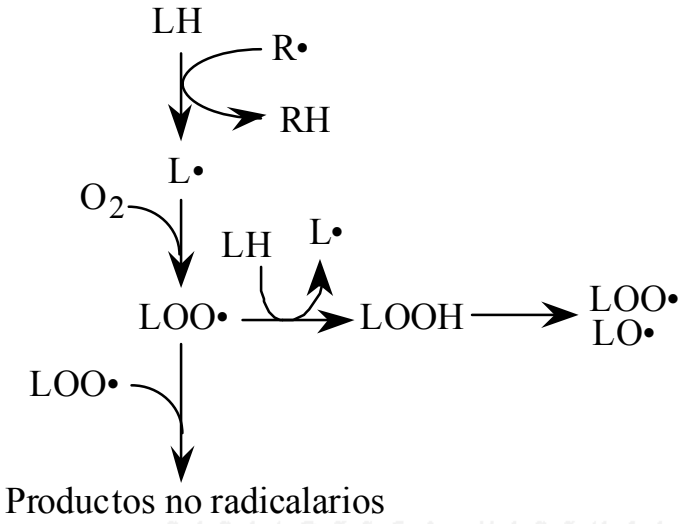
Cuando hay un exceso de producción de ROS y los mecanismos de defensa son insuficientes para contrarrestar la agresiones oxidativas, la homeostasis del redox celular se desequilibra en favor de las formas oxidadas. Esta situación se conoce como estrés oxidativo. Los ROS no controlados producen gran número de lesiones en la estructura celular, que son origen de importantes patologías. El listado de enfermedades humanas relacionadas con niveles elevados de H_2O_2 o $O_2^{\bullet -}$ es amplio, incluye cáncer, artritis, aterosclerosis, cirrosis hepática, cataratas y muchas otras.



Esquema 12: Efectos tóxicos mediados por ROS.

3. 1. MODIFICACIONES EN LA MEMBRANA: PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS

Los radicales libres son capaces de iniciar procesos de peroxidación de lípidos de las membranas celulares. En la peroxidación se distinguen tres etapas diferentes: iniciación, propagación y terminación, que corresponden a la generación, transferencia y desaparición de radicales libres (Haenen, 1990). La peroxidación se inicia cuando un radical libre abstrae un átomo de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado (LH) y se forma un radical alquilo ($L^{\bullet}$) que reacciona rápidamente con O_2 y forma un radical peroxilo ($LOO^{\bullet}$). El $LOO^{\bullet}$ abstrae un átomo de hidrógeno de un nuevo ácido graso y se obtiene un hidroperóxido lipídico y otro radical $L^{\bullet}$.



Esquema 13: Reaciones de iniciación, propagación y terminación de la peroxidación de lípidos de las membranas. LH: ácido graso poliinsaturado; L•: radical alquilo; LOO•: radical peroxilo; LO•: radical alcoxilo; R•: radical iniciador.

Esta propagación o reacción en cadena se interrumpe cuando los electrones desapareados se encuentran y forman un par (terminación). Ciertas moléculas, como la vitamina E, actúan interrumpiendo la fase de propagación.

3. 2. MODIFICACIONES EN PROTEÍNAS

Los ROS pueden alterar la estructura y función de las proteínas mediante una oxidación directa de las cadenas laterales aminoacídicas o por oxidación de grupos SH.

La oxidación directa de las proteínas se denomina modificación primaria. Estas reacciones están catalizadas por metales de transición, como el Fe^{2+} y el Cu^{+}, que se encuentran en centros de unión de cationes en las proteínas. Un ataque por ROS conduce a la formación de derivados proteicos carbonilo (aldehídos y cetonas), en las cadenas laterales de algunos aminoácidos (arginina, lisina, prolina o treonina) (Berlett y Stadtman, 1997).

En muchos casos las proteínas oxidadas sufren una degradación proteolítica completa. En eucariotas las proteínas oxidadas se degradan en vías dependientes de ubiquitina. En esta vía, numerosas copias de una proteína de 8 kDa denominada ubiquitina se unen covalentemente a la proteína diana, que se degrada posteriormente por el complejo proteasoma que es dependiente de ATP.

Otras modificaciones más leves pueden alterar la función de las proteínas, como enzimas de transporte, mecanismos de reconocimiento por modificación de receptores y afectar a cascadas de señalización celular. Debido a que los grupos tioles son muy sensibles a la oxidación, las proteínas que contienen cisteína son susceptibles de modificaciones redox (Nose y Ohba, 1996). Se ha visto que la actividad tirosina fosfatasa (PTP) se controla por mecanismos redox. La oxidación/reducción reversible de un único residuo catalítico puede ser un importante mecanismo regulador del enzima y desencadenar vías de señalización celular dependientes de fosforilación de tirosinas.

3. 3. MODIFICACIONES DEL ADN

La exposición de diversos tipos celulares a ROS produce lesiones en el ADN (Halliwell y Aruoma, 1991; Shackelford y col., 2000). Altas concentraciones de ROS alteran las bases de los ácidos nucleicos (despurinización o despirimidinación, rotura de una o las dos hebras, entrecruzamiento entre hebras y aberraciones cromosómicas). Estos efectos se producen por una reacción directa del $HO^{\bullet}$ o de compuestos carbonilo con el ADN y la activación de nucleasas (Halliwell y Aruoma, 1991). El $O_2^{\bullet -}$ y el H_2O_2 no reaccionan con el ADN excepto cuando hay metales iónicos de transición que permiten la formación del $HO^{\bullet}$. El $HO^{\bullet}$ ataca a la desoxirribosa, a las purinas y pirimidinas generando productos como la 8-hidroxidesoxiguanosina, timidina glicol o 8-hidroxidesoxiadenosina. La rotura de las hebras conduce a la inactivación del enzima reparador de ADN poli(ADP-ribosa) polimerasa. Finalmente, este enzima forma polímeros de ADP-ribosa que se unen a varias proteínas nucleares.

3. 4. MODIFICACIONES EN LA HOMEOSTASIS DEL Ca^{2+}

Los ROS alteran la homeostasis del Ca^{2+} elevando la concentración del Ca^{2+} libre intracelular (Elliott y col., 1992; Klyubin y col., 1996). Esta es una perturbación crítica y temprana tras la oxidación. Los cambios redox de grupos tioles y de coenzimas, así como los productos de degradación de la peroxidación lipídica, alteran la membrana y su funcionalidad con lo que se afecta a la capacidad mitocondrial para retener Ca^{2+} (Richter y col., 1992). Se libera también Ca^{2+} del retículo endoplásmico (Kourie, 1998). Por otro lado, se inhibe la bomba que expulsa Ca^{2+} a través de la membrana plasmática y la entrada de Ca^{2+} al retículo endoplásmico. La alteración en la homeostasis cálcica afecta a los enzimas que se activan por Ca^{2+} y a la red del citoesqueleto (Nicotera y col., 1996a y 1996b). Se activan fosfolipasas, quinasas y proteasas que conducen a lesiones irreversibles en la estructura y función celulares (Goldman y col., 1992; Fialkow y col., 1993; Natarajan y col., 1993; Rao y col., 1995; Ito y col., 1997; Konishi y col., 1997).

4. SEÑALIZACIÓN CELULAR

Las células dependen de un continuo flujo de señales desde el medio externo para su crecimiento y desarrollo. La detección y procesado de los estímulos que llegan a una célula se realiza mediante cascadas de transducción de señales. Estos circuitos moleculares de las células están constituídos por receptores, enzimas, conductos y proteínas reguladoras que detectan, amplifican e integran las diversas señales externas.

En la última década se ha desarrollado un importante trabajo para esclarecer numerosas cascadas de señalización. Los principios básicos implicados en la transducción de información incluyen el ensamblaje regulado de algunas proteínas, a menudo mediante la relocalización de componentes entre compartimentos celulares, seguidos de la activación o inhibición de ciertas actividades enzimáticas. Estos principios permiten la progresión lineal de la señal, con las correspondientes posibilidades de amplificación de la señal o

retroinhibición. Siguen identificándose nuevas proteínas de señalización y se ha puesto de manifiesto que el flujo de la información no es siempre lineal como en los modelos de rutas metabólicas. Está claro que entre distintas cascadas de señalización hay una considerable interacción y que las proteínas se relacionan en una compleja red desde donde pueden controlarse de muchas maneras independientes.

Los agentes tóxicos afectan a la transducción de señales cuando alteran el comportamiento fisiológico de las macromoléculas que pertenecen a la red de comunicación intracelular. La radiación ultravioleta o ionizante, los metales, oxidantes y agentes alquilantes no reaccionan exclusivamente con un receptor específico y pueden inducir respuestas génicas elaboradas (Devary y col., 1992; Hayashi y col., 1993; Stevenson y col., 1994).

5. EFECTOS DE ROS SOBRE LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

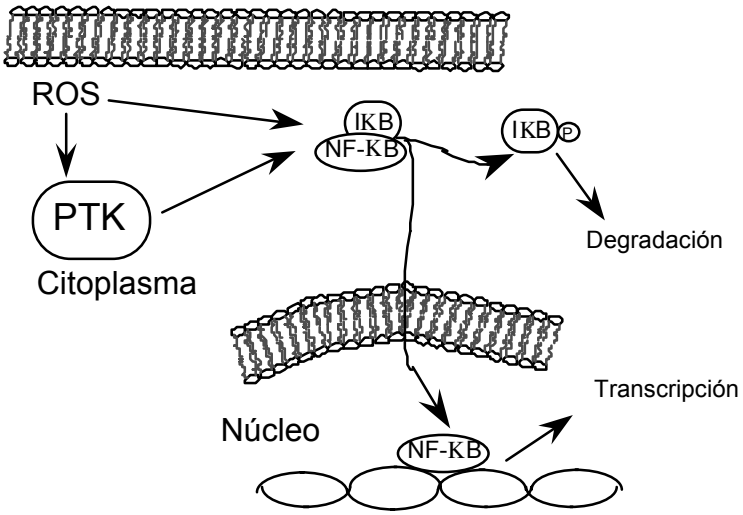
Es conocido que ROS como el H_2O_2 y el $O_2^{\bullet -}$ ejercen distintos efectos sobre la transducción de señales en cultivos de células de mamíferos, que varían dependiendo del tipo celular considerado, del estímulo oxidativo, de la intensidad y del tiempo de estimulación. La alta reactividad de los intermediarios oxigenados, su vida media y el fuerte control de sus niveles celulares por una compleja red de enzimas antioxidantes son el prerrequisito ideal para considerarlos "mensajeros secundarios". A niveles bajos de oxidación los efectos inducidos por ROS son frecuentemente "positivos" o mitogénicos, y a niveles mayores los efectos suelen ser "negativos", es decir, inhiben el crecimiento celular o son tóxicos. Los efectos mediados por ROS mimetizan efectos de ligandos fisiológicos como factores de crecimiento, hormonas y citoquinas.

5. 1. SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR MEDIADA POR ROS

En muchos tipos celulares distintos ligandos extracelulares (hormonas, citoquinas, factores de crecimiento, etc...) actúan mediante el aumento de la concentración intracelular de ROS. Se ha demostrado que la eliminación de ROS por mecanismos enzimáticos, por

moléculas con acción antioxidante o por agentes reductores interfiere con la respuesta celular normal a factores de crecimiento (Sundaresan y col., 1995) y citoquinas (Lo y Cruz, 1995), atenuando o anulando sus efectos.

Se empezó a prestar atención a los ROS como segundos mensajeros cuando se encontró que la activación mediada por agonistas del factor de transcripción NF-κB estaba acompañada por una producción de ROS (Schreck y col., 1991). NF-κB tiene una gran importancia en la regulación de numerosos genes que participan en procesos inflamatorios e inmunes. La activación de NF-κB no requiere síntesis proteica. En células no estimuladas, NF-κB está unido a una proteína inhibidora denominada IκB, que retiene al complejo en el citoplasma previniendo la unión al ADN. La activación de NF-κB requiere la disociación de IκB del complejo NF-κB. Se ha comprobado que la degradación de IκB va precedida de procesos fosforilativos (Traenckner y col., 1995). Es muy probable que proteínas quinasas o fosfatasas sensibles a cambios en los niveles intracelulares de ROS sean uno de los componentes iniciales de la vía de señalización que conduce a la modificación de IκB. El tratamiento de las células con antioxidantes o la sobreexpresión de enzimas antioxidantes inhiben la activación de NF-κB (Schreck y col., 1991; Schmidt y col., 1995). Además, la adición de H_2O_2 exógena activa el factor de transcripción (Los y col., 1995).



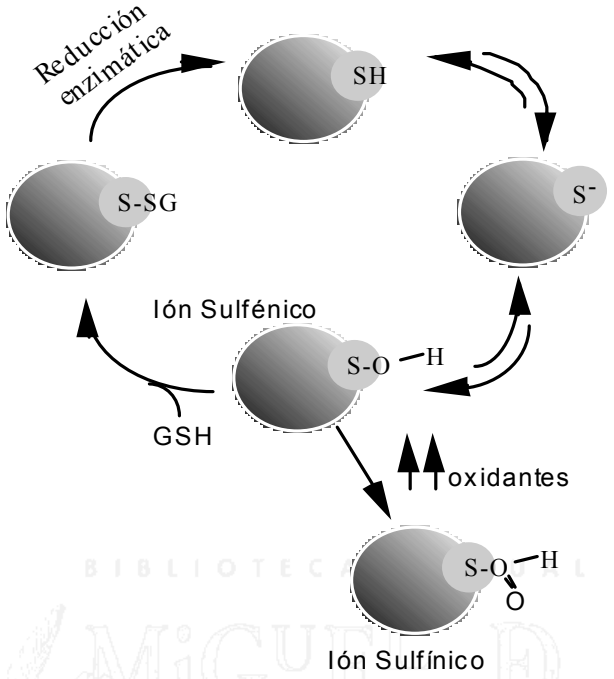
Esquema 14: Activación del factor de transcripción NF-κB mediada por ROS.

NF-κB no es el único factor de transcripción que responde a cambios en la concentración de ROS. Distintos factores de transcripción con dominios de unión al ADN contienen residuos de cisteína cuyo estado de oxidación afecta a la unión al ADN. Dichas cisteínas susceptibles a modificaciones redox se han encontrado, por ejemplo, en las proteínas c-Fos y c-Jun (Schenk y col., 1994; Uchida y col., 1999).

5. 2. PROCESOS DE SEÑALIZACIÓN INDUCIDOS POR ROS

Los oxidantes exógenos son capaces de inducir procesos bioquímicos como fosforilación de proteínas e iniciar cascadas de señalización similares a las que se producen en la célula en condiciones fisiológicas. Los ROS ejercen dichos efectos cuando interactúan y modifican la actividad de proteínas que participan en dichas vías de señalización.

La exposición de ciertas proteínas celulares a ROS conduce a una alteración del estado redox proteico alterando de este modo la función de la proteína diana. Se ha comprobado que los ROS inhiben procesos de desfosforilación en receptores de factores de crecimiento asociados a membrana. Esta interferencia sobre los procesos desfosforilativos es causada por una oxidación reversible de un grupo -SH, probablemente en el centro activo de una o varias PTPs (Denu y Tanner, 1998). Todos los miembros de la familia de las PTPs tienen una cisteína reactiva en su centro activo y se ha observado que la actividad fosfatasa se inactiva reversiblemente por ROS. El mecanismo de la inactivación transitoria consiste en la oxidación de la cisteína reactiva formando un anión sulfénico (esquema 15). En este estado, la actividad enzimática de la PTP se reduce significativa o completamente.



Esquema 15: Modelo de inactivación de PTPs mediada por ROS. Tomado de Finkel, 2000.

La alta actividad de las PTPs hace pensar que controlan los niveles de fosfotirosina en la célula. Las PTPs desfosforilan *in vivo* los residuos tirosilo fosforilados y participan en las vías de señalización y en la regulación del ciclo celular.

Las PTKs y PTPs actúan en una compleja red reguladora, ya que, a su vez, las PTPs pueden ser fosforiladas en residuos de tirosina. Debido a que estos enzimas se relacionan en complejas redes en las que puede haber una regulación positiva o negativa, los ROS pueden tanto activar como inhibir vías de señalización mediadas por estos enzimas.

En los últimos años distintos trabajos han demostrado que los ROS a baja concentración pueden inducir señales iónicas similares a las mediadas por receptor, incluyendo elevaciones transitorias del Ca^{2+} intracelular (Volk y col., 1997), liberación de Ca^{2+} de la mitocondria (Richter y col., 1992), activación de canales de potasio (Wei y col., 1996) e hiperpolarización de la membrana plasmática (Bauer y col., 1997). Además, se ha descrito que los ROS inducen la producción de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) (Qin y col.,

1995). El IP_3 promueve la salida del Ca^{2+} desde reservorios internos y el Ca^{2+} activa canales iónicos.

La elevación de los niveles intracelulares de Ca^{2+} activa distintos tipos de fosfolipasas que tienen gran importancia en los procesos de transducción de señales. El diacilglicerol (DAG) es un mediador con capacidad de activar la proteína quinasa C (PKC), que es otro enzima implicado en estos procesos. La suma de estos efectos conduce a la activación de múltiples cascadas de señalización dependiendo del enzima afectado por los ROS.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

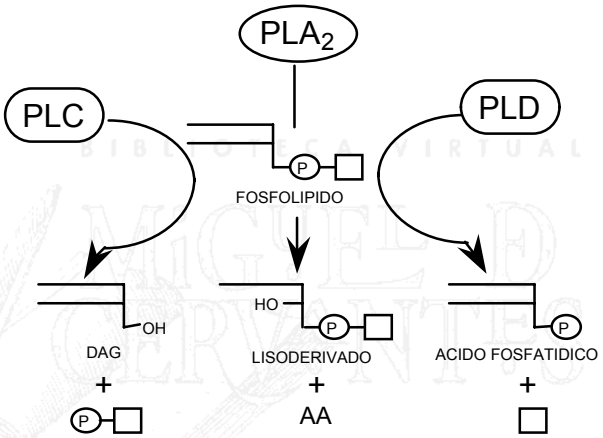
6. FUNCIÓN DE LAS FOSFOLIPASAS EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

El descubrimiento de que los lípidos estructurales podían convertirse en moléculas señal revolucionó el campo de la investigación lipídica. Los estudios iniciales de recambio de fosfatidilinositol (PI) condujeron al descubrimiento del DAG como segundo mensajero en la estimulación de la PKC. Posteriormente se ha implicado a numerosas moléculas derivadas de los lípidos en la regulación de la proliferación y diferenciación celular, senescencia y muerte celular. Los lípidos bioactivos sirven como mensajeros extracelulares que actúan sobre receptores de superficie y como mensajeros intracelulares que median respuestas celulares. Las moléculas mensajeras se derivan de constituyentes lipídicos de membranas biológicas por acción de gran número de enzimas que incluyen a las fosfolipasas, quinasas de lípidos y acilasas. Dichos enzimas, inactivos en estado basal, son activados específicamente en respuesta a estimulación de receptores u otros mecanismos. Esto tiene como resultado la conversión de constituyentes estructurales de la membrana en señales moleculares biológicamente activas.

Las fosfolipasas son enzimas que juegan un importante papel en el metabolismo celular. Catalizan la hidrólisis y reacilación de fosfolípidos siendo enzimas clave en la remodelación de membranas y en procesos de señalización celular.

7. TIPOS DE FOSFOLIPASAS

Las fosfolipasas se clasifican de acuerdo al enlace del fosfolípido que rompen. Así, la fosfolipasa A_2 (PLA_2) hidroliza selectivamente el enlace éster de la posición 2 (sn-2) del glicerofosfolípido. La fosfolipasa C (PLC) corta el enlace entre el glicerol y el fosfato, y la fosfolipasa D (PLD) cataliza la hidrólisis del enlace fosfoéster entre el fosfato y el grupo polar (que puede ser colina, etanolamina, serina, glicerol o inositol).



Esquema 16: Reacciones catalizadas por distintas fosfolipasas sobre los fosfolípidos de las membranas.

7. 1. FOSFOLIPASA A_2

Las PLA_2s son enzimas que se localizan tanto intracelular como extracelularmente; catalizan la hidrólisis de fosfolípidos, generando ácidos grasos y lisofosfolípidos. Dichos productos pueden actuar como mediadores lipídicos o pueden ser metabolizados generando eicosanoides, moléculas activas que participan en diversos procesos. Cada vez se conoce más profundamente la diversidad de formas y funciones de las acilhidrolasas sn-2 de mamíferos. La nomenclatura para dichos enzimas se ha basado en su estructura y secuencia. Se encuentran en casi todos los tipos celulares examinados e incluso en bacterias y protozoos. La primera isoforma de PLA_2 de mamífero identificada fue la PLA_2 contenida

en el jugo pancreático. Posteriormente, se han aislado y caracterizado distintas PLA_2s, clasificándose de la siguiente manera:

PLA_2	**Peso molecular**	**Dependencia Ca^{2+}**	**Sustratos**	**Localización**
PLA_2 tipo I	14 kDa	mM	PE = PC	páncreas
PLA_2 tipo II	14 kDa	mM	PE, PS>PC	células inflamatorias, tejidos inflamados, intestino, bazo, pulmón, hígado, etc
PLA_2 citosólica	85 kDa	µM	Araquidonil PE o PC	ubicua
$iPLA_2$	80 kDa	no	plasmalógeno	corazón
$iPLA_2$	80 kDa	no	PC	macrófago
$iPLA_2$	120 kDa	no	PL, TG, DAG, MG	intestino
PAF-AH Isoforma I	29, 30, 45 kDa heterotrímero	no	PAF	cerebro, riñón
PAF-AH Isoforma II	40 kDa	no	PAF, PL oxidados	hígado, riñón
PAF-AH extracelular	44 kDa	no	PAF, PL oxidados	plasma, macrófago

Tabla 1. Clasificación de las PLA_2s caracterizadas en mamíferos. PE, fosfatidiletanolamina; PC, fosfatidilcolina; PS, fosfatidilserina; PL, fosfolípido; TG, triacilglicerol; DAG, diacilglicerol; MG, monoacilglicerol, PAF-AH, factor de agregación plaquetaria acetilhidrolasa; PAF, factor de agregación plaquetaria.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

7. 1. 1. PLA_2 TIPO I O PANCREÁTICA

La PLA_2 pancreática tiene similitudes estructurales con la PLA_2 del veneno de serpiente tipo I y por ello ahora se la denomina PLA_2 tipo I de mamíferos. En el páncreas este enzima se produce en forma de proenzima inactivo y se activa mediante un enzima proteolítico como la tripsina. Debido a su abundancia en el jugo pancreático de muchos mamíferos, se ha atribuído a la PLA_2 tipo I una función en la digestión de los fosfolípidos de los nutrientes. Sin embargo, ciertos mamíferos no producen este enzima en el páncreas, sino que contienen cantidades significativas en distintos órganos no digestivos como pulmón y bazo. Este hecho pone en duda que la función de la PLA_2 tipo I sea exclusivamente digestiva y plantea la posibilidad de otra función biológica.

7. 1. 2. PLA_2 TIPO II

A finales de los 80 otro tipo de PLA_2 fue aislado de gran variedad de células y tejidos de mamíferos. Actualmente se denomina a esta isoforma PLA_2 tipo II de mamíferos y posee características estructurales similares a la PLA_2 tipo II del veneno de serpiente. La PLA_2 tipo II se encuentra a altas concentraciones en fluídos extracelulares como el líquido sinovial, líquido ascítico y suero recogido en procesos de inflamación, de ahí su denominación como $sPLA_2$. En la actualidad se han identificado en mamíferos 4 $sPLA_2$ distintas. Actividades potenciales de la $sPLA_2$ incluyen efectos bactericidas, ser componentes claves de la digestión, producción de ácido araquidónico (AA) para la generación de eicosanoides y se le asigna un papel en la transducción de señales. Las $sPLA_2$ son reguladoras potenciales de enfermedades severas como la sepsis, pancreatitis y lesión a órganos y componentes inflamatorios en enfermedades como la artritis reumatoide y el asma.

Las $sPLA_2$s tienen una masa molecular de aproximadamente 14 kDa. El enzima presenta 7 puentes disulfuro en su estructura, lo que le hace sensible a agentes reductores como el ditiotreitol (DTT), y es resistente al calor o a condiciones ácidas (Hara y col., 1989). Las $sPLA_2$s requieren concentraciones de Ca^{2+} del orden de mM para su actividad

catalítica (Scott y col., 1990) y no exhiben selectividad por el ácido graso que liberan en la hidrólisis. Algunas de las actividades biológicas de las $sPLA_2$ pueden estar mediadas por receptores para las $sPLA_2$s.

7. 1. 2. 1. Regulación

La $sPLA_2$ no existe como proenzima. Una vez que la secuencia señal es procesada adecuadamente, el enzima puede actuar eficazmente. La $sPLA_2$ se almacena en gránulos de secreción en distintos tipos de células que participan en procesos inflamatorios (p.e. plaquetas, mastocitos) y es secretada tras la estimulación (Hayakawa y col., 1988; Mizushima y col., 1989). En otros tipos celulares (p.e. células de la musculatura vascular lisa, células renales mesangiales) la expresión de la $sPLA_2$ se regula por citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF) e interleukinas (IL-1 e IL-6) (Crowl y col., 1991; Pfeilschifter y col., 1993). La $sPLA_2$ tiene la capacidad de unirse a los polisacáridos sulfatados, donde puede permanecer activa durante periodos de tiempo prolongados en la matriz extracelular del cartílago y en otros tejidos conectivos. Se ha demostrado que en células de hígado el enzima se almacena en el proteoglicano heparán sulfato de la superficie celular (Suga y col., 1993).

La actividad de la $sPLA_2$ aumenta en presencia de lípidos peroxidados (Sevanian y col., 1988). Además, en células epiteliales de riñón el daño oxidativo en la membrana puede degradar el proteoglicano de la superficie celular. De este modo, los fosfolípidos quedan más accesibles al ataque de la $sPLA_2$, conduciendo al daño celular (Dan y col., 1996).

7. 1. 3. FOSFOLIPASA A_2 CITOSÓLICA

La PLA_2 citosólica de 85 kDa ($cPLA_2$ o PLA_2 tipo IV), que libera selectivamente el AA en posición sn-2 de los fosfolípidos, es uno de los isoenzimas de PLA_2 más importantes implicados en la generación de mediadores lipídicos resultante de la activación celular (Irvine 1982; Samuelsson y col., 1987). Hasta ahora sólo se ha identificado un isoenzima de

esta familia de $cPLA_2$ y se ha purificado en distintos tipos celulares. La $cPLA_2$ tiene una masa molecular de 85 kDa y responde a concentraciones intracelulares de Ca^{2+} entre 0,3 - 1,0 μM.

La $cPLA_2$ se expresa en células tanto asociadas a la respuesta inflamatoria (monocitos, neutrófilos y fibroblastos sinoviales) (Alonso y col., 1986; Wijkander y Sundler, 1991) como con otras funciones (células de riñón, bazo, corazón, pulmón, hígado, testículos e hipocampo) (Gronich y col., 1988; Kim y Bonventre, 1993). La $cPLA_2$ participa en procesos de señalización, activación plaquetaria (McNicol y Shibou, 1998), citotoxicidad inducida por el TNF (Wissing y col., 1997) y en la proliferación celular (Adachi y col., 1995).

BIBLIOTECA VIRTUAL

La activación del enzima genera AA libre y lisofosfolípido, siendo las mayores fuentes de AA el PI, la fosfatidilcolina (PC) y la fosfatidiletanolamina (PE). A partir del AA liberado, se producen sustancias biológicamente activas como prostaglandinas y leucotrienos. Además, el AA tiene acción *per se* sobre enzimas celulares. Por ejemplo, se ha descrito que puede activar ciertos isoenzimas de PKC (Huang y col., 1993; Lu y col., 1999). A partir del lisofosfolípido se genera el factor de activación plaquetario (PAF). Los lisofosfolípidos son sustancias citotóxicas y fusógenos de membrana y están involucrados en procesos inflamatorios. Los lisofosfolípidos, en particular las lisofosfatidilcolinas, son potentes detergentes que pueden romper la estructura e integridad de las membranas celulares. La $cPLA_2$, además, posee actividad lisofosfolipasa y previene el acúmulo de lisofosfolípidos potencialmente tóxicos.

La actividad $cPLA_2$ se regula tanto transcripcional como postraduccionalmente. Transcripcionalmente está regulada por la IL-1, el TGF-β, el TNF-α y el factor estimulador de colonias (CSF), que incrementan la síntesis de $cPLA_2$ (Goppelt-Struebe y Rehfeldt, 1992; Nakamura y col., 1992; Schalkwijk y col., 1992). La regulación postraduccional de la actividad de la PLA_2 es compleja. Gran variedad de señales conducen a la activación del enzima.

7. 1. 3. 1. Activación del Enzima

Se piensa que la activación postraduccional tiene lugar por dos mecanismos. Uno de ellos es el resultado de la fosforilación de la $cPLA_2$ vía porteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) inducida por agonista, cuyo resultado es la estimulación de la actividad del enzima (Lin y col., 1992; Qiu y col., 1993; de Carvalho y col., 1996). El segundo requiere la translocación de la $cPLA_2$ a la membrana, proceso dependiente de Ca^{2+} y que permite el acceso al sustrato (Clark y col., 1991).

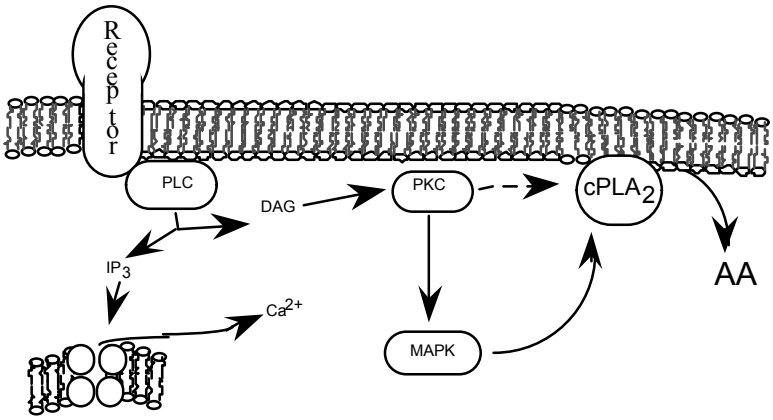
Se ha demostrado que el Ca^{2+} es necesario para la unión del enzima a la membrana y no para la catálisis. La $cPLA_2$ contiene un dominio de unión a fosfolípido dependiente de Ca^{2+} en el extremo N-terminal (CaLB) que comparte homología con los dominios C2 de isoformas convencionales de PKC (Clark y col., 1995).

Se ha estudiado la translocación intracelular de la $cPLA_2$ por fraccionamiento y tinción inmunohistoquímica (Schievella y col., 1995). En dichos estudios se ha visto que la $cPLA_2$ se transloca del citosol a la envoltura perinuclear y al retículo endoplásmico inmediatamente después de la activación. La membrana nuclear y el retículo endoplásmico son los lugares donde se metaboliza principalmente el AA liberado por la $cPLA_2$. Este hecho es importante porque los enzimas de la vía sintética de los prostanoides, la ciclooxigenasa 1 y 2, se localizan predominantemente en el retículo endoplásmico y la membrana nuclear, respectivamente (Morita y col., 1995). Otros enzimas terminales, como la tromboxano A2 sintasa (Ohashi y col., 1992) y la prostaglandina I2 sintasa (Hara y col., 1994) están en la membrana del retículo endoplásmico. Además la 5-lipooxigenasa, el enzima biosintético de leucotrienos, se transloca del citosol a la envoltura perinuclear en respuesta a incrementos intracelulares de Ca^{2+}, al igual que la $cPLA_2$.

En muchos tipos celulares se produce un incremento en la actividad de la $cPLA_2$ tras la exposición a diversos agonistas, que puede revertirse con tratamiento con fosfatasas (Clark y col., 1995). Se ha comprobado que la fosforilación del residuo Ser^{505} conduce a la activación de la $cPLA_2$ (Lin y col., 1993; Qiu y col., 1993; de Carvalho y col., 1996). Este

residuo se encuentra en una secuencia consenso ($PLS^{505}P$) para la fosforilación directa por la MAPK. En estudios con proteínas purificadas se ha demostrado que tanto la p42 como la p44 MAPK fosforilan la $cPLA_2$ e inducen un retraso de la movilidad electroforética característica del enzima (Lin y col., 1993; Nemenoff y col., 1993). La fosforilación en el residuo Ser^{505} es importante en la activación del enzima, ya que la sustitución de ese residuo por Ala elimina la fosforilación por la MAPK. En muchos modelos celulares la fosforilación y activación de la $cPLA_2$ se correlaciona con la activación de las p42/p44 MAPKs (Clark y col., 1995). Sin embargo, se ha demostrado que la fosforilación de la $cPLA_2$ en neutrófilos estimulados con lipopolisacárido (LPS) o TNF-α y plaquetas estimuladas con trombina tienen lugar de forma independiente de la activación de la p42 o p44 MAPK (Fouda y col., 1995; Kramer y col., 1995; Waterman y Sha'afi, 1995). Se ha sugerido que quinasas homólogas a MAPK como la p38 y c-Jun pueden fosforilar directamente a $cPLA_2$ en el residuo Ser^{505} (Hernández y col., 1997).

En la secuencia aminoacídica de la $cPLA_2$ se han identificado, además, otros 3 residuos susceptibles de fosforilación: Ser^{437}, Ser^{454} y Ser^{727} (de Carvalho y col., 1996). La Ser^{727} está muy conservada en $cPLA_2$ de especies evolutivamente distantes (humana, murina, pollo), lo que confirma su importante papel funcional. La quinasa que fosforila la Ser^{727} no se ha identificado, aunque el hecho de estar en una secuencia consenso para PKC o proteína quinasa A (PKA) sugiere que estos enzimas son los responsables de dicha fosforilación. La fosforilación en este residuo favorece la asociación del enzima con la membrana incluso en ausencia de Ca^{2+} (de Carvalho y col., 1996). Se ha descrito en varios trabajos la participación de la PKC en la fosforilación de la $cPLA_2$ (Nemenoff y col., 1993). Estudios de fosforilación con $cPLA_2$ recombinante han revelado que la PKC fosforila a la $cPLA_2$ en varios residuos, aunque la activa mínimamente (Lin y col., 1993; Nemenoff y col., 1993). Estos datos ponen de manifiesto la posibilidad de un mecanismo que conduce a la activación directa de la $cPLA_2$ mediada por la PKC.



Esquema 17: Modelo de activación de la $cPLA_2$.

Hay evidencias de que la $cPLA_2$ puede ser fosforilada además en residuos de tirosina. Se ha detectado $cPLA_2$ en inmunoprecipitados antifosfotirosina de queratinocitos tratados con TGF-α (Kast y col., 1993). Sin embargo, parece que la fosforilación en tirosinas de la $cPLA_2$ varía dependiendo del tipo celular y del estímulo.

7. 1. 3. 2. Activación por Proteínas G

Distintos estudios muestran que la proteína G sensible a la toxina pertussis (proteína G inhibidora, Gi) puede participar en la regulación de la $cPLA_2$ (Tong y col., 1998; Hirabayashi y col, 1999). Se ha visto que la GTPγS estimula la liberación de AA en varios tipos celulares y la toxina pertussis inhibe dicha liberación (Xing y Mattera, 1992). En la actualidad hay pocas evidencias de una interacción directa de la $cPLA_2$ con la Gi. Debido a que las señales iniciadas por las proteínas G van unidas a los isoenzimas PI-PLCβ con generación de IP_3 y elevación de Ca^{2+}, parece que en muchos casos el efecto inhibidor de la toxina pertussis sobre la liberación de AA es debido a la inhibición de la señalización del Ca^{2+}, que es esencial en la activación de la $cPLA_2$.

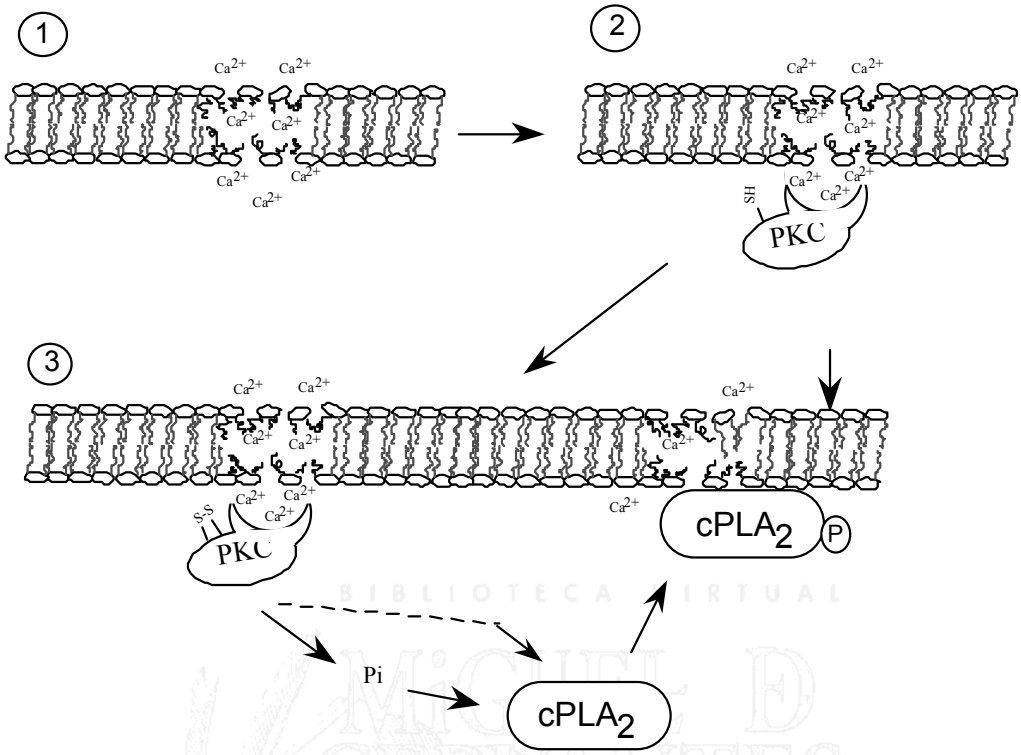
7. 1. 3. 3. Activación de la $cPLA_2$ inducida por oxidantes

Se conoce poco sobre el efecto de oxidantes y peróxidos de lípidos sobre el estado de fosforilación y la actividad catalítica de la $cPLA_2$. Hay pocos estudios que demuestren que la actividad de la $cPLA_2$ aumenta tras la exposición de células intactas a oxidantes

(Chakraborti y col., 1989; Goldman y col., 1994) y el mecanismo de estimulación de la $cPLA_2$ está todavía por determinar.

Se ha demostrado que la activación de la $cPLA_2$ puede estar mediada por la PKC y se produce sin elevaciones marcadas de Ca^{2+} intracelular. Se ha descrito que la PKC puede ser activada por oxidantes y peróxidos de lípidos (Taher y col., 1993). La activación mediada por oxidantes altera el requerimiento de Ca^{2+} del enzima, convirtiéndolo en una forma calcio independiente (Gopalakrishna y Anderson, 1989). De hecho, la PKC unida a las membranas se activa a concentraciones bajas de Ca^{2+} (Bazzi y Nelsestuen, 1988).

Se ha propuesto que la PKC se activa y une a membranas que continen productos de peroxidación lipídica. En las membranas peroxidadas se produce una ruptura local de la estructura y empaquetamiento de los fosfolípidos. En estos dominios aumenta la carga aniónica y se une Ca^{2+} liberado de almacenes intracelulares o proveniente del exterior celular. La PKC puede interaccionar con los peróxidos formados en las membranas y con el Ca^{2+}, produciéndose la translocación, unión a la membrana y activación de la PKC. La PKC se activaría tras la oxidación de grupos tioles del dominio regulador mediada por los productos de la peroxidación. Una vez activa, la PKC podría iniciar la cascada de fosforilación que activa la $cPLA_2$ o fosforilar directamente la $cPLA_2$.



Esquema 18: Modelo de activación de la $cPLA_2$ mediada por oxidantes. 1: se produce un aumento de la concentración de Ca^{2+} en lugares con peróxidos de lípidos. 2: la PKC se une a dichos lugares. 3: la PKC se activa tras la oxidación de grupos -SH del dominio regulador y activaría la $cPLA_2$ directa o indirectamente.

8. FOSFOLIPASA C

La PLC es un enzima clave en la señalización celular que implica a segundos mensajeros derivados de lípidos (Berridge e Irvine, 1984). La PLC cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 4, 5-bisfosfato (PIP_2), generando IP_3 y DAG. El IP_3 regula la salida de Ca^{2+} del retículo endoplásmico, mientras que el DAG es un activador endógeno positivo de la PKC (Nishizuka, 1984). Basándonos en los sustratos fosfolipídicos utilizados, la PLC puede ser clasificada como PIP_2-PLC, PI-PLC (PLC específica de fosfoinosítidos) o PC-PLC (PLC específica de fosfatidilcolina). En los últimos años se han realizado numerosos estudios sobre las propiedades catalíticas, estructura y activación de la PI-PLC. Por el contrario, se sabe poco sobre la PC-PLC.

8. 1. FOSFOLIPASA C ESPECIFICA DE PI

Se han encontrado isoenzimas de PI-PLC en gran número de organismos y aunque poseen propiedades catalíticas comunes, son activadas por distintos mecanismos desencadenados por señales extracelulares. Dentro de la superfamilia de PI-PLCs, en eucariotas encontramos tres isoenzimas, PLCβ, PLCγ y PLCδ, cuyas actividades son estrictamente dependientes de calcio como cofactor. La tres isoformas constan de un único polipéptido y hasta el momento se han identificado más de 10 PI-PLCs en mamíferos pertenecientes a los tres isotipos (4 β, 2 γ y 4 δ). Todos los isoenzimas de PLC comparten dos regiones altamente homólogas designadas como X e Y, que constituyen el centro catalítico, y un dominio denominado PH, que se une a los fosfoinosítidos. Además, la PLCγ consta de otros dos dominios, SH2 y SH3, que se unen a secuencias cortas de aminoácidos que contienen fosfotirosinas y a secuencias ricas en prolina, respectivamente.

8. 1. 1. ACTIVACION DE LOS ISOENZIMAS DE PLC

8. 1. 1. 1. PLCγ

Se han identificado dos tipos distintos de PLCγ en mamíferos, la PLCγ1 y PLCγ2 (Rhee y Bae, 1997). Se han descrito enzimas similares en otros organismos, pero su regulación no se ha estudiado en profundidad (Shortidge y McKay, 1995). Respecto a la regulación de los isoenzimas de mamíferos, los estudios se han centrado en la PLCγ1. Está aceptado que la activación de la PLCγ1 implica a receptores con actividad tirosina quinasa (RTK) o a tirosina quinasas solubles (STK).

La mayoría de los receptores de factores de crecimiento, caracterizados por una actividad tirosina quinasa intrínseca, se han relacionado con la estimulación de la PLCγ1 (Rhee y Bae, 1997). El proceso involucra dimerización y autofosforilación de esos receptores tras la unión al agonista, creando lugares de unión fosfotirosina con el dominio SH2 de la PLCγ. Tras la unión se produce la fosforilación.

Otros receptores que no poseen actividad tirosina quinasa pueden estimular la actividad de la PLCγ mediante la activación de STK, como proteínas de las familias Src o Syk. Las STK fosforilan a los receptores o a proteínas adaptadoras, generando un lugar de

unión de la PLCγ. Además, se asocian y fosoforilan a la PLCγ activándola (Rhee y Bae, 1997).

Debido a la capacidad de distintos segundos mensajeros lipídicos, IP_3, AA y PA de activar a la PLCγ *in vitro*, se ha sugerido que desempeñan un papel en la activación de la PLCγ (Rhee y Bae, 1997). Sin embargo, no está claro si en ausencia de fosforilación en tirosinas esas interacciones son suficientes para activar la PLCγ en células.

8. 1. 1. 2. PLCβ

La estimulación de la PLCβ por numerosos agonistas (histamina, vasopresina, agonistas α y β adrenérgicos) se realiza selectivamente a través de receptores unidos a proteínas G heterotriméricas y está mediada tanto por las subunidades α de la subfamilia Gq como por las subunidades βγ. La relación estimulatoria entre las distintas isoformas de la PLCβ y las subunidades α de la subfamilia Gq está claramente establecida y la incapacidad de las subunidades α de otras proteínas G para activar la PLCβ confirma la naturaleza única de esta vía.

8. 1. 1. 3. PLCδ

Se han identificado cuatro isoenzimas de la PLCδ (PLCδ1-PLCδ4). Los estudios del mecanismo de unión a receptores de membrana se han centrado en la PLCδ1 y más recientemente en el isoenzima PLCδ4. Estudios experimentales indican que la activación de este enzima está mediada por una proteína G denominada Gh. Gh es diferente de las proteínas G heterotriméricas conocidas y consiste en dos subunidades, una α de 75-80 kDa y otra β de 50 kDa (Im y col., 1997). Se ha sugerido un mecanismo de señalización vía Gh inducido por adrenalina como agonista (Im y Graham, 1990). La estimulación del receptor seguida por la estimulación de Ghα causa una interacción con la PLC incrementando su actividad. Sin embargo, no está claro si la señalización vía Ghα representa el principal mecanismo regulador de la PLCδ1. Otro regulador potencial de la PLCδ1 es el Ca^{2+}. A

diferencia de la PLCβ1 y PLCγ1, la actividad de la PLCδ1 se estimula con incrementos en la concentración de Ca^{2+} sin necesidad de activadores adicionales.

8. 2. ACTIVACIÓN DE LA PLC INDUCIDA POR OXIDANTES

Se sabe que el H_2O_2 incrementa la fosforilación de tirosinas en distintos tipos celulares incluyendo las células T y las endoteliales (Natarajan y col., 1996; Rao y col., 1999). Se ha observado que exposiciones cortas de células endoteliales a H_2O_2 resultan en una alteración en la permeabilidad que está precedida por un incremento de IP_3 y DAG como consecuencia de la hidrólisis de fosfoinosítidos mediada por la PLC (Shasby y col., 1988). El incremento de DAG generado por la PLC activa la PKC. Como la PLCγ se regula por fosforilación en tirosinas es tentador especular que el subtipo de PLC estimulado por el H_2O_2 u otros oxidantes es la PLCγ.

La hepatotoxicidad inducida por etanol está mediada por el citocromo P450 Cyp 2E1 e implica la formación de intermediarios radicalarios y ROS (Ingelman-Sundberg y Johansson, 1984). Se ha demostrado que los peróxidos de lípidos participan en este tipo de lesión celular. Asímismo, en otros estudios se ha observado una actividad elevada de PLC en ratas alimentadas con etanol (Nanji y col., 1993). Es bastante probable que radicales libres y ROS formados durante la exposición de los hepatocitos a etanol sean los responsables de esa activación de la PLC.

Distintos estudios han demostrado la capacidad de algunos productos de la peroxidación de lípidos para activar la PLC en membranas aisladas de hígado y de neutrófilos de rata. En dicha activación los aldehidos podrían actuar sobre el mismo enzima o sobre una proteína G reguladora de actividad PLC (Rossi y col., 1990).

9. FOSFOLIPASA D

La PLD es un enzima ubicuo que hidroliza preferentemente PC, dando lugar a ácido fosfatídico (PA) y colina. Además, se han encontrado isoformas con actividad frente a PE y PI. Se ha descrito actividad PLD en fracciones citosólicas y de membranas, aunque sus propiedades son diferentes. Las actividades asociadas a membrana tienen distinta preferencia por la PC y no requieren Ca^{2+} para su actividad. Por el contrario, los enzimas citosólicos pueden hidrolizar PE, PI y PC y requieren Ca^{2+} para su actividad. No está claro si las actividades citosólicas y de membrana representan diferentes isoformas de PLD o diferentes estados del mismo enzima.

Se considera al PA como la molécula de señalización producida por la PLD, ya que en la mayoría de las células los niveles basales de colina son altos. Se han propuesto numerosas funciones para el PA, principalmente acciones mitogénicas en fibroblastos y estimulación de la explosión respiratoria en neutrófilos (Exton, 1997). Los productos del metabolismo del PA son el DAG y el ácido lisofosfatídico (LPA), generados por la fosfatidato fosfohidrolasa (PAP) y la PLA_2, respectivamente. Gran parte del DAG que se acumula en células estimuladas puede provenir del PA tras la acción de la PAP. El LPA es el mayor producto del metabolismo del PA en plaquetas y está reconocido como un importante mensajero intercelular. Muchas células responden al LPA mediante un receptor de membrana que se une a proteínas G.

Una propiedad de la PLD es que cataliza una reacción de transfosfatidilación, en la que el grupo fosfatidilo del fosfolípido es aceptado por alcoholes primarios, produciendo así fosfatidilalcohol (POH) en lugar de PA (Kobayashi y Kanfer, 1987). Debido a que el metabolismo del POH es lento, su acúmulo intracelular es el método más común para estudiar la actividad PLD.

La PLD específica de fosfatidilcolina se activa por gran variedad de hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento, citoquinas y otras moléculas relacionadas con

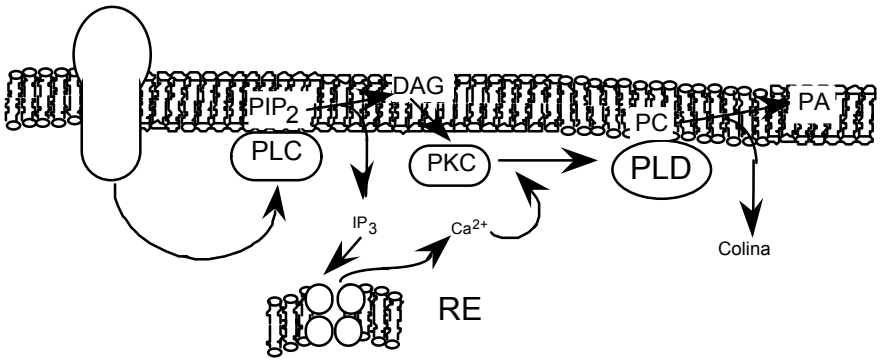
la comunicación intercelular. Por esta razón se cree que participa en procesos de transducción de señales en numerosas células.

9. 1. ACTIVACIÓN DE LA PLD

La mayoría de agonistas que estimulan la PLD son conocidos activadores de la vía de la PLC específica del PI. En muchas ocasiones la activación de la PLD parece ocurrir en fases posteriores a la activación de la PLC y a la consecuente estimulación de la PKC. Sin embargo, se han identificado distintos sistemas en los que la PLD es activada por ligandos que no estimulan la PLC, movilizan Ca^{2+}, o activan la PKC (Billah, 1993). Esas observaciones son consistentes con la evidencia actual de otra vía de activación de la PLD independiente del DAG y de la PKC.

Se ha demostrado que inhibidores específicos e inespecíficos de la PKC inhiben parcial o totalmente la estimulación de la PLD en muchos tipos celulares. De la misma manera, la regulación negativa de la expresión de las isoformas convencionales y noveles de PKC inducidas por tratamientos prolongados de las células con ésteres de forbol bloquean la capacidad de agonistas de estimular el enzima (Exton, 1997).

Numerosos agonistas que activan la PLD inducen, además, la hidrólisis de PIP_2 a través de la activación de la PIP_2-PLC. La generación resultante de IP_3 y DAG es presumiblemente responsable de la activación de isoenzimas de PKC sensibles al Ca^{2+} que estimulan la PLD.



Esquema 19: Modelo de activación de la PLD vía PKC.

La expresión de la isoforma PLD1 de humanos y ratas ha demostrado que esta isoforma responde directamente a la PKCα y PKCβ y no a otras isoformas de PKC (Lee y col., 1997). La estimulación no siempre requiere ATP y es, de hecho, inhibida por el nucleótido (Hammond y col., 1997; Min y col., 1998). Esto indicaría que la activación mediada por la PKC no es por fosforilación, sino que la PKC actuaría como efector alostérico de la PLD. Probablemente la interacción de la fosfolipasa con el dominio regulador de la PKC produce un cambio conformacional que activa al enzima. Se ha visto que la PKC interacciona con un dominio en el extremo N-terminal de la PLD1 (Park y col., 1998) que es inhibidor de la actividad catalítica de la PLD y se ha sugerido que la PKC actúa anulando dicha inhibición (Park y col., 1998).

La asociación de la PLD a la membrana es esencial para su actividad ya que el sustrato del enzima se encuentra exclusivamente en la membrana. El enzima está presente en la membrana plasmática, aparato de Golgi, gránulos de secreción, lisosomas y núcleo (Siddiqi y col., 1995; Provost y col., 1996; Banno y col., 1997; Colley y col., 1997). La translocación de isoenzimas convencionales y noveles de PKC a la membrana mediada por agonistas puede ser el principal mecanismo por el que los agonistas activan la PLD. Numerosos agonistas inducen una acumulación temprana de DAG debido a la hidrólisis de PIP_2 (van Blitterswijk, 1991) y esto se asocia con una rápida translocación a la membrana de los isoenzimas (α, β, δ y γ) PKC (Hung y Sarre, 1993). Aunque la translocación de la PKC podría explicar la acción de algunos agonistas sobre la PLD, el hecho de que inhibidores de la actividad quinasa de la PKC puedan impedir la activación de la PLD

indica un cierto papel de la fosforilación en la activación de la proteína (Exton, 1997). En estudios con sistemas libres de células se ha demostrado que únicamente las isoformas α y β de la PKC son capaces de fosforilar la PLD. Es posible que la quinasa no fosforile la PLD *in vivo,* pero que actúe fosforilando a una o más proteínas que regulan la actividad de la PLD.

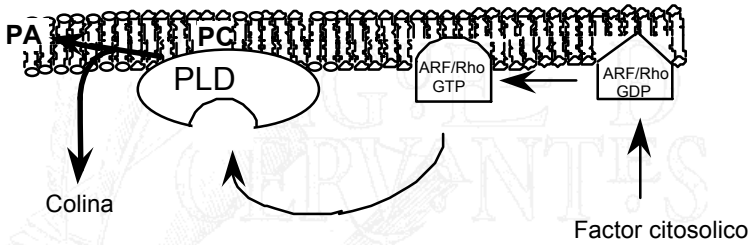
9. 1. 1. Activación por Ca^{2+}

Se ha descrito que elevaciones del Ca^{2+} citosólico inducidas por agonistas estimulan la actividad de ciertas isoformas de PLD (Gargett y col., 1996). Aunque la activación requiere elevaciones de los niveles de Ca^{2+}, parece que el ion no activa directamente al enzima. Distintos estudios han demostrado que la eliminación del Ca^{2+} intracelular mediante quelantes inhibe la activación de la PLD inducida por agonistas (Exton, 1997) y que ionóforos de Ca^{2+} pueden activar a la PLD en distintos tipos celulares. Estos datos sugieren que la PLD se activa por una proteína dependiente de Ca^{2+}, que podría ser la calmodulina (Kumada y col., 1995; Takahashi y col., 1996). Otros posibles activadores son los isoenzimas de PKC dependientes de Ca^{2+} y las PTKs.

9. 1. 2. Activación por proteínas G de bajo peso molecular

En la regulación de la PLD participan proteínas G de bajo peso molecular de las familias ARF y Rho. Se ha comprobado que estas GTPγS estimulan la actividad de la PLD y que, además, requieren un factor citosólico que facilite dicha activación. ARF (factor de ribosilación del ADP) fue originalmente identificado como un cofactor proteico requerido para una eficiente ribosilación de ADP de la subunidad α de Gs por la toxina del cólera. Se ha identificado una proteína de 50 kDa como un factor citosólico adicional para la activación de la PLD (Bourgoin y col., 1995), pero su estructura, función, así como si interacciona directamente con la PLD o ARF está por determinar. Se ha visto que otro de los factores es la PKCα (Singer y col., 1996). Esta quinasa puede activar directamente el enzima o actuar sinérgicamente con ARF o Rho para producir una fuerte activación de la

PLD. La familia Rho de proteínas G monoméricas comprenden un segundo grupo de activadores citosólicos de la PLD dependientes de GTP. Los miembros de la familia Rho juegan un importante papel en la activación de la PLD asociada a membrana y se ha visto que la isoforma de PLD activada en las membranas de hígado por Rho es diferente de la isoforma de PLD activada por ARF. De hecho, el enzima regulado por Rho parece estar presente sólo en membranas, mientras que el que responde a ARF se encuentra tanto en el citosol como en membranas. Para la detección de actividad PLD dependiente de Rho o ARF la presencia de PIP_2 en las vesículas sustrato es esencial (Provost y col., 1996). Este hecho señala una nueva función del PIP_2 como cofactor de la PLD.



Esquema 20: Modelo de activación de la PLD por proteínas G de bajo peso molecular.

9. 1. 3. Activación por tirosina quinasas

La actividad tirosina quinasa representa un modo alternativo de regulación de la PLD. Muchos agonistas, factores de crecimiento y oxidantes pueden activar receptores que poseen actividad tirosina quinasa o activar proteína tirosina quinasas solubles que estimulan la PLD (Lin y Gilfillan, 1992; Uings y col., 1992). En el caso de los factores de crecimiento, la estimulación de la PLD sigue frecuentemente a la activación de la PLC y PKC aunque también existen mecanismos independientes de PKC. Por ejemplo, la estimulación de la PLD en respuesta a la actividad tirosina quinasa de v-Src es distinguible de la inducida por ésteres de forbol (Song y col., 1991) y parece estar mediada por una vía que utiliza proteínas G monoméricas Ras y Ral (Jiang y col., 1995).

9. 1. 4. Activación por PIP_2 y fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP_3)

El PIP_2 juega un papel en la regulación de la PLD en sistemas libres de células (Hammond y col., 1997; Jones y Wessling-Resnick, 1998). Sin embargo, no se ha demostrado que los agonistas controlen la actividad de la PLD a través de variaciones del PIP_2 en células intactas. Debido a que muchos agonistas elevan los niveles de PIP_3 (Fry, 1994) y a que este lípido activa directamente algunos isoenzimas de PLD (Min y col., 1998) es posible que la generación de PIP_3 represente un mecanismo de regulación de este enzima.

9. 1. 5. Activación por oxidantes

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

El tratamiento de células endoteliales con H_2O_2 o ácido linoleico peroxidado produce un acúmulo de DAG que puede ser debido a la activación de la PIP_2-PLC, PC-PLC, PC-PLD o a la activación de todas ellas. Esta activación no está asociada con citotoxicidad. La adición de cloruro ferroso aumenta la actividad PLD, lo que sugiere un papel del $HO^{\bullet}$ en la activación. Otros productos de la peroxidación lipídica estimulan la actividad PLD. Dicha activación es independiente de Ca^{2+} y PKC y conlleva la hidrólisis tanto de PC como de PE (Natarajan y col., 1993).

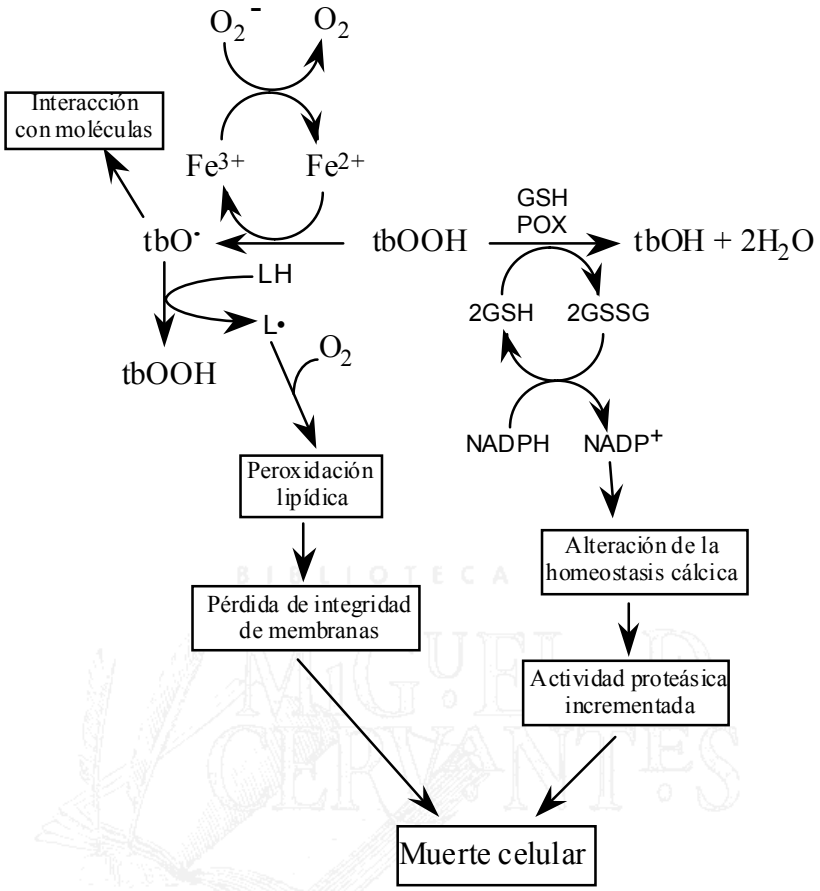
10. ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR *TERT*-BUTILHIDROPERÓXIDO

Los radicales libres son los principales iniciadores y/o mediadores de procesos bioquímicos que conducen a la lesión hepatocelular inducida por el estrés oxidativo (Coleman y col., 1989; Rao y col., 1993; Ahmed-Choudhury y col., 1998; Factor y col., 2000). La utilización de peróxidos orgánicos es una aproximación experimental muy útil para definir los mecanismos por los que los radicales libres dañan las células y para explorar el potencial de los antioxidantes citoprotectores. Se ha empleado frecuentemente el *tert*-butilhidroperóxido (TBHP), compuesto orgánico altamente lipofílico, como modelo en la inducción aguda de estrés oxidativo en células de parénquima hepático (Coleman y col., 1989; Masaki y col., 1989; Sakaida y col., 1991; Ahmed-Choudhury y col., 1998; Cortez-

Pinto y col., 1999). En la célula el TBHP es metabolizado por la GSH peroxidasa o puede reaccionar con Fe^{2+} y generar radicales *tert*-butoxilo.

La metabolización reductiva del TBHP a *tert*-butanol mediada por la glutatión peroxidasa genera glutatión oxidado (GSSG). Para reestablecer el nivel intracelular de GSH, el GSSG formado es rápidamente reducido por la glutatión reductasa en una reacción en la que se utiliza NADPH (Lötscher y col., 1979; Sies, 1985). El consumo sostenido de GSH y NADPH conduce a una inhibición de translocasas de Ca^{2+}. Se ha propuesto que una elevación del Ca^{2+} citosólico es, al menos parcialmente, el resultado de una masiva oxidación del NAD(P)H en la mitocondria seguida de su hidrólisis a nicotinamida, ADP-ribosa y fosfato inorgánico (Bellomo y col., 1982). Estos cambios en la concentración del calcio citosólico tienen como resultado la formación de protuberancias en la membrana plasmática del hepatocito, que son un signo temprano de la toxicidad inducida por TBHP (Jewell y col., 1982; Moore y col., 1983; Thor y col., 1984; Bellomo y col., 1984).

El TBHP puede ser tóxico para las células a través de la formación de ROS que se generan por una vía dependiente de hierro en la que se forman radicales *tert*-butoxilo. Estos radicales pueden reaccionar con ácidos grasos poliinsaturados, iniciando la degradación peroxidativa de los fosfolípidos de la membrana y por ello induciendo la pérdida de la integridad de la membrana, que finalmente conduce a la muerte celular (Masaki y col., 1980; Rush y col., 1985). Además, los radicales libres derivados del TBHP pueden formar uniones covalentes con moléculas celulares produciendo daño celular (Orrenius y col., 1983; Kensler y col., 1995).



Esquema 21: Metabolismo del TBHP en el hepatocito. tbOOH: *tert*-butilhidroperóxido, tbO•: radical *tert*-butoxilo, tbOH: *tert*-butanol.

Como se ha descrito anteriormente, los radicales libres y otros ROS estimulan la liberación de AA en distintos tipos celulares por mecanismos que están por esclarecer. Se ha descrito que la exposición de células endoteliales de arteria pulmonar a TBHP estimula la liberación de AA y la síntesis de productos de la ciclooxigenasa (Chakraborti y col., 1989, 1993). En estas condiciones las acciones del TBHP parecían estar mediadas por ROS, ya que el pretratamiento de las células con α-tocoferol, DTT y atrapadores de ROS previno el acúmulo de AA (Taylor y col., 1996; Chakraborti y col, 1989, 1993).

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El compuesto TBHP es un agente hepatotóxico que se utiliza a menudo como modelo para estudiar las alteraciones que tienen lugar como consecuencia de la acción de radicales libres. En particular, el TBHP induce la liberación de AA de los fosfolípidos de las membranas en diversos tipos celulares. Hemos descrito recientemente que en hepatocitos de rata marcados con AA-[^{14}C] tratados con TBHP a la concentración citotóxica de 1 mM hay una liberación incrementada de productos marcados en ^{14}C al medio, así como un aumento intracelular de AA-[^{14}C] y de DAG-[^{14}C] (Babenko y col., 1998). En la presente Tesis Doctoral se ha planteado como objetivo principal conocer las vías por las que tiene lugar dicho acúmulo intracelular de AA y DAG en células tratadas con el oxidante en una situación que precede a la muerte celular.

Como objetivos específicos se desarrolló:

1- El estudio de la implicación de GSH, ROS y de la peroxidación de lípidos en el acúmulo intracelular de AA y DAG.

2- El estudio de las vías integradas en la cascada de señalización por las que el TBHP induce el cambio en los niveles intracelulares de AA y DAG.

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1. 1. REACTIVOS

DF, DES, E_2, EGTA, inhibidor de tripsina, BSA libre de ácidos grasos, TBA, DTNB, TBHP, α-tocoferol, azul brillante de coomassie G-250, azul de tripán, leupeptina, oleato de colesterol, DCF, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, PMSF, SDS, urea, formato de colesterol, trioleína, persulfato amónico, CDNB, GSH transferasa, membrana de diálisis Sacks, Triton X-100, anticuerpos contra IgG conejo y contra IgG de ratón conjugados a peroxidasa, LPS 0111:B4, prometacina, mepacrina, y glicina, de Sigma Co. (E.E.U.U.).

ADP, Hepes, piruvato, G6P, $NADP^+$, NAD^+, NADH, 3-fosfoglicerato, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, fosfoenolpiruvato, LDH, piruvato quinasa, mioquinasa, GSH, colagenasa A, DTT y Tritón X-100, de Boehringer Mannheim (Alemania).

DMSO de Fluka Chemica (España). Sacarosa (para análisis), KBr, reactivo Folin Ciocalteu y ácido fórmico, de Panreac (España).

[1-^{14}C] Ácido araquidónico, ECL y aprotinina de Amersham Pharmacia Biotech. (Gran Bretaña).

Acrilamida, bisacrilamida, TEMED y azul de Coomassie R-250 para electroforesis de BioRad Laboratories (E.E.U.U.).

Lecitina de huevo de Lipid Products (Gran Bretaña).

Cloroformo, metanol, n-heptano, líquido de centelleo (Cocktail Biogreen 3), tolueno, éter diisopropílico, ácido fosfórico, etanol y placas para cromatografía en capa

fina (TLC) SIL-G-25 de silica-gel, de un grosor de 0,25 mm, de Scharlau F.E.R.O.S.A. (España).

HCl, ácido ácetico glacial y yodo de Probus S.A. (España).

Heparina de Analema (España).

Nitrógeno y carbógeno, de la Sociedad española de oxígeno (S.E.O.).

HA1004, PD98059, $AACOCF_3$ y $PACOCF_3$, de Alexis (E.E.U.U).

DCFH-DA de Molecular Probes (EE.UU).

Esfingosina, H7, propranolol, neomicina y D609, de Calbiochem (Alemania)

Reactivo para tinción de proteínas en geles Pierce (E.E.U.U.).

Membranas para transferencia Western Immobilon-P, de Millipore (E.E.U.U.).

Suero fetal bovino de Biochrom (Alemania).

Anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosinas (PY20) de Trasduction Laboratories (Gran Bretaña).

Anticuerpos policlonales anti-$sPLA_2$ de rata cedidos por Jun Takasaki, de Yamanouchi Pharmaceutical Co. (Japón).

Genisteína de LC laboratories (E.E.U.U.).

Tween 20, TCA y resto de reactivos, de Merck (Alemania).

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

1. 2. EQUIPAMIENTO

- Centrífugas de mesa Beckman, modelo TJ-6R y Selecta, modelo Centronic.
- Centrífuga de alta velocidad Sorvall, modelo RC-5B
- Microcentrífuga Sigma, modelo 10.
- Ultrasonador Cole-Parmer, modelo 8890.
- Concentrador evaporador Savant, modelo A-290.
- Espectrofotómetros Perkin-Elmer, 550-SE y Kontron, modelo Uvikon S10P.
- Espectrofluorímetro Perkin-Elmer, LS-50.
- Equipo de perfusión para obtención de hepatocitos (bomba peristáltica Watson-Marlow y oxigenador multiampollas termostatizado).
- Baños termostatizados con agitación Unitronic Orbital 320, Selecta.
- Microscopio óptico Olympus.
- Analizador de imagen BioImage de Bio Image Corporation, con cámara digital Kodak Videk Megaplus y software Whole Ban Sun Wiew de Bio Image Co.
- Contador de centelleo líquido LKB-Wallac, modelo 1215 Rackbeta.
- Arcón congelador zanussi de -20°C.
- Ultracongelador de -80°C Forma Scientific, modelo -86°C Freezer.
- Balanzas de precisión Sartorius Werke Gmbh y Metler, modelo PJ400 y AE163.
- Medidor de pH Crison, modelo 2001.
- Fuente de alimentación para electroforesis BioRad, modelo Power Pac 1000.
- Cubeta de electroforesis vertical BioRad, modelo Mini-Protean® II.
- Secador de geles BioRad, modelo 5833
- Bomba de vacío BioRad, modelo Hydrotech Vacuum Pump.
- Cámara de transferencia Semy Dry BioRad.

1. 3. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratas macho *Sprague-Dawley* de 180 g de peso aproximado procedentes del estabulario de la Universidad del País Vasco. Los animales se mantuvieron

en condiciones controladas de luz-oscuridad (luz de 8:00 a 20:00 h) y fueron alimentados con una dieta tipo y agua *ad libitum*. Los animales se sacrificaban a las 8:30 - 9:00 h, hora de comienzo de los experimentos.

2. MÉTODOS

2. 1. OBTENCIÓN DE LOS HEPATOCITOS

El método de perfusión utilizado para obtener las células está basado en el descrito inicialmente por Seglen (Seglen, 1976) y adaptado definitivamente por Ruiz-Larrea (Ruiz-Larrea y col., 1993); se utiliza la colagenasa como enzima disgregante del tejido conectivo, estando el circuito termostatizado a 37°C en todo momento y con carbogenación continua.

2. 2. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular se determina por el test de exclusión de azul de Tripán y por la liberación al medio de LDH (Bergmeyer, 1974). Se rechazaron todas las suspensiones celulares con una viabilidad inferior al 88%.

2. 3. INCUBACIONES CELULARES

Los hepatocitos ($2 \bullet 10^6$ cél /ml) se resupenden en medio Krebs-Henseleit (K-H), pH 7,4, glucosa 20 mM y 2% BSA libre de acidos grasos. Las células se preincuban 20 min a 37°C, en agitación y carbogenación constante. Transcurrida la preincubación, se añade el TBHP (tiempo cero) y se continúan las incubaciones durante 10 min.

Las distintas moléculas (antioxidantes, inhibidores, hormonas, quelantes, etc...) se añaden a la suspensión celular durante la preincubación. E_2, DES, prometacina, α-tocoferol, mepacrina, $AACOCF_3$, $PACOCF_3$, D609, PMA, esfingosina, H7, HA1004, genisteína, PD98059 y 8-TMB se añaden disueltas en etanol al 0,1% (v/v). DTT, DF, neomicina, y propranolol se añaden disueltas en tampón K-H.

2. 4. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CITOTÓXICOS:

2. 4. 1. DETERMINACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS

La peroxidación de lípidos se determina valorando la formación de TBARS (sustancias que reaccionan con TBA) como se describe en Fee y Teitelbaum (Fee y Teitelbaum, 1972). Se toman alícuotas de la suspensión de hepatocitos a distintos tiempos de incubación, se desproteinizan con la adición de TCA al 100 % (p/v) y posterior centrifugación. Al sobrenadante se le añade TBA al 0,67% (p/v) disuelto en TCA al 5% y la mezcla se calienta a 100°C durante 15 min. La absorbancia del sobrenadante se determina a 532 nm. La peroxidación de lípidos se expresa como nmol de malondialdehido (MDA) formado por millón de células. Estos valores se calculan utilizando el coeficiente de extinción molar para el MDA, $\varepsilon = 156\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ a 532 nm.

2. 4. 2. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES CELULARES DE ATP

La cantidad del ATP celular se determina según Jaworek y col. (Jaworek y col., 1974). Se toman alícuotas de la suspensión celular, las células se lavan dos veces en tampón K-H y se sedimentan por centrifugación. Los hepatocitos se desproteinizan con ácido perclórico (1 N) y el sobrenadante separado por centrifugación se neutraliza con K_2CO_3. El precipitado se elimina y se cuantifica el contenido en ATP del sobrenadante. El método determina espectrofotométricamente el consumo de NADH a expensas del ATP celular en una serie de reacciones enzimáticas acopladas. Utilizando el coeficiente de extinción molar del NADH a 365 nm, cuyo valor es $\varepsilon = 3{,}4\ mM^{-1}\ cm^{-1}$, calculamos el NADH consumido, siendo este valor, el doble del ATP presente en la muestra.

2. 4. 3. MEDIDA DE GRUPOS SULFHIDRILO (-SH) PROTEICOS

Se emplea el método descrito por Sedlak y Lindsay (Sedlak y Lindsay, 1968) modificado por Albano y col. (Albano y col., 1985). Se toman alícuotas de la suspensión

celular, se lavan las células dos veces con tampón K-H y se sedimentan por centrifugación. La pastilla celular se desproteiniza con TCA al 5% que contiene EDTA 5 mM. Las muestras se centrifugan, se elimina el sobrenadante y se repite dos veces el mismo proceso. La pastilla se resuspende en tampón Tris/HCl 0,1 M, pH 7,4, que contiene EDTA 5 mM y SDS al 0,5%. Se toman alícuotas de estas muestras y se las hace reaccionar con una disolución de DTNB (reactivo Ellman) a una concentración final de 0,1 mM en tampón Tris/HCl 0,1 mM que contiene EDTA 5 mM, pH 8,6. La absorbancia del cromógeno formado, estable entre 2 min y 2 h, se mide a 412 nm. Los valores se expresan como nmol equivalentes de -SH/ mg de proteína utilizando GSH como estándar.

La cantidad de proteínas se valora según el método de Lowry modificado por Peterson (Peterson, 1977).

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

2. 4. 4. DETERMINACIÓN DEL GSH

Se determina según el método de Brigelius y col. (Brigelius y col., 1983). Se toman alícuotas de la suspensión de hepatocitos, se añade $HClO_4$ a una concentración final del 2% con EDTA 2 mM y se centrifugan. El sobrenadante ácido se neutraliza con K_2CO_3 y se determina su contenido en GSH mediante la conjugación con Cl-2,4-dinitrobenceno (CDNB) catalizada por la GSH-S-transferasa. La reacción tiene lugar en tampón fosfato 0,1 M, EDTA 1 mM, pH 7,4 y la formación del aducto se determina espectrofotométricamente a 340 nm. La concentración de GSH se calcula con el coeficiente de extinción molar del cromógeno formado que es ε = 9,6 mM^{-1} cm^{-1} y se expresa como nmol GSH/10^6 cél utilizando GSH como estándar.

2. 4. 5. DETERMINACIÓN DEL NAD(P)H

Se determina según Staddon y Hansford (Staddon y Hansford, 1987). Los hepatocitos ($2 \bullet 10^6$ cél/ml) se resuspenden en tampón K-H y se preincuban durante 15 min a 37°C con agitación y carbogenación constantes. Durante este tiempo se añaden las distintas moléculas antioxidantes. A continuación, los hepatocitos se transfieren a una cubeta de

plástico y se determina la fluorescencia emitida por el NAD(P)H a una λ de emisión de 460 nm para una λ de excitación de 365 nm. La suspensión celular se mantiene con agitación magnética constante y a 37°C. A tiempo cero se añade el TBHP (0,5 mM) a la suspensión celular, midiéndose la fluorescencia a intervalos de 30 s. La fluorescencia se expresa en unidades arbitrarias.

2. 5. ESPECIES OXIGENADAS REACTIVAS (ROS)

La formación intracelular de ROS se determina fluorimétricamente en hepatocitos cargados con diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA) de acuerdo con Royall e Ischiropoulos (Royall e Ischiropoulos, 1993). La DCFH-DA es hidrolizada por esterasas intracelulares a la forma no fluorescente diclorofluorescina (DCFH). Cuando la DCFH es oxidada por radicales libres, ésta pasa a la forma fluorescente diclorofluoresceína (DCF).

Los hepatocitos ($3 \bullet 10^6$ cél/ml) se resuspenden en tampón K-H, pH 7,4, glucosa 20 mM y se incuban 30 min con DCFH-DA a una concentración final de 20 μM. A continuación las células se lavan tres veces y se resuspenden ($1 \bullet 10^6$ cél/ml) en tampón K-H. Para determinar la formación intracelular de ROS se transfieren 3 ml de la suspensión celular a cubetas de cuarzo, se mantienen en agitación y a 37ºC durante toda la incubación. La formación de DCF se determina cada 30 s a una λ ex = 502 nm y λ em = 525 nm.

2. 6. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE DAG-[^{14}C] Y AA-[^{14}C]

2. 6. 1. INCORPORACIÓN DE AA-[^{14}C] EN LÍPIDOS CELULARES

Los hepatocitos ($3 \bullet 10^6$ cél/ml) se resuspenden en tampón K-H con $CaCl_2$ (2,5 mM), suero fetal bovino (20%) y HEPES (20 mM), pH 7,4. Se añade 1 μCi de AA-[^{14}C] a 20 ml de la suspensión celular y se incuban durante 1 h a 37ºC bajo atmósfera de carbógeno y en agitación constante. El procedimiento de cargado no afectó al estado tiol, a los niveles de

ATP o a la peroxidación lipídica, que fueron similares a los observados en células no marcadas.

Los hepatocitos marcados con AA-[^{14}C] se lavan 3 veces con medio K-H que contiene 0,5% de BSA libre de ácidos grasos. Las incubaciones celulares se realizan según el apartado 2. 3. Transcurrido el tiempo de incubación, se toman alícuotas y se centrifugan. Se utiliza la pastilla celular para la extracción de lípidos totales y posterior cuantificación de DAG-[^{14}C] y AA-[^{14}C].

2. 6. 3. EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE LÍPIDOS

BIBLIOTECA VIRTUAL

Los lípidos se extraen de las pastillas celulares con cloroformo/metanol (2:1 v/v) de acuerdo con Folch y col. (Folch y col., 1957). Se evapora la fase clorofórmica en un concentrador-evaporador speedVac (Savant). El residuo lipídico se disuelve en tolueno. Se toma una alícuota de la suspensión en tolueno y se detemina la radioactividad que corresponderá a la radioactividad incorporada en los lípidos totales. El resto de la muestra lipídica se aplica en placas de silicagel G-25 para cromatografía en capa fina (TLC). Los patrones de lípidos se cromatografían en líneas adyacentes. Se desarrollan las placas en el eluyente n-heptano/éter di-isopropílico/ácido acético glacial (70:30:2 v/v/v). Se visualizan las áreas correspondientes a los distintos lípidos y se transfieren a viales de centelleo conteniendo líquido de centelleo comercial (Biogreen3), determinándose su radioactividad.

2. 7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PLD

La actividad PLD se determina mediante la formación de fosfatidiletanol en hepatocitos marcados con AA-[^{14}C]. Las células marcadas se incuban 10 min en K-H con BSA al 2 % y etanol 200 mM. A tiempo cero se añade TBHP (0,5 mM) o PMA (100 nM) a la suspensión celular y la incubación se continúa durante 10 min. Transcurrido ese tiempo las células se separaran del medio por centrifugación y se extraen los lípidos de las pastillas celulares de acuerdo con Folch y col. (Folch y col., 1957). Los distintos lípidos se separan por cromatografía en capa fina en dos fases. En la primera las placas se desarrollan 8 cm en

cloroformo/metanol/ácido acético (9:1:1, v/v/v) como eluyente. En la segunda etapa las placas se eluyen 16 cm con éter de petróleo (punto de ebullición 40-60°C)/dietiléter/ácido acético (60:40:1, v/v/v). Los patrones de lípidos se cromatografían en líneas adyacentes. Se visualizan las área correspondientes a los distintos lípidos y se transfieren a viales de centelleo conteniendo líquido de centelleo comercial (Biogreen3), determinándose su radioactividad.

2. 8. ESTUDIOS INMUNOQUÍMICOS

Se utilizó la técnica de transferencia *Western* para la detección de $sPLA_2$ en distintos tipos celulares y para la determinación de los niveles de fosfofotirosinas en hepatocitos tratados y no tratados con TBHP (0,5 mM).

2. 8. 1. ANÁLISIS DE $sPLA_2$

Se estudió la distribución de la expresión de $sPLA_2$ en homogenado de hígado de rata, en hepatocitos y en células no parenquimales utilizando anticuerpos policlonales anti-$sPLA_2$. La perfusión del hígado se realiza según se ha descrito en el apartado 1 de Materiales y Métodos. Las células obtenidas se lavan 3 veces en tampón K-H por centrifugación. La pastilla celular obtenida corresponde a los hepatocitos. Las células no parenquimales, contenidas en los sobrenadantes de los lavados, se recogen también por centrifugación. Como controles positivos de expresión de $sPLA_2$ se utilizan extractos proteicos obtenidos de plaquetas y de homogenado de bazo de rata. Asimismo, se indujo la expresión de $sPLA_2$ en ratas mediante tratamiento con LPS. Para ello se inyectan intraperitonealmente 250 µg de LPS disuelto en tampón K-H y a las dos horas se aislan los hepatocitos según el apartado 2.1. Se estudió la sobreexpresión de $sPLA_2$ en las mismas fracciones celulares que en las ratas sin tratar.

Para el estudio del efecto del TBHP sobre la $sPLA_2$ se analizaron los niveles del enzima en células procedentes de ratas tratadas y sin tratar con LPS e incubadas 10 min con

el oxidante. Después de la incubación se recogen la células y se obtienen los extractos proteicos celulares que se utilizan en los análisis.

2. 8. 1. 1. Extractos celulares

Las células tratadas con TBHP durante 10 min se lavan dos veces con PBS y los extractos celulares se obtienen mediante la adición de tampón de lisis (Hepes 50 mM, NaCl 150 mM, Triton x-100 1%, SDS 0,1%, NaF 50 mM, pirofosfato sódico 10 mM, ortovanadato sódico 2 mM, EDTA 10 mM, EGTA 2 mM, fluoruro de PMSF 1 mM, aprotinina 10 µg/ml y leupeptina 5 µg/ml, pH 7,6). Tras agitar las muestras, éstas se centrifugan a 12.000g durante 30 min a 4ºC y se recoge el sobrenadante, se reparte en alícuotas y se congela a -20ºC.

2. 8. 1. 2. Detección de $sPLA_2$ por transferencia *Western*

El extracto celular se procesa según Laemmli (Laemmli, 1970). La separación de las proteínas se realiza por electroforesis en condiciones desnaturalizantes en un gel homogéneo al 12% de poliacrilamida, a un voltaje de de 150 V durante 1 h. Las proteínas se transfieren a membranas de Inmovilon P aplicando un voltaje de 1 mA/cm^2 durante 1 h. A continuación se bloquea la membrana en tampón Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, BSA 3% y Tween 20 0,05%, pH 7,5, durante 16 h a temperatura ambiente. La membrana bloqueada se incuba con el anticuerpo primario (anti-$sPLA_2$) durante 3 h a temperatura ambiente. Tras lavar la membrana 3 veces con tampón Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, BSA 1% y Tween 20 0,05%, pH 7,5, se añade el anticuerpo secundario acoplado con peroxidasa y se incuba 1 h a temperatura ambiente. A continuación se lava la membrana 3 veces y se detectan las bandas correspondientes a la $sPLA_2$ por quimioluminiscencia.

2. 8. 2. ANÁLISIS DE FOSFOTIROSINAS

Se estudiaron los niveles de fosfotirosinas en hepatocitos tratados y sin tratar con TBHP (0,5 mM) durante 10 min. Las células incubadas como se describe en el apartado 3.

1. se recogen por centrifugación y se obtienen los extractos proteicos celulares que se utilizan en los análisis.

2. 8. 2. 1. Extractos celulares

Los extractos proteicos se obtienen como se ha descrito en el apartado 2. 8. 1. 1.

2. 8. 2. 2. Detección de fosfotirosinas por transferencia *Western*

El extracto celular se procesa según Laemmli (Laemmli, 1970). La separación de las proteínas se realiza por electroforesis en condiciones desnaturalizantes en un gel homogéneo al 8% de poliacrilamida, a un voltaje de 230 V durante 45 min. Las proteínas se transfieren a membranas de Immovilon P aplicando un voltaje de 20 V durante 1 h. A continuación se bloquea la membrana en tampón Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, BSA 1% y Tween 20 al 0,1%, pH 7,5 (tampón II) durante 2 h a temperatura ambiente. La membrana bloqueada se incuba con el anticuerpo primario (fosfotirosina-PY20) durante 16 h a 4°C. Tras lavar la membrana 3 veces con tampón II sin BSA se añade el anticuerpo secundario acoplado con peroxidasa y se incuba 1 h a 25 C. Después de otros 3 lavados se localizan las proteínas fosforiladas en residuos tirosina por quimioluminiscencia. Los niveles de fosforilación proteica se determinan por análisis de imagen.

2. 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Los cálculos de significación estadística se han realizado empleando el test de la t de Student para datos no apareados y el análisis de la variancia con dos factores. Se consideran significativos los valores de $p<0,05$. Se utiliza la correlación Kendall para determinar la relación entre variables en los caso indicados.

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

RESULTADOS

1. ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR TBHP

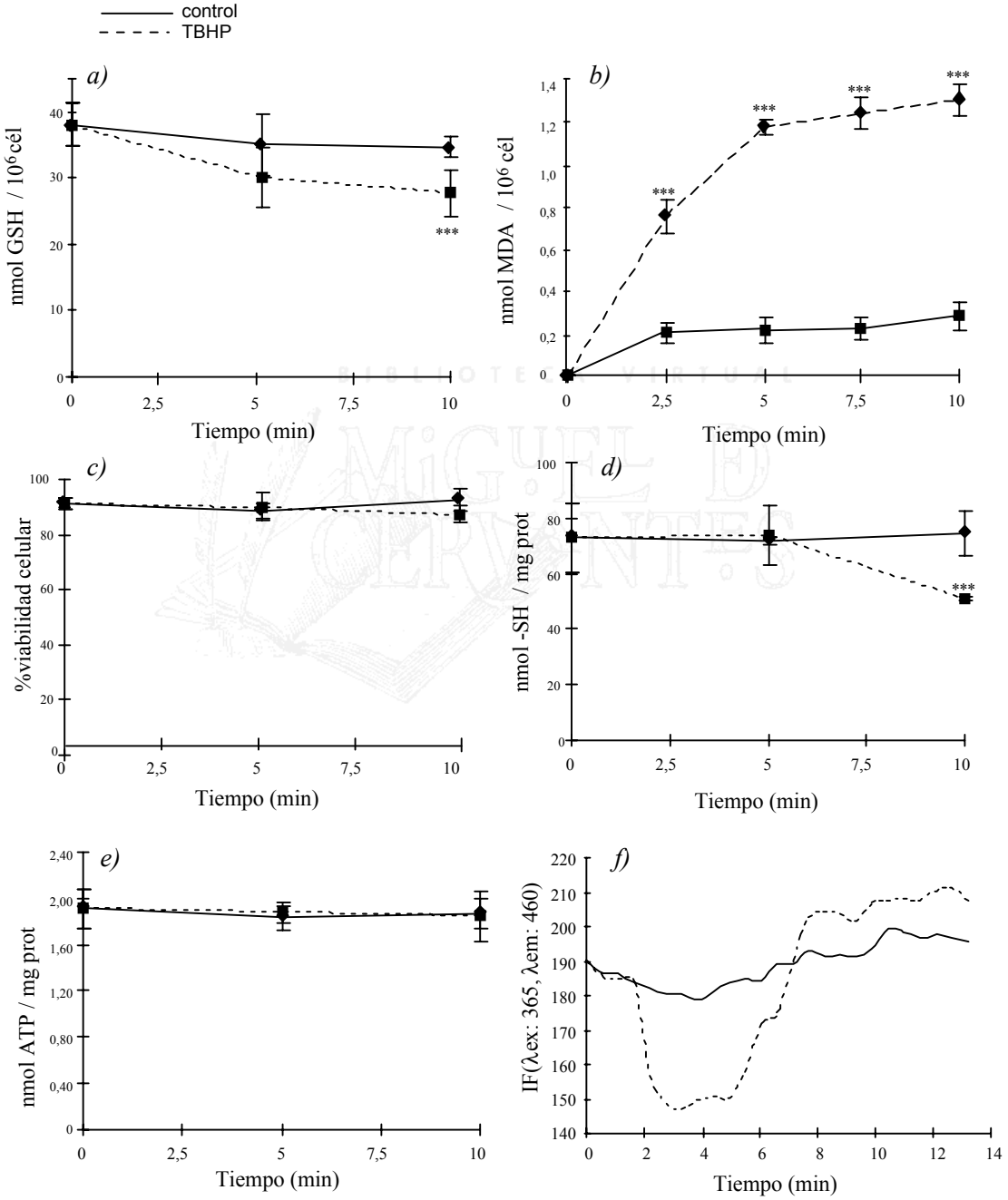
1. 1. ESTUDIOS CON TBHP (0,5 mM)

Estudios previos en nuestro laboratorio habían demostrado que el TBHP (1mM) induce toxicidad y muerte celular a los 15 min de incubación. La generación de TBARS y el descenso de los niveles de GSH intracelulares serían los mecanismos desencadenantes del daño hepatocelular. Antes de la muerte celular también se observó un descenso en los valores de ATP (Leal y col., 1998). En este apartado se presentan los resultados obtenidos en el estudio del estrés oxidativo inducido por TBHP 0,5 mM. El oxidante indujo la muerte celular, determinada por liberación al medio de LDH, a los 45 min de incubación. No se observó pérdida de viabilidad a los 10 min. Se eligió este tiempo máximo de incubación para estudiar las alteraciones tempranas que induce el oxidante en el hepatocito independientes de muerte celular, y que preceden a la citotoxicidad. Los estudios se llevaron a cabo en suspensiones de hepatocitos aislados en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. En el presente trabajo se ha estudiado el efecto del TBHP sobre los siguientes parámetros indicativos de estrés oxidativo: viabilidad celular, peroxidación de lípidos, concentración intracelular de ATP, contenido de GSH, estado de los grupos sulfhidrilo (-SH) proteicos y valores de NAD(P)H.

Las células se incubaron en presencia o ausencia del oxidante y a los tiempos señalados en la figura 1 se determinaron los distintos parámetros indicativos de estrés oxidativo, como se describe en Materiales y Métodos. La adición del hidroperóxido a la suspensión celular no afectó a la viabilidad de los hepatocitos, determinada por la liberación de LDH al medio de incubación (Fig. 1c). La concentración intracelular de ATP tampoco resultó alterada por la presencia del TBHP (controles no tratados 1,87 ± 0,13 nmol ATP/ mg prot; TBHP 1,85 ± 0,22 nmol ATP/ mg prot) (Fig. 1e). Por el contrario, el TBHP estimuló la peroxidación lipídica, e indujo un consumo de GSH intracelular, la oxidación de grupos tioles proteicos y un rápido descenso en los niveles de nucleótidos de piridina (Figs. 1 a, b, d y f). El GSH y los grupos -SH proteicos a los 10 min de incubación descendieron significativamente (un 20% y un 31,5%, respectivamente) como consecuencia de la adición del TBHP (Figs. 1a y 1d). El oxidante provocó un rápido descenso de los

niveles de NAD(P)H celulares que se restablecieron hasta valores iniciales durante el transcurso de la incubación (Fig. 1f) .

Figura 1: Efecto del TBHP sobre a) GSH, b) peroxidación lipídica, c) viabilidad celular, d) grupos -SH proteicos, e) ATP y f) niveles de NAD(P)H intracelulares. Las células se preincubaron 20 min y tras



la adición del oxidante (tiempo cero) se incubaron durante 10 min. A los tiempos señalados en las gráficas se determinaron los valores de los distintos parámetros según se describe en Materiales y Métodos. Los resultados de las figuras a, b, c, d y e son la media ±EE de al menos N=3 y los de la figura f son los obtenidos en un experimento representativo.

1. 2. EFECTO DE ANTIOXIDANTES SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR TBHP

A continuación, se estudió la acción de distintas moléculas antioxidantes sobre los efectos inducidos por el TBHP. Los antioxidantes se añadieron durante la preincubación celular.

1. 2. 1. EFECTO SOBRE LA PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS

Se estudiaron los efectos de diferentes antioxidantes que reaccionan a distintos niveles en el proceso de la peroxidación lipídica: prometacina (0,25-5 μM), α-tocoferol (0,1-1 mM), E_2 (5-50 μM) y DES (5-50 μM). Se utilizó también el quelante de Fe^{3+}, DF (25 y 50 μM). Se estudió el efecto del TBHP sobre hepatocitos cuyo estado redox citoplásmico se mantuvo reducido con DTT. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 2.

La prometacina, el E_2 y el DES previnieron la formación de TBARS de forma dependiente de la dosis (Figs. 2a, b y d). El α-tocoferol fue un antioxidante menos eficaz. Así, cuando se ensayó a concentraciones 100 veces superiores a las del E_2 provocó una inhibición de la formación de TBARS similar a la de la hormona (Fig. 2c). El tratamiento de las células con DF y DTT redujo significativamente la formación de TBARS (Figs. 2f y 2g).

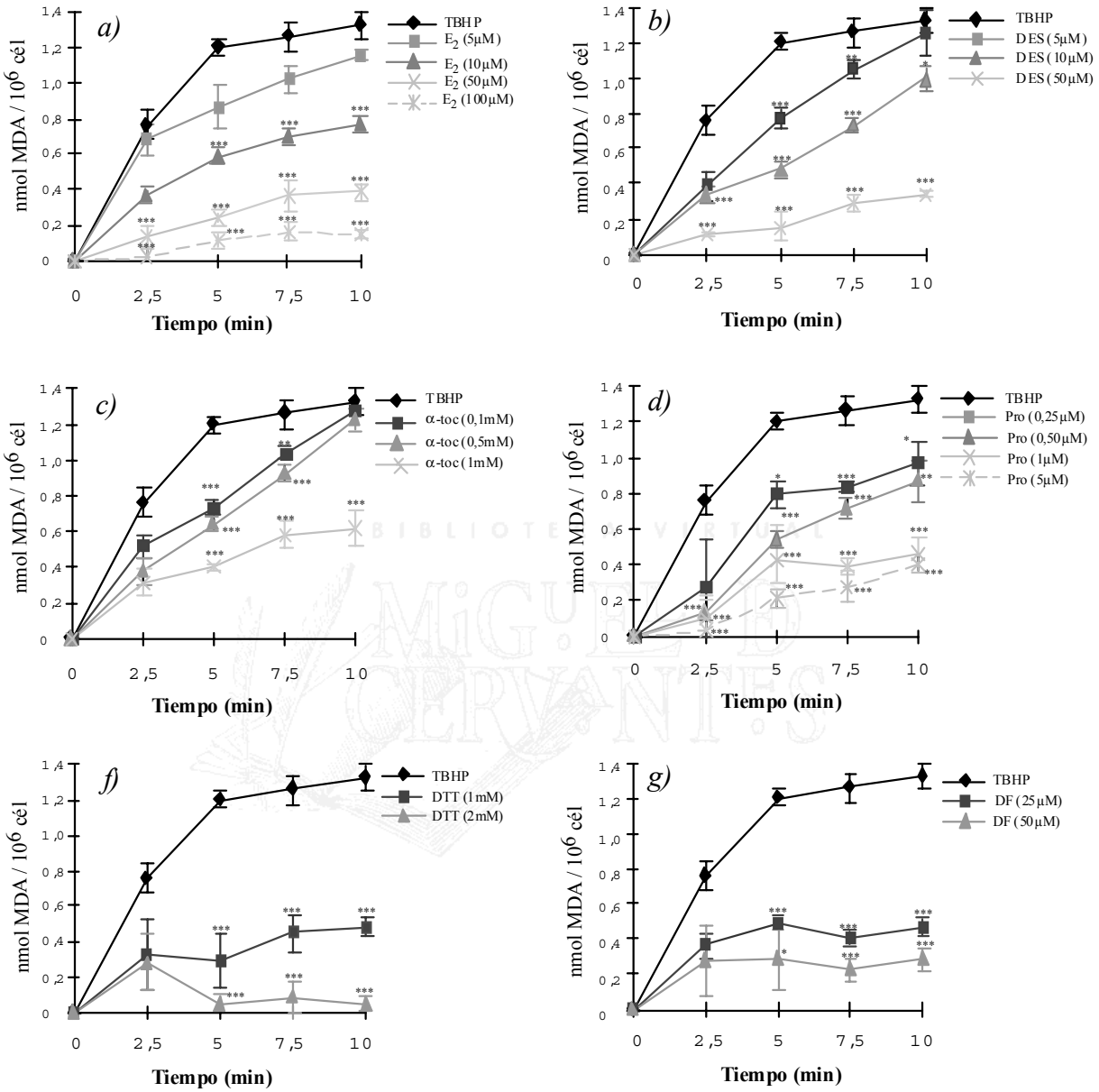


Figura 2: Efecto de distintas moléculas antioxidantes sobre la peroxidación lipídica inducida por TBHP. Las células se preincubaron 15 min con las moléculas a las concentraciones indicadas. A tiempo cero, se añadió el TBHP y la incubación continuó durante 10 min. A los tiempos señalados en las gráficas se determinaron los valores de MDA según se describe en Materiales y Métodos. Los resultados de las figuras son la media ±EE de al menos N=3. ***p<0,01, **p<0,025 y *p<0,05, diferente respecto a TBHP.

1. 2. 2. EFECTO SOBRE EL GSH Y LOS GRUPOS -SH PROTEICOS

Se estudió el efecto de las moléculas antioxidantes sobre el descenso de GSH y de grupos -SH proteicos inducido por TBHP a los 10 min. Las moléculas ensayadas ejercieron distintos efectos sobre las modificaciones producidas por el oxidante. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1.

	GSH	***-SH***
	nmol/10^6 cél	*nmol/mg prot*
Sin adición	44 ± 2	75 ± 5
TBHP (0,5 mM)	28 ± 2 ***	51 ± 2***
+ E2 (5 μM)	21 ± 2 ***	67 ± 4 ##
+ E2 (50 μM)	39 ± 2 ###	62 ± 3 #
+ DES (5 μM)	36 ± 1 ###	63 ± 6 #
+ DES (50 μM)	41 ± 2###	69 ± 4 ##
+ α-toc (0,1 mM)	33 ± 2 **, #	62 ± 3 **, ##
+ α-toc (1 mM)	40 ± 3 ###	65 ± 6 ##
+ Prometacina (0,25 μM)	28 ± 4 ***	59 ± 2 ***
+ Prometacina (1 μM)	24 ± 3 ***	59 ± 6 ***
+ Desferal (25 μM)	26 ± 5 ***	55 ± 11**
+ Desferal (50 μM)	29 ± 3***	45 ± 7 ***
+ DTT (1 mM)	n.d.	69 ± 8 ##
+ DTT (2 mM)	n.d.	75 ± 4 ###
DTT (1 mM)	n.d.	64 ± 6 ***
DTT (2 mM)	n.d.	64 ± 2 ***

Tabla 1: Efecto de distintas moléculas antioxidantes sobre el vaciado de GSH y grupos -SH proteicos inducido por TBHP. Las condiciones de incubación se describen en la figura 2. A los 10 min de incubación se determinó la concentración intracelular de GSH y de los grupos -SH proteicos según se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media ±EE de al menos N=3. ***p<0,01, **p<0,025 y *p<0,05, diferente respecto al control sin adición, ###p<0,01, ##p<0,025 y #p<0,05, diferente respecto a TBHP; n.d.: no determinado.

El E_2 a la concentración de 50 μM previno el descenso de GSH inducido por TBHP. A 5 y 50 μM el estrógeno evitó la oxidación de los grupos tioles proteicos inducida por el oxidante. El DES a ambas concentraciones evitó el descenso de GSH y de grupos -SH proteicos. El α-tocoferol 0,1 mM previno parcialmente el descenso del GSH y de los grupos -SH proteicos. A la concentración de 1 mM el efecto protector fue total, alcanzándose valores intracelulares similares a los observados en ausencia del oxidante

La prometacina y el DF a las concentraciones ensayadas resultaron ineficaces en la prevención del descenso de GSH y grupos -SH proteicos.

El DTT resultó ser un eficaz protector de los grupos -SH proteicos frente a la oxidación producida por el hidroperóxido. Los valores de GSH no se pudieron calcular debido a la interferencia del DTT con el método de valoración del GSH.

1. 2. 3. EFECTO SOBRE LOS NUCLEÓTIDOS DE PIRIMIDINA

El TBHP produjo un rápido (2 min) descenso en los niveles intracelulares de NAD(P)H que permaneció constante durante aproximadamente 3 min, para luego recuperar los niveles iniciales. Las distintas moléculas antioxidantes ensayadas modificaron de forma diferente la respuesta al oxidante. Así, el DTT, como se puede ver en la figura 3a regeneró rápidamente la fluorescencia debida al NAD(P)H. Por otra parte, la incubación con DES hizo que el descenso de nucleótidos reducidos fuese marcadamente inferior (57% respecto al TBHP) y que la velocidad de recuperación de los valores iniciales fuese mayor (Fig. 3c). El E_2 se comportó de manera diferente según la concentración ensayada. A la concentración de 5 μM el estrógeno evitó ligeramente el descenso de los niveles de NAD(P)H, aunque el tiempo que las células necesitaron para restablecer los valores iniciales de NAD(P)H fue similar al de células tratadas con el hidroperóxido. A la concentración de 50 μM tanto el descenso, como el tiempo necesario para alcanzar los valores iniciales de NAD(P)H fueron menores (55% y 30% del TBHP, respectivamente) (Fig. 3b).

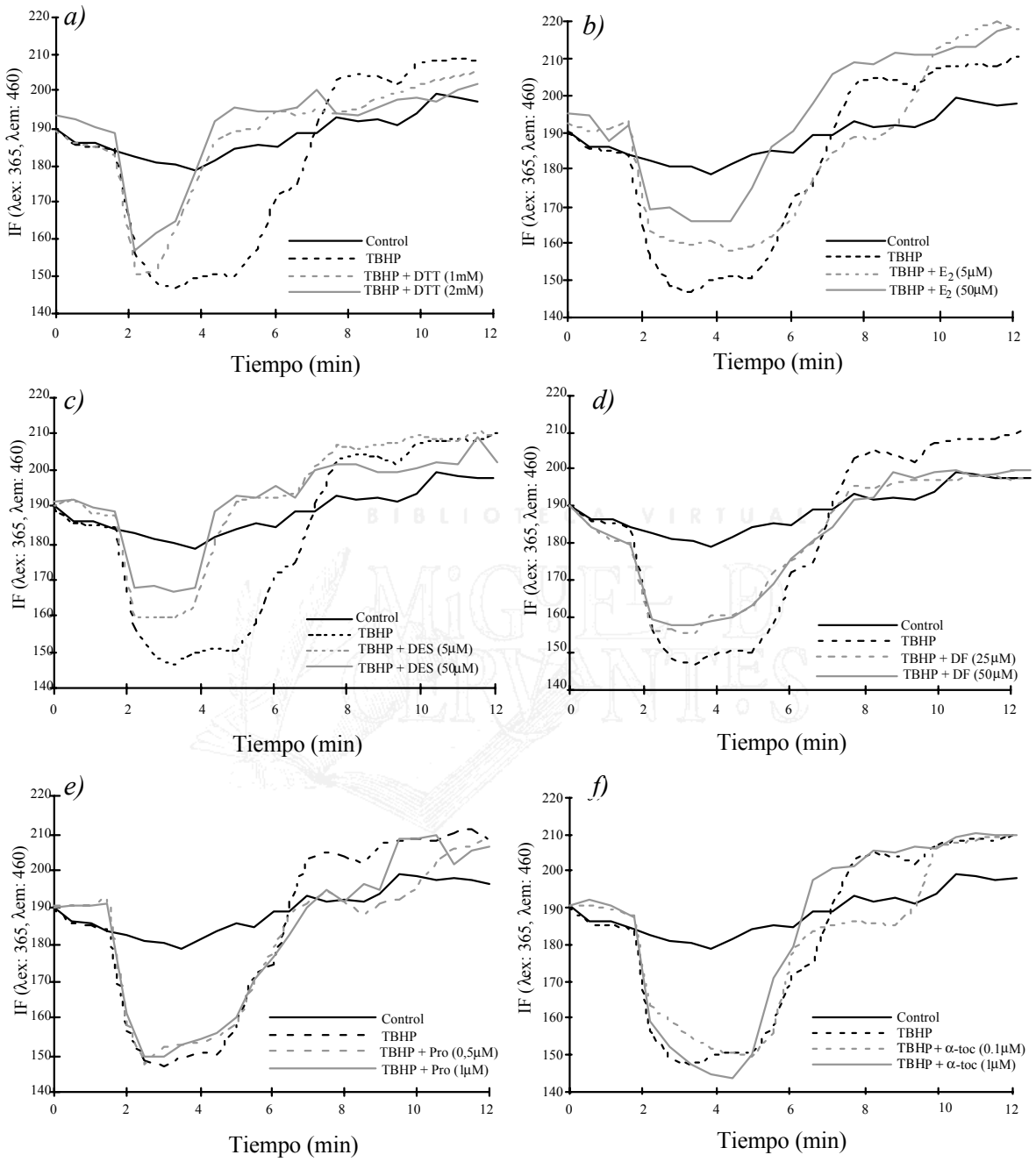


Figura 3: Efecto de distintas moléculas antioxidantes sobre el NAD(P)H intracelular en hepatocitos aislados incubados con TBHP. Las condiciones de incubación se describen en la figura 2. Los valores de NAD(P)H se determinaron cada 30 s fluorimétricamente, según se describe en Materiales y Métodos. Las gráficas muestran los resultados obtenidos en un experimento representativo.

El DF evitó ligeramente el descenso de la concentración inicial de NAD(P)H, siendo el tiempo de recuperación similar al de las células tratadas con el oxidante (Fig. 3d). Tanto la prometacina como el α-tocoferol fueron ineficaces en la prevención del consumo de los nucleótidos de pirimidina inducido por el TBHP (Figs. 3e y 3f).

2. FORMACIÓN INTRACELULAR DE ROS INDUCIDA POR TBHP

La generación de ROS inducida por TBHP se determinó fluorimétricamente mediante la sonda fluorescente sensible a la oxidación DCFH. El método se basa en la formación de DCF fluorescente a partir de la forma reducida, no fluorescente, DCFH mediante especies oxidantes. En estudios previos vimos que el TBHP no induce directamente fluorescencia cuando se añadía a la sonda, indicando estos resultados que el TBHP no es capaz de oxidar directamente a la DCFH. A continuación, en los hepatocitos cargados con DCFH se determinó la generación de ROS inducida por distintas concentraciones de TBHP. Se calculó el incremento de IF a los 10 min de incubación viéndose que la generación de ROS inducida por el TBHP es dosis dependiente (Fig. 4). El aumento de la fluorescencia se correlacionó linealmente (R^2=0,93) con la concentración de TBHP en el rango de 0,1 a 1 mM.

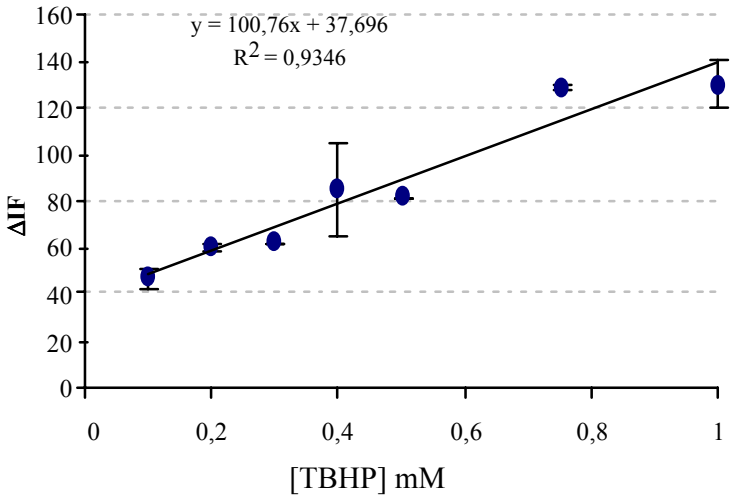


Figura 4: Formación intracelular de ROS inducida por diferentes concentraciones de TBHP en hepatocitos cargados con DCFH a los 10 min de incubación. Las células cargadas con DCFH (20 μM) se incubaron con el TBHP a distintas concentraciones y se calculó la ΔIF a los 10 min de incubación. Cada dato representa la media ± el rango de dos preparaciones de hepatocitos diferentes.

A continuación se estudió el efecto de diversas moléculas sobre la generación de ROS inducida por TBHP (0,5 mM). Para ello las células cargadas con DCFH se incubaron con las distintas moléculas en presencia del TBHP. Los resultados obtenidos se representan en la figura 5. A tiempo cero se añadió el TBHP y las incubaciones celulares se continuaron durante 15 min. Los resultados obtenidos se representan en la figura 5. A partir de los datos se calcularon los valores de eficacia de las moléculas a los 10 min de incubación. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2.

En ausencia de TBHP no se vió aumento de la fluorescencia debida a la DCF. La adición de TBHP a la suspensión celular produjo un incremento de la fluorescencia a los 4,5-5 min de incubación (Fig. 5). La formación de ROS inducida por el oxidante fue inhibida de modo dependiente de la dosis por E_2 y α-tocoferol (Figs. 5a y 5d, tabla 2). DES, DTT y DF, a las concentraciones ensayadas, previnieron la formación de ROS (Figs. 5c, 5e y 5f, tabla 2). Estos datos sugieren que la oxidación de DCFH a DCF depende de iones metálicos. En este sentido, se sabe que la generación de radiales *tert*-butoxilo a partir de TBHP es dependiente de metales de transición. La prometacina, a concentraciones en las que resultó ser un eficaz inhibidor de la peroxidación lipídica, no evitó la oxidación de la DCFH inducida por el TBHP (Fig. 5b). Estos datos sugieren que radicales peroxilo lipídicos no estarían implicados en la oxidación de la sonda DCFH.

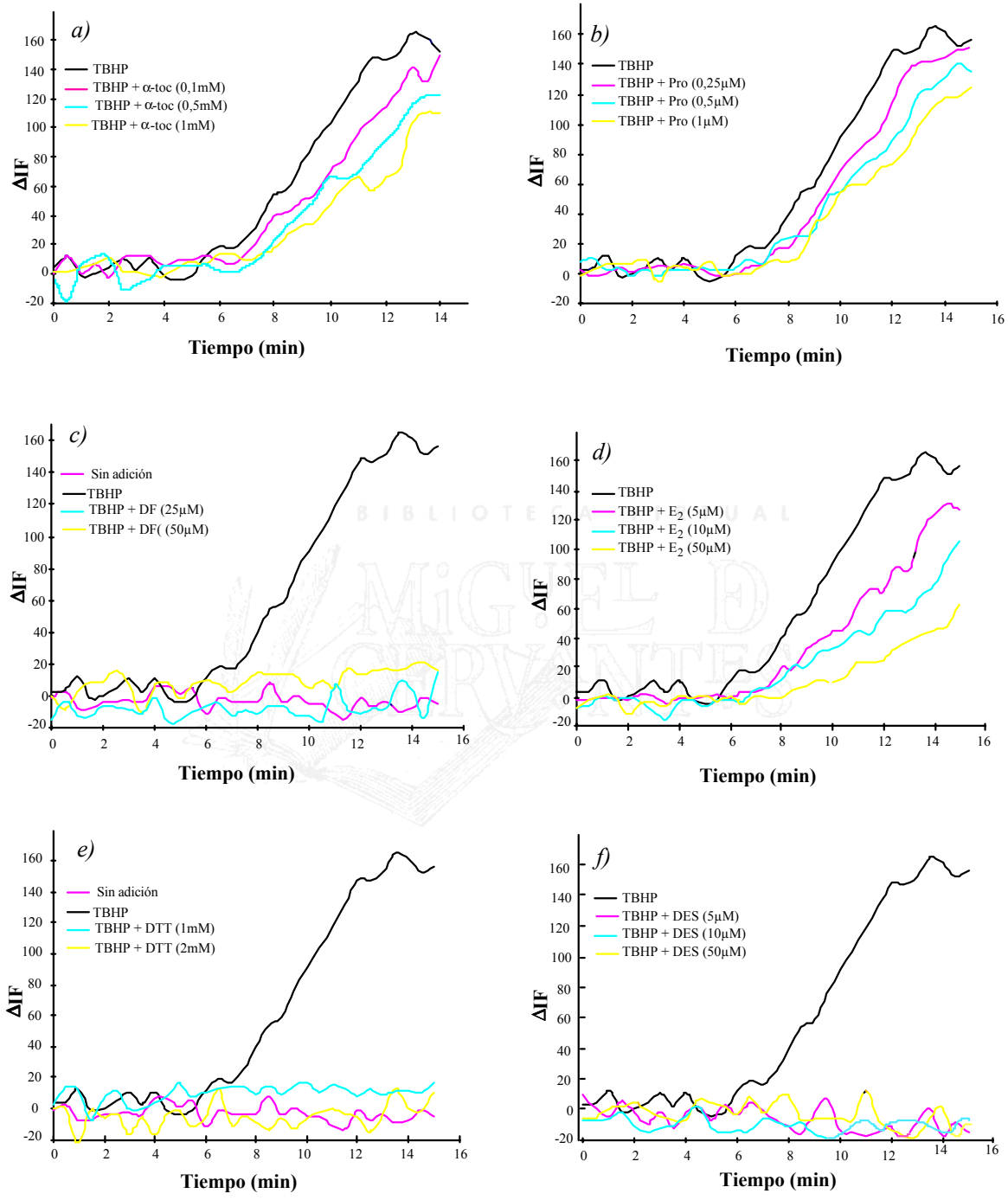


Figura 5: Efecto de distintas moléculas antioxidantes sobre la formación intracelular de ROS inducida por TBHP. Las células cargadas con DCFH-DA (20 μM) se incubaron 15 min con las distintas moléculas. A continuación, se añadió TBHP (tiempo cero) a la suspensión celular y se determinó cada 30 s la intensidad de fluorescencia a una λex: 502nm y λem: 525nm durante 15 min. Las gráficas muestran los resultados obtenidos en un experimento representativo de 3. IF: Intensidad de Fluorescencia

	ROS
	% Formación
TBHP (0,5 mM)	100
+E_2 (5 μM)	54 ± 15
+E_2 (10 μM)	40 ± 13
+E_2 (50 μM)	14 ± 7
+DES (5 μM)	14 ± 3
+DES (10 μM)	9 ± 3
+DES (50 μM)	7 ± 3
+α-toc (0,1 mM)	67 ± 13
+α-toc (0,5 mM)	67 ± 8
+α-toc (1 mM)	44 ± 7
+Prometacina (0,25 μM)	84 ± 11
+Prometacina (0.5 μM)	83 ± 14
+Prometacina (1 μM)	65 ± 10
+DTT (1 mM)	5 ± 1
+DTT (2 mM)	2 ± 4
+Desferal (25 μM)	7 ± 8
+Desferal (50 μM)	9 ± 4

Tabla 2: Formación de ROS inducida por TBHP en presencia de distintas moléculas. Las células cargadas con DCFH (20 μM) se incubaron 15 min con las diferentes moléculas. A continuación, se añadió TBHP (tiempo cero) y se determinó la ΔIF (λex: 502 nm y λem: 525 nm) a los 10 min. El incremento de la IF en las células tratadas con TBHP fue 76 unidades. Los resultados se expresan como el porcentaje de formación de ROS respecto al valor del TBHP (100%) y representan la media ±EE de N= 3-6.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

3. ESTUDIO DEL EFECTO DEL TBHP SOBRE EL ACÚMULO INTRACELULAR DE AA Y DAG DE LOS FOSFOLÍPIDOS DE MEMBRANA

Primeramente se establecieron las condiciones óptimas de cargado de los hepatocitos con AA-[^{14}C]. A continuación se estudió el efecto del TBHP sobre los niveles intracelulares de AA-[^{14}C] y DAG-[^{14}C]. Finalmente se estudió el efecto de antioxidantes sobre la respuesta al TBHP. Los resultados obtenidos se describen en los siguientes apartados.

3. 1. INCORPORACIÓN DE AA-[^{14}C] EN LOS LÍPIDOS CELULARES

La incorporación de AA-[^{14}C] en los lípidos de los hepatocitos se muestra en la figura 6. Desde los primeros minutos de incubación de las células con el AA-[^{14}C] se observa una incorporación significativa de AA. El AA-[^{14}C] asociado a los lípidos totales y a la PC se mantuvo constante durante 2 h de incubación.

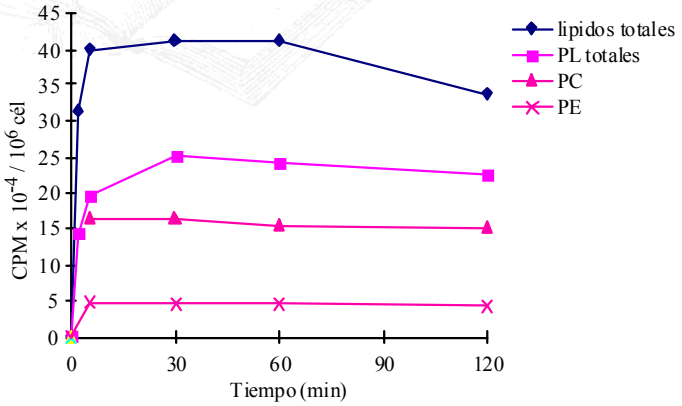


Figura 6: Incorporación de AA-[^{14}C] en hepatocitos a lo largo del tiempo de incubación. Las células se marcaron con AA-[^{14}C] durante un tiempo máximo de 2 h. A cada tiempo se tomaron alícuotas de las suspensiones celulares, se extrajeron los lípidos y se fraccionaron por TLC, según se describe en Materiales y Métodos. PL, fosfolípidos; PC, fosfatidilcolina; PE fosfatidiletanolamina.

Para experimentos posteriores se eligió el tiempo de 1 h para el marcaje celular con AA-[^{14}C]. En estas condiciones un 55,8 ± 2,8 % del AA-[^{14}C] total se incorporó a los lípidos celulares y sólo un 0,1% del ácido graso radioactivo se asoció en la cromatografía con la fracción de ácido graso libre.

3. 2. EFECTO DEL TBHP SOBRE EL ACÚMULO INTRACELULAR DE AA-[^{14}C] Y DAG-[^{14}C] EN HEPATOCITOS

Se estudió el efecto del TBHP sobre el acúmulo intracelular de AA-[^{14}C] y DAG-[^{14}C] a distintos tiempos de incubación. Los datos obtenidos se representan en la figura 7. El oxidante produjo un aumento significativo de los niveles de AA-[^{14}C] y DAG-[^{14}C] a los 7,5 min de incubación.

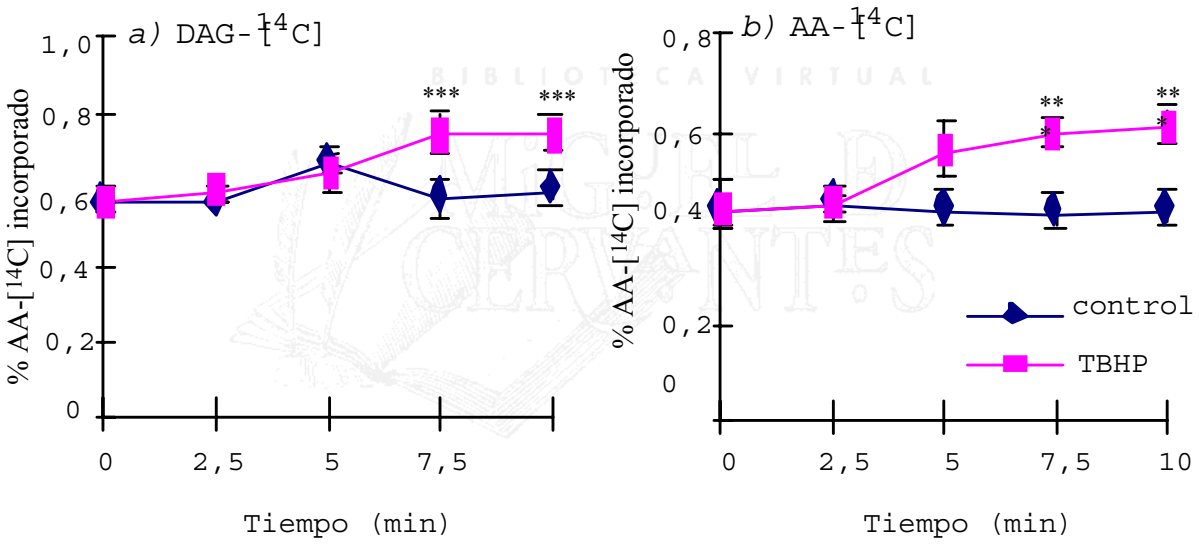


Figura 7: Efecto del TBHP sobre los niveles intracelulares de a) DAG-[^{14}C] y b) AA-[^{14}C]. Las células marcadas con AA-[^{14}C] se incubaron durante un tiempo máximo de 10 min con el TBHP. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de la suspensión celular y se cuantificó el AA-[^{14}C] y DAG-[^{14}C] según se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media ±EE de al menos N=3. ***p<0,01, diferente respecto del control sin adición.

En las mismas condiciones se determinó la liberación de lípidos marcados en ^{14}C al medio de incubación inducida por TBHP. El tratamiento durante 10 min con el oxidante estimuló la liberación de AA-[^{14}C] y fosfolípidos-[^{14}C] un 23 y 25 %, respectivamente (datos no mostrados).

3. 3. EFECTO DE ANTIOXIDANTES SOBRE EL ACÚMULO INTRACELULAR DE AA-[^{14}C]

Para los experimentos posteriores se eligió un tiempo de incubación con el TBHP de 10 min. Se estudió el efecto de las moléculas antioxidantes sobre la elevación de los niveles de AA-[^{14}C] inducida por TBHP. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.

	AA-[^{14}C] intracelular
	% AA-[^{14}C] incorporado
Sin adición	0,44 ± 0,08
TBHP (0,5 mM)	0,61 ± 0,09 **
+ E_2 (5 μM)	0,48 ± 0,04 **,##
+ E_2 (10 μM)	0,46 ± 0,03 ###
+ E_2 (50 μM)	0,39 ± 0,02 ###
+ E_2 (100 μM)	0,41 ± 0,03 ###
+ DES (5 μM)	0,43 ± 0,01 ##
+ DES (10 μM)	0,35 ± 0,04 ##
+ DES (50 μM)	0,32 ± 0,10 ###
+ α-toc (0,1 mM)	0,53 ± 0,07 #
+ α-toc (0,5 mM)	0,39 ± 0,02 ###
+ α-toc (1 mM)	0,44 ± 0,06 ###
+ Prometacina (0,25 μM)	0,60 ± 0,05 **
+ Prometacina (0,50 μM)	0,59 ± 0,06 *
+ Prometacina (1 μM)	0,59 ± 0,03 **
+ DTT (1 mM)	0,43 ± 0,04 ##
+ Desferal (25 μM)	0,49 ± 0,05 ##
+ DEM (0,5 mM)	0,61 ± 0,03 **

Tabla 3: Efecto de distintas moléculas sobre el acúmulo intracelular de AA-[^{14}C] inducido por TBHP. Las células marcadas se incubaron en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Los lípidos celulares totales se extrajeron y los niveles intracelulares de AA-[^{14}C] se determinaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media ±EE de N=3. **p<0,01 y *p<0,025, diferente respecto del control sin adición, ###p<0,01, ##p<0,025 y #<0,05, diferente respecto a TBHP.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

El TBHP incrementó un 39% los niveles intracelulares de AA-[^{14}C]. DES, DTT y DF, a todas las dosis ensayadas, previnieron los efectos del TBHP, siendo los valores de AA-[^{14}C] a los 10 min similares a los de las células no tratadas. El E_2 a concentraciones superiores a 5 μM evitó el acúmulo de AA-[^{14}C]. El α-tocoferol inhibió totalmente el acúmulo de AA-[^{14}C]. La prometacina no modificó los valores de AA-[^{14}C] elevados por el tratamiento con TBHP.

Se estudiaron los niveles de AA-[^{14}C] en células desprovistas de GSH por un tratamiento con DEM (0,5 mM). La adición de esta molécula a la suspensión celular redujo un 65 % los valores iniciales de GSH. DEM no modificó la respuesta del AA-[^{14}C] al TBHP.

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

3. 4. EFECTO DE ANTIOXIDANTES SOBRE EL ACÚMULO INTRACELULAR DE DAG-[^{14}C]

Se estudió el efecto de los antioxidantes sobre la elevación de los niveles de DAG-[^{14}C] mediado por TBHP. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 4. La adición de TBHP a la suspensión celular estimuló el acúmulo intracelular de DAG-[^{14}C] un 25%.

La prometacina y el E_2 no ejercieron efecto alguno sobre el acúmulo intracelular de DAG-[^{14}C] inducido por TBHP. Por el contrario, DES, DTT, DF, y α-tocoferol disminuyeron significativamente los niveles de DAG-[^{14}C].

Como en el apartado anterior, se estudió el efecto del TBHP en células desprovistas de GSH previo tratamiento con DEM. En estas condiciones, el acúmulo intracelular de DAG-[^{14}C] fue similar al de las células tratadas únicamente con TBHP.

	DAG-[^{14}C] *intracelular*
	% AA-[^{14}C] incorporado
Sin adición	0,59 ± 0,02
TBHP (0,5 mM)	0,74 ± 0,02 ***
+ E_2 (5 μM)	0,69 ± 0,06 ***
+ E_2 (10 μM)	0,72 ± 0,04 ***
+ E_2 (50 μM)	0,69 ± 0,01 ***
+ E_2 (100 μM)	0,74 ± 0,02 ***
+ DES (5 μM)	0,66 ± 0,04 n.s.
+ DES (10 μM)	0,61 ± 0,02 ###
+ DES (50 μM)	0,60 ± 0,01 ###
+ α-toc (0,1 mM)	0,66 ± 0,01 ###
+ α-toc (0,5 mM)	0,62 ± 0,01 ###
+ α-toc (1 mM)	0,65 ± 0,01 ###
+ Prometacina (0,25 μM)	0,77 ± 0,09 **
+ Prometacina (0,50 μM)	0,68 ± 0,05 *
+ Prometacina (1 μM)	0,66 ± 0,01 *
+ DTT (1 mM)	0,54 ± 0,06 ###
+ DEM (0,5 mM)	0,61 ± 0,01 ***

Tabla 4: Efecto de distintas moléculas sobre el acúmulo intracelular de DAG-[^{14}C] inducido por TBHP. Las células marcadas se incubaron en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Los lípidos celulares totales se extrajeron y los niveles intracelulares de DAG-[^{14}C] se determinaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media ±EE de N=3. ***p<0,01, **p<0,025 y *p<0,05, diferente respecto del control sin adición, ###p<0,01, ##p<0,025 y #p<0,05, diferente respecto a TBHP.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

4. ESTUDIO DE CORRELACIONES ENTRE LOS NIVELES INTRACELULARES DE AA-[^{14}C] Y DAG-[^{14}C] Y PARÁMETROS CITOTÓXICOS

A partir de los resultados obtenidos en los apartados anteriores se estudiaron las posibles correlaciones entre los niveles de AA-[^{14}C] y DAG-[^{14}C] inducidos por TBHP y la concentración de los distintos parámetros de estrés oxidativo (GSH, grupos -SH proteicos, TBARS y ROS) cuando se incuban las células en presencia de distintos antioxidantes.

4. 1. AA-[^{14}C]

Las gráficas de las correlaciones entre AA-[^{14}C] y los valores de TBARS, GSH, grupos -SH proteicos y ROS se muestran en la figura 8.

El acúmulo de AA-[^{14}C] se correlacionó positivamente con los ROS ($p<0,05$, coeficiente de Kendall: 0,3) e inversamente con la concentración intracelular de GSH ($p<0,01$, coeficiente de Kendall: 0,67).

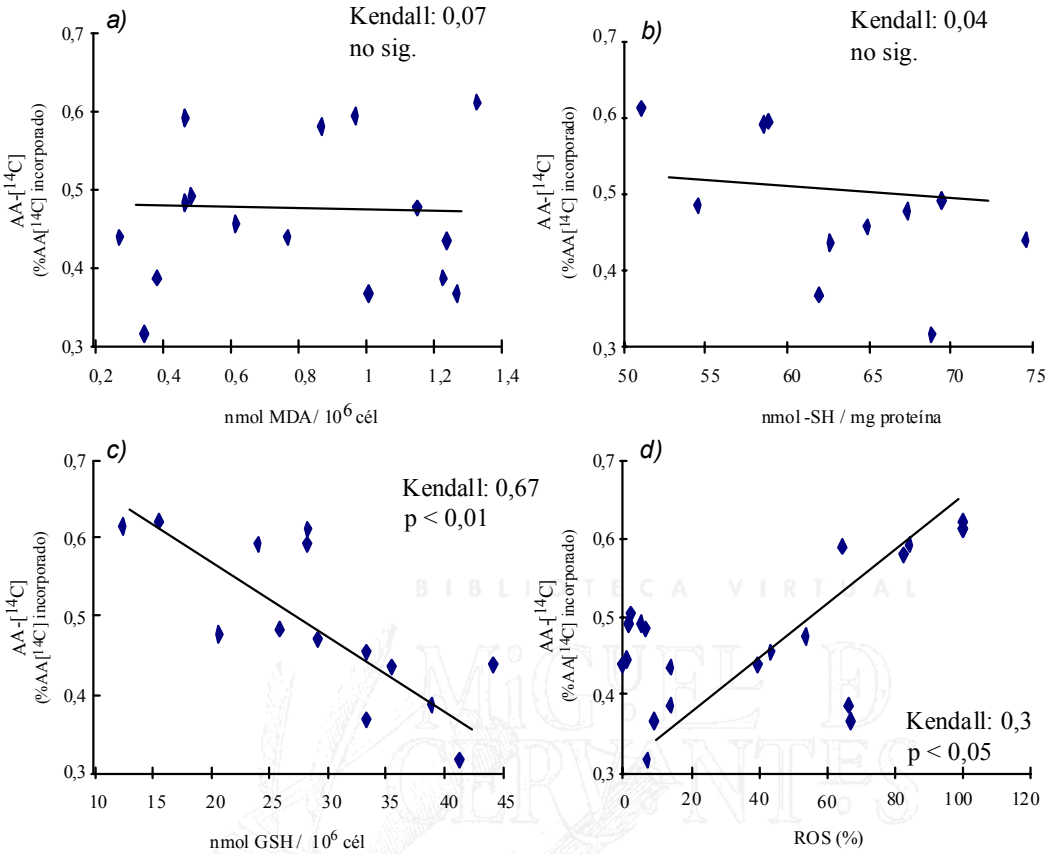


Figura 8: Correlación entre los niveles intracelulares de AA-[^{14}C] y a) peroxidación lipídica, b) grupos -SH proteicos, c) GSH y d) ROS en presencia de TBHP y antioxidantes. Se estudiaron las correlaciones entre los valores de AA-[^{14}C] obtenidos en el apartado 3.3 y los valores de MDA, grupos -SH proteicos, GSH y ROS obtenidos en los apartados 1.2 y 2.

4. 2. DAG-[^{14}C]

Los resultados se representan en la figura 9. La concentración de DAG-[^{14}C] se correlacionó directamente con los niveles intracelulares de ROS ($p<0,01$, coeficiente de Kendall: 0,57).

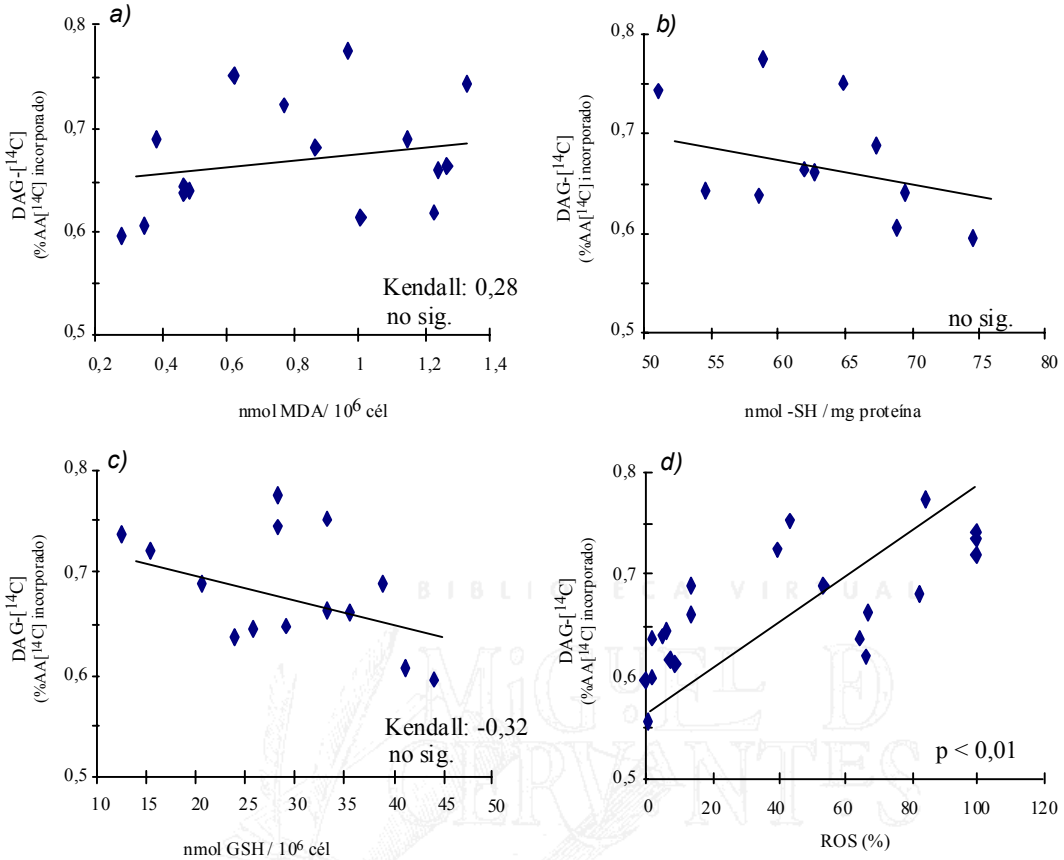


Figura 9: Correlación entre los niveles intracelulares de DAG-[^{14}C] y a) peroxidación lipídica, b) grupos -SH proteicos, c) GSH y d) ROS en presencia de TBHP y antioxidantes. Se estudiaron las correlaciones entre los valores de DAG-[^{14}C] obtenidos en el apartado 3.3 y los valores de MDA, grupos -SH proteicos, GSH y ROS obtenidos en los apartados 1.2 y 2.

5. ESTUDIO DEL MECANISMO DE LIBERACIÓN DE AA Y DAG

En el siguiente apartado experimental se estudió la implicación de diversos enzimas en la liberación de DAG-[^{14}C] y AA-[^{14}C] inducida por TBHP, empleándose inhibidores específicos.

Se estudió el papel de la PLA_2, de la PLC y de la PLD en la acumulación de DAG-[^{14}C] y AA-[^{14}C] estimulada por el TBHP. Asimismo, se estudió la implicación en la señalización de la PKC, PKA y proteína quinasa G (PKG), de la MAPK, de PTKs y del calcio intracelular.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

5. 1. PLA_2

Debido a que la principal movilización de AA se debe a la PLA_2, en este bloque experimental se estudió la implicación de este enzima en la respuesta al TBHP. Para ello, se probaron diferentes inhibidores de esta familia de enzimas. En primer lugar, se determinó el efecto del inhibidor de actividad PLA_2 mepacrina. Se ha descrito que la mepacrina es capaz de inhibir tanto la $cPLA_2$ como la $sPLA_2$ (Cifone y col., 1996; Xue y col., 1999). La mepacrina inhibe la hidrólisis de los fosfolípidos mediante una interferencia no específica de esta molécula con el sustrato. Esto conduce a una perturbación de la interacción lípido-proteína.

Los resultados obtenidos se representan en la figura 10. La mepacrina, a las concentraciones ensayadas, evitó completamente el acúmulo intracelular de AA-[^{14}C] y no ejerció efecto alguno sobre la elevación de DAG-[^{14}C] inducida por el TBHP.

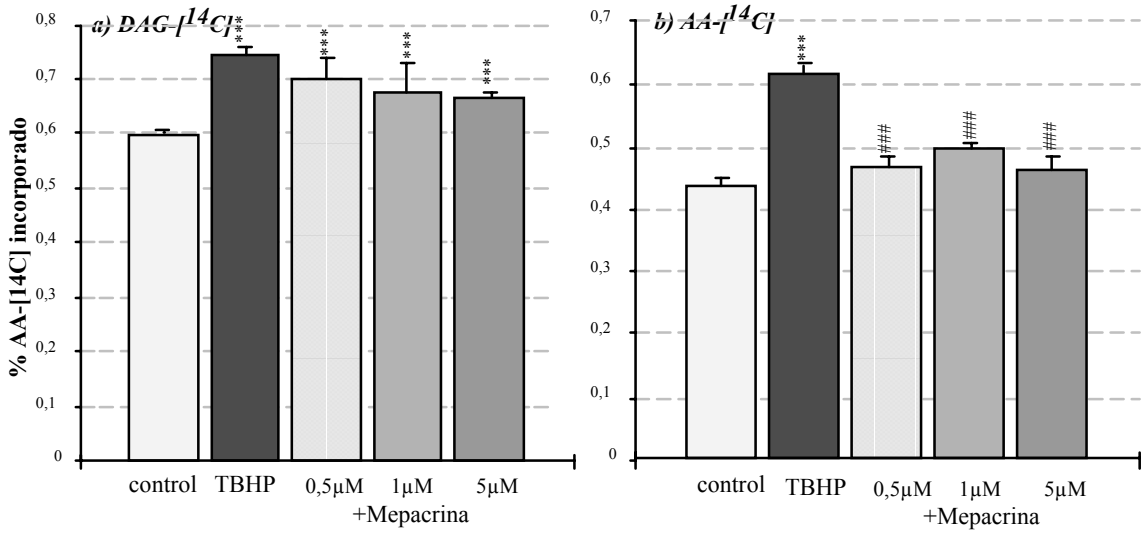


Figura 10. Efecto de la mepacrina sobre el acúmulo intracelular de a) DAG-[^{14}C] y b) AA-[^{14}C] estimulado por TBHP. Las células marcadas ($2x10^6$ cél/ml) se incubaron durante 10 min con TBHP (0,5 mM) en presencia del inhibidor a las concentraciones indicadas en la figura. Los valores de AA-[^{14}C] y DAG-[^{14}C] se determinaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como el porcentaje de AA-[^{14}C] incorporado a las células y son la media ±EE de N=3. Significación respecto a control: ***p< 0,01. Significación respecto a TBPH: $^{###}$p< 0,01.

A continuación, se estudió el efecto de inhibidores específicos de la $cPLA_2$ y de la PLA_2 independiente de calcio ($iPLA_2$), para determinar si estas isoformas de PLA_2 estaban implicadas en el acúmulo de AA-[^{14}C] inducido por TBHP. Como inhibidor específico de la $cPLA_2$ se utilizó un análogo del AA denominado $AACOCF_3$. En esta molécula, el grupo -COOH del AA ha sido reemplazado por un grupo $-COCF_3$ y el inhibidor se une selectivamente al centro activo del enzima. Como inhibidor específico de la $iPLA_2$ se empleó $PACOCF_3$.

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 11 y 12.

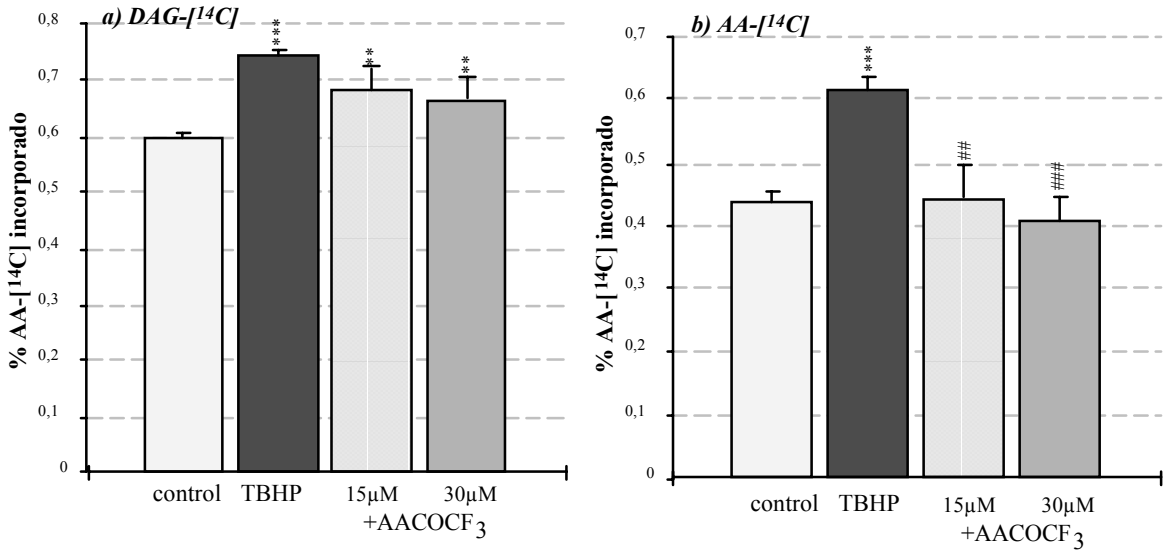


Figura 11. Efecto del AACOCF$_3$ sobre el acúmulo intracelular de a) DAG-[^{14}C] y b) AA-[^{14}C] estimulado por TBHP. Las células marcadas (2x10^6 cél/ml) se incubaron durante 10 min con TBHP (0,5 mM) en presencia del inhibidor a las concentraciones indicadas en la figura. Los valores de AA-[^{14}C] y DAG-[^{14}C] se determinaron como se describe en Materiales y métodos. Los resultados se expresan como el porcentaje de AA-[^{14}C] incorporado a las células y son la media ±EE de N=3. Significación respecto a control: **p<0,025, ***p< 0,01. Significación respecto a TBPH: $^{\#\#}$p< 0,025, $^{\#\#\#}$p< 0,01.

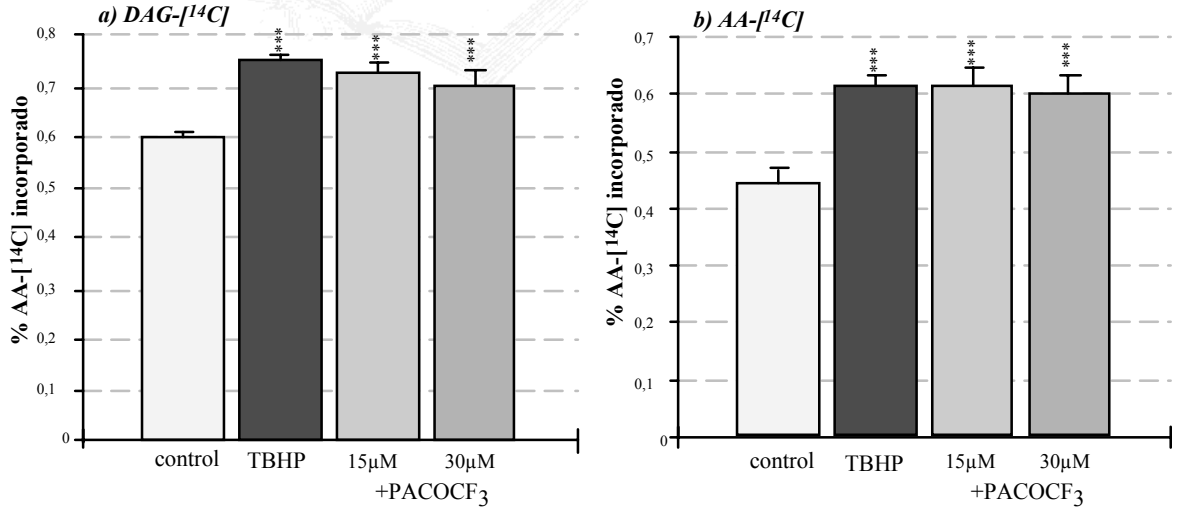


Figura 12. Efecto del PACOCF$_3$ sobre el acúmulo intracelular de a) DAG-[^{14}C] y b) AA-[^{14}C] estimulado por TBHP. Las células marcadas (2x10^6 cél/ml) se incubaron durante 10 min con TBHP (0,5 mM) en presencia del inhibidor a las concentraciones indicadas en la figura. Los valores de AA-[^{14}C] y DAG-[^{14}C] se determinaron como se describe en Materiales y métodos. Los resultados se expresan como el porcentaje de AA-[^{14}C] incorporado a las células y son la media ±EE de N=3. Significación respecto a control: ***p< 0,01.

El $AACOCF_3$ mantuvo los niveles intracelulares de AA-[^{14}C] similares a los de células no tratadas con TBHP, sin afectar a la elevación de los niveles intracelulares de DAG-[^{14}C] inducida por el hidroperóxido. El $PACOCF_3$ no modificó la respuesta al TBHP.

A partir de los resultados obtenidos en el apartado anterior podría deducirse que la liberación de AA-[^{14}C] estimulada por TBHP es consecuencia de la actividad $cPLA_2$, aunque dichos resultados no excluirían totalmente la actuación de una $sPLA_2$. Debido a la falta de inhibidores específicos para esta isoforma y a que se desconoce si se expresa en hepatocitos en condiciones basales, se emplearon técnicas inmunoquímicas para estudiar su posible implicación en las acciones inducidas por el oxidante. Se analizaron extractos proteicos obtenidos a partir de homogenado de hígado, hepatocitos y células no parenquimales. Como controles positivos se utilizaron extractos de plaquetas y de homogenado de bazo. Asimismo, la expresión de la $sPLA_2$ se analizó en hepatocitos tratados con TBHP. Como se puede comprobar en la figura 13, en el hígado se encontró expresión de $sPLA_2$. Al analizar por separado las células parenquimales y las no parenquimales, se comprobó que la expresión de la $sPLA_2$ únicamente está asociada a las células no parenquimales. No se detectó $sPLA_2$ en hepatocitos.

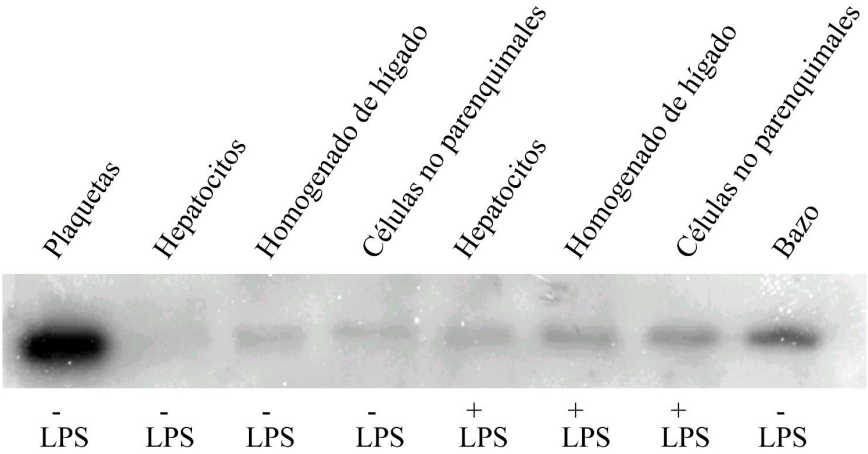


Figura 13. Detección por inmunotransferencia de $sPLA_2$. Los diferentes tipos celulares se obtuvieron de ratas no tratadas y tratadas con lipopolisacárido (LPS) durante 2 h como se describe en Materiales y Métodos. A continuación se detectó la expresión de la $sPLA_2$ como se decribe en Materiales y Métodos. La figura corresponde a un experimento representativo.

Se ha descrito que un tratamiento *in vivo* con lipopolisacárido (LPS) induce una estimulación de la síntesis de $sPLA_2$ en el hígado (Inada y col., 1991a). Analizamos la expresión de $sPLA_2$ en extractos proteicos procedentes de homogenado de hígado, hepatocitos y células no parenquimales de ratas tratadas con LPS durante 2 h. En estas condiciones se detectó expresión de $sPLA_2$ en los hepatocitos. Asimismo, aumentó de forma significativa la expresión de la $sPLA_2$ en las demás fracciones (Fig. 13). La exposición de las células al TBHP durante 10 min no incrementó adicionalmente la expresión de la $sPLA_2$ (Fig. 14).

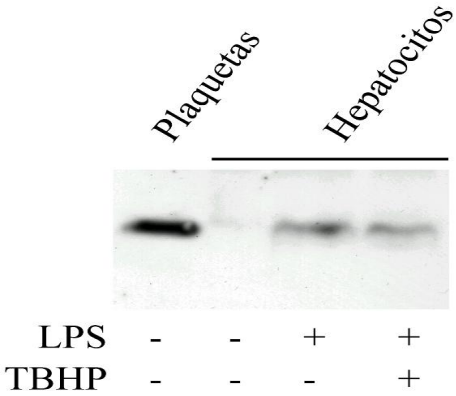


Figura 14. Detección por inmunotransferencia de $sPLA_2$ de hepatocitos de rata tratada con LPS en ausencia y presencia de TBHP. Las células ($2x10^6$ cél/ml) se incubaron con TBHP durante 10 min. A continuación se obtuvieron los extractos proteicos y se detectó la $sPLA_2$ según se describe en Materiales y Métodos. La figura corresponde a un experimento representativo.

5. 2. PLC

En este apartado se muestran los resultados del estudio de la implicación de la PLC en el acúmulo de DAG-[^{14}C] y AA-[^{14}C] inducido por TBHP. La actividad PLC genera DAG, ya que el enzima hidroliza el enlace entre el glicerol y el fosfato. A partir del DAG generado se puede liberar AA mediante DAG lipasas. Para determinar el papel de la PLC en el acúmulo de DAG y AA se utilizó neomicina y el compuesto D609, inhibidores específicos de la PI-PLC y de la PC-PLC, respectivamente.

El tratamiento de los hepatocitos con neomicina redujo hasta valores del control los niveles intracelulares de DAG-[^{14}C] y AA-[^{14}C] (Fig. 14). Por el contrario, el D609 no modificó la respuesta al TBHP (Fig. 15).

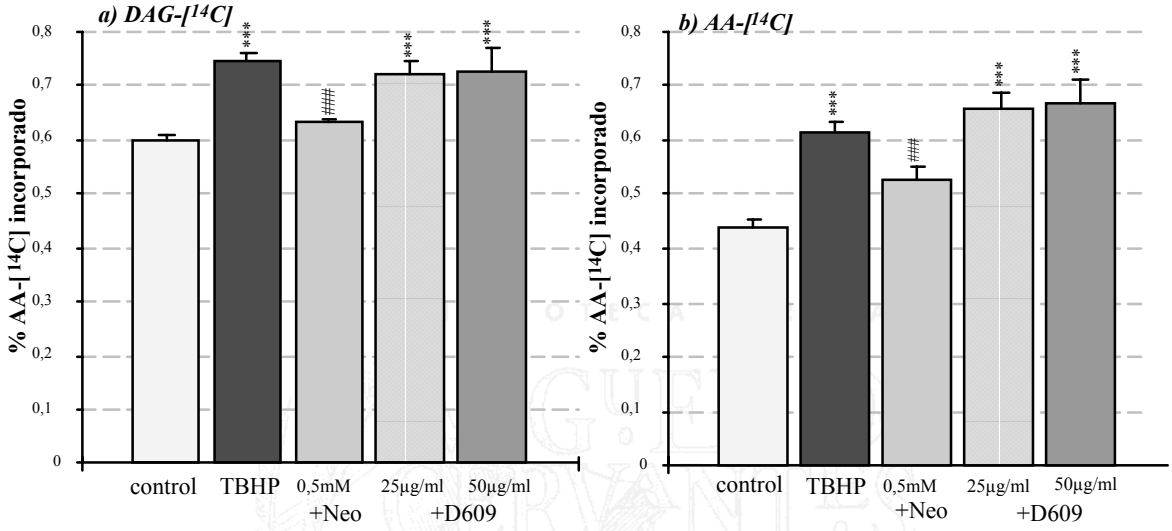


Figura 15. Efecto de la neomicina y del D609 sobre el acúmulo intracelular de a) DAG-[^{14}C] y b) AA-[^{14}C] estimulado por TBHP. Las células marcadas (2x10^{6} cél/ml) se incubaron durante 10 min con TBHP (0,5 mM) en presencia del inhibidor a las concentraciones indicadas en la figura. Los valores de AA-[^{14}C] y DAG-[^{14}C] se determinaron como se describe en Materiales y métodos. Los resultados se expresan como el porcentaje de AA-[^{14}C] incorporado a las células y son la media ±EE de N=3. Significación respecto a control: ***p< 0,01. Significación respecto a TBPH: $^{###}$p< 0,01. Neo: neomicina.

Estos resultados sugieren que la PI-PLC está implicada en el acúmulo tanto de DAG-[^{14}C] como de AA-[^{14}C] estimulada por el TBHP.

5. 3. PLD

Otra vía importante que produce acúmulo intracelular de DAG es la mediada por la PLD. El PA producido por la PLD puede ser metabolizado a DAG en una reacción mediada por la PAP. A su vez, una acción posterior de DAG lipasas conduciría a la liberación de AA. El estudio de la implicación de la PLD en el aumento de los niveles intracelulares de DAG-[^{14}C] y AA-[^{14}C] inducidos por TBHP se abordó indirectamente mediante el empleo de propranolol, inhibidor de la PAP.

En caso de que la exposición a TBHP tuviera como resultado la activación de la PLD, la presencia de propranolol resultaría en una inhibición de la PAP y, por lo tanto, en un descenso de los niveles de DAG-[^{14}C] y también de AA-[^{14}C].

El propranolol no modificó la respuesta al TBHP (Fig. 16).

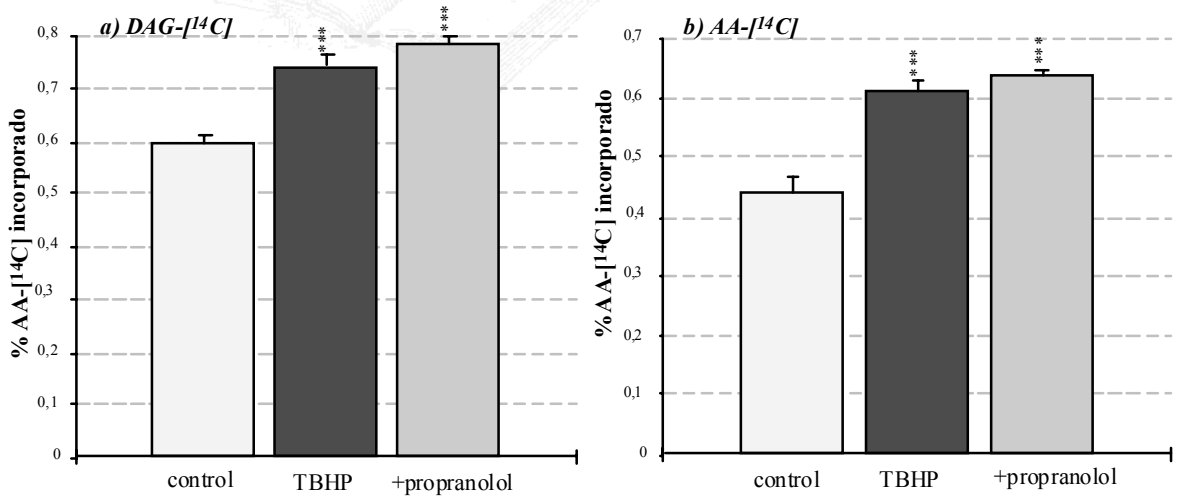


Figura 16. Efecto del propranolol (300 µM) sobre el acúmulo intracelular de a) DAG-[^{14}C] y b) AA-[^{14}C] estimulado por TBHP. Las células marcadas (2x10^{6} cél/ml) se incubaron durante 10 min con TBHP (0,5 mM) en presencia del inhibidor. Los valores de AA-[^{14}C] y DAG-[^{14}C] se determinaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como el porcentaje de AA-[^{14}C] incorporado a las células y son la media ±EE de N=3. Significación respecto a control: ***p< 0,01.

Se estudió la actividad PLD valiéndonos de la propiedad de transfosfatidilación del enzima en presencia de alcoholes. Como se ha descrito en Introducción, el enzima activado en presencia de alcoholes primarios genera fosfatidiletanol, catalizando la unión del alcohol al grupo fosfato del fosfolípido. Estudiamos el efecto del TBHP sobre los niveles de DAG-[^{14}C] y AA-[^{14}C] en presencia de 1-butanol. Como control negativo se empleó el 2-butanol, ya que no es utilizado por la PLD para producir fosfatidilalcohol. En estas condiciones, si el TBHP activara la PLD no se observaría acúmulo de DAG-[^{14}C] ni de AA-[^{14}C], ya que el PA se metabolizaría a fosfatidilbutanol.

El 1-butanol no previno el acúmulo de DAG-[^{14}C] y AA-[^{14}C] inducido por el TBHP (Fig. 17).

BIBLIOTECA VIRTUAL

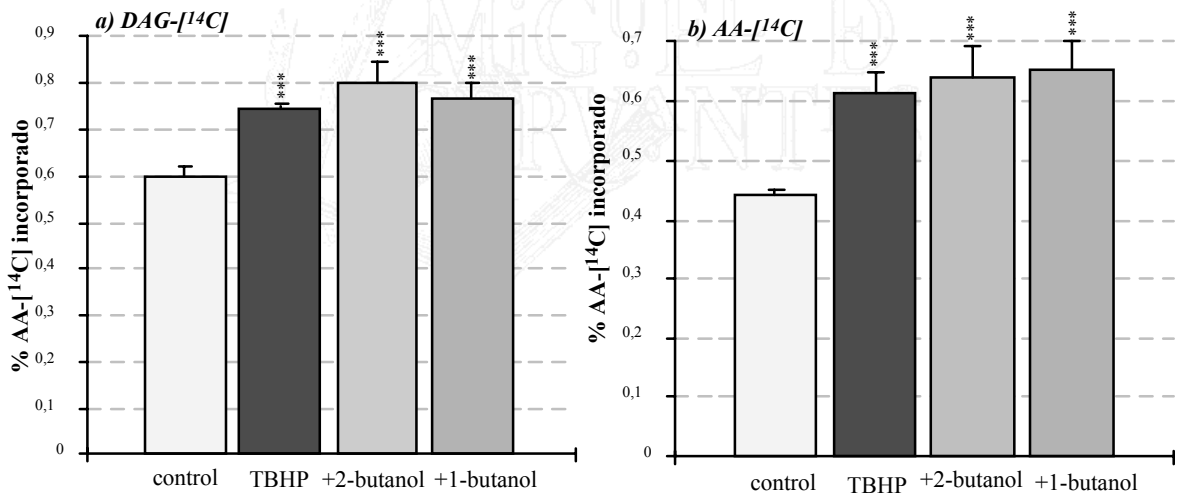


Figura 17. Efecto del 1 y 2-butanol sobre el acúmulo intracelular de a) DAG-[^{14}C] y b) AA-[^{14}C] estimulado por TBHP. Las células marcadas (2x10^{6} cél/ml) se incubaron durante 10 min con TBHP (0,5 mM) en presencia de 1 ó 2-butanol al 0,3% v/v. Los valores de AA-[^{14}C] y DAG-[^{14}C] se determinaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como el porcentaje de AA-[^{14}C] incorporado a las células y son la media ±EE de N=3. Significación respecto a control: ***p< 0,01.

Por último se determinaron los niveles de fosfatidiletanol en hepatocitos marcados con AA-[^{14}C] e incubados con etanol. Como control positivo de producción de fosfatidiletanol se utilizaron hepatocitos tratados con forbol miristato acetato (PMA), ya

que este análogo estructural del DAG estimula la PLD vía PKC (Mukherjee y col., 1996). Como se puede ver en la figura 18, el tratamiento de los hepatocitos con PMA (100 nM) en presencia de etanol provocó un acúmulo intracelular significativo de fosfatidiletanol. Sin embargo, el TBHP no modificó los niveles intracelulares de fosfatidiletanol (Fig. 17).

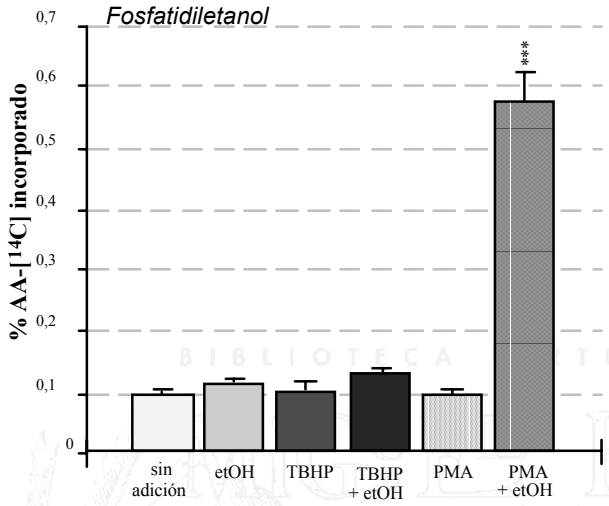


Figura 18. Efecto del TBHP y PMA sobre el acúmulo intracelular de fosfatidiletanol. Las células marcadas ($2x10^6$ cél/ml) se incubaron durante 10 min con TBHP (0,5 mM) o PMA (100 nM) en ausencia o presencia de etanol al 0,3% v/v (+etOH). El acúmulo intracelular de fosfatidiletanol se determinó como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como el porcentaje de AA-[^{14}C] incorporado a las células. Cada valor representa la media ±EE de N=3. Significación respecto a control: ***p< 0,01.

El conjunto de estos resultados parece indicar que la actividad PLD no se halla implicada en la respuesta del DAG-[^{14}C] y AA-[^{14}C] al TBHP.

5. 4. PROTEÍNA QUINASAS

Las proteína quinasas dependientes de nucleótidos trifosfato tienen un importante papel en los procesos de transducción de señales celulares, por ello se utilizaron inhibidores de PKA, PKC y PKG para estudiar su implicación en los efectos mediados por TBHP. Como inhibidor de actividad PKA y PKG se utilizó el HA1004. El H7 y la esfingosina se utilizaron como inhibidores específicos de la PKC.

Tanto la esfingosina (Sph) como el H7 disminuyeron significativamente los niveles de AA-[^{14}C]. Los efectos sobre los niveles intracelulares de DAG-[^{14}C] fueron diferentes, ya que la esfingosina no afectó al incremento de DAG-[^{14}C] inducido por el TBHP, mientras que el H7 evitó el aumento de los niveles de DAG-[^{14}C] (Fig. 19).

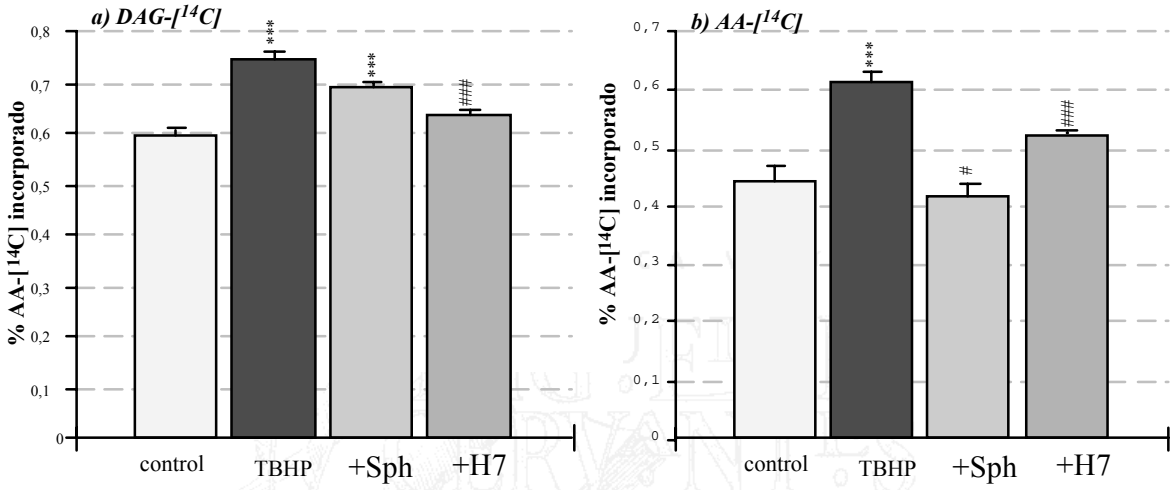


Figura 19. Efecto de la Sph (20 µM) y del H7 (100 µM) sobre el acúmulo intracelular de a) DAG-[^{14}C] y b) AA-[^{14}C] estimulado por TBHP. Las células marcadas (2x10^{6} cél/ml) se incubaron durante 10 min con TBHP (0,5 mM) en presencia del inhibidor a la concentración indicada en la figura. Los valores de AA-[^{14}C] y DAG-[^{14}C] se determinaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como el porcentaje de AA-[^{14}C] incorporado a las células y son la media ±EE de N=3. Significación respecto al control: ***p< 0,01. Significación respecto a TBPH: $^{\#}$p< 0,05, $^{\#\#\#}$p< 0,01.

El HA1004, inhibidor de las PKA y PKG no ejerció efecto alguno respecto a las células tratadas con TBHP (Fig. 20).

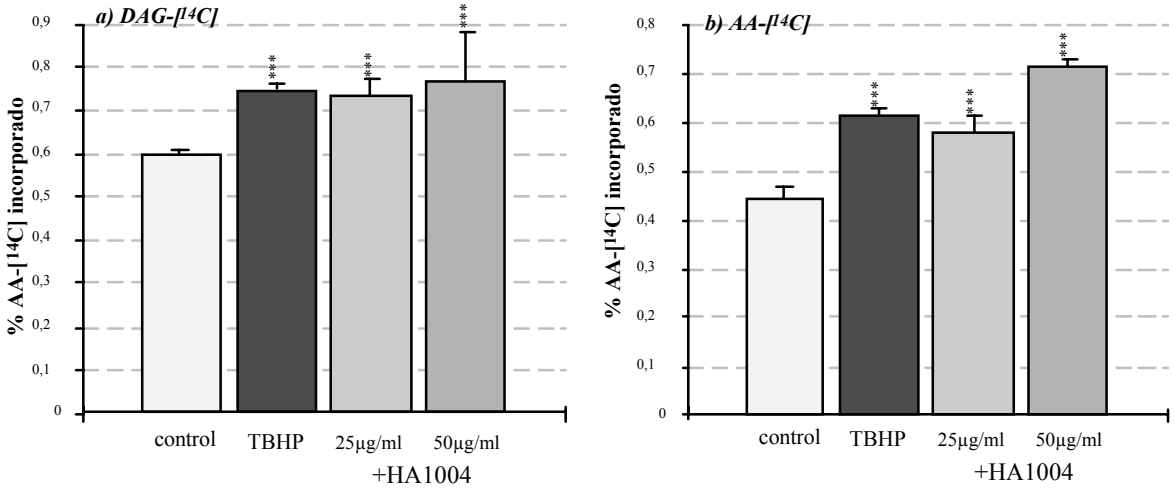


Figura 20. Efecto del HA1004 sobre el acúmulo intracelular de a) DAG-[^{14}C] y b) AA-[^{14}C] estimulado por TBHP. Las células marcadas ($2x10^6$ cél/ml) se incubaron durante 10 min con TBHP (0,5 mM) en presencia del inhibidor a las concentraciones indicadas en la figura. Los valores de AA-[^{14}C] y DAG-[^{14}C] se determinaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como el porcentaje de AA-[^{14}C] incorporado a las células y son la media ±EE de N=3. Significación respecto al control: ***p< 0,01.

5. 5. MAPK

Debido a que la MAPK activa a la $cPLA_2$ y a que según lo descrito en el apartado 1 este enzima queda claramente implicado en el acúmulo de AA-[^{14}C] inducido por TBHP, se estudió el papel de la MAPK sobre los efectos inducidos por el TBHP. Para ello, se empleó el compuesto PD98058, inhibidor específico de la proteína quinasa de MAPK (MAPKK), enzima que fosforila y activa selectivamente a la MAPK.

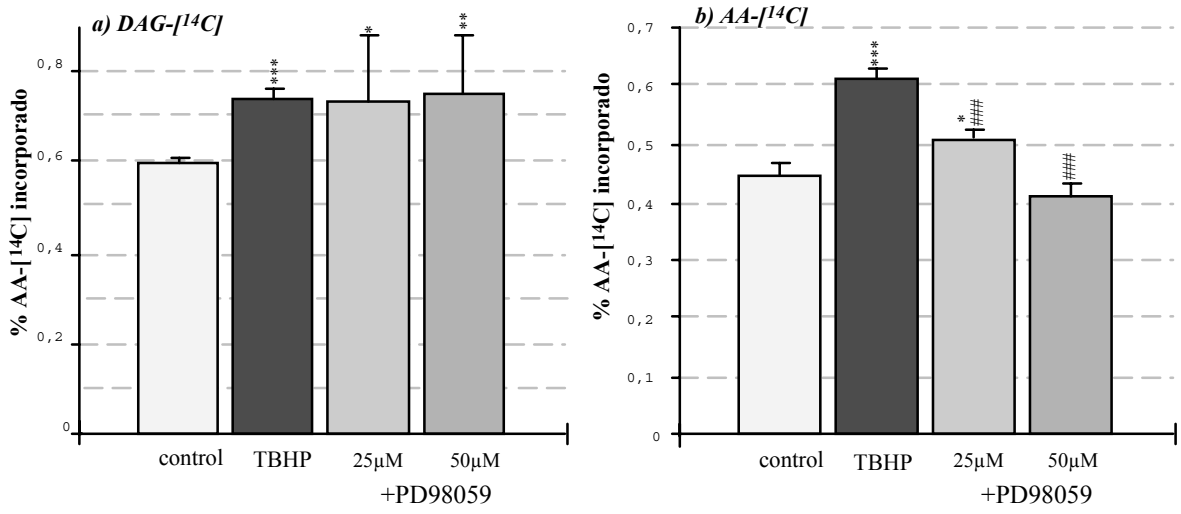


Figura 21. Efecto del PD98059 sobre el acúmulo intracelular de a) DAG-[^{14}C] y b) AA-[^{14}C] estimulado por TBHP. Las células marcadas ($2x10^6$ cél/ml) se incubaron durante 10 min con TBHP (0,5 mM) en presencia del inhibidor a las concentraciones indicadas en la figura. Los valores de AA-[^{14}C] y DAG-[^{14}C] se determinaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como el porcentaje de AA-[^{14}C] incorporado a las células y son la media ±EE de N=3. Significación respecto al control: *p<0,05, **p<0,025, ***p< 0,01. Significación respecto a TBPH: $^{###}$p< 0,01.

La adición de PD98059 a la suspensión celular redujo significativamente el acúmulo intracelular de AA-[^{14}C], sin alterar el aumento de los niveles de DAG-[^{14}C] estimulado por el oxidante (Fig. 21).

5. 6. Ca^{2+} INTRACELULAR

Las fosfolipasas requieren Ca^{2+} para su actividad. En este apartado se estudió el efecto del Ca^{2+} intracelular en la acción del TBHP. Para ello, se utilizó un quelante intracelular de Ca^{2+}, el 8-TMB.

El 8-TMB previno el acúmulo de DAG-[^{14}C] y AA-[^{14}C] inducido por el TBHP (Fig. 22).

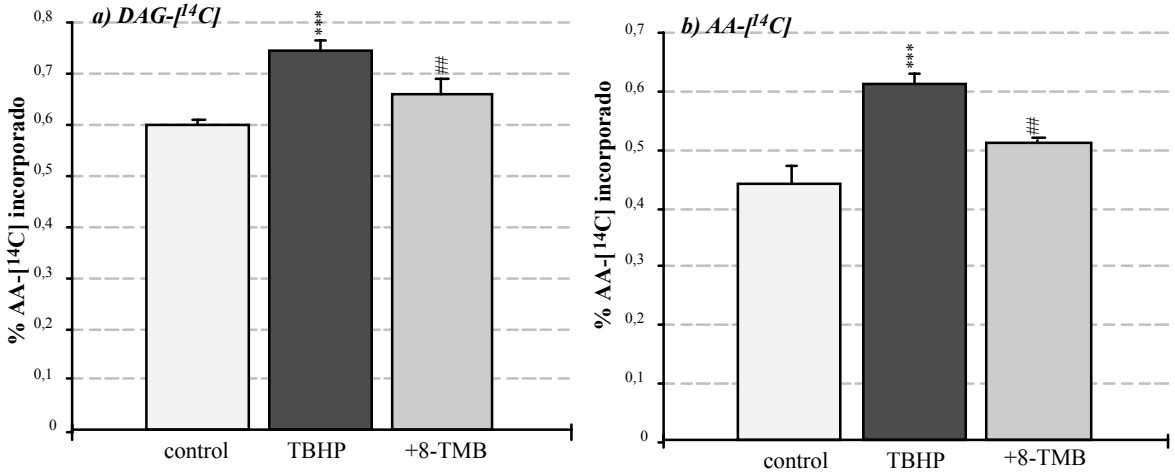


Figura 22. Efecto del 8-TMB (20 µM) sobre el acúmulo intracelular de a) DAG-[^{14}C] y b) AA-[^{14}C] estimulado por TBHP. Las células marcadas ($2x10^6$ cél/ml) se incubaron durante 10 min con TBHP (0,5 mM) en presencia del quelante de Ca^{2+}. Los valores de AA-[^{14}C] y DAG-[^{14}C] se determinaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como el porcentaje de AA-[^{14}C] incorporado a las células y son la media ±EE de N=3. Significación respecto al control: ***p< 0,01. Significación respecto a TBPH: $^{\#\#}$p< 0,025.

5. 7. TIROSINA QUINASAS

En este apartado se estudió el papel de las PTKs en los efectos inducidos por TBHP. Enzimas como la PLC, PLD o MAPK, posiblemente implicados en la liberación de DAG y AA, requieren fosforilación en residuos de tirosina para ser catalíticamente activas. Para determinar el papel de las PTKs en este proceso se utilizó la genisteína, un inhibidor de actividad tirosina quinasa. Los resultados obtenidos se representan en la figura 23.

La genisteína a las concentraciones ensayadas previno el acúmulo intracelular de AA-[^{14}C], mientras que sólamente la concentración mayor fue capaz de mantener los valores de DAG-[^{14}C] similares al de las células no tratadas.

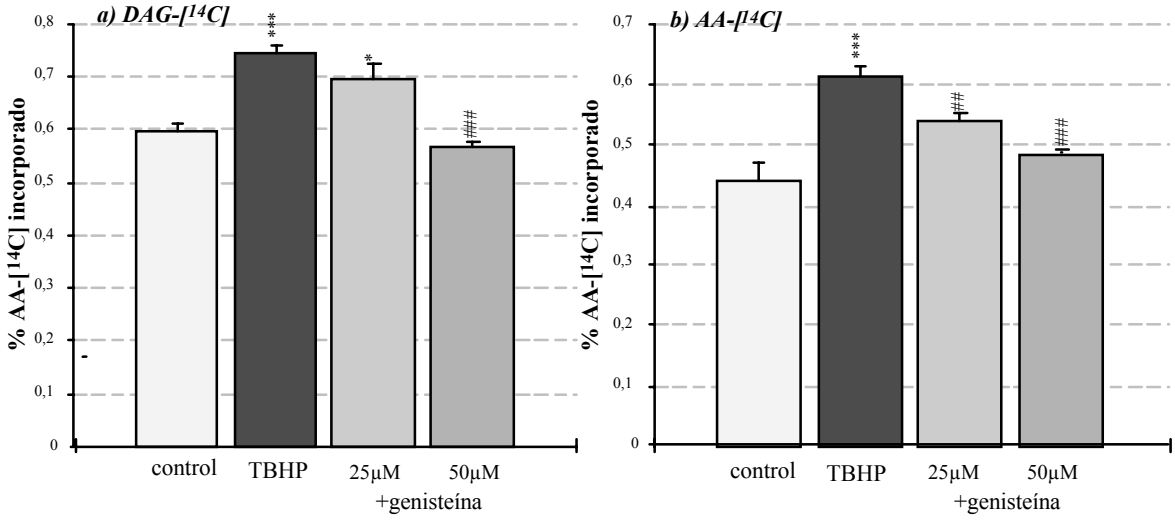
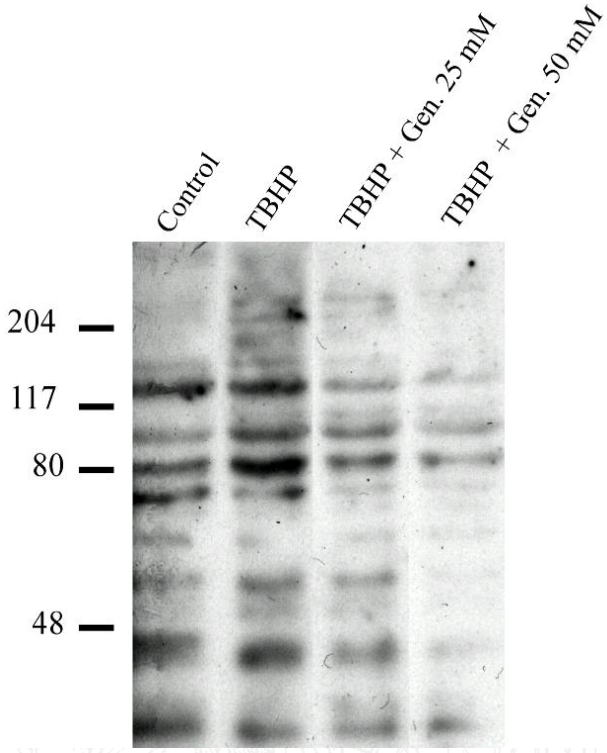


Figura 23. Efecto de la genisteína sobre el acúmulo intracelular de a) DAG-[^{14}C] y b) AA-[^{14}C] estimulado por TBHP. Las células marcadas (2x10^{6} cél/ml) se incubaron durante 10 min con TBHP (0,5 mM) en presencia del inhibidor a las concentraciones indicadas en la figura. Los valores de AA-[^{14}C] y DAG-[^{14}C] se determinaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como el porcentaje de AA-[^{14}C] incorporado a las células y son la media ±EE de N=3. Significación respecto al control: *p<0,05, ***p< 0,01. Significación respecto a TBPH: $^{\#\#}$p< 0,025, $^{\#\#\#}$p< 0,01.

A continuación, mediante la técnica de transferencia *Western* se analizó el estado de fosforilación proteica en residuos de tirosina en células tratadas y sin tratar con el oxidante. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 24. El grado de fosforilación en residuos tirosina se vió incrementado en respuesta al tratamiento con TBHP (58 % respecto a las células no tratadas). El tratamiento con genisteína previno los efectos del TBHP, siendo los niveles de fosfotirosinas en presencia de genisteína 50 µM un 53% menor que los niveles detectados en células no tratadas con TBHP.



F**igura 24. Detección por inmunotransferencia del estado de fosforilación proteica en residuos tirosina.** Las células ($2x10^6$ cél/ml) se incubaron durante 10 min con TBHP (0,5 mM) en presencia del inhibidor a las concentraciones indicadas en la figura. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. La figura corresponde a un experimento representativo.

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El estrés oxidativo se asocia a menudo con una liberación de AA y con la posterior producción de eicosanoides en gran variedad de células (Goligorski y col., 1993; Martínez y Moreno, 1996; Sapirstein y col., 1996; Gunasekar y col., 1998). El presente estudio fue realizado para estudiar los eventos iniciales mediados por el oxidante, que pudieran conducir a la liberación de AA en los hepatocitos bajo condiciones de estrés oxidativo. El TBHP es un compuesto utilizado como modelo para inducir estrés oxidativo en diversos sistemas celulares. En este estudio se empleó como prooxidante a una concentración de 0,5 mM. A dicha concentración, comprobamos que el hidroperóxido no causaba una pérdida de viabilidad celular ni descenso de ATP durante el tiempo de 10 min. Se eligió este tiempo para estudiar respuestas al estrés oxidativo en hepatocitos independientes de cualquier alteración debida a la muerte celular.

El TBHP indujo una clara peroxidación lipídica y disminuyó el contenido de GSH y grupos tioles proteicos intracelulares. En el hepatocito, el TBHP se metaboliza por distintas vías. El TBHP puede reaccionar con el GSH mediante la GSH peroxidasa, generando GSSG (Sies y Summer, 1975; Rush y col., 1985). El GSSG es nuevamente reducido a GSH a expensas de NADPH por la GSSG reductasa. El consumo de GSH y la oxidación de NADPH se asocian con una alteración de la homeostasis del Ca^{2+}, conduciendo a una pérdida de viabilidad (Bellomo y col., 1982; Rush y col., 1986). En nuestras condiciones experimentales, observamos que el TBHP produce en hepatocitos un rápido descenso en los niveles intracelulares de NAD(P)H, que podrían ser reflejo del consumo y posterior regeneración mediada por la GSSG reductasa del GSH. Se ha descrito que el estrés oxidativo estimula la actividad del ciclo de las pentosas fosfato, regenerando así los niveles de NADPH normales (Halliwell y Gutteridge, 1989). La actividad del enzima clave del ciclo, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, está fuertemente regulada, siendo el $NADP^+$ el factor regulador más importante. Este hecho podría explicar el restablecimiento de los niveles basales de NAD(P)H después de 5 min de incubación con el oxidante (Fig. 1f).

Se ha descrito que los niveles de GSH celulares son importantes en el mantenimiento de la actividad de la vía de las pentosas fosfato (Przybytkowski y Averill-Bates, 1996), en la regulación de enzimas reparadores del ADN (Alaoui-Jamalli y col., 1994), catalasa (Sun y Oberley, 1989) y la glutatión S-transferasa (Aniya y Anders, 1989), que son importantes sistemas de defensa celulares. Además de la función destoxificante del GSH, recientemente se ha puesto de manifiesto el potencial de este tiol para modular procesos de transducción de señales (Sen y Packer, 1996; Sen y col., 1997). Estudios en linfocitos han demostrado que el vaciado del GSH intracelular potencia respuestas de señalización generadas por citoquinas (Staal y col., 1994). Se ha sugerido que la relación GSH/GSSG tiene un importante papel regulador en la actividad de ciertas proteínas claves en procesos de señalización celular como la PKC (Kass y col., 1989) y que el consumo de GSH, provoca alteraciones en el mecanismo de señalización celular que incide sobre la activación del factor de transcripción NF-kB (Staal y col., 1990, Liu y col., 2000).

En nuestro estudio, el tratamiento de los hepatocitos con distintas moléculas con capacidad antioxidante demostró que los niveles intracelulares de GSH tienen un importante papel en el proceso que conduce a la liberación de AA estimulada por el TBHP. De hecho, se encontró una correlación significativa entre los niveles intracelulares de GSH y el acúmulo intracelular de AA inducido por el oxidante. El GSH, sin embargo, no parece ser el único factor implicado en la liberación y posterior acumulación de AA intracelular. Así, el DF, que no afectó al vaciado de GSH inducido por TBHP, revirtió de forma significativa los niveles de AA hasta niveles controles (en ausencia del hidroperóxido).

El TBHP puede ser metabolizado, además, a radicales libres (radicales *tert*-butoxilo) por reacciones dependientes de hierro, iniciando la peroxidación de lípidos.

La peroxidación de lípidos de las membranas es un proceso asociado con incrementos de actividad de la PLA_2. En estas condiciones la actividad PLA_2 ejerce una acción protectora sobre la membrana al eliminar los ácidos grasos oxidados. Asimismo, la PLA_2 puede regenerar el fosfolípido dañado, ya que cataliza reacciones de transacilación, contribuyendo, de este modo, al mantenimiento estructural y dinámico de la membrana.

El papel de los hidroperóxidos lipídicos en la señalización celular se pone de manifiesto en estudios en los que se ha descrito que el hidroperóxido de ácido linoleico activa la PLD (Natarajan y col., 1993), pudiendo ser esta vía otro mecanismo de movilización de AA dependiente de la lipoperoxidación. Así, la PLD genera PA, que sería metabolizado por la PAP a DAG y posteriormente a AA por DAG lipasas. Asimismo, se ha descrito en células endoteliales que el 4-hidroxinonenal, uno de los principales productos de la peroxidación lipídica, estimula la actividad PLD (Natarajan y col., 1997). De forma similar, se ha demostrado que tanto el 4-hidroxinonenal como el 4-hidroxioctenal estimulan la actividad basal de la PLC en membranas de hígado de rata (Rossi y col., 1990; 1994), pudiendo ser ésta otra vía de generación de DAG y AA.

BIBLIOTECA VIRTUAL

Aunque los trabajos descritos muestran el importante papel de la peroxidación de lípidos en procesos que conducen a la liberación de AA en determinadas condiciones, en nuestro estudio la lipoperoxidación no parece estar implicada en la movilización y acúmulo intracelular de AA. Así, la utilización de la prometacina, atrapador de radicales peroxilo que inhibió completamente la formación de TBARS inducida por TBHP, no tuvo efecto alguno sobre el acúmulo intracelular de AA (Fig. 2d y tabla 3). El DES (5 μM), E_2 (5 μM) y el α-tocoferol (0,1-0,5 mM) previnieron la respuesta del AA al TBHP sin afectar a la formación de TBARS. Los valores de MDA tampoco se correlacionaron con el AA-[^{14}C] endógeno. Estos resultados sugieren que procesos relacionados con la generación de lipoperóxidos no están implicados en el acúmulo intracelular del ácido graso.

La prometacina es un inhibidor específico de la descomposición peroxidativa de los lípidos de las membranas, que, sin embargo, no previno la formación de ROS mediada por TBHP, como se pudo observar en los experimentos en los que se utilizó la sonda fluorescente sensible a la oxidación, DCFH. El método que utiliza la sonda fluoresente DCF para la determinación de determinados ROS ha sido criticado por diversos autores, debido a la falta de especificidad de la sonda para determinadas especies oxigenadas (Rota y col., 1999). Sin embargo, se utiliza ampliamente como método cualitativo, indicativo de la generación de ROS. A los 5,5 min después de la adición del TBHP, la velocidad de aparición de fluorescencia se incrementó notablemente (Fig. 5). La presencia de

antioxidantes evitó o retrasó la formación de DCF. Los resultados obtenidos con la prometacina sugieren que el TBHP genera en el hepatocito especies oxidantes diferentes de hidroperóxidos lipídicos capaces de oxidar a la DCFH y que pudieran mediar la liberación intracelular de AA. Así, se observó una correlacion positiva entre la formación de ROS detectada por DCF y el acúmulo de AA-[^{14}C] (Fig. 8d). Quizás una de estas especies pudiera ser el radical *tert*-butoxilo, generado en reacciones dependientes de hierro (o metales de transición). El efecto del quelante de hierro, desferal, que inhibió completamente tanto la generación de ROS, como el acúmulo de AA-[^{14}C], estaría de acuerdo con esta hipótesis.

Se ha descrito que el α-tocoferol es un atrapador típico de radicales peroxilo, pero es, sin embargo, poco eficaz frente a la peroxidación de lípidos inducida por radicales alcoxilo (Maiorino y col., 1989). En nuestras condiciones de ensayo el α-tocoferol inhibió significativamente la producción de TBARS inducida por TBHP, pero no evitó la formación de ROS detectada por DCF, mostrando un comportamiento similar al de la prometacina. Sin embargo, y sorprendentemente el α-tocoferol evitó completamente la movilización de AA-[^{14}C]. La vitamina E inhibe la PKC mediante un mecanismo mediado por fosfatasas, disminuyendo, además, los niveles intracelulares de Ca^{2+} en macrófagos peritoneales de rata (Sakamoto y col. 1993). Estos factores son necesarios para la activación de la $cPLA_2$ (Mayer y Marshall, 1993), que hidrolizaría los fosfolípidos de las membranas, para dar lugar a AA. Un mecanismo similar del α-tocoferol en hepatocitos de rata podría explicar el efecto inhibidor del α-tocoferol sobre la movilización de AA observado.

El metabolismo de AA intracelular está fuertemente regulado debido a la importancia de las funciones que tiene tanto el ácido graso libre como los metabolitos generados a partir de él. La liberación intracelular del AA en posición sn-2 de los fosfolípidos es el paso limitante de la producción de eicosanoides y esta liberación está controlada por sistemas de señalización celular (Irvine y col., 1982; Rey y col., 1999). Distintos trabajos han demostrado que el tratamiento con oxidantes de distintos tipos celulares provoca la liberación de AA (Goldman y col., 1992; Zor y col., 1993; Kondakova y col., 1995; Rao y col., 1995; Kohjimoto y col., 2000), aunque el mecanismo por el que tiene lugar dicho proceso no está claro. En el presente estudio hemos observado que el TBHP induce en hepatocitos de rata un acúmulo de AA que se correlaciona con la producción intracelular de ROS.

BIBLIOTECA VIRTUAL

En la célula la liberación de AA de los fosfolípidos de las membranas tiene lugar principalmente por los distintos sistemas de fosfolipasas. Se estudió la implicación de la PLA_2 mediante el empleo de mepacrina, un inhibidor inespecífico de actividad PLA_2. La mepacrina previno completamente la movilización de AA-[^{14}C] inducida por TBHP, sugiriendo estos datos un papel determinante de la actividad PLA_2 en el efecto causado por el oxidante (Fig. 10). A continuación, debido a que tanto la $cPLA_2$ como la $sPLA_2$ son susceptibles de activación por oxidantes, se estudió la implicación de dichas isoformas en el proceso que conduce al acúmulo de AA intracelular. La expresión de la $sPLA_2$ en hepatocitos en condiciones basales no está aún definida. En nuestro estudio hemos utilizado técnicas de transferencia Western para detectar esta isoforma en hepatocitos en condiciones basales. Los resultados mostraron que en el hígado de rata la $sPLA_2$ se localiza mayoritariamente en células no parenquimales, mientras que en hepatocitos su presencia es prácticamente indetectable (Fig. 13). Estos resultados están de acuerdo con distintos estudios en los que se muestra que la actividad $sPLA_2$ en hepatocitos de rata es muy baja (Inada y col., 1991b) o que la expresión de su ARN mensajero es prácticamente indetectable (Wang y col., 1996). Los resultados que se presentan en este estudio descartarían la participación de esta isoforma en los efectos inducidos por el hidroperóxido, apuntando a otras isoformas como la $cPLA_2$. Mediante la utilización del $AACOCF_3$,

inhibidor específico de la $cPLA_2$, y del $PACOCF_3$, inhibidor específico de la $iPLA_2$, vimos que la $cPLA_2$ está implicada en la movilización intracelular de AA inducida por TBHP.

La implicación de la PLD en la respuesta al TBHP se estudió indirectamente empleando propranolol, un inhibidor de la PAP. Esta molécula no previno el acúmulo de AA inducido por TBHP, efecto que habríamos observado en caso de una actividad PLD incrementada. A continuación determinamos la actividad PLD valiéndonos de su propiedad de transfosfatidilación. En las incubaciones celulares en presencia de etanol el tratamiento con TBHP no originó un acúmulo intracelular de fosfatidiletanol. Asimismo, el acúmulo de AA intracelular fue similar en hepatocitos tratados con TBHP en presencia y ausencia de 1-butanol en el medio de incubación. A la vista de estos resultados podríamos concluir que el estrés oxidativo generado por TBHP no estimula la actividad de la PLD.

La caracterización de sistemas de señalización responsables de la regulación de la $cPLA_2$ indica que distintas vías pueden entrecruzarse dando lugar a distintos grados de liberación de AA. Distintos estudios han demostrado que la activación de la $cPLA_2$ se produce por fosforilación catalizada por la MAPK (Lin y cols, 1993; Nemenoff y cols, 1993; Miura y col., 1999; Soloff y col., 2000) o por la PKC (Lin y cols, 1992; Xing y Mattera, 1992; Husain y Abdel-Latif, 1998). En nuestro trabajo se estudió el papel de ambos enzimas en la activación de la $cPLA_2$. El tratamiento de los hepatocitos con H7 y esfingosina, inhibidores específicos de la PKC, previno completamente el acúmulo intracelular de AA inducido por TBHP. Asimismo, en células tratadas con PD98059, inhibidor específico de la MAPKK, observamos el mismo efecto. Estos resultados ponen de manifiesto que la activación de la $cPLA_2$ en respuesta al TBHP requiere una activación previa tanto de la PKC como de la MAPK.

En hepatocitos la $cPLA_2$ puede activarse por distintas vías de señalización dependientes o independientes de la proteína G de bajo peso molecular Ras (Adachi y col., 1996). Generalmente la activación de la MAPK se produce a través de Ras tras la activación de receptores con actividad tirosina quinasa, como los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGF) o los del factor de crecimiento derivado de plaquetas

(PDGF). En estos casos Ras se une al complejo Grb2-Sos y activa a Raf-1, que funciona como la quinasa de MAPKK. Asimismo, en hepatocitos existe una vía de activación de la MAPK independiente de Ras en la cual Raf es activada directamente por la PKC (Adachi y col., 1996; Takahashi y col., 1999). Los resultados obtenidos en nuestro estudio sugieren una fosforilación directa de Raf vía PKC, ya que el tratamiento con inhibidores específicos de PKC bloquea completamente la activación de la $cPLA_2$, estando descartada la participación de Ras en la cascada de señalización (Fig. 19).

Distintos mecanismos conducen a la activación de la PKC. En hepatocitos se ha descrito la expresión de las isoformas α y βII, que son dependientes de Ca^{2+} y activadas por DAG o ésteres de forbol, las isoformas δ y ε, que son independientes de Ca^{2+} , y la isoforma ζ, que no responde al Ca^{2+} y se activa débilmente por ésteres de forbol (Ducher y col., 1995). Se ha visto que en situaciones de estrés oxidativo la PKC puede ser activada por la oxidación directa de un grupo tiol específico cercano al dominio regulador del enzima y que altas concentraciones de peróxidos lipídicos actúan de esta forma (Gopalakrishna y Anderson, 1991). En nuestras condiciones experimentales hemos visto que el acúmulo intracelular de AA se correlaciona con los niveles intracelulares de ROS. Así, los ROS generados tras la adición de TBHP a la suspensión celular podrían activar directamente la PKC o actuar en un paso previo a la activación de este enzima.

Se estudió la activación de la PLC como respuesta al TBHP vía DAG generado por la PLC. Observamos que el tratamiento de los hepatocitos con neomicina, inhibidor específico de la PI-PLC, evitó completamente el acúmulo de AA intracelular inducido por el oxidante. El tratamiento de las células con D609, inhibidor específico de la PC-PLD, no tuvo efecto alguno sobre el acúmulo de AA inducido por TBHP. Estos resultados sugieren un papel de la actividad PI-PLC como responsable de la activación de la PKC. Podría especularse la implicación de la isoforma PKCα en la respuesta al TBHP, ya que se ha descrito que PKCβ solamente se activa por el DAG proveniente de la PC (Pfeffer y cols, 1990).

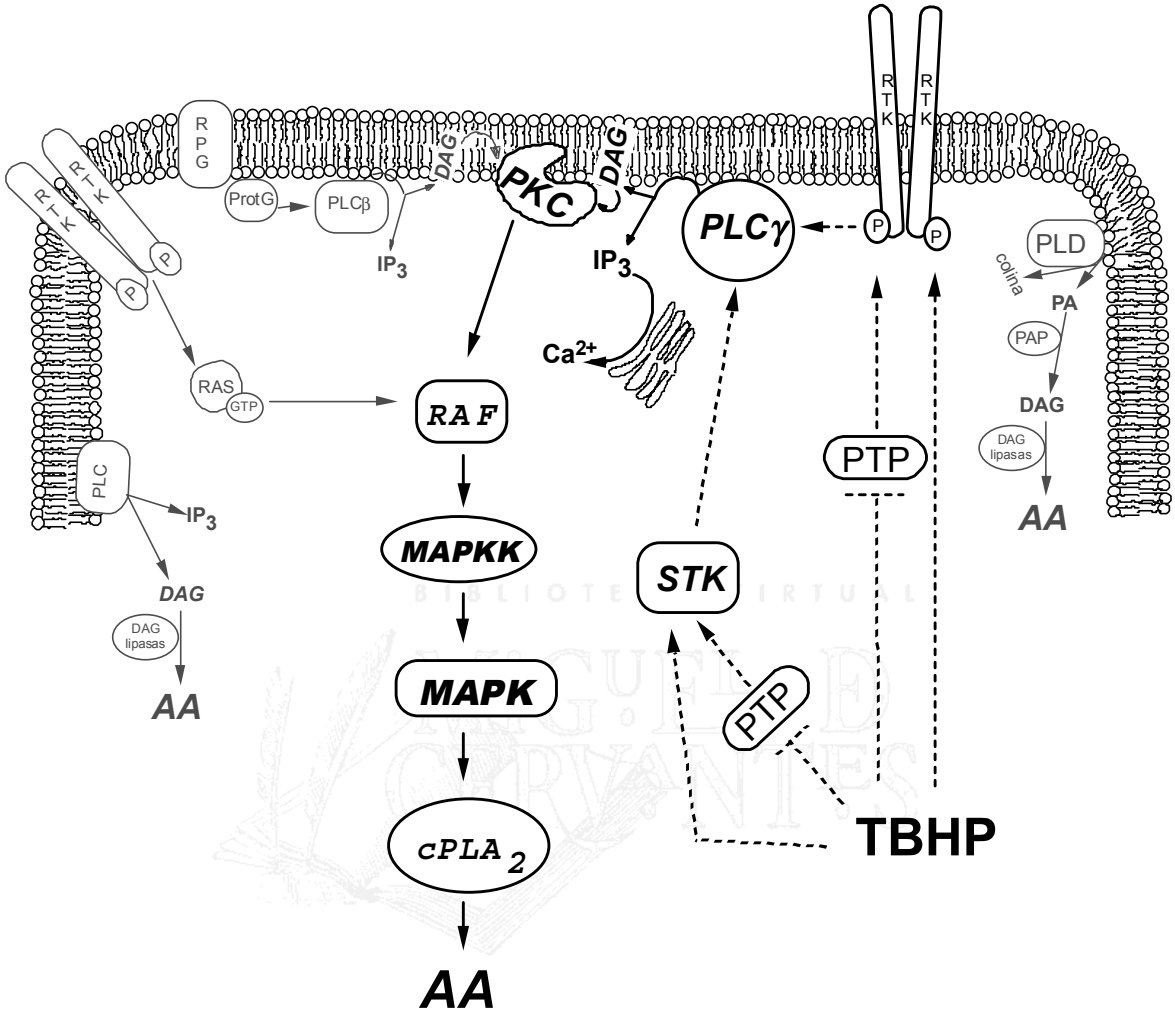
Los dos subtipos de PLC más estudiados se regulan de forma diferente. Se ha demostrado que la PLCγ se activa por fosforilación de residuos de tirosina (Wahl y cols, 1992) y que la activación de la PLCβ está mediada por proteínas G (Rhee y Bae, 1997). La estimulación de la PLC vía proteínas G no parece estar implicada, ya que la genisteína, un inhibidor de tirosina quinasas, previno tanto la movilización de DAG como de AA (Fig. 23). Estos resultados sugieren que el TBHP aumenta la actividad tirosina quinasa, lo que llevaría a la activación de la PLCγ. En nuestro estudio el TBHP provocó un incremento de la fosforilación en residuos de tirosina de un 58%, respecto de las células no expuestas al oxidante (Fig. 24). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que el subtipo de PLC estimulado por el TBHP es la PLCγ.

BIBLIOTECA VIRTUAL

Entre las tirosina quinasas que activan la PLCγ encontramos los receptores tirosina quinasa como el del PDGF (Kim y cols, 1991; Alimandi y col., 1997; Bae y col., 2000) y el del EGF (Margolis y cols, 1990; Chattopadhyay y col., 1999). Asimismo, otras tirosina quinasas solubles fosforilan a la PLCγ (Yurchak y cols, 1996).

Aunque la estimulación de la actividad fosforilativa puede ser uno de los mecanismos de activación de quinasas mediado por oxidantes, la inhibición de enzimas desfosforilantes puede también conducir al mismo incremento en la fosforilación y activación de proteínas. Se ha descrito la inhibición de PTPs por agentes oxidantes (Sundaresan y cols, 1995; Whisler y cols, 1995; Knebel y cols, 1996; Natarajan y cols, 1996; Rao, 1996). Puesto que todas las PTPs tienen residuos de cisteína en su centro activo (Fischer y cols, 1991; Takakura y col., 1999), la oxidación de dichas cisteínas causaría la inhibición de las PTPs, produciendo la acumulación de tirosinas fosforiladas. Quedaría por determinar la implicación de fosfatasas en la respuesta al TBHP.

En resumen, los resultados obtenidos sugieren que el estrés oxidativo inducido por TBHP en hepatocitos de rata conduce a la activación de la $cPLA_2$ y posterior liberación de AA de los fosfolípidos de las membranas, que podría tener lugar mediante la cascada de señalización que se esquematiza en la figura siguiente:



El TBHP por su metabolización en el hepatocito generaría ROS (radicales libres) que actuarían directamente sobre grupos reactivos de PTKs o sobre PTPs. Este hecho generaría un aumento de la actividad basal de PTKs que fosforilarían y activarían a la PLCγ. La actividad de este enzima sobre los fosfolípidos de inositol, generaría DAG e IP_3. El DAG en la membrana junto con el Ca^{2+} activaría la PKC. Es probable que la isoforma activada fuese la PKCα que fosforilaría directamente a la proteína Raf. Se activaría la cascada de las MAPKs, lo que finalmente, conduciría a la fosforilación y activación de la $cPLA_2$, con la siguiente movilización de AA de los fosfolípidos de las membranas.

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1- El TBHP, en estadíos iniciales que preceden a la muerte celular, induce en hepatocitos de rata un estrés oxidativo reflejado por un consumo de GSH y la formación de TBARS, así como un acúmulo intracelular de AA y DAG.

2- ROS derivados del metabolismo hepático del TBHP y el GSH intracelular están implicados en el acúmulo de AA inducido por TBHP. ROS median también el acúmulo de DAG inducido por el oxidante.

3- La peroxidación de lípidos no está implicada en el acúmulo intracelular de AA ni de DAG inducido por TBHP.

4- El posterior acúmulo intracelular de AA y DAG inducido por TBHP depende de la presencia de metales de transición, sugiriéndose que los radicales *tert*-butoxilo derivados del metabolismo del TBHP dependiente de iones de hierro tienen un papel importante en dicho efecto.

5- El TBHP causa la activación de la $cPLA_2$, siendo este enzima responsable de la liberación de AA observada en respuesta al oxidante. Quedaría descartada la contribución de otras isoformas de PLA_2 ($iPLA_2$ o $sPLA_2$) y de la PLD a la liberación del ácido graso mediada por el TBHP.

6- La MAPK y la PKC median la activación de la $cPLA_2$. Podría sugerirse una fosforilación directa de Raf mediada por la PKC que conduciría a la activación de la MAPK y finalmente de la $cPLA_2$.

7- El aumento en los niveles intracelulares de DAG está mediado por la PLC.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

8- El TBHP induce la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, lo que indica una actividad elevada de tirosina quinasas, bien por acción directa del oxidante o indirecta mediante la inactivación de proteínas tirosina fosfatasas.

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

BIBLIOGRAFÍA

ADACHI, T., NAKASHIMA, S., SAJI, S., NAKAMURA, T. AND NOZAWA, Y. (1995) Roles of prostaglandin production and mitogen-activated protein kinase activation in hepatocyte growth factor-mediated rat hepatocyte proliferation. *Hepatology*. 21: 1668-1674.

ADACHI, T., NAKASHIMA, S., SAJI, S., NAKAMURA, T. AND NOZAWA, Y. (1996) Mitogen-activated protein kinase activation in hepatocyte growth factor-stimulated rat hepatocytes: involvement of protein tyrosine kinase and protein kinase C. Hepatology 23: 1244-1253.

AFANASÉV, I.B., DOROZHKO, A.I., BRODSKII, A.V., KOSTYUK, V.A. AND POTAPOVITCH, A.I. (1988) Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol*. 38: 1763-1769.

AHMED-CHOUDHURY, J., ORSLER, D.J. AND COLEMAN,R. (1998) Hepatobiliary effects of tertiary-butylhydroperoxide (tBOOH) in isolated rat hepatocyte couplets. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 152: 270-275.

ALAOUI-JAMALI, M., LOUBABA, B.B., ROBYN, S., TAPIERO, H. AND BATIST, G. (1994) Effect of DNA-repair-enzyme modulators on cytotoxicity of L-phenylalanine mustard and cis-diamminedichloroplatinum (II) in mammary carcinoma cells resistant to alkylating drugs. *Cancer. Chemother. Pharmacol*. 34: 153-158.

ALBANO, E., RUNDGREN, M., HARVISON, P.J., NELSON, S.D. AND MOLDEUS, P. (1985) Mechanism of N-acetyl-p-benzoquinone imine cytotoxicity. *Mol. Pharmacol*. 28: 306-311.

ALIMANDI, M., HEIDARAN, M.A., GUTKIND, J.S., ZHANG, J., ELLMORE,N., VALIUS,M., KAZLAUSKAS, A., PIERCE, J.H. AND LI, W. (1997) PLC-gamma activation is required for PDGF-betaR-mediated mitogenesis and monocytic differentiation of myeloid progenitor cells. *Oncogene* 15: 585-593.

ALONSO, F., HENSON, P.M. AND LESLIE, C.C. (1986) A cytosolic phospholipase in human neutrophils that hydrolyzes arachidonoyl-containing phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* 878: 273-280.

ANIYA, Y. AND ANDERS, M.W. (1989) Regulation of rat liver microsomal glutathione S-transferase activity by thiol/disulfide exchange. *Arch. Biochem. Biophys.* 270: 330-334.

BABENKO, N.A. RUIZ-LARREA, M.B., MARTINEZ, R. MARTIN, C. AND LACORT, M. (1998) Inhibition by estrogens of the oxidant-mediated mobilization of arachidonic acid in hepatocytes. *J. Physiol. Biochem*. 54: 77-84.

BAE, Y.S., SUNG, J.Y., KIM, O.S., KIM, Y.J., HUR, K.C., KAZLAUSKAS, A. AND RHEE, S.G. (2000) Platelet-derived growth factor-induced H(2)O(2) production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 275: 10527-10531.

BANNO, Y., TAMIYA-KOIZUMI, K., OSHIMA, H., MORIKAWA, A., YOSHIDA, S. AND NOZAWA, Y. (1997) Nuclear ADP-ribosylation factor (ARF)- and oleate-dependent phospholipase D (PLD) in rat liver cells. Increases of ARF-dependent PLD activity in regenerating liver cells. *J. Biol. Chem*. 272: 5208-5213.

BAUER, V., OIKE, M., TANAKA, H., INOUE, R. AND ITO, Y. (1997) Hyrogen peroxide induced responses of cat tracheal smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol* 121: 867-874.

BAZZI, M.D, AND NELSESTUEN, G.L. (1988) Constitutive activity of membrane-inserted protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 152: 336-343.

BELLOMO, G., JEWELL, S.A., THOR, H. AND ORRENIUS, S. (1982) Regulation of intracellular calcium compartimentation; studies with isolated hepatocytes and t-butyl hydroperoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6842-6846.

BELLOMO, G., MARTINO, A., RICHELMI, P., MOORE, G.A., JEWELL, S.A. AND ORRENIUS, S. (1984) Pyridine-nucleotide oxidation, Ca^{2+} cycling and membrane damage during *tert*-butyl hydroperoxide metabolism by rat-liver mitochondria. *Eur. J. Biochem*. 140: 1-6.

BERGMEYER, H.U. (1974) Lactate dehydrogenase. UV assay with piruvate and NADH. En *Methods of enzymatic analysis* . (H.U. Bergmeyer Ed.), vol 2: 574-579. Verlag Chemie Weinheim, Academic Press, New York and London.

BERLETT, B.S. AND STADTMAN, E.R. (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272: 20313-20316.

BERRIDGE, M.J. AND IRVINE, R.F. (1984) Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. [Review]. *Nature* 312: 315-321.

BILLAH, M.M. (1993) Phospholipase D and cell signaling. *Curr. Opin. Immunol*. 5: 114-123.

BOURGOIN, S., HARBOUR, D., DESMARAIS, Y., TAKAI, Y. AND BEAULIEU, A. (1995) Low molecular weight GTP-binding proteins in HL-60 granulocytes. Assesment of the role of ARF and of a 50-kDa cytosolic protein in phospholipase D activation. *J. Biol. Chem*. 270: 3172-3178.

BRIGELIUS, R., MERCKEL, C., AKERBOOM, T.P.M. AND SIES, H. (1983) Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfdes and its relatioship to glutathione disulfide. *Biochem. Pharmacol*. 32: 2529-2534.

BURTON, G.W. AND INGOLD, K.U. (1981) Autooxidation of biological molecules. 1. the antioxidant activity of vitamin e and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *J. Am. Chem. Soc*. 103: 6472-6477.

CIFONE, M.G., CIRONI, L., RONCAIOLI, P., MARTINOTTI, S., TONIATO, E., CILENTI, L., BOTTI, D., SOLITO, R., PARENTE, L. AND SANTONI, A. (1996) Phospholipase A_2 activity and calpactin I levels in rat lymphokine-activated killer cells: correlation with the cytotoxic activity. *Cell. Immunol.* 170: 274-282.

CLARK, J.D., LIN, L.-L., KRIZ, R.W., RAMESHA, C.S., SULTZMAN, L.A., LIN, A.Y., MILONA, N. AND KNOPF, J.L. (1991) A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA_2 contains a $Ca(^{2+})$-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell* 65: 1043-1051.

CLARK, J.D., SCHIEVELLA, A.R., NALEFSKI, E.A. AND LIN, L.-L. (1995) Cytosolic phospholipase A_2. *J. Lipid Mediat. Cell Signal*. 12: 83-117.

COLEMAN, J.B., GILFOR, D. AND FARBER, J.L. (1989) Dissociation of the accumulation of single-strand breaks in DNA from the killing of cultured hepatocytes by an oxidative stress. *Mol. Pharmacol*. 36: 193-200.

COLLEY, W.C., SUNG, T.-C., ROLL, R., JENCO, J., HAMMOND, S.M., ALTSHULLER, Y., BAR-SAGI, D., MORRIS, A.J. AND FROHMAN, M.A. (1997) Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. *Curr. Biol*. 7: 191-201.

CORTEZ-PINTO, H., ZHI-LIN, H., QI-YANG, S., ODWIN-DA-COSTA, S. AND DIEHL, A.M. (1999) Lipids up-regulate uncoupling protein 2 expression in rat hepatocytes.*Gastroenterology* 116: 1184-1193.

CROWL, R.M., STOLLER, T.J., CONROY, R.R. AND STONER, C.R. (1991) Induction of phospholipase A_2 gene expression in human hepatoma cells by mediators of the acute phase response. *J. Biol. Chem*. 266: 2647-2651.

CHAKRABORTI, S., GURTNER, G.H. AND MICHAEL, J.R. (1989) Oxidant-mediated activation of phospholipase A_2 in pulmonary endothelium. *Am. J. Physiol*. 257: L430-L437.

CHAKRABORTI, S., MICHAEL, J.R., GURTNER, G.H., GHOSH, S.S., DUTTA, G. AND MERKER, A. (1993) Role of a membrane-associated serine esterase in the oxidant activation of phospholipase A_2 by t-butyl hydroperoxide. *Biochem. J.* 292: 585-589.

CHATTOPADHYAY, A., VECCHI, M., JI, Q.S., MERNAUGH, R. AND CARPENTER, G. (1999) The role of individual SH2 domains in mediating association of

phospholipase C-gamma1 with the activated EGF receptor. *J. Biol. Chem*. 274: 26091-26097.

DAN, P., NITZAN, D.W., DAGAN, A., GINSBURG, I. AND YEDGAR, S. (1996) H_2O_2 renders cells accessible to lysis by exogenous phospholipase A_2: a novel mechanism for cell damage in inflammatory processes. *FEBS Lett*. 383: 75-78.

de CARVALHO, M.G.S., McCORMACK, A.L., OLSON, E., GHOMASHCHI, F., GELB, M.H., YATES, J.R.III AND LESLIE, C.C. (1996) Identification of phosphorylation sites of human 85-kDa cytosolic phospholipase A_2 expressed in insect cells and present in human monocytes. *J. Biol. Chem*. 271: 6987-6997.

DENU, J.M. AND TANNER, K.G. (1998) Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* 37: 5633-5642.

DEVARY, Y., GOTTILEB, R.A., SMEAL, T. AND KARIN, M. (1992) The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src tyrosine kinases. *Cell* 71: 1081-1091.

DOBA, T., BURTON, G.W. AND INGOLD, K.M. (1985) Antioxidant and coantioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C either alone or in the presence of vitamin E or a water soluble vitamin E analog, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 835: 298-303.

DUCHER, L., CROQUET, F., GIL, S., DAVY, J., FEGER, J. AND BREHIER, A. (1995) Differential expression of five protein kinase C isoenzymes in FAO and HEPG2 hepatoma cell lines compared with normal rat hepatocytes. Biochim. Biophys. Res. Commun. 217: 546-553.

ELLIOTT, S.J., MESZAROS, J.G. AND SCHILLING, W.P. (1992) Effect of oxidant stress on calcium signaling in vascular endothelial cells. *Free Rad. Biol. Med*. 13: 635-650.

EXTON, J.H. (1997) Phospholipase D: enzymology, mechanisms of regulation, and function. *Physiol. Rev.* 77: 303-320.

FACTOR, V.M., LASKOWSKA, D., JENSEN, M.R., WOITACH, J.T., POPESCU, N.C. AND THORGEIRSSON, S.S. (2000) Vitamin E reduces chromosomal damage and inhibits hepatic tumor formation in a transgenic mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 2196-2201.

FEE, J.A. AND TEITELBAUM, H.D. (1972) Evidence that superoxide dismutase plays a role in protecting red blood cells against peroxidative hemolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49: 150-158.

FIALKOW, L., CHAN, C.K., GRINSTEIN, S. AND DOWNEY, G.P. (1993) Regulation of tyrosine phosphorylation in neutrophils by the NADPH oxidase. Role of reactive oxygen intermediates. *J. Biol. Chem*. 268: 17131-17137.

FINKEL, T. (2000) Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett*. 476: 52-54.

FISCHER, E.H., CHARBONNEAU, H. AND TONKS, N.K. (1991) Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science* 253: 401-406.

FOLCH, J., LEES, M. AND SLOANE-STANLEY, G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem*. 226: 497-509.

FOUDA, S.I., MOLSKI, T.F.P., ASHOUR, M.S.-E. AND SHA'AFI, R.I. (1995) Effect of lipopolysaccharide on mitogen-activated protein kinases and cytosolic phospholipase A_2. *Biochem. J*. 308: 815-822.

FRY, M.J. (1994) Structure, regulation and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1226: 237-268.

GARGETT, C., CORNISH, E.J. AND WILEY, J.S. (1996) Phospholipase D activation by p_{2z}-purinoreceptor agonists in human lymphocytes is dependent on bivalent cation influx. *Biochem. J*. 313: 529-535.

GOLDMAN, R., FERBER, E. AND ZOR, U. (1992) Reactive oxygen species are involved in the activation of cellular phospholipase A_2. *FEBS Lett*. 309: 190-192.

GOLDMAN, R., FERBER, R., MELLER, R. AND ZOR, U. (1994) A role for reactive oxygen species in zymosan and beta-glucan induced protein tyrosine phosphorylation and phospholipase activation in murine macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 1222: 265-276.

GOLIGORSKI, M.S., MORGAN, M.A., LYUBSKY, S., GROSS, R.W., ADAMS, D.T. AND SPITZ, D.R. (1993) Establishment of a hydrogen peroxide resistant variant of renal tubulr epithelial cells: role of calcium-independent phospholipase A2 in cell damage. *Arch. Biochem. Biophys*. 301: 119-128.

GOPALAKRISHNA, R. AND ANDERSON W.B. (1991) Reversible oxidative activation and inactivation of protein kinase C by the mitogen/tumor promoter periodate. Arch. Biochem. Biophys. 285: 382-387.

GOPALAKRISHNA, R. AND ANDERSON, W.B. (1989) Ca^{2+} -and phospholipid-independent activation of protein kinase C by selective oxidative modification of the regulatory domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6758-6762.

GOPPELT-STRUEBE, M. AND REHFELDT, W. (1992) Glucocorticoids inhibit TNF-alpha-induced cytosolic phospholipase A_2 activity. *Biochim. Biophys. Acta*. 1127: 163-167.

GRONICH, J.H., BONVENTRE, J.V. AND NEMENOFF, R.A. (1988) Identification and characterization of a hormonally regulated form of phospholipase A_2 in rat renal mesanglial cells. *J. Biol. Chem*. 263: 16645-16651.

GUNASEKAR, P.G., BOROWITZ, J.L. AND ISOM, G.E. (1998) Cyanide-induced generation of oxidative species: involvement of nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2. *J. Pharmacol. Exp-Ther*. 285: 236-241.

GUS'KOVA, R.A., IVANOV, I.I., KOLTOVER, V.K., AKHOBADZE, V.V., AND RUBIN, A.B. (1984) Permeability of bylayer lipid membranes for superoxide (O_2^-) radicals. *Biochim. Biophys. Acta* 778:579-585.

GUTTERIDGE, J.M. (1994) Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem. Biol. Interact.* 91: 133-140.

HAENEN, G.R.M.M. (1990) *In Thiols in oxidative stress. Some implications for the catechollamine toxicity (2nd edition), Amsterdam*

HALLIWELL, B. AND ARUOMA, O.I. (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett*. 281: 9-19.

HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J.M.C. (eds.) (1989) Free radicals in biology and medicine, 2nd edn., pp. 188-276, clarendon press, oxford.

HAMMOND, S.M., JENCO, J.M., NAKASHIMA, S., CADWALLADER, K., GU, Q.-M., COOK, S., NOZAWA, Y., PRESTWICK, G.D., FROHMAN, M.A. AND MORRIS, A.J. (1997) Characterization of two alternately spliced forms of phospholipase D1. Activation of the purified enzymes by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, ADP-ribosylation factor, and Rho family monomeric GTP-binding proteins and protein kinase C-alpha. *J. Biol. Chem*. 272: 3860-3868.

HARA, S., KUDO, I., CHANG, H.W., MATSUTA, K., MIYAMOTO, T. AND INOUE, K. (1989) Purification and characterization of extracellular phospholipase A_2 from human synovial fluid in rheumatoid arthritis. *J. Biochem*. 105: 395-399.

HARA, S., MIYATA, A., YOKOYAMA, C., INOUE, H., BRUGGER, R., LOTTSPEICH, F., ULLRICH, V. AND TANABE, T. (1994) Isolation and molecular cloning of prostacyclin synthase from bovine endothelial cells. *J. Biol. Chem*. 269: 19897-19903.

HASSAN, N.M. AND FRIDOVICH, I. (1979) Paraquat and *Escherichia coli*. Mechanism of production of extracellular superoxide radical. *J. Biol. Chem*. 254: 10846-10852.

HAYAKAWA, M., KUDO, I., TOMITA, M., NOJIMA, S. AND INOUE-K. (1988) The primary structure of rat platelet phospholipase A_2. *J. Biochem*. 104: 767-772.

HAYASHI, T., UENO, Y., OKAMOTO, T. (1993) Oxidoreductive regulation of nuclear factor kB. Involvement of a cellular reducing catalyst thioredoxin. *J. Biol. Chem*. 268: 11380-11388.

HERNANDEZ, M., BAYON, Y., SANCHEZ-CRESPO, M. AND NIETO, M.L. (1997) Thrombin produces phosphorylation of cytosolic phospholipase A_2 by a mitogen-activated protein kinase kinase-independent mechanism in the human astrocytoma cell line 1321N1. *Biochem. J*. 328: 263-269.

HIRABAYASHI, T., KUME, K., HIROSE, K., YOKOMIZO, T., IINO, M., ITOH, H. AND SHIMIZU, T. (1999) Critical duration of intracellular Ca^{2+} response required for continuous translocation and activation of cytosolic phospholipase A_2. *J. Biol. Chem*. 274: 5163-5169.

HUANG, X.P., da SILVA, C., FAN, X.T. AND CASTAGNA, M. (1993) Characteristics of arachidonic-acid-mediated brain protein kinase C activation: evidence for concentration-dependent heterogeneity. *Biochim. Biophys. Acta* 1175: 351-356.

HUG. H. AND SARRE, T.F. (1993) Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction?. *Biochem. J*. 291: 329-343.

HWANG, C., SINSKEY, A.J. AND LODISH, H.F. (1992) Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 257: 1496-1502.

IM, M.J. AND GRAHAM, R.M. (1990) A novel guanine nucleotide-binding protein coupled to the alpha 1-adrenergic receptor. II. Purification, characterization, and reconstitution. *J. Biol. Chem.* 265: 18944-18951.

IM, M.J., RUSSELL, M.A. AND FENG, J.F (1997) Transglutaminase II: a new class of GTP-binding protein with new biological functions. *Cell. Signal.* 9: 477-482.

INADA, M., TOJO, H., KAWATA, S., TARUI, S. AND OKAMOTO, M. (1991a) Induction of group II-like phospholipase A_2 by lipopolysaccharide in the liver of BCG-primed rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 174: 1077-1083.

INADA, M., TOJO, H., KAWATA, S., TARUI, S. AND OKAMOTO, M. (1991b) Preferential distribution of group II-like phospholipase A2 in mononuclear phagocytic cells in ratspleen and liver. *Eur. J. Biochem*. 197: 323-329.

INGELMAN-SUNDBERG, M. AND JOHANSSON, I. (1984) Mechanisms of hydroxyl radical formation and ethanol oxidation by ethanol-inducible and others forms of rabbit liver microsomal cytochromes p-450. *J. Biol. Chem*. 259: 6447-6458.

IRVINE, R.F. (1982) How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cels?. *Biochem. J.* 204: 3-16.

ITO, Y., NAKASHIMA, S. AND NOZAWA. Y. (1997) Hydrogen peroxide-induced phospholipase D activation in rat pheochromocytoma PC12 cells: possible involvement of Ca^{2+}-dependent protein tyrosine kinase. *J. Neurochem*. 69: 729-736.

JAWOREK, D. (1974) Adenosine-5'-triphosphate. En *Methods of enzymatic analysis*. (H.U. Bergmeyer Ed.)Vol. 2: 2147-2160. Hans Ulricle Bergmeyer, Academic Press, New york.

JEWELL, S.A., BELLOMO, G., THOR, H., ORRENIUS, S. AND SMITH, M.T. (1982) Bleb formation in hepatocytes during drug-metabolism is caused by disturbances in thiol and calcium ion homeostasis. *Science* 217: 1257-1259.

JIANG. H., LU, Z., LUO, J.-Q., WOLFMAN, A. AND FOSTER, D.A. (1995) Ras mediates the activation of phospholipase D by v-Src. *J. Biol. Chem*. 270: 6006-6009.

JONES, A.T. AND WESSLING-RESNICK, M. (1998) Inhibition of in vitro endosomal vesicle fusion activity by aminoglycoside antibiotics. *J. Biol. Chem.* 273: 25301-25309.

KASS, G.E., DUDDY, S.K. AND ORRENIUS, S. (1989) Activation of hepatocyte protein kinase C by redox-cycling quinones. *Biochem. J.* 260: 499-507.

KAST, R., FÜRSTENBERGER, G. AND MARKS, F. (1993) Activation of cytosolic phospholipase A_2 by transforming growth factor-alpha in HEL-30 keratinocytes. *J. Biol. Chem*. 268: 16795-16802.

KENSLER, T., GUYTON, K., EGNER, P., McCARTHY, T., LESKO, S. AND AKMAN, S. (1995) Role of reactive intermediates in tumor promotion and progresion. *Prog. Clin. Biol. Res.* 392: 103-116.

KIM, D.K. AND BONVENTRE, J.V. (1993) Purification of a 100-kDa phospholipase A_2 from spleen, lung and kidney: antiserum raised to pig spleen phospholipase A_2 recognizes a similar form in bovine lung, kidney and platelets, and immunoprecipitates phospholipase A_2 activity. *Biochem. J*. 294: 261-270.

KIM, H.K., KIM, J.W., ZILBERSTEIN, A., MARGOLIS, B., KIM, J.G., SCHLESSINGER, J. AND RHEE, S.G. (1991) PDGF stimulation of inositol phospholipid hydrolysis requires PLC-γ1 phosphorylation on tyrosine residues 783 and 1254. Cell 65: 435-441.

KLYUBIN, I.V., KIRPICHNIKOVA, K.M. AND GAMALEY, I.A. (1996) Hydrogen peroxide-induced chemotaxis of mouse peritoneal neutrophils. *Eur. J. Cell Biol*. 70: 347-351.

KNEBEL, A., RAHMSDORF, H.J., ULLRICH, A. AND HERRLICH, P. (1996) Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. EMBO J. 15: 5314-5325.

KOBAYASHI, M. AND KANFER, J.N. (1987) Phosphatidylethanol formation via transphosphatidylation by rat brain synaptosomal phospholipase D. *J. Neurochem*. 48: 1597-1603.

KOHJIMOTO, Y., HONEYMAN, T.W. JONASSEN, J., GRAVEL, K., KENNINGTON, L. AND SCHEID, C.R. (2000) Phospholipase A_2 mediates immediate early genes in cultured renal epithelial cells: possible role of lysophospholipid. *Kidney Int*. 58: 638-646.

KONDAKOVA, I.V., PEIRETTI, F., NALBONE, G. AND LAFONT, H. (1995) Phospholipase A stimulation in tumor cells by subtoxic concentration of *tert*-butyl hydroperoxide. Biochim. Biophys. Acta 1258: 297-302.

KONISHI, H., TANAKA, M., TAKEMURA, Y., MATSUZAKI, H., ONO, Y., KIKKAWA, U. AND NISHIZUKA, Y. (1997) Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H_2O_2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11233-11237.

KOURIE, J.I. (1998) Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am. J. Physiol*. 275: C1-24.

KRAMER, R.M., ROBERTS, E.F., HYSLOP, P.A., UTTERBACK, B.G., HUI, K.Y. AND JAKUBOWSKI, J.A. (1995) Differential activation of cytosolic phospholipase A_2 ($cPLA_2$) by thrombin and thrombin receptor agonist peptide in human platelets. Evidence for activation of $cPLA_2$ independent of the mitogen-activated protein kinases ERK1/2. *J. Biol. Chem*. 270: 14816-14823.

KUMADA, T., NAKASHIMA, S., NAKAMURA, Y., MIYATA, H. AND NOZAWA, Y. (1995) Antigen-mediated phospholipase D activation in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells: possible involvement of calcium/calmodulin. *Biochim. Biophys. Acta* 1258: 107-114.

LÖTSCHER, H.R., WINTERHALTER, K.H., CARAFOLI, E. AND RICHTER, C. (1979) Hydroperoxides can modulate the redox state of pyridine nucleotides and the calcium balance in rat liver mitochondria. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* 76: 4340-4344.

LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

LEAL, A.M., RUIZ-LARREA, M.B., MARTINEZ, R. AND LACORT, M. (1998) Cytoprotective actions of estrogens against tert-butyl hydroperoxide-induced toxicity in hepatocytes. *Biochem. Pharmacol*. 56: 1463-1469.

LEE, T.G., PARK, J.B., LEE, S.D., HONG, S., KIM, J.H., KIM, Y., YI, K.S., BAE, S., HANNUN, Y.A., OBEID, L.M., SUH, P.-G. AND RYU, S.H. (1997) Phorbol myristate acetate-dependent association of protein kinase C alpha with phospholipase D1 in intact cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1347: 199-204.

LIN, L.-L., LIN, A.Y. AND KNOPF, J.L. (1992) Cytosolic phospholipase A_2 is coupled to hormonally regulated release of arachidonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6147-6151.

LIN, L.-L., WARTMANN, M., LIN, A.Y., KNOPF, J.L., SETH, A. AND DAVIS, R.J. (1993) $cPLA_2$ is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 72: 269-278.

LIU, G., ZHANG, T., WANG, B. AND WANG, Y. (1992) Protective action of seven natural phenolic compounds against peroxidative damage to biomembranes. *Biochem. Pharmacol*. 43: 147-152.

LIN, P. AND GILFILLAN, A.M. (1992) The role of calcium and protein kinase C in the IgE-dependent activation of phosphatidylcholine-specific phosphlipase D in rat mast (RBL 2H3) cell line. *Eur. J. Biochem*. 207: 163-168.

LIU, T.Z., HU, C.C., CHEN., Y.H., STERN, A. AND CHENG, J.T. (2000) Differentiation status modulates transcription factor NF-kappaB activity in unstimulated human Hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer. Lett*. 151: 49-56.

LO, Y.Y. AND CRUZ, T.F. (1995) Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *J. Biol. Chem*. 270: 11727-11730.

LOS, M., DROGE, W., STRICKER, K., BAEUERLE, P.A. AND SCHULZE-OSTHOFF, K. (1995) Hydrogen peroxide as a potent activator of T lymphocyte functions. *Eur. J. Immunol*. 25: 159-165.

MAIORINO, M., COASSIN, M., ROVERI, A. AND URSINI, F. (1989)Microsomal lipid peroxidation: effect of vitamin E and its functional interaction with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Lipids* 24: 721-726.

MARGOLIS, B., LI, N., KOCH, A., MOHAMMADI, M., HURWITZ, D.R., ZILBERSTEIN, A. ULLRICH, A., PAWSON, T. AND SCHLESSINGER, J. (1990) The tyrosine phosphorylated carboxyterminus of the EGF receptor is a binding site for GAP and PLC-gamma. *EMBO J*. 9: 4375-4380.

MARTINEZ, J. AND MORENO, J.J (1996) Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem. Pharmacol*. 59: 865-870.

MASAKI, N., KYLE, M. AND FARBER, J.L. (1989) *tert*-Butyl hydroperoxide kills cultures hepatocytes by peroxidizing membrane lipids. *Arch. Biochem. Biophys*. 269: 390-399.

MAYER, R.J. AND MARSHALL, L.A. (1993) New insights on mammalian phospholipase A_2 (s); comparison of arachidonoyl-selective and -nonselective enzymes. *FASEB J*. 7: 339-348.

McNICOL, A. AND SHIBOU, T.S. (1998) Translocation and phosphorylation of cytosolic phospholipase A_2 in activated platelets. *Thromb. Res*. 92: 19-26.

MEISTER, A. (1983) Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 220: 472-477.

MIN, D.S., PARK, S.K. AND EXTON, J.H. (1998) Characterization of a rat brain phospholipase D isozyme. *J. Biol. Chem*. 273: 7044-7051.

MIURA, K., SCHROEDER, J.T., HUBBARD, W.C. AND MACGLASHAN, D.W. JR(1999) Extracellular signal-regulated kinases regulate leukotriene C4 generation, but not histamine release or IL-4 production from human basophils. *J. Immunol*. 162: 4198-4206.

MIZUSHIMA, H., KUDO, I., HORIGOME, K., MURAKAMI, M., HAYAKAWA, M., KIM, D.K., KONDO, E., TOMITA, M. AND INOUE, K. (1989) Purification of rabbit platelet secretory phospholipase A_2 and its characteristics. *J. Biochem*. 105: 520-525.

MOORE, G.A., JEWELL, S.A., BELLOMO, G. AND ORRENIUS, S. (1983) On the relationship between Ca^{2+} efflux and membrane damage during t-butylhydroperoxide metabolism by liver mitochondria. *FEBS Lett*. 153: 289-292.

MORITA, I., SCHINDLER, M., REGIER, M.K., OTTO, J.C., HORI, T., DeWITT, D.L. AND SMITH, W.L. (1995) Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H syntase-1 and -2. *J. Biol. Chem*. 270: 10902-10908.

MUKAI, K., DAIFUKU, K., YOKOYAMA, S. AND NAKANO, M. (1990) Stopped-flow investigation of antioxidant activity of estrogens in solution. *Biochim. Biophys. Acta* 1035: 348-352.

MUKHERJEE, J.J., CHUNG, T., WAYS, D.K. AND KISS, Z. (1996) Protein kinase Calpha is a major mediator of the stimulatory effect of phorbol ester on phospholipase D-mediated hydrolysis of phosphatidylethanolamine. *J. Biol. Chem*. 271: 28912-28917.

NAKAMURA, T., LIN, L.-L., KHARBANDA, S., KNOPF, J. AND KUFE, D. (1992) Macrophage colony-stimulating factor activates phosphatidylcholine hydrolysis by cytoplasmic phospholipase A_2. *EMBO J.* 11: 4917-4922.

NANJI, A.A., ZHAO, S., LAMB, R.G., SADRZADEH, S.M., DANNENBERG, A.J. AND WAXMAN, D.J. (1993). Changes in microsomal phospholipases and arachidonic acid in experimental alcoholic liver injury: relationship to cytochrome P-450 2E1 induction and conjugated diene formation. *Alcohol. Clin. Exp. Res*. 17: 598-603.

NATARAJAN, V., TAHER, M.M., ROEHM, B., PARINANDI, N.L., SCHMID, H.H., KISS, Z. AND GARCIA, J.G. (1993a) Activation of endothelial cell phospholipase D by hydrogen peroxide and fatty acid hydroperoxide. *J. Biol. Chem*. 268: 930-937.

NATARAJAN, V., SCRIBNER, W.M. AND TAHER, M.M. (1993b) 4-Hydroxynonenal, a metabolite of lipid peroxidation, activates phospholipase D in vascular endothelial cells. *Free. Rad. Biol. Med.* 15: 365-375. [Published erratum appears in 1994, *Free Rad. Biol. Med*. 16: 295.

NATARAJAN, V., VEPA, S., VERMA, R.S. AND SCRIBNER, W.M. (1996) Role of protein tyrosine phosphorylation in H_2O_2-induced activation of endothelial cell phospholipase D. *Am. J. Physiol*. 271: L400-L408.

NATARAJAN, V., SCRIBNER, W.M. AND VEPA, S. (1997) Phosphatase inhibitors potentiate 4-hydroxynonenal-induced phospholipase D activation in vascular endothelial cells. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 17: 251-259.

NEMENOFF, R.A., WINITZ, S., QIAN, N.-X., PUTTEN, V., JOHNSON, G.L. AND HEASLEY, L.E. (1993) Phosphorylation and activation of a high molecular weight form of phospholipase A_2 by p42 microtubule-associated protein 2 kinase and protein kinase C. *J. Biol. Chem*. 268: 1960-1964.

NICOTERA, P., HARTZELL, P., BALDI, C., SVENSSON, S.A., BELLOMO, G. AND ORRENIUS, S. (1996a) Cystamine induces toxicity in hepatocytes through the elevation of cytosolic Ca^{2+} and the stimulation of non-lyposomal proteolitic system. *J. Biol. Chem*. 261: 14628-14635.

NICOTERA, P., HARTZELL, P., DAVIS, G. AND ORRENIUS, S. (1996b) The formation of plasma membrane blebs in hepatocytes exposed to agents that increase cytosolic Ca^{2+} is mediated by the activation of non-lyposomal proteolitic system. *FEBS Lett*. 209: 139-144.

NIKI, E., TSUCHIYA, J., KAWAKIMI, A., SAITO, M., YAMAMOTO, Y. AND KAMIYA, Y. (1985) Effects of phytyl side chain of vitamin E on its antioxidant activity. *J. Biol. Chem*. 260: 2191-2196.

NISHIZUKA, Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. [Review]. *Nature* 308: 693-698.

NOSE, K. AND OHBA, M. (1996) Functional activation of the egr-1 (early growth response-1) gene by hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 316: 381-383.

OHASHI, K., RUAN, K.-H., KULMACZ, R.J., WU, K.K. AND WANG, L.-H. (1992) Primary structure of human thromboxane synthase determined from the cDNA sequence. *J. Biol. Chem.* 267: 789-793.

ORRENIUS, S., ORMSTAD, K., THOR, H. AND JEWELL, S.A. (1983) Turnover and functions of glutathione studied with isolated hepatic and renal cells. *Fed. Proc*. 42: 3177-3188.

PACKER, J.E., SLATER, T.F. AND WILSON, R.L. (1979) Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 278: 737-738.

PACKER, L., WITT, E.H. AND TRITSCHLER, H.J. (1995) Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free. Radic. Biol. Med*. 19: 227-250.

PARK, S.K., MIN, D.S., EXTON, J.H. (1998) Definition of the protein kinase C interaction site of phospholipase D. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 244: 364-367.

PERLY, B., SMITH, I.C.P., HUGHES, L.H., BURTON, G.W. AND INGOLD, K.U. (1985) Estimation of the location of natural α-tocopherol in lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 819: 131-135.

PETERSON, G.L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. Wich is more generally aplicable. *Anal. Biochem*. 83: 346-356.

PFEFFER, L.M., STRULOVICI, B. AND SALTIEL, A.R. (1990) Interferon-a selectively activates the b isoform of protein kinase C through phosphatidylcholine hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 87: 6537-6541.

PFEILSCHIFTER, J., SCHALKWIJK, C., BRINER, V.A. AND VAN DEN BOSCH, H. (1993) Cytokine-stimulated secretion of group II phospholipase A_2 by rat mesangial cells. Its contribution to arachidonic acid release and prostaglandin synthesis by cultured rat glomerular cells. *J. Clin. Invest*. 92: 2516-2523.

PROVOST, J.J., FUDGE, J., ISRAELIT, S., SIDDIQUI, A.R. AND EXTON, J.H. (1996) Tissue specific distribution and subcellular distribution of phospholipase D in rat. Evidence for distinct RhoA- and ARF-regulated isoenzymes. *Biochem. J*. 319: 285-291.

PRZYBYTKOWSKI, E. AND AVERILL-BATES, D.A. (1996) Correlation between glutathione and stimulation of the pentose phosphate cycle in situ in Chinese hamster ovary cells exposed to hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys*. 325 91-98.

PULLA REDDY, A.CH. AND LOKESH, B.R. (1992) Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Mol. Cell. Biochem*. 111: 117-124.

QIU, Z.-H., de CARVALHO, M.G.S. AND LESLIE, C.C. (1993) Regulation of phospholipase A_2 activation by phosphorylation in mouse peritoneal macrophages. *J. Biol. Chem*. 268: 24506-24513.

QUIN, S., INAZU, T. AND YAMAMURA, H. (1995) Activation and tyrosine phosphorylation of $p72^{syk}$ as well as calcium mobilization after hydrogen peroxide stimulation in peripheral blood lymphocytes. Biochem. J. 308: 347-352.

RAO, R., BAKER, R.D. AND BAKER, S.S.(1999) Inhibition of oxidant-induced barrier disruption and protein tyrosine phosphorylation in Caco-2 cell monolayers by epidermal growth factor. *Biochem. Pharmacol*. 57: 685-695.

RAO, G.N., RUNGE, M.S. AND ALEXANDER, R.W. (1995) Hydrogen peroxide activation of cytosolic phospholipase A_2 in vascular smooth muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1265: 67-72.

RAO, V.C. AND MEHENDALE, H.M. (1993) Effect of antimitotic agent colchicine on carbon tetrachloride toxicity. *Arch-Toxicol*. 67: 392-400.

REY, A., QUARTULLI, F., ESCOUBET, L., SOZZANI, P., CAPUT, D., FERRARA, P. AND PIPY, B. (1999) IL-13 induces serine phosphorylation of $cPLA_2$ in mouse peritoneal macrophages leading to arachidonic acid and PGE_2 production and blocks the zymosan-induced serine phosphorylation of $cPLA_2$ and eicosanoid production. *Biochim. Biophys. Acta*. 1440: 183-193.

RHEE, S.G. AND BAE, Y.S. (1997) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* 272: 15045-15048.

RICHTER, C., SCHLEGEL, J. AND SCHWEIZER, M. (1992) Prooxidant-induced Ca^{2+} release from liver mitochondria. Specific versus nonspecific pathways. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 663: 262-268.

ROSSI, M.A., DI-MAURO, C., ESTERBAUER, H. FIDALE, F. AND DIANZANI, M.U. (1994) Activation of phosphoinositide-specific phospholipase C of rat neutrophils by the chemotactic aldehydes 4-hydroxy-2,3-trans-nonenal and 4-hydroxy-2,3-trans-octenal. *Cell. Biochem. Funct.* 12: 275-280.

ROSSI, M.A., FIDALE, F., GARRAMONE, A., ESTERBAUER, H. AND DIANZANI, M.U. (1990) Effect of 4-hydroxyalkenals on hepatic phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-phospholipase C. *Biochem. Pharmacol*. 309: 1715-1719.

ROTA, C., FANN, Y.C. AND MASON, R.P. (1999) Phenoxyl free radical formation during the oxidation of the fluorescent dye 2',7'-dichlorofluorescein by horseradish

peroxidase. Possible consequences for oxidative stress measurements. *J. Biol. Chem*. 274: 28161-28168.

ROYALL, J.A. AND ISCHIROPOULOS, H. (1993) Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescin and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H_2O_2 in cultures endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys*. 302: 348-355.

RUIZ-LARREA, M.B., MARTIN, C., MARTINEZ, R., NAVARRO, R., LACORT, M. AND MILLER, N.J. (2000) Antioxidant activities of estrogens against aqueous and lipophilic radicals; differences between phenol and catechol estrogens. *Chem. Phys. Lipids* 105: 179-188.

RUIZ-LARREA, M.B., LEAL, A. AND LACORT, M. (1994) Hydroxyl radical scavenging properties of estrogens and catechol estrogens. *Life Chem. Rep*. 12: 33-36.

RUIZ-LARREA, M.B., GARRIDO, M.J. AND LACORT, M. (1993) Estradiol induced effects on glutathione metabolism in rat hepatocyts. *J. Biochem*. 113: 563-567.

RUSH, G.F., GORSKI, J.R., RIPPLE, M.G., SCOWINSKI, J., BUGELSKI, P. AND HEWITT, W.R. (1985) Organic hydroperoxide-induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes. Toxicol. Appl. Pharmacol. 78: 473-483.

RUSH, G.F., YODIS, L.A. AND ALBERTS, D. (1986) Protection of rat hepatocytes from tert-butyl hydroperoxide-induced injury by catechol. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 84: 607-616.

SAKAIDA, I., THOMAS, A.P. AND FARBER, J.L. (1991) Increases in cytosolic calcium ion concentration can be dissociated from the killing of cultured hepatocytes by *tert*-butyl hydroperoxide. *J. Biol. Chem*. 266: 717-722.

SAMUELSSON, B., DAHLEN, S.E., LINDGREN, J.A., ROUZER, C.A. AND SERHAN, C.N. (1987) Leukotrienes ans lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* 237: 1171-1176.

SAPIRSTEIN, A., SPECH, R.A., WITZGALL, R. AND BONVENTRE, J.V. (1996) Cytosolic phospholipase A_2 (PLA_2), but not secretory PLA_2, potentiates hydrogen peroxide cytotoxicity in kidney epithelial cells. *J. Biol. Chem*. 271: 21505-21513.

SCOTT, D.L., WHITE, S.P., OTWINOWSKI, Z., YUAN, W., GELB, M.H. AND SIGLER, P.B. (1990) Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A_2. *Science* 250: 1541-1546.

SCHALKWIJK, C.G., de VET, E., PFEILSCHIFTER, J. AND van den BOSCH, H. (1992) Interleukin-1β and transforming growth factor-β2 enhance cytosolic high-molecular-mass phospholipase A_2 activity and induce prostaglandin E2 formation in rat mesanglial cells. *Eur. J. Biochem*. 210: 169-176.

SCHENK, H., KLEIN, M., ERDBRUGGER, W., DROGE, W. AND SCHULZE-OSTHOFF, K. (1994) Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 1672-1676.

SCHIEVELLA, A.R., REGIER, M.K., SMITH, W.L. AND LIN, L.L. (1995) Calcium-mediated translocation of cytosolic phospholipase A_2 to the nuclear envelope and endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem*. 270: 30749-30754.

SCHMIDT, K.N., AMSTAD, P., CERUTTI, P. AND BAEUERLE, P.A. (1995) The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF-kappa B. *Chem. Biol*. 2: 13-22.

SCHRECK, R., RIEBER, P. AND BAEUERLE, P.A. (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transciption factor and HIV-1. *EMBO J*. 10: 2247-2258.

SEGLEN, P.O. (1976) Preparation of isolated rat liver cells. *Meth. Cell. Biol*. 13: 29-83.

SEDLAK, J. AND LINDSAY, R.H. (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem*. 25:192-205.

SEN, C.K. AND PACKER, L. (1996) Antioxidant and redox regulation of gene transcription [see comments]. *FASEB J*. 10: 709-720.

SEN, C.K., KHANNA, S., REZNICK, A.Z., ROY, S. AND PACKER, L. (1997) Glutathione regulation of tumor necrosis factor-alpha-induced NF-kappa B activation in skeletal muscle-derived L6 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 237: 645-649.

SEVANIAN, A., WRATTEN, M.L., McLEOD, L.L. AND KIM, E. (1988) Lipid peroxidation and phospholipase A_2 activity in liposomes composed of unsaturated phospholipids: a structural basis for enzyme activation. *Biochim. Biophys. Acta* 961: 316-327.

SHACKELFORD, R.E., KAUFMANN, W.K. AND PAULES, R.S. (2000) Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free. Radic. Biol. Med*. 28: 1387-1404.

SHASBY, D.M., YOREK, M. AND SHASBY, S.S. (1988) Exogenous oxidants initiate hydrolysis of endothelial cell inositol phospholipids. *Blood* 72: 491-499.

SHORTRIDGE, R.D. AND McKAY, R.R. (1995) Invertebrate phosphatidylinositol-specific phospholipases C and their role in cell signaling. *Invertebrate Neurosci.* 1: 199-206.

SIDDIQI, A.R., SMITH, J.L., ROSS, A.H., QIU, R.-G., SYMONS, M. AND EXTON, J.H. (1995) Regulation of phospholipase D in HL60 cells. Evidence for a cytosolic phospholipase D. *J. Biol. Chem*. 270: 8466-8473.

SIES, H. AND SUMMER, K.H. (1975) Hydroperoxide-metabolizing system in rat liver. *Eur. J. Biochem*. 57: 503-512.

SIES, H. (1985) Hydroperoxides and thiol oxidants in the study of oxidative stress in intact cells and organs. In: Oxidative Stress (Ed. Sies H), pp. 73-90. Academic Press, London.

SIES, H. (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol*. 82: 291-295.

SINGER, W.D., BROWN, H.A., JIANG, X. AND STERNWEIS, P.C. (1996) Regulation of phospholipase D by protein kinase C is synergistic with ADP-ribosylation factor and independent of protein kinase activity. *J. Biol. Chem*. 271: 4504-4510.

SOBOLL, S., GRÜNDEL, S., HARRIS, J., KOLB-BACHOFEN, V., SIES, H. AND KETTERER, B. (1995) The content of glutathione and glutathione S-transferases and the glutathione peroxidase activity in rat liver nuclei determined by nonaqueous technique of liver cell fractionation. *Biochem. J*. 311: 889-894.

SOLOFF, M.S., JENG, Y.J., COPLAND, J.A., STRAKOVA, Z. AND HOARE, S. (2000) Signal pathways mediating oxytocin stimulation of prostaglandin synthesis in select target cells. *Exp. Physiol*. 85 Spec No: 51S-58S.

SONG, J., PFEFFER, L.M. AND FOSTER, D.A. (1991) v-Src increases diacylglycerol levels via a type D phospholipase-mediated hydrolysis of phosphatidylcholine. *Moll. Cell. Biol*. 11: 4903-4908.

STAAL, F.J., ANDERSON, M.T. STAAL, G.E., HERZENBERG,. L.A., GITLER, C. AND HERZENBERG, L.A. (1994) Redox regulation of signal transduction: tyrosine phosphorylation and calcium influx. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3619-3622.

STAAL, F.J., ROEDERER, M. AND HERZENBERG, L.A. (1990) Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor kappa B and transcription of human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9943-9947.

STADDON, J.M. AND HANSFORD, R.G. (1987) The glucagon-induced activation of pyruvate dehydrogenase in hepatocytes is diminished by 4beta-phorbol 12-myristate 13-acetate. A role for cytoplasmic Ca2+ in dehydrogenase regulation. *Biochem. J*. 241: 729-35.

STEVENSON, M.A., POLLOCK, S.S., COLEMAN, C.N. AND CALDERWOOD, S.K. (1994) X-irradiation, phorbol esters, and H_2O_2 stimulate mitogen-activated protein

kinase activity in NIH-3T3 cells through the formation of reactive oxygen intermediates. *Cancer Res*. 54: 12-15.

SUGA, H., MURAKAMI, M., KUDO, I. AND INOUE, K. (1993) Participation in cellular prostaglandin synthesis of type-II phospholipase A_2 secreted and anchored on cell-surface heparan sulfate proteoglycan. *Eur.J. Biochem*. 218: 807-13.

SUN, Y. AND OBERLEY, L.W. (1989) The inhibition of catalase by glutathione. *Free. Radic. Biol. Med*. 7: 595-602.

SUNDARESAN, M., YU, Z.-X., FERRANS, V.J., IRANI, K. AND FINKEL, T. (1995) Requirement of generation of H_2O_2 for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 270: 296-299.

TAHER, M.M., GARCIA, J.G.N. AND NATARAJAN, V. (1993) Hydroperoxide-induced diacylclycerol formation and protein kinase C activation in vascular endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys*. 303: 260-266.

TAKAHASHI, T., UENO, H. AND SHIBUYA, M. (1999) VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene* 18: 2221-2230.

TAKAHASHI, K.-I., TAGO, K., OKANO, H., OHYA, Y., KATADA, T. AND KANAHO, Y. (1996) Augmentation by calmodulin of ADP-ribosylation factor-stimulated phospholipase D activity in permeabilized rabbit peritoneal neutrophils. *J. Immunol*. 156: 1229-1234.

TAKAKURA, K., BECKMAN, J.S., CROW, L.A. AND CROW J.P. (1999) Rapid and irreversible inactivation of protein tyrosine phosphatases PTP1B, CD45, and LAR by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys*. 369: 197-207.

TAYLOR, B.M., FLEMING, W.E., BENJAMIN, C.W., WU, Y., MATHEWS, W.R. AND SUN, F.F. (1996)The mechanism of cytoprotective action of lazaroids I: Inhibition of reactive oxygen species formation and lethal cell injury during periods of energy depletion.*J. Pharmacol. Exp. Ther*. 276: 1224-1231.

THOR, H., HARTZELL, P. AND ORRENIUS, S. (1984) Potentiation of oxidative cell injury in hepatocytes which have accumulated Ca^{2+}. *J. Biol. Chem*. 259: 6612-6615.

TONG, L.J., DONG, L.W. AND LIU, M.S. (1998) GTP-binding protein mediated phospholipase A_2 activation in rat liver during the progression of sepsis. *Mol. Cell. Biochem*. 189: 55-61.

TRAENCKNER, E.B.-M., PAHL, H.L., SCHMIDT, K.N., WILK, S. AND BAEUERLE, P.A. (1995) Phosphorylation of human IkB-α on serines 32 and 36 controls IkB-α proteolysis and NF-kB activation in response to diverse stimuli. *EMBO J*. 14: 2876-2883.

UCHIDA, K., SHIRAISHI, M., NAITO, Y., TORII, Y., NAKAMURA, Y. AND OSAWA, T. (1999) Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *J. Biol. Chem*. 274: 2234-2242.

UINGS, I.J., THOMPSON, N.T., RANDALL, R.W., SPACEY, G.D., BONSER, R.W., HUDSON, A.T. AND GARLAND, L.G. (1992) Tyrosine phosphorylation is involved in receptor coupling to phospholipase D but not phospholipase C in the human neutrophil. *Biochem. J*. 281: 597-600.

Van BLITTERSWIJK, W.J., HILKMANN, H., de WIDT, J. AND van der BEND, R.L. (1991) Phospholipid metabolism in bradykinin-stimulated human fibroblasts. II. Phosphatidylcholine breakdown by phospholipases C and D; involvement of protein kinase C. *J. Biol. Chem*. 266: 10344-50

VOLK, T., HENSEL, M. AND KOX, W.J. (1997) Transient Ca^{2+} changes in endothelial cells induced by low doses of reactive oxygen species: role of hydrogen peroxide. *Mol. Cell. Biochem*. 171: 11-21.

WAHL, M.I., JONES, G.A., NISHIBE, S., RHEE, S.G. AND CARPENTER, G. (1992) Growth factor stimulation of phospholipase C-γ1 activity. J. Biol. Chem. 267: 10447-10456.

WANG, H., HARRISON-SHOSTAK, D.C., LEMASTERS, J.J. AND HERMAN, B. (1996) Contribution of pH-dependent group II phospholipase A2 to chemical hypoxic injury in rat hepatocytes. FASEB J. 10: 1318-1325.

WATERMAN, W.H. AND SHA'AFI, R.I. (1995) A mitogen-activated protein kinase independent pathway involved in the phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A_2 in human neutrophils stimulated with tumor necrosis factor-alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 209: 271-278.

WEGLICKI, W.B. AND MAK, I.T. (1992) Antioxidant drug mechanisms: transition metal-binding and vasodilation. *Mol. Cell. Biochem*. 118: 105-111.

WEI, E.P., KONTOS, H.A. AND BECKMAN, J.S. (1996) Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Am. J. Physiol*. 271: H1262-H1266.

WHISLER, R.L., GOYETTE, M.A., GRANTS, I.S. AND NEWHOUSE, Y.G. (1995) Sublethal levels of oxidant stress stimulate multiple serine/threonine kinases and suppress protein phosphatases in Jurkat T cells. Arch. Biochem. Biophys. 319: 23-35.

WIJKANDER, J. AND SUNDLER, R. (1991) An 100-kDa arachidonate-mobilizing phospholipase A_2 in mouse spleen and the macrophage cell line J774. *Eur. J. Biochem*. 202: 873-880.

WISSING, D., MOURITZEN, H., EGEBLAD, M., POIRIER, G.G. AND JAATTELA, M. (1997) Involvement of caspase-dependent activation of cytosolic phospholipase A_2 in tumor necrosis factor-induced apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94 5073-5077.

XING, M. AND MATTERA, R. (1992) Phosphorylation-dependent regulation of phospholipase A_2 by G-proteins and Ca^{2+} in HL-60 granulocytes. *J. Biol. Chem*. 267: 25966-25975.

XUE, D., XU, J., MCGUIRE, S.O., DEVITRE, D. AND SUN, G.Y. (1999) Studies on the cytosolic phospholipase A2 in immortalized astrocytes (DITNC) revealed new properties of the calcium ionophore, A23187. *Neurochem. Res*. 24: 1285-1291.

YURCHAK, L.K., HARDWICK, J.S., AMREIN, K., PIERNO, K. AND SEFTON, B.M. (1996) Stimulation of phosphorylation of tyr^{394} by hydrogen peroxide reactivates biologically inactive, non-membrane-bound forms of Lck. J. Biol. Chem. 271: 12549-12554.

ZOR, U., FERBER, E., GERGELY, P., SZÜCS, K., DOMBRADI, V. AND GOLDMAN, R. (1993) Reactive oxygen species mediate phorbol ester-regulated tyrosine phosphorylation and phospholipase A_2 activation: potentiation by vanadate. Biochem. J. 295: 879-888.