



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS

**ACCION CITOPROTECTORA DE HERP AL ESTRÉS
OXIDATIVO: REGULACION DE LOS NIVELES DEL
RECEPTOR DE INOSITOL TRISFOSFATO**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al grado de Doctor en Bioquímica por:**

FELIPE IGNACIO PAREDES DÍAZ

Directores de Tesis

Dr. Enrique Jamovich Pérez

Dr. Sergio Lavandero González

SANTIAGO- CHILE

2015

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

Felipe Ignacio Paredes Díaz

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendido el día _____ de _____ del _____.

Directores de Tesis:

Dr. Sergio Lavandero _____

Dr. Enrique Jaimovich _____

Comisión Informante de Tesis:

Dra. Cecilia Rojas (Presidenta) _____

Dra. Cecilia Vergara _____

Dr. Felipe Barros _____

***Dedicada a mi hijo.
Los problemas de la vida,
se resuelven con una sonrisa***

Esta tesis de doctorado se llevó a cabo en los Laboratorios de Transducción de Señales Moleculares dirigido por el Dr. Sergio Lavandero y de Fisiología de Células Musculares, dirigido por el Dr. Enrique Jaimovich. Los estudios en el modelo animal se realizaron en el Departamento de Cardiología de la Universidad de Emory, Atlanta, USA bajo la dirección de la Dra. Alejandra San Martín.

Para su realización, este trabajo contó con el apoyo y financiamiento de los siguientes proyectos:

- Beca CONICYT 2010 - 2014 (a FPD)
- Beca de Apoyo a la Realización de Tesis Doctoral 24121057, CONICYT, año 2012 - 2014 (a FPD)
- Beca de pasantía de la Universidad de Chile (a FPD)
- Proyecto FONDAP 15130011 (a SL)

Producción científica de la Tesis

a) Revistas:

- Quiroga C, Gatica D, **Paredes F**, Bravo R, Troncoso R, Pedrozo Z, Rodriguez AE, Toro B, Chiong M, Vicencio JM, Hetz C, Lavandero S. Herp depletion protects from protein aggregation by up-regulating autophagy. *Biochim Biophys Acta*. 1833:3295-305, 2013.
- Bravo R, Parra V, Gatica D, Rodriguez AE, Torrealba N, **Paredes F**, Wang ZV, Zorzano A, Hill JA, Jaimovich E, Quest AF, Lavandero S. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *Int Rev Cell Mol Biol*. 301:215-90, 2013.
- Bravo R, Gutierrez T, **Paredes F**, Gatica D, Rodriguez AE, Pedrozo Z, Chiong M, Parra V, Quest AF, Rothermel BA, Lavandero S. Endoplasmic reticulum: ER stress regulates mitochondrial bioenergetics. *Int J Biochem Cell Biol*. 44:16-20, 2012
- Bravo-Sagua R, Torrealba N, **Paredes F**, Morales PE, Pennanen C, López-Crisosto C, Troncoso R, Criollo A, Chiong M, Hill JA, Simmen T, Quest AF, Lavandero S. Organelle communication: Signaling crossroads between homeostasis and disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 50:55-9, 2014
- Morales PE, Torres G, Sotomayor-Flores C, Peña-Oyarzún D, Rivera-Mejías P, **Paredes F**, Chiong M. GLP-1 promotes mitochondrial metabolism in vascular smooth muscle cells by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria coupling. *Biochem Biophys Res Commun*. 28; 446:410-6, 2014.
- Troncoso R, **Paredes F**, Parra V, Gatica D, Vázquez-Trincado C, Quiroga C, Bravo-Sagua R, Lopez-Crisosto C, Rodriguez AE, Oyarzun AP, Kroemer G, Lavandero S. Dexamethasone-induced autophagy mediates muscle atrophy through mitochondrial clearance. *Cell Cycle*.13:2281-95, 2014.

- **Paredes F**, Gatica D, Troncoso R, Parra V, Bravo R, Torrealba N, Navarro M, Pennanen C, Quiroga C, Chiong M, Caesar C, San Martin A, Jaimovich E, Lavandero S. HERPUD1 protects against oxidative stress-induced cell death by increasing in the degradation of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor. Manuscrito en revisión.
- **Paredes F**, Torrealba N, Parra V, Bravo R, Troncoso R, Gatica D, Navarro M, Pennanen C, Fernandez C, Quiroga C, Chiong M, San Martin A, Jaimovich E, Lavandero S. HERPUD1 regulates mitochondrial metabolism. Manuscrito en preparación.

b) Libros:

- Troncoso R, Vasquez-Trincado C, Del Campo A, Gatica D, Morales P, **Paredes F**, Gutierrez T, Lopez-Crisosto C, Torrealba N, Garcia L, Diaz-Araya G. Battiprolu PK, Nemchenko A, Ferdous A, Gillette TG, Hill JA, Lavandero S. Regulation of autophagy by insulin/IGF-1 signaling pathways. Nova Science Publishers, Inc 9: 1-19, 2011.

c) Congresos nacionales e internacionales:

- **Paredes F**, Gatica D, Quiroga C, Parra V, Bravo R, Troncoso R, Torrealba N, Navarro M, Jaimovich E, Lavandero S. Herp cytoprotective effect against oxidative stress XXXIV Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Septiembre 27-30, 2011, Valdivia, Chile.
- **Paredes F**, Gatica D, Quiroga C, Parra V, Bravo R, Troncoso R, Torrealba N, Navarro M, Jaimovich E, Lavandero S. Herp cytoprotective effect against oxidative stress through regulation of the inositol trisphosphate receptor (IP3R). XXXV Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Octubre 2-5, 2012, Puerto Varas, Chile.

- **Paredes F**, Gatica D, Quiroga C, Parra V, Bravo R, Troncoso R, Torrealba N, Navarro M, Jaimovich E, Lavandero S. Herp cytoprotective effect against oxidative stress. XXXVI Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Noviembre 14-19, 2013, Puerto Varas, Chile
- **Paredes F**, Gatica D, Quiroga C, Parra V, Bravo R, Troncoso R, Torrealba N, Navarro M, Jaimovich E, Lavandero S. Herp cytoprotective effect against oxidative stress through regulation of the inositol trisphosphate receptor (IP3R). Annual meeting American Society for Cell Biology. December 14-18 2013, New Orleans, USA.
- **Paredes F**, Gatica D, Quiroga C, Parra V, Bravo R, Troncoso R, Torrealba N, Navarro M, Jaimovich E, Lavandero S. Herp cytoprotective effect against oxidative stress through regulation of the inositol trisphosphate receptor. XXXVII Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Septiembre 30 - Octubre 4, 2014, Puerto Varas, Chile.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas las personas que hicieron posible el desarrollo y término de esta tesis:

Al Dr. Sergio Lavandero, por darme la guía necesaria para poder desarrollar esta tesis, aportar siempre con ideas novedosas y presionarme para mejorar día a día.

Al Dr. Enrique Jaimovich, por ser un aporte fundamental para el desarrollo de esta tesis, su vasta experiencia me sirvió para crecer como científico y profesional.

A Don Fidel y la Sra. Gindra que siempre estuvieron para brindarme una mano cuando más lo necesite.

A mis compañeros de Laboratorio en especial al grupo cobra por que siempre recibí buenas críticas y apoyo de parte de todos en general, fue un gusto poder desenvolverme en un ambiente de trabajo grato durante todos estos años.

A los amigos que forme en el Laboratorio, Vale, Roberto, Oveja, Rodrigo, Andrea, Cesar, Cristian, Pablo, Damián, Natalia, Mario, Carolina, Arieles, Carlos, Ignacio, Francisco, Sandra y Ruth, por estar conmigo no tan solo en las instancias profesionales sino que por que fueron mis amigos, me apoyaron y acompañaron en distintas instancias de la vida.

Al grupo la célula por causar caos conmigo durante tanto tiempo, por ser amigos de verdad de esos que se mantienen para toda la vida.

A mis amigos de la vida, los que se quedaron en Concepción y los que estuvieron en Santiago, nuestra amistad se mantuvo aunque cada uno siguió su propio camino ojala que se siga manteniendo así por toda la vida.

Agradezco al igual que en todos los logros de mi vida a mi familia, mis padres, hermanas, tíos, primos, abuelos y a mi sobrina, porque siempre han creído en mí y me han apoyado de forma incondicional, son mi fuerza para mejorar el día a día.

Agradezco a mi esposa, Paola Merino, por ser la compañera de mi vida, la persona a quien más amo y que siempre me ha apoyado, la que cree que soy un súper hombre y me hace sentir así, gracias por tu paciencia y ayuda sin ti nada esto hubiera sido el doble de complicado. Te amo.

Finalmente a mi hijo, el que le da sentido a mi vida, tu llegada marca el inicio de mi programa de Doctorado y un nuevo inicio en mi vida, contigo he aprendido más que con cualquiera, eres mi inspiración y mi fuerza.

INDICE GENERAL	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	13
ABREVIATURAS	17
RESUMEN	20
SUMMARY	22
1. INTRODUCCIÓN	24
1.1 ROS	24
1.2. Calcio	28
1.3. Metabolismo energético	30
1.4. Muerte celular: apoptosis	32
1.5. Herp: regulación y función	34
2. HIPÓTESIS	39
3. OBJETIVO GENERAL	39
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
5. MATERIALES Y MÉTODOS	40
5.1. Reactivos	40
5.2. Modelo experimental celular	40
5.3. Modelo animal	41
5.4. Producción de células Hela knock-down (KD) para Herp	41
5.5. Sobreexpresión de Herp	41
5.6. Extracción de RNA, transcripción reversa y PCR en tiempo real	42
5.7. Preparación de extractos celulares totales	44
5.8. Electroforesis en geles de poliacrilamida	44
5.9. Electrotransferencia de proteínas	45
5.10. Western blot	45
5.11. Citometría de flujo	45
5.12. Medición de Ca ²⁺ intracelular	46

5.13. Inmunofluorescencia indirecta	47
5.14. Medición de niveles intracelulares de ATP mediante luminometría	47
5.15. Oxigrafía de Clark	48
5.17. Análisis estadístico	49
6 .RESULTADOS	50
6.1. La proteína Herp aumenta su expresión en células Hela tratadas con H ₂ O ₂ de forma dependiente del tiempo y concentración	50
6.2. Herp aumenta su expresión en respuesta al estrés oxidativo a tiempos cortos por un mecanismo dependiente de la traducción	55
6.3. Angiotensina II aumenta expresión de Herp por mecanismo dependiente de la generación intracelular de ROS	58
6.4. Herp aumenta su expresión en animales tratados con angiotensina II	59
6.5. El silenciamiento de Herp altera la cinética del Ca ²⁺ intracelular generada por H ₂ O ₂ en células Hela	64
6.6. El silenciamiento de Herp altera la cinética del Ca ²⁺ mitocondrial generada por H ₂ O ₂ en células Hela	65
6.7. Las células Sh-Herp tienen más IP3R que las células controles	66
6.8. Papel citoprotector de Herp frente al tratamiento con H ₂ O ₂	74
6.9. El efecto de la depleción de Herp en la supervivencia celular: rol del Ca ²⁺	82
6.10. IP3R participa en la muerte de las células carentes de Herp inducida por H ₂ O ₂	82
6.11. Las células Sh-Herp son más sensibles a la muerte producida por H ₂ O ₂ por pérdida en la permeabilidad de la membrana mitocondrial.	85
6.12. Herp regula el metabolismo energético de la célula Hela	89
6.13. Reexpresión de Herp revierte los efectos metabólicos en células Sh-Herp	93
6.14. Herp regula la función mitocondrial a través regulación del Ca ²⁺ intracelular por regulación del IP3R	93

6.15. Células Sh-Herp presentan una caída en el potencial mitocondrial debido a una mayor apertura del PTM	96
6.16. Las células Sh-Herp son más sensibles a los antineoplásicos que las células controles	100
7. DISCUSIÓN	105
8. MODELO FINAL Y PROYECCIONES	119
9. CONCLUSIONES	121
10. BIBLIOGRAFÍA	122
11. FIGURAS SUPLEMENTARIAS	136

ÍNDICE DE FIGURAS	Página
Figura 1. Papel del estrés oxidativo y Ca^{2+} en la muerte celular	33
Figura 2. Herp	38
Figura 3. Aumento de los niveles totales de Herp inducido por el tratamiento con H_2O_2 en células Hela	51
Figura 4. Rápido aumento de los niveles totales de Herp inducido en células Hela tratadas con H_2O_2	52
Figura 5. Aumento de los niveles totales de Herp inducido por el tratamiento con H_2O_2 en células Hela y MEF	53
Figura 6. Aumento de los niveles de mRNA de Herp en células Hela tratadas con H_2O_2	54
Figura 7. El aumento de los niveles totales de Herp inducido por H_2O_2 es prevenido por CHX	56
Figura 8. El aumento de los niveles totales de Herp inducido por el tratamiento con H_2O_2 es prevenido por 4EGI-1	57
Figura 9. Ang II aumenta los niveles de peróxido intracelular en células Hela	60
Figura 10. Aumento de los niveles totales de Herp inducido por Ang II en células Hela	61
Figura 11. Ang II aumenta los niveles de mRNA de Herp en células Hela tratadas con Ang II	62

Figura 12. Efecto de Ang II en los niveles del mRNA de Herp en células musculares lisas de aorta de ratones silvestres (wild type) y que sobreexpresan catalasa	63
Figura 13. Células Sh-Herp presentan una cinética de Ca^{2+} diferencial en respuesta al H_2O_2 , la cual depende parcialmente del IP3R	68
Figura 14. Cinética de Ca^{2+} en células Sh-Herp expuestas a H_2O_2 presentan dos componentes: Ca^{2+} liberado a través del IP3R y Ca^{2+} externo	69
Figura 15. Células Sh-Herp presentan un mayor influjo de Ca^{2+} mitocondrial respuesta a H_2O_2 dependientes del IP3R	70
Figura 16. Las células Sh-Herp presentan un mayor influjo de Ca^{2+} mitocondrial en respuesta a un pulso de histamina dependiente del IP3R	71
Figura 17. Células Hela Sh-Herp tienen más IP3R en comparación a las células controles	72
Figura 18. La mayor cantidad de IP3R en las células Hela Sh-Herp se debe a una menor degradación del receptor por la vía proteosomal	73
Figura 19. Células Hela Knock down para Herp (Sh-Herp) son más sensibles a la muerte producida por H_2O_2	75
Figura 20. Células Hela Knock down para Herp (Sh-Herp) son más sensibles a la muerte producida por diferentes concentraciones de H_2O_2	76
Figura 21. Células Hela Sh-Herp son menos sensibles al tratamiento con H_2O_2 cuando recuperan los niveles normales de Herp	77

Figura 22. Células Hela knock down para Herp (Sh-Herp) son más sensibles al H ₂ O ₂ por una vía dependiente de la activación de caspasas y calpaina	79
Figura 23. Células Herp (Sh-Herp) son más sensibles a la muerte producida por H ₂ O ₂ por apoptosis.	80
Figura 24. Células Herp (Sh-Herp) no mueren de forma diferencial a las células Sh-Luc via necrosis.	81
Figura 25. Células Hela Sh-Herp son menos sensibles al tratamiento con H ₂ O ₂ cuando son preincubadas con BAPTA-AM	83
Figura 26. Células Herp (Sh-Herp) son más sensibles a la muerte producida por H ₂ O ₂ por un mecanismo dependiente del IP3R	84
Figura 27. Células Herp (Sh-Herp) son más sensibles a la muerte producida por H ₂ O ₂ por un mecanismo dependiente de la apertura del PTM.	87
Figura 28. Células Herp (Sh-Herp) son más sensibles a la muerte producida por H ₂ O ₂ por desregulación del IP3R y pérdida de la permeabilidad mitocondrial	88
Figura 29. Herp regula el metabolismo mitocondrial	91
Figura 30. Células Hela Sh-Herp no presentan cambios significativos en la cantidad de mtHSP70 en comparación a las células controles	92
Figura 31. La recuperación de los niveles de Herp en células Sh-Herp revierte los cambios en el metabolismo mitocondrial	94
Figura 32. Sobreexpresión de Herp en células Hela Wt afecta el metabolismo mitocondrial en forma contraria a lo descrito en las células Sh-Herp	95

Figura 33. Herp regula el metabolismo mitocondrial por un mecanismo dependiente del Ca^{2+} intracelular	97
Figura 34. Herp regula el metabolismo mitocondrial por un mecanismo dependiente del IP3R	98
Figura 35. Células Sh-Herp presentan una caída en el potencial mitocondrial debido a una mayor apertura del PTM	99
Figura 36. Células Hela Sh-Herp son más sensibles al tratamiento con antineoplásicos que las células controles	102
Figura 37. Células U2OS Sh-Herp presentan un mayor consumo de oxígeno que las células U2OS controles	103
Figura 38. Células U2OS Sh-Herp son más sensibles al tratamiento con antineoplásicos que las células controles	104
Figura 39. La proteína Herp aumenta su expresión en respuesta al H_2O_2 por mecanismos traduccional y transcripcional	109
Figura 40. Herp ejerce un efecto citoprotector frente al estrés oxidativo por regulación de la liberación de Ca^{2+} vía IP3R	114
Figura 41. Herp regula el metabolismo mitocondrial por regulación de los niveles de IP3R	117
Figura 42. Células Sh-Herp proliferan menos y son más sensibles a la muerte producida por los antineoplásicos	118
Figura 43. Modelo final	120

ABREVIATURAS

AMP	: Monofosfato de adenosina
Act D	: Actinomicina D
ANT	: Translocador de nucleótidos de adenina
ANG II	: Angiotensina II
APS	: Persulfato de amonio
ATF6	: Factor de transcripción activador 6
ATG5	: Proteína de la autofagia 5
ATPs	: ATP sintasa
BAPTA-AM	: 1,2-Bis (2-aminophenoxy) ethane-N, N, N', N'-tetraacetic acid tetrakis (acetoxymethyl ester)
CsA	: Ciclosporina A
CCCP	: Carbonil-cianuro-3-clorofenilhidrazona
CHOP	: C/EBP-homologous protein
CHX	: Cicloheximida
CREB	: cAMP response element-binding
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO	: Dimetil sulfóxido
ADN	: Ácido desoxirribonucleico
ADNc	: Hebra de ADN complementario
ECL	: Enhanced chemiluminescence
EDTA	: Ácido etilendiaminotetraacético
eIF4E	: Factor de iniciación de la traducción eucariota 4 gamma
ERAD	: ER-associated protein degradation
ERSE	: Elemento de respuesta al estrés de retículo endoplasmico
FADH ₂	: Forma oxidada del dinucleótido de flavina-adenina
FBS	: Suero fetal bovino
GAPDH	: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GFP	: Proteína fluorescente verde
GSH	: Glutación
HERP	: Homocysteine-responsive endoplasmic reticulum-resident protein

HERPUD1	: Homocysteine-responsive endoplasmic reticulum-resident ubiquitin-like domain member 1 protein
HDR1	: ERAD-associated E3 ubiquitin-protein ligase
IP3R	: Receptor de inositol 1,4,5- trifosfato.
K.O	: <i>Knock out</i>
K.D	: <i>Knock down</i>
MAMs	: Membranas asociadas a mitocondrias
MCU	: Uniporter de Ca ²⁺ mitocondrial
MEF	: Mouse embryonic fibroblast
Mg132	: Carbobenzoxy-Leu-Leu-leucina
mtHsp70	: Proteína " <i>heat shock</i> " -70 de la mitocondria
NADH	: Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	: Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reducido
NNT	: Nicotinamide nucleotide transhydrogenase
NOX	: NADPH oxidasa
OXPHOS	: Fosforilación oxidativa
PBS	: Tampón fosfato salino
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
PDH	: Piruvato deshidrogenasa
PI	: Ioduro de propidio
PI3-K	: Fosfatidilinositol 3-kinasa
PKC	: Proteína kinasa C
PMSF	: p-Fenilmetilsulfonilfluoruro
PTM	: Poro de transición mitocondrial.
qPCR	: PCR cuantitativo
RE	: Retículo endoplásmico
REDOX	: óxido-reducción
RNA	: Ácido ribonucleico
RNAi	: RNA de interferencia
ROI	: Región óptica de interés
ROS	: Especies reactivas del oxígeno
RPL	: Ribosomal protein L13a
SDS	: Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE	: Gel de poliacrilamida desnaturalante
SEM	: Error estándar de la media
Sh-Herp	: Short hairpin de Herp
Sh-Luc	: Short hairpin de Luciferasa
SOD	: Superóxido dismutasa
TBS	: Tampón tris salino
TEMED	: N, N, N', N'-tetrametil-etilendiamina
TMRM	: Tetrametilrodamina metil éster
Tris	: Tris-(hidroximetil)-aminoetano
ULD	: Dominio similar al de ubiquitina
UPR	: Unfolded protein response
VDAC	: Canal aniónico dependiente de voltaje
WT	: Cepa silvestre o " <i>wild type</i> "
XeB	: Xestospongina B
ZVAD	: Z-Val-Ala-Asp
Ψ_{mt}	: Potencial de membrana mitocondrial
[ATP] _i	: Niveles intracelulares de ATP
4EGI-1	: inhibidor de la interacción eIF4E/eIF4G
1,2,3 DHR	: Dihidrorodamina 1,2,3

RESUMEN

Herp es una proteína residente de la membrana del retículo endoplásmico que regula la degradación de proteínas a través del proteosoma. Este efecto lo ejerce principalmente regulando la formación del complejo de degradación de proteínas asociado al retículo endoplásmico (ERAD). Además, Herp se ha vinculado con la regulación del Ca^{2+} intracelular y citoprotección frente al estrés de retículo. Se desconoce si Herp tiene un efecto citoprotector frente al estrés oxidativo y los mecanismos por los cuales podría ejercer esta función.

En esta tesis se planteó como hipótesis de trabajo que *“Herp es una proteína inducida por H_2O_2 que regula la sobrevivencia celular, modulando la degradación del receptor de IP_3 y la transferencia de Ca^{2+} a la mitocondria”*. Para probar esta hipótesis se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Establecer si el H_2O_2 estimula la expresión de Herp en células Hela.
- Determinar si Herp regula los niveles intracelulares de Ca^{2+} dependientes de H_2O_2
- Determinar si Herp regula el traspaso de Ca^{2+} del retículo endoplásmico a la mitocondria por modulación del IP_3R , en células Hela expuestas a H_2O_2 .
- Establecer si Herp tiene un papel citoprotector frente al H_2O_2 por regulación del Ca^{2+} intracelular.

Los resultados mostraron que Herp aumenta sus niveles frente a el tratamiento con H_2O_2 en forma rápida, antes de los 30 min post estímulo, por un mecanismo transcripcional y traduccional. Esta respuesta es importante para la sobrevivencia celular frente a agentes que producen estrés oxidativo. Las células que poseen bajos niveles de la proteína Herp son más sensibles a la muerte producida por H_2O_2 que las células controles. También las células con menores niveles de Herp presentaron cinéticas de Ca^{2+} intracelular y mitocondrial diferentes en respuesta al H_2O_2 , comparado con los controles. Estos cambios se debieron a una desregulación en los niveles del IP_3R dado que Herp reguló su degradación a través de la vía proteosomal. Nuestros resultados sugieren que Herp mantiene los niveles normales de IP_3R , regulando así la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria. De este modo, Herp evita la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial, apertura del poro de

transición mitocondrial y posterior apoptosis en respuesta a estímulos nocivos como el H_2O_2 .

Junto con lo anterior, nuestros estudios mostraron que Herp regula el metabolismo mitocondrial, lo cual tienen repercusiones en la proliferación celular y la sensibilidad de las células a antineoplásicos. Las células HeLa con bajos niveles de Herp mostraron un metabolismo mitocondrial aumentado por un mayor influjo de Ca^{2+} mitocondrial vía IP3R. Estas células basalmente presentaron mayores niveles del IP3R. Tanto células HeLa como células U2OS con bajos niveles de la proteína Herp presentaron una mayor sensibilidad a la muerte frente a una batería de antineoplásicos, probablemente producto de los cambios metabólicos anteriormente mencionados. Estos resultados sugieren que la proteína Herp podría ser un posible blanco terapéutico contra el cáncer.

En resumen, Herp regula los niveles del IP3R de forma basal en las células HeLa, de esta manera mantiene la homeostasis del Ca^{2+} mitocondrial, regulando la apertura del poro de transición mitocondrial y la función mitocondrial. En ausencia de la proteína ocurre una desregulación en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular y mitocondrial, lo que produce aumentos de la actividad mitocondrial y mayor sensibilidad de las células a agentes nocivos como el H_2O_2 y quimioterapéuticos.

SUMMARY

Herp is a resident membrane protein of the endoplasmic reticulum (ER) that regulates protein degradation via proteasome. This effect is primarily done by regulating the formation of the ER-associated protein degradation (ERAD) complex. In addition, Herp regulates intracellular Ca^{2+} levels and stimulates cytoprotection against ER stress. It is unknown whether Herp protects against oxidative stress and the molecular mechanisms involved in this action.

Our working hypothesis was "*Herp is a H_2O_2 -inducible protein that regulates cell survival by modulating IP3 receptor degradation and transfer of Ca^{2+} into mitochondria*". To test this, the following specific objectives were established:

- To assess whether H_2O_2 stimulates Herp expression in HeLa cells.
- To determine if Herp regulates H_2O_2 -dependent intracellular Ca^{2+} levels.
- To evaluate whether Herp regulates Ca^{2+} transfer from the ER to mitochondria by modulating IP3R in HeLa cells exposed to H_2O_2 .
- To assess if Herp has a cytoprotective role against H_2O_2 by regulating intracellular Ca^{2+} levels.

The results showed that the Herp levels rapidly increase in response to exogenous H_2O_2 by a mechanism involving transcriptional and translational regulation. This response was important for cell survival against agents producing oxidative stress. Cells with low levels of protein Herp exposed to H_2O_2 were more sensitive to die than controls, showing a different intracellular and mitochondrial Ca^{2+} kinetics and desregulation of IP3 receptor levels. Our results suggest that Herp maintains normal levels of IP3R, thus regulating Ca^{2+} entry to the mitochondria. Thus Herp seems to prevent mitochondrial Ca^{2+} overload, mitochondrial transition pore opening and apoptosis in response to H_2O_2 .

HeLa cells with low mitochondrial metabolism Herp depicted increased mitochondrial Ca^{2+} influx via IP3 receptors. These cells had higher baseline levels of IP3R. Both HeLa and U2OS cells with low Herp levels depicted a higher sensitivity to antineoplastic drugs due to

the aforementioned metabolic changes. These results suggest that the Herp protein could be a potential therapeutic target for cancer.

In summary, Herp regulates IP3 receptor basal levels in HeLa cells maintaining mitochondrial Ca^{2+} homeostasis and thereby regulating mitochondrial transition pore opening and cell survival.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ROS

Los niveles fisiológicos de especies reactivas del oxígeno (ROS) se asocian con mecanismos de regulación de transcripción génica, vías de señalización y la respuesta defensiva frente a patógenos infecciosos (Chetsawang *et al*, 2008). Sin embargo, una excesiva producción de ROS o disminución de las defensas antioxidantes en la célula conducen al proceso conocido como “estrés oxidativo”, caracterizado por producir daño a moléculas intracelulares y organelos y teniendo como consecuencia final la muerte de célula por apoptosis o necrosis (D’Auréaux *et al*, 2007). El estrés oxidativo tiene un papel clave en patologías como la diabetes mellitus, infarto del miocardio, enfermedades hepáticas, cáncer, neurodegeneración y envejecimiento (Martindale *et al*, 2002).

Las ROS incluyen a una serie de moléculas derivadas del oxígeno caracterizadas por contener electrones desapareados o radicales libres (D’Auréaux *et al*, 2007). Las especies más conocidas son el ión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\bullet OH$) y el óxido nítrico (NO) (Kohen *et al*, 2002; Decuypere *et al*, 2011). Estos compuestos son generados principalmente en la membrana interna mitocondrial o por enzimas endógenas como flavoenzimas, xantino oxidasa, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, glucosa oxidasa, óxido nítrico sintasa y metales de transición (Kohen *et al*, 2002; Decuypere *et al*, 2011). Las ROS son neutralizadas por sistemas enzimáticos entre los que se cuentan a la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPT), catalasa, tioredoxina reductasa o por compuestos químicos captadores de radicales libres como el glutatión y otros agentes antioxidantes (Kohen *et al*, 2002; D’Auréaux *et al*, 2007; Decuypere *et al*, 2011).

Las ROS modifican los residuos de cisteína (Cys) en las proteínas, siendo el H_2O_2 uno de los principales agentes oxidantes. Estas modificaciones conducen a cambios estructurales en las proteínas que pueden activar o inactivar su función enzimática, producir pérdida o ganancia de afinidad entre proteínas, etc. (D’Auréaux *et al*, 2007). Las modificaciones producidas en las cisteínas son derivadas de la formación del ácido sulfénico (-SOH), el cual puede reaccionar con otro grupo -SOH y estabilizarse, o

reaccionar con otras ROS para generar $-SO_2H$ y $-SO_3H$, los cuales son más reactivas que el $-SOH$. Alternativamente, los residuos de cisteína pueden formar puentes disulfuro por oxidación, por lo que las ROS pueden estimular la generación de nuevos puentes disulfuros dentro de la proteína o entre proteínas cercanas. Otra opción es la glutationilación de proteínas por formación de puentes disulfuro entre las proteínas y el glutatión (GSH). Por último, las especies reactivas derivadas del nitrógeno (RNS) también son radicales con capacidad oxidante y que pueden nitrosilar proteínas (Chetsawang *et al*, 2008). Dada la naturaleza reversible de varias de estas modificaciones, el estrés oxidativo puede regular vías transduccionales de manera análoga a como ocurre con la modificación covalente de proteínas por fosforilación/desfosforilación (Kiley *et al*, 2004).

Las principales fuentes de ROS intracelular son la producción por parte de la familia NADPH oxidasas (NOXs) y la producción de ROS mitocondrial. La familia de las NOXs son proteínas de transmembrana que transportan electrones a través de las membranas biológicas, y que tienen como función reducir el oxígeno al ión superóxido. Esta familia está formada por variados integrantes entre los que se cuentan a NOX1, NOX2 (también conocida como gp91phox), NOX3, NOX4, NOX5, Duox1 y Duox2 (Cheng *et al*, 2001; Geiszt, 2006; Bedard *et al*, 2007; Jiang *et al*, 2011). Las NOXs cumplen una importante función en la señalización intracelular y la respuesta de la célula frente a distintos tipos de estímulos tanto intracelulares como externos. Algunos ejemplos son su participación en vías de señalización de repuestas de adaptación y tolerancia frente a distintos tipos de estrés, de sobrevivencia, diferenciación, proliferación celular, reparación de tejidos, angiogénesis, muerte vía necrosis y apoptosis, etc. (Cheng *et al*, 2001; Geiszt, 2006; Bedard *et al*, 2007; Jiang *et al*, 2011).

Por otra parte, las ROS de origen mitocondrial se generan durante el transporte de electrones a través de la cadena transportadora de electrones. El O_2 es convertido en H_2O , pero este proceso no es 100% eficiente y existe producción de radicales superóxido a nivel de los complejos I y III. Múltiples sitios de producción de ROS han sido descritos en la mitocondria. La flavina en los complejos I y II, sitios de unión a ubiquinona en los complejos I, II y III, flavoproteínas como la Q oxidoreductasa que participa en la beta-oxidación y la glicerol 3-fosfatasa, 2-oxoglutarasa y piruvato deshidrogenasa (Yankovskaya *et al*, 2003; Guo & Lemire, 2003; Brand, 2010; Paranagama *et al*, 2010; Chong *et al*, 2014).

De todas estas fuentes, las mayores productoras de ROS mitocondrial son los complejos I y III de la cadena transportadora de oxígeno. Otros componentes como citocromo C, el complejo succinato deshidrogenasa, aconitasa, entre otros, también producen ROS a nivel mitocondrial, pero en menor grado (Apel *et al*, 2004). Otro mecanismo que produce aumentos en la producción de ROS mitocondriales es el proceso denominado ROS induce liberación de ROS (RIRR), mecanismo mediado por el poro de transición mitocondrial (PTM). Las ROS inducen apertura del PTM, proceso que a su vez aumenta la producción de ROS a nivel mitocondrial. Este feedback positivo resulta en un aumento sustancial de los niveles de ROS mitocondriales que se propaga a través de la red mitocondrial, causando daño en el organelo y finalmente muerte celular.

Dado que la mitocondria es una importante fuente de ROS intracelulares, participa de forma activa en las señales redox. La principal molécula ROS producida por la mitocondria es el H₂O₂, la cual puede difundir desde la mitocondria y modificar la actividad de diferentes proteínas blanco por oxidación de residuos de cisteína reactivos. Estas modificaciones son revertidas por una serie de moléculas antioxidantes, varias de ellas son producidas a nivel de la mitocondria (Zorov *et al*, 2014).

Diversos estímulos se utilizan para producir estrés oxidativo al interior de las células. El más conocido es la adición directa del H₂O₂ a la célula, utilizando diferentes concentraciones y tiempos dependiendo de los estudios a realizar. Diversas investigaciones han mostrado que el H₂O₂ participa en vías de señalización responsables de la migración, proliferación y diferenciación celular (Peden *et al*, 1994; Chen *et al*, 2004; Pan *et al*, 2011), así como también es un importante mediador de la muerte celular por apoptosis y necrosis (Lin *et al*, 2004; Saito *et al*, 2006; Linden *et al*, 2008; Ferrero-Gutiérrez *et al*, 2008; Pallepati *et al*, 2011). La citotoxicidad de H₂O₂ depende del tiempo de exposición y concentración utilizada. En la literatura se encuentran estudios de citotoxicidad con rangos desde 10 a 1000 μM (Lin *et al*, 2004; Saito *et al*, 2006; Linden *et al*, 2008; Pallepati *et al*, 2011; Ferrero-Gutiérrez *et al*, 2008). Por otra parte, en los estudios de proliferación, migración y diferenciación celular se utilizan concentraciones relativamente bajas entre 3-15 μM. Concentraciones intermedias (100-400 μM) causan arresto celular (Wise *et al*, 1995; Davies *et al*, 1999). El H₂O₂ también participa en la regulación de la respuesta frente a proteínas mal plegadas (UPR), participando en la activación de la vía

PERK, IRE1a y ATF6 (Pallepati *et al*, 2011; Pierre *et al*, 2014). Otros antecedentes muestran que el H₂O₂ activa la UPR, estimulando la degradación de proteínas y aumentando la síntesis de chaperonas. Estímulos con tiempos de exposición superiores a 3 h inducen apoptosis con participación de CHOP y caspasas (Pallepati *et al*, 2011). Esta muerte puede ser prevenida con BAPTA-AM e inhibidores de calpainas, confirmando el rol del Ca²⁺ en la muerte mediada por H₂O₂ (Pallepati *et al*, 2011).

Más aún, el H₂O₂ produce aumento del Ca²⁺ intracelular seguido de un incremento en la entrada de Ca²⁺ hacia la mitocondria (Castro *et al*, 2004), lo que desencadena apertura del PTM y posterior muerte de la célula (Espinosa *et al*, 2009; Decuypere *et al*, 2011). Los mecanismos de muerte celular mediados por H₂O₂ se definirán dependiendo de la formación de ATP de la célula. Saito *et al*. (2006) describieron que el tratamiento con H₂O₂ (50 µM) gatilla la apoptosis en células humanas derivadas de linfoma, con salida de citocromo C hacia el citoplasma y activación de caspasa-9, proceso dependiente de la presencia de ATP.

Angiotensina II (Ang II) es un péptido del sistema renina-angiotensina-aldosterona que activa a algunos integrantes de la familia de las NOX y genera aumentos intracelulares de las ROS. Sus efectos fisiológicos son mediados por la generación de ROS intracelular y prevenidos por la expresión de catalasa, enzima que hidroliza el H₂O₂ (Seshiah *et al*, 2002). En líneas celulares de músculo liso vascular, el tratamiento con Ang II por 4-6 h incrementa la formación intracelular del anión superóxido, formado por la activación de NADPH y NADH oxidasa. (Griendling *et al*, 1994). En células Hela incrementos en la producción de ROS por Ang II se asocian principalmente a la activación de Nox1, un homólogo de Nox2 (Matsuno *et al*, 2005). La generación de anión superóxido y consiguiente formación de H₂O₂ activa una serie de señales características de la respuesta al estrés oxidativo, como aumento de proteínas antioxidantes y cambios metabólicos (Lassègue *et al*, 2001). Ratones tratados por 2 semanas con Ang II aumentan la producción de anión superóxido a través de la activación de las NOXs (Dikalova *et al*, 2005).

1.2. Calcio

El ion calcio, Ca^{2+} , juega un rol importante tanto en los compartimientos intracelulares como en el extracelular. En el extracelular juega un rol importante en la mantención de la integridad de la membrana plasmática y el correcto funcionamiento de varias proteínas, como por ejemplos moléculas de adhesión, factores de coagulación, enzimas de secreción, etc. Por otro lado junto al ion fosfato juega un rol fundamental en la mantención del esqueleto (Berridge *et al*, 2000, Brown *et al*, 2013).

Las señales de Ca^{2+} intracelular participan en diferentes procesos celulares como desarrollo, liberación de neurotransmisores, contracción muscular, metabolismo, síntesis de ATP, autofagia, muerte celular, proliferación, regulación génica, entre otras (Kaufman and Malhotra, 2014). En general, el Ca^{2+} participa, de forma directa o indirecta, en casi todas las funciones biológicas. Su fina regulación es un proceso fundamental para la correcta mantención de la función celular. El retículo endoplasmico juega un papel fundamental como reservorio de Ca^{2+} intracelular, siendo éste el más importante. Seguido por otros reservorios como la mitocondria, el núcleo y otros organelos con capacidad buffer de Ca^{2+} (Kaufman and Malhotra, 2014).

La dinámica de liberación de Ca^{2+} entre los organelos y el citosol así como la transferencia de Ca^{2+} entre organelos permite la compartimentalización de las señales de Ca^{2+} y que sean altamente específicas. Las señales de Ca^{2+} se presentan como transitorios locales de Ca^{2+} muy específicos dados por el alto grado de compartimentalización de canales, transportadores y bombas que lo liberan y recompartimentalizan en forma rápida y específica. Las concentraciones citosólicas de Ca^{2+} pueden fluctuar en varios órdenes de magnitud dependiendo del estado en el cual se encuentre la célula. En condiciones basales, las concentraciones citosólicas de Ca^{2+} son cercanas a los 100 nM, pudiendo alcanzar 1 mM frente a ciertos estímulos celulares (Aufman & Ikura, 2013).

Bajo condiciones fisiológicas y patológicas puede ocurrir una disminución de los niveles normales de Ca^{2+} en el RE. Los canales que regulan los niveles de Ca^{2+} del lumen del RE se conocen como SOCs (store-operated Ca^{2+} channels). STIM1 (Stromal Interaction Molecule), por otra parte, es un sensor de Ca^{2+} intraluminal que juega un rol clave en la

activación de los canales SOC's y, por lo tanto, en la mantención de los niveles de Ca^{2+} reticulares (Kaufman & Malhotra, 2014).

La regulación del Ca^{2+} citoplasmático depende de la actividad de una serie de canales en la membrana del RE. SERCA es una bomba de Ca^{2+} con capacidad ATPasa que capta Ca^{2+} desde el citosol hacia el lumen del RE, manteniendo los niveles de Ca^{2+} citosólicos bajos (Strehler *et al*, 2004). Por otro parte, los receptores de rianodina (RYR) y de IP3 (IP3R) son canales de Ca^{2+} intermembrana que se encuentran en el RE y cumplen la función de movilizar este ión hacia el citoplasma en forma regulada (Strehler *et al*, 2004). Las chaperonas que unen Ca^{2+} como calreticulina y calnexina también juegan un papel importante en su regulación (Kohen *et al*, 2002).

Los niveles de ROS regulan la salida del Ca^{2+} intracelular en varios tipos celulares, como líneas de células musculares (Orzechowski *et al*, 2002; Saris *et al*, 2005), células endoteliales (Krippeit-Drews *et al*, 1995), neuronas (Doan *et al*, 1994) y cardiomiocitos (Whittemore *et al*, 1995). En células osteoblasticas aumenta la salida de Ca^{2+} frente a estímulos como H_2O_2 que se acompaña de aumento de la expresión del IP3R (Wang *et al*, 1999). También plaquetas humanas expuestas a H_2O_2 aumentan los niveles de Ca^{2+} citosólico por oxidación de un grupo sulfhidrilo de la SERCA y activación del IP3R independiente de la generación del IP3 (Ho *et al*, 2002). En células musculares esqueléticas, insulina activa NADPH oxidasa, aumentando la producción citoplasmática de H_2O_2 , el cual activa al IP3R en forma independiente del IP3, generando aumento del Ca^{2+} citoplasmático (Sitia *et al*, 2004). Estos resultados muestran que la regulación del IP3R por H_2O_2 , tiene una importancia biológica considerable. Este efecto ha sido ampliamente estudiado, sabiéndose que la activación es de tipo directa e independiente del IP3 (Redondo *et al*, 2004). Sin embargo aún no se ha encontrado los residuos de cisteínas del IP3R sensibles al estrés oxidativo ni tampoco se descarta la posibilidad de que otra proteína también sensible al estrés oxidativo module la apertura del canal (Feng *et al*, 2000; Hidalgo *et al*, 2005; Zheng *et al*, 2005).

El IP3R está formado por 4 subunidades de 310 kDa. En mamíferos existen 3 isoformas de IP3R, las cuales presentan estructuras similares. La estructura tetramérica del IP3R es altamente dependiente de la concentración local de Ca^{2+} . El IP3 y el Ca^{2+} son considerados co-activadores del IP3R mientras que el ATP, proteínas kinasas, fosfatasa y proteínas reguladoras del IP3R son moduladoras de su función (Redondo *et al*, 2004). El IP3R interactúa con la mitocondria en el proceso de traspaso de Ca^{2+} desde el RE a la mitocondria. Traspasos de bajos niveles de Ca^{2+} desde el RE a la mitocondria son beneficiosos para la supervivencia celular dado que estimula la

producción de ATP y la transcripción de genes específicos (Espinosa *et al*, 2009; Decuypere *et al*, 2011). Un aumento excesivo de Ca^{2+} en el interior de la mitocondria estimula la apertura del PTM, produciendo permeabilización de la membrana mitocondrial y eventualmente muerte celular (Figura 1). La permeabilización conduce a la salida de una serie de moléculas desde la mitocondria al citoplasma, incluyendo factores pro-apoptóticos.}

El Ca^{2+} es necesario para la función mitocondrial, 3-deshidrogenasas del ciclo de Krebs son activadas por este ión así como otros componentes de la cadena transportadora de electrones como la ATPasa y los traslocadores de ATP/ADP que son finamente regulados por Ca^{2+} . Este ión sirve como una señal tanto para controlar la función mitocondrial, aumentar la síntesis de ATP como para gatillar los mecanismos de muerte dependientes de la mitocondria, por lo cual su regulación a nivel mitocondrial es muy importante (Rizzuto *et al*, 1998; Szabadkai *et al*, 2008, Rasola *et al*, 2011; Glancy *et al*, 2012).

Rueda *et al*. 2015, plantearon que no solo el Ca^{2+} favorece la síntesis de ATP a través de este mecanismo sino que también podría activar dos transportadores mitocondriales que favorecen la síntesis de ATP. Estos son el "Carrier" aspartato-glutamato (AGCs) y el transportador ATP-Mg/Pi (APCs), que favorecen la síntesis de ATP dado que permiten el transporte de NADH al interior de la mitocondria. La activación de estos transportadores mediada por Ca^{2+} no requiere la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria y responden más bien a aumentos del Ca^{2+} en el citosol (Rueda *et al*, 2015)

1.3. Metabolismo energético

En presencia de oxígeno la mayoría de las células obtienen el ATP principalmente a través de la metabolización de la glucosa por oxidación en la mitocondria (Lenzen *et al*, 2014). El proceso comienza con la metabolización de la glucosa una molécula de 6 carbonos a piruvato una molécula de 3 átomos de carbono a través de una serie de reacciones enzimáticas que en conjunto se conocen como glicolisis (Lenzen *et al*, 2014). Este proceso aporta solo 2 moléculas de ATP por glucosa gastada. El piruvato se convierte en acetil-CoA en la mitocondria en un proceso de descarboxilación oxidativa, catalizado por la piruvato deshidrogenasa (Akram *et al*, 2014; Lenzen *et al*, 2014). El acetil-CoA es el punto en común de las rutas metabólicas de tipo catabólicas. Tanto la metabolización de los lípidos a través de la beta-oxidación como la metabolización de algunos aminoácidos a través del proceso de deaminación y la propia glicolisis producen acetil-CoA como intermediario metabólico para la síntesis de ATP (Akram *et al*, 2014).

El acetil-CoA ingresa al ciclo de Krebs o ciclo del ácido tricarboxílico en la matriz mitocondrial para producir finalmente nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) y flavín adenín dinucleótido (FADH), metabolitos que aportan electrones a la cadena transportadora de electrones que serán utilizados para generar el gradiente de protones que finalmente culminará en la síntesis de ATP por parte de la ATPasa. Este proceso se conoce como fosforilación oxidativa (Aon *et al*, 2012; Mazat *et al*, 2013). La metabolización de la glucosa por oxidación en la mitocondria aporta aproximadamente 32 moléculas de ATP por glucosa, suministrando grandes cantidades de ATP por glucosa en comparación al proceso de glicólisis por sí solo (Mazat *et al*, 2013).

La fosforilación oxidativa es dependiente de oxígeno, dado que este cumple el rol de ser el aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones (Aon *et al*, 2012; Mazat *et al*, 2013). Bajo condiciones anaeróbicas las células no metaboliza el acetil-CoA en el ciclo de Krebs y no se puede producir la fosforilación oxidativa dado que son procesos dependientes del oxígeno. En estas condiciones, la célula genera energía principalmente a través del proceso de glicólisis que como ya se mencionó aporta menos ATP por molécula de glucosa que su oxidación. La producción de ATP en condiciones anaeróbicas se caracteriza por la producción de altos niveles de lactato, metabolito resultante de la reducción del piruvato por la lactato deshidrogenasa (LDH) (Hirschhaeuser *et al*, 2011). La función de la producción de lactato es oxidar NADH para regenerar la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) necesaria para la glicólisis y, por tanto, para que continúe la producción de ATP (Hirschhaeuser *et al*, 2011).

Las células neoplásicas presentan un metabolismo alterado, caracterizado por una disminución en la actividad mitocondrial y un aumento de la glicólisis, evidenciado por un aumento en los niveles de lactato. A este fenómeno se le conoce como efecto Warburg y se ha presentado como un blanco terapéutico esencial para combatir el cáncer (Vander Heiden *et al*, 2009). Diversos estudios muestran que el revertir el efecto Warburg sensibiliza a las células neoplásicas a los tratamientos en general, dado que los mecanismos de muerte apoptóticos dependen de la función mitocondrial. Un ejemplo es el dicloroacetato, droga utilizada como coadyuvante en la terapia contra el cáncer, actúa estimulando la actividad de la piruvato deshidrogenasa por inhibición de la piruvato

deshidrogenasa kinasa. Esto produce un aumento de la actividad mitocondrial y un descenso de la producción de lactato, ósea un “shift metabólico” (Kankotia *et al*, 2014).

1.4 Muerte celular: apoptosis

Este proceso se caracteriza por el aumento en la producción mitocondrial de ROS, salida masiva del Ca^{2+} desde sus reservorios intracelulares, pérdida de la permeabilidad celular y activación de proteasas. Aumentos en el Ca^{2+} citoplasmáticos pueden producir apoptosis a través de la activación de calpaínas, proteasas dependientes de Ca^{2+} que residen en el citosol de forma inactiva y que en respuesta a un aumento en los niveles del catión, se traslocan hacia las membranas intracelulares y activan su actividad catalítica (Rizzuto *et al*, 1998; Apel *et al*, 2004; Hu *et al*, 2005; Kroemer *et al*, 2006; Greene *et al*, 2006; Festjens *et al*, 2006; Szabadkai *et al*, 2008; Szydłowska *et al*, 2010). Sus sustratos son proteínas del citoesqueleto, proteínas de membrana, moléculas de adhesión, transportadores de iones, proteínas kinasas, fosfatasas y fosfolipasas (Zong *et al*, 2006). Estas proteasas están también asociadas a muerte celular por activación de caspasas, degradación de Bcl-2 (inhibidor de la apoptosis), etc.

Yamashima *et al*. postularon como hipótesis que el daño causado por un exceso de Ca^{2+} intracelular estaría dado por una pérdida de la integridad de la membrana lisosomal mediada por calpaina, que llevaría a la salida y activación de catepsinas, proteasas relacionadas con necrosis y apoptosis (Yamashima *et al*, 1998). Otras enzimas activadas por aumentos del Ca^{2+} y que median la muerte celular son proteínas kinasas, óxido nítrico sintasa (NOS) y calcineurina (Szydłowska *et al*, 2010).

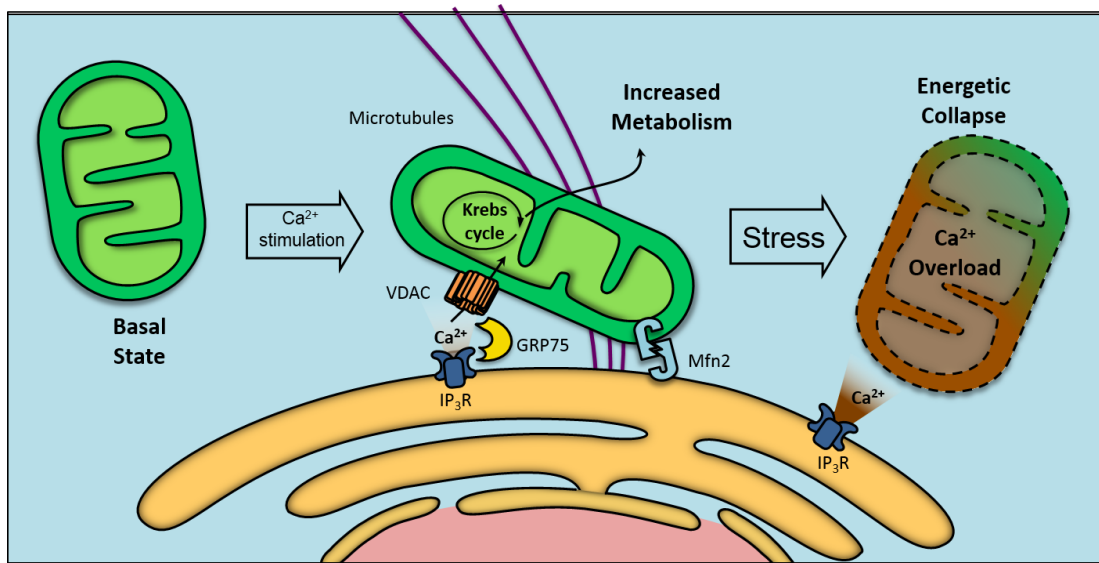


Figura 1. Papel del estrés oxidativo y Ca^{2+} en la muerte celular: El traspaso de Ca^{2+} está mediado por un grupo de proteínas que comprenden al IP₃R, VDAC y la proteína de anclaje GRP75. Por otra parte, la interacción entre el retículo endoplásmico (RE) y la mitocondria son fundamentales para que el proceso suceda de manera óptima, este anclaje entre organelos es mediado por mitofusina 2 (Mfn2). El traspaso de Ca^{2+} hacia la mitocondria es importante para la regulación de la función mitocondrial, el Ca^{2+} es un activador de diversas enzimas del ciclo de Krebs, por lo tanto aumentos en los niveles del Ca^{2+} mitocondrial se traducen en un incremento del metabolismo. Frente a situación de estrés, como el estrés oxidativo, puede suceder una desregulación del proceso que se caracteriza por una excesiva entrada de Ca^{2+} a la mitocondria que produce una sobrecarga de Ca^{2+} y que lleva al colapso energético y finalmente la muerte.

1.5. Herp: regulación y función

La proteína Herp se descubrió en 1998 con el nombre KIAA0025 (Nagase *et al*, 1998). En el 2002, dos grupos independientes caracterizaron esta proteína, siendo denominada como MIF-1 por Van Laar *et al.*, por su capacidad de responder a metil-metanosulfonato y a otros factores como el estrés osmótico y tunicamicina, este último un clásico inductor de estrés de retículo (Van Laar *et al*, 2000). También en los resultados publicados por este grupo se observó que el tratamiento de células Hela por 1 h con 500 μ M H₂O₂ (condición de estrés oxidativo) estimula un incremento de los niveles del mRNA para MIF-1. Sin embargo, estos resultados prácticamente no se discutieron en esa publicación. Por otro lado, Kokame *et al* (2000) también describieron la misma proteína, la cual denominaron Herp (proteína residente del RE que responde a homocisteína). En este artículo se caracterizó a Herp como una proteína de la membrana del RE con sus dominios tanto carboxilo y amino-terminal mirando hacia la cara citoplasmática de la membrana del retículo (Figura 2A). Se describió que Herp se expresaba en respuesta a diferentes inductores del estrés de retículo (tunicamicina, 2-mercaptoetanol y homocisteína) y a compuestos que alteran la homeostasis del Ca²⁺ intracelular (el ionóforo de Ca²⁺ A23187 y el inhibidor de la SERCA tapsigargina) (Kokame *et al*, 2000). Finalmente se adoptó el nombre de Herp y se definió como un marcador del estrés de RE, carente de actividad enzimática y con una función biológica poco clara.

El gen de Herp humano se encuentra en el cromosoma 16, específicamente en la región 16q12.2-13, y presenta un marco de lectura abierto de 2198 pb, compuesto de 8 exones que codifican una proteína de 391 aa (Kokame *et al*, 2000). Herp es una proteína integral de la membrana del RE de 54 kDa y que se expresa en todos los tejidos (Figura 2B) (Kokame *et al*, 2000). Al realizar un análisis de la secuencia de Herp, tanto humana como murina, se descubrió que posee hacia el extremo amino terminal, una región de analogía con ubiquitina o ULD (Ubiquitin-like domain) específicamente entre los aminoácidos V10 y L72 (Van Laar *et al*, 2000; Van Laar *et al*, 2001; Kokame *et al*, 2002). La expresión de Herp a nivel transcripcional es regulada por una serie de elementos respuesta, destacando los sitios ERSE I (CCAAT-gggcggcag-CCACA) y ERSE II (ATTGG-N-CCACG), los cuales están relacionados con respuestas génicas frente al estrés de retículo (Van Laar *et al*, 2000, Kokame *et al*, 2000, Ma *et al*, 2004).

La función principal conocida de Herp es la regulación de la degradación de proteínas a través de la vía ERAD. Herp se vincula a ciertos componentes del ERAD como p97, Derlin-1 y VIMP a través de su dominio ULD, especulándose que su función sería reclutar proteínas desde el RE al proteosoma a través de una interacción directa mediante su dominio ULD (Schulze *et al*, 2005). Sin embargo, no se ha podido demostrar una interacción directa de Herp con el proteosoma (Schulze *et al*, 2005; Okuda-Shimizu *et al*, 2007). Interesantemente este dominio ULD también participa en la autodegradación de Herp (Sai *et al*, 2003), interactuando directamente con la ubiquitina, proteína involucrada en la degradación de proteínas por vía proteosomal (Kima *et al*, 2008). La vida media estimada de la proteína Herp es de 2,5 h (Sai *et al*, 2003). El dominio UDL es fundamental para que Herp medie la degradación de una serie de proteínas a través del ERAD, como se ha mostrado para niscatrina (Marutani *et al*, 2011), la proteína NHK (Kny *et al*, 2011) y policistina 2 (Liang *et al*, 2008).

Por otro lado, Herp interactúa con HRD1 de forma dependiente de su segmento ULD, esta interacción aumenta en condiciones de estrés celular. Esto tiene como consecuencia un aumento en la ubiquitinación de proteínas y consecuentemente su degradación (Kny *et al*, 2011). También se ha observado que en células de mamífero, Herp inicia el reclutamiento de HRD1 y de los diferentes componentes del ERAD, así como también recluta diferentes sustratos del ERAD. Este reclutamiento es importante para la formación del complejo y su función (Bernasconi *et al*, 2013; Huang *et al*, 2013, Leitman *et al*, 2014). Herp se requiere tanto para la degradación de proteínas glicosiladas como las no-glicosiladas vía ERAD (Bernasconi *et al*, 2013; Huang *et al*, 2013, Leitman *et al*, 2014).

Otro efecto atribuido a Herp es su capacidad de modular la salida de Ca^{2+} desde el RE. Su sobreexpresión en células PC12 disminuye los niveles de Ca^{2+} intracelular posterior al tratamiento con bradiquinina o taspigargina, mientras que la inhibición de su expresión aumenta significativamente la concentración de Ca^{2+} intracelular respecto de los controles (Chan *et al*, 2004). La regulación del Ca^{2+} intracelular tiene relación con la función mitocondrial. En células PC12 que sobreexpresan Herp se observa una menor caída del potencial mitocondrial, lo que se relaciona con un aumento en la supervivencia celular. La sobreexpresión de Herp también previene las perturbaciones de Ca^{2+} producidas por MPP^+ (inhibe el complejo I de la cadena transportadora de electrones) en células PC12. Herp

atenúa el incremento del Ca^{2+} mitocondrial, sugiriendo que Herp podría inhibir la transferencia del Ca^{2+} desde el RE hacia la mitocondria. Este efecto es dependiente del dominio ULD de Herp y del funcionamiento del proteosoma (Chigurupati *et al*, 2009). Herp forma un complejo con el IP3R1 y con RYR. Aumentos en la expresión de Herp resulta en una reducción de los niveles proteicos de IP3R1 y pan-RYR, que es revertido al inhibir la actividad del proteosoma. Al parecer Herp regula la degradación del IP3R y el RYR vía proteosoma y de esta manera regular la homeostasis del Ca^{2+} intracelular (Belal *et al*, 2012).

Hay evidencias que muestran que Herp posee un papel citoprotector frente al efecto nocivo del estrés de RE (Chan *et al*, 2004; Hori *et al*, 2004). Herp previene la muerte celular por apoptosis, disminuyendo la actividad de diversas caspasas, la caída del potencial mitocondrial, la inducción de CHOP y la fosforilación de JNK (Chan *et al*, 2004; Hori *et al*, 2004). Sin embargo, estos resultados se remiten casi exclusivamente a células neuronales, lo que no permite extrapolar esta propiedad a otros tipos celulares (Sai *et al*, 2002; Chan *et al*, 2004; Hori *et al*, 2004). Un ejemplo del papel citoprotector de Herp se ha documentado en células F9 tratadas con un siRNA para Herp, en donde se observa que las células que poseen menores niveles de la proteína Herp más susceptibles a la muerte inducida por estrés de RE (Hori *et al*, 2004). También las células PC12 y MN9D, *knock down* para Herp, son más sensibles a la muerte por toxicidad del 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺), compuesto utilizado para generar modelos de Parkinson *in vitro*. El efecto contrario se observa al sobreexpresar Herp en células PC12. Además estas investigaciones han mostrado que la sobreexpresión del Δ ULD-Herp hace perder la acción protectora de Herp al MPP⁺, sugiriendo que este dominio es muy importante para su función citoprotectora (Hori *et al*, 2004). Aunque la disminución de la proteína Herp está asociada a disminución de la viabilidad frente al estrés, se ha encontrado de manera sorpresiva que frente al estrés oxidativo la sobreexpresión exacerbada de la proteína Herp reduce la viabilidad, posiblemente dado que Herp juega un importante rol en la mantención del estado fisiológico de la célula (Yan *et al*, 2014).

Por otro lado, en el último tiempo existe una serie de estudios que muestran evidencias de que Herp es importante en el proceso de secreción de la insulina, ratones KO para Herp tienen problemas en la secreción de insulina lo que genera ratones con un perfil

diabético. En estudios con líneas celulares derivadas de células pancreáticas se observó que células KO para Herp presentan disminuida la expresión y actividad de la nicotinamida nucleótido transhidrogenasa (Nnt), importante para la transformación de NADH a NADPH en la mitocondria y que se ha postulado como una proteína clave en la regulación de la secreción de la insulina (Worg *et al*, 2013). En otro estudio, ratones KO para Herp mostraron deficiencias en test de tolerancia a la glucosa y vulnerabilidad en el desarrollo de isquemias cerebrales (Yuca *et al*, 2012).

Nuestras investigaciones han mostrado que Herp regula negativamente la autofagia mediante la modulación de los niveles de Beclin-1 y ATG5, proteínas claves para la formación de los autofagosomas en células Hela privadas de glucosa (Quiroga *et al*, 2013). Hemos observado que células *knock down* para Herp forman más autofagosomas a tiempos mas tempranos de privación de glucosa que las células controles. Este cambio en la temporalidad en la cual sucede la autofagia se acompaña de aumentos en los niveles de la proteína beclin-1 y ATG5 en comparación a las células control (Quiroga *et al*, 2013). Además frente a estas condiciones se observaron mayores niveles de proteínas poliubiquitinadas en los controles que en las células *knock down* para Herp, lo que hace pensar que Herp podría regular la degradación de Beclin-1 y ATG5 (Quiroga *et al*, 2013).

Diversas evidencias apuntan a que Herp podría jugar un papel importante en la respuesta frente al estrés oxidativo. En uno de los primeros artículos sobre la proteína Herp se observó un aumento del mRNA de Herp frente al tratamiento de 1 h con H₂O₂ (0,5 mM), pero por ser un aumento menor a lo observado con tunicamicina o estrés osmótico, prácticamente se descartó su importancia (Kokame *et al*, 2000). Liang *et al*. observaron aumentos en los niveles proteicos de Herp frente al tratamiento con H₂O₂ (300 nM, por 8 h) y MG132 (inhibidor del proteosoma). Este aumento es menor al observado al tratar las células con tunicamicina, aunque aún significativo (Liang *et al*, 2006). Herp es importante para la citoprotección y regulación de los niveles intracelulares de Ca²⁺ en las células PC12 expuestas a MPP⁺ (Chigurupati *et al*, 2009). Esta sustancia produce toxicidad por su capacidad de producir altos niveles de ROS en las células neuronales, lo que aumenta los niveles del Ca²⁺ intracelular y su traspaso desde el retículo endoplasmico a la mitocondria, lo que se traduce en un aumento en la muerte celular (Liang *et al*, 2006; Chigurupati *et al*, 2009). Colectivamente estos hallazgos permiten sugerir, que Herp podría ejercer una acción citoprotectora frente al estrés oxidativo dada su capacidad de regular el Ca²⁺ intracelular y el traspaso de Ca²⁺ desde el RE a la mitocondria mediante la modulación del IP3R.

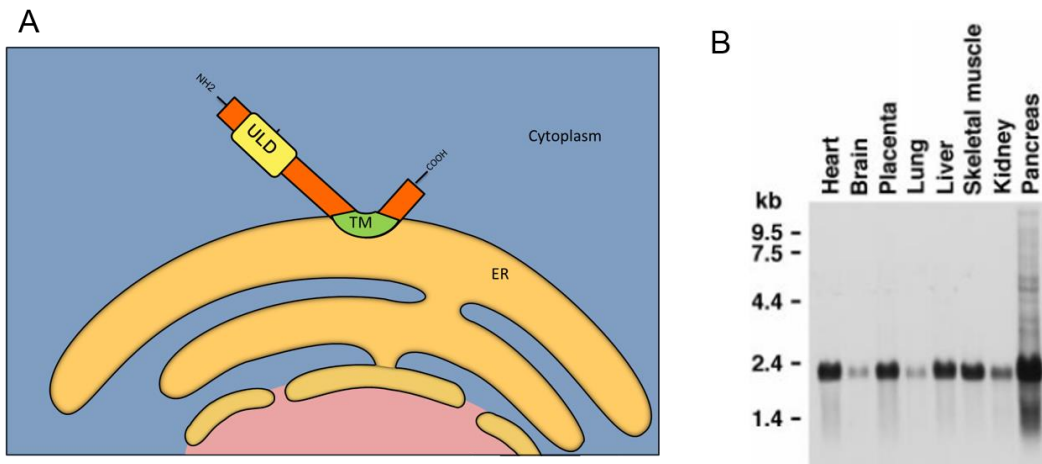


Figura 2. Herp. Panel A: Herp es una proteína de 54 KDa residente del retículo endoplásmico, se encuentra en la cara citoplasmática de la membrana del RE con ambos extremos carboxilo y amino terminal mirando hacia el citoplasma. Herp presenta una pequeña porción transmembrana y un dominio ULD de unión a ubiquitina. Panel B: Herp es una proteína ubicua que se expresa principalmente en órganos con alta síntesis de proteínas y estrés de retículo como el páncreas (Figura 2B obtenida de Kokame et al, 2000)

2. HIPÓTESIS

“Herp es una proteína inducible por H₂O₂ que regula la supervivencia celular, modulando la transferencia de Ca²⁺ a la mitocondria y degradación del receptor de IP3”

3. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la participación de Herp en la respuesta frente al H₂O₂ y regulación de la función mitocondrial e IP3R en células Hela.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer que el H₂O₂ estimula la expresión de Herp en células Hela.
- Definir si Herp regula los niveles intracelulares de Ca²⁺ dependientes de H₂O₂.
- Definir si Herp regula el traspaso de Ca²⁺ del retículo endoplásmico a la mitocondria por modulación del IP3R en células Hela expuestas a H₂O₂.
- Establecer si Herp tiene un papel citoprotector frente al H₂O₂ por regulación del Ca²⁺ intracelular.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU): Medio DME, ciclosporina A, angiotensina II, polibrem, carboxi-cianuro-3-clorofenilhidrazona (CCCP), actinomicina D, cicloheximida, histamina, citocalasina B, Tritón X-100, anticuerpos anti β -actina (A5441) y anti β -tubulina (T4026). De Gibco BRL (Carlsbad, CA, EEUU) se obtuvieron: suero fetal bovino (FBS). Mitotracker Green-FM (M7514), tetrametilrodamina metil éster perclorato (TMRM, T-668). Los anticuerpos secundarios anti IgG de conejo y ratón conjugados a peroxidasa se obtuvieron en Calbiochem (La Jolla, CA, EEUU), así como también el cisplatino y 4EGI. El reactivo quimioluminiscente ECL se adquirió en Amersham Biosciences (Buckinghamshire, Inglaterra). Todos los otros compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos, solventes y el H_2O_2 se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania), a no ser que se especifique lo contrario. El medio de montaje para fluorescencia DAKO se compró en DAKO Corporation (Carpinteria, CA, EEUU). Las sondas Fluo 4, Fura 2 y Rhod-FF, así como el BAPTA-AM se adquirieron en Molecular Probe (Life Technology, EEUU). La puromicina se obtuvo en Gibco (Life Technology, EEUU). Xestospongina B se obtuvo de *Xestospongia exigua* como se describe en el paper de Quirion *et al.* (1992), este reactivo fue donado gentilmente por el Dr. Jordi Molgó.

5.2. Modelo experimental celular

Se usó la línea celular Hela (CCL-2) obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC) como modelo de estudio dado que gran parte de los antecedentes existentes sobre Herp (Nagase *et al*, 1998), estrés oxidativo (Sai *et al*, 2003; Chan *et al*, 2004; Schuelze *et al*, 2005) movimiento de Ca^{2+} intracelular (Chan *et al*, 2004; Schuelze *et al*, 2005; Kima *et al*, 2008; Marutani *et al*, 2011) y la comunicación RE-mitocondria (Hori *et al*, 2004; Liang *et al*, 2008; Kny *et al*, 2011) han sido obtenidos en este modelo. Además, nuestro trabajo previo en el tema se realizó íntegramente en estas células (Quiroga *et al*, 2013). Alternativamente, se utilizaron otras líneas celulares, para corroborar nuestros hallazgos en otros modelos, como fibroblastos derivados de ratón, MEF2 y células derivadas de osteocarcinoma

humano U2OS obtenidas de la ATCC (HTB96).

5.3. Modelo animal

Ratones wild type (wt) o que sobreexpresan catalasa fueron tratados con Ang II con una dosis de 0,75 mg/kg/día por 7 días como se describe en (Zhang et al, 2005). Ang II proveniente de Sigma se reconstituyó en solución salina y se infundió mediante una bomba Alzet mini-osmótica.

5.4. Producción de células Hela *knock-down* (KD) para Herp

Para la obtención de lentivirus que contiene el Sh-Herp, células HEK 293T se transfectaron en medio Optimem con lipofectamina 2000 de acuerdo a las instrucciones del proveedor usando los siguientes plásmidos: VSV-G, pMDL, REV y Sh-Herp o Sh-Luc. Después de 48 h. el medio condicionado con partículas lentivirales se recolectó y filtró con filtros de 0.45 μm ([figura S1](#)).

Para la generación de células knock-down (KD) para Herp, células Hela o U2OS se incubaron con el medio condicionado obtenido en el punto anterior. Después de 48 h de transducción viral, las células se seleccionaron usando 2 $\mu\text{g/ml}$ de puromicina. Los plásmidos de Sh-Herp y Sh-Luc para la generación de lentivirus fueron donados por Dr. H. Komano, National Institute for Longevity Sciences, Obu, Aichi, Japan.

5.5. Sobreexpresión de Herp

Las células Hela se transfectaron en medio Optimem con lipofectamina 2000 de acuerdo a las instrucciones del proveedor usando los plásmidos anteriormente mencionados. Las células se transfectaron por 4-6 h y posteriormente se cambió el medio por DMEM 10% FBS. Las células se estimularon según corresponda entre 24 y 48 h después de la transfección. Los plásmidos de expresión para la sobreexpresión de Herp (SC114911) y de Herp-GFP (RG211835) de origen humano se adquirieron en Origen S.A.

5.6. Extracción de RNA, transcripción reversa y PCR en tiempo real (qPCR)

El RNA total se extrajo de células Hela, previamente estimuladas y sembradas a una densidad de 3×10^6 células/placa en placas de 60 mm. Las células se lisaron con 500 μ L de Trizol (Gibco BRL, Carlsbad, CA, EEUU). Una vez obtenido el lisado, éste se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 100 μ L de cloroformo a cada muestra, las cuales se mezclaron 20 veces por inversión y 20 s en vórtex, se incubaron a temperatura ambiente por 3 min y luego se centrifugaron a 12.000 g durante 15 min en una microcentrífuga a 4°C. Luego de centrifugar, se formaron dos fases, la fase superior acuosa se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 mL para luego precipitar, en 250 μ L de isopropanol. Para esto, el tubo se invirtió varias veces con la finalidad de mezclar y se incubó a temperatura ambiente durante 5 – 10 min, formándose una pella que contiene el RNA precipitado. Las muestras se volvieron a centrifugar a 12.000 g durante 10 min a 4°C, descartándose el sobrenadante. Posteriormente, la pella se lavó con 500 μ L de etanol 75% frío y se centrifugó a 12.000 g por 5 min a 4°C, eliminándose nuevamente el sobrenadante. La pella se dejó secar al aire y a temperatura ambiente, para luego ser resuspendida en 40 μ L de agua - DEPC (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, EEUU).

Para el tratamiento con DNAsa se utilizó el kit 4368814 de Applied Biosystems (Carlsbad, CA, EEUU). Para este fin; 300 μ L de cada una de las muestras de RNA, se traspasaron a tubos de 200 μ L a los cuales adicionalmente se les agregó 7,3 μ L de agua, 1 μ L de tampón 10x DNAsa I y 0,7 μ L de DNAsa I (2 U/ μ L). Esta mezcla se incubó por 30 min a 37°C y posteriormente, por 10 min a 65°C en un termociclador Eppendorf (Hamburgo, Alemania).

La reacción de transcripción reversa se llevó a cabo con el sistema de síntesis para RT-PCR Improm-IITM Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, WI, EEUU). Para este fin, se utilizaron 0,2 μ g de RNA totales, junto a 0,5 μ L de partidores al azar o “*random*” a una concentración de 500 μ g/mL. Esta mezcla se llevó a un volumen final de 5 μ L con agua - DEPC a 65°C por 5 min y luego a 4°C por otros 5 min adicionales. Simultáneamente se preparó una mezcla de reacción que incluyó: 5,75 μ L de agua - DEPC, 4 μ L de 5x RT Buffer Improm-II (tampón de reacción), 3 μ L de MgCl₂ 25 mM, 0,75 μ L de dNTP 10 mM, 0,5 μ L de RNAsin y 1 μ L de Improm-II RVT, completando así un volumen

final de 15 μ L. Posteriormente, esta segunda mezcla se agregó a la inicial y se incubó por 5 min a 25°C, luego 60 min a 42°C y por último 15 min a 70°C. El cDNA obtenido se alicuotó y almacenó a -20°C hasta su uso en reacciones de PCR.

Partidores para *herp* humano:

CGTTGTTATGTACCTGCATC	Herp+3
TCAGGAGGAGGACCATCATTT	Herp-4
CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA	RPL +3
TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA	RPL -4

Partidores para *herp* raton:

CAGTTGGAGTGTGAGT	Herp+1
CAACAGCAGCTTCCCAGAATA	Herp-1
ATGACAAGAAAAGCGGATG	RPL+1
CTTTTCTGCCTGTTTCCGTA	RPL-2

La reacción de PCR en tiempo real se realizó utilizando el Kit Roche480 Sybre Green – 12203848 (Basel, Suiza) y un termociclador Mx3000P, Stratagene (Santa Clara, CA, EEUU). Mientras que el análisis de datos se realizó utilizando el software MxPro. Bajo las siguientes condiciones se determinaron los transcritos de interés: H₂O libre de nucleasas, tampón de PCR, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, Taq 2U (Kit Taq Polimerasa, Fermentas), partidor sentido 0,5 μ M, partidor antisentido 0,5 μ M, SYBR Green 1/20.000 (Roche, Basel, Suiza), más 2 μ L de templado (curva estándar o muestras). El programa de amplificación para todos los transcritos, consistió en un ciclo de denaturación inicial a 95°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de amplificación que consistieron en: un período de denaturación a 94°C por 20 s, uno de apareamiento a 60°C por 20 s y finalmente, uno de extensión a 72°C por 20 s. La fluorescencia se adquirió al final de la fase de extensión (lectura a 84°C por 7 s al final de cada ciclo). Finalmente, se realizó una curva de denaturación desde 72°C hasta 95°C, manteniendo una lectura continua de la fluorescencia. Finalmente, los resultados se expresaron como la razón del transcrito de interés/transcrito housekeeping. Como housekeeping se utilizó el mRNA de Ribosomal protein L13a (RPL).

Para la cuantificación del producto de PCR se utilizó el “Mass action Kinetic model”

(MAK2), descrito por Boggy y Woolf, 2010, este método no requiere realización de curva estandar o un valor de referencia relativa para realizar la cuantificación. La ecuación que define el método de cuantificación es:

$$F_n = F_b + \frac{F_{max} - F_b}{(1 + e^{q*(\log(n) - \log(r))})^s}$$

En donde F_n , F_b , and F_{max} son la fluorescencia en el ciclo n , la fluorescencia basal y el máximo de fluorescencia respectivamente; los parámetros q , r y s son ajustes de la curva (Boggy y Woolf, 2010).

5.7. Preparación de extractos celulares totales

Las células se sembraron en placas de 35 mm a una densidad de $1,5 \times 10^6$ células/placa. Una vez estimuladas, las células se lavaron tres veces con solución PBS fría y luego se lisaron con 80 μ L de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 5 mM; NaCl 50 mM; tritón X-100 1% v/v; aprotinina 20 mg/mL; leupeptina 1 mg/mL; PMSF 1 mM y Na_3VO_4 1 mM). El homogeinizado se centrifugó a 12.000 g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante o extracto de proteínas se recuperó en un tubo nuevo, se determinó su concentración por el método de Bradford (BioRad protein assay, BioRad, Hercules, CA, EEUU) y se desnaturó en tampón SDS-PAGE 4x, para ser almacenado posteriormente a -20°C.

5.8. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La separación de las proteínas en base a su masa molecular se realizó mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida. En todos los casos se cargaron alrededor de 30 μ g de extracto protéico. El gel concentrador se preparó al 5% y el separador al 10%, sin embargo, para la detección de IP3R se utilizó geles en gradiente de concentración. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 V en tampón de electroforesis.

5.9. Electrotransferencia de proteínas

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad, Hercules, CA) de 0,45 μm a 0,45 A durante 90 min en tampón de transferencia.

5.10. Western blot

Una vez transferidas, las membranas se trataron con tampón de bloqueo (TBS 1x; Tween-20 0,1%; leche descremada 5% p/v) durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios anti Herp, anti pan-IP3R, anti mtHsp-70, (dilución 1:5.000 para todos ellos) y anti tubulina, anti- GAPDH y anti-actina (dilución 1:10000 cada uno) en tampón de incubación (TBS 1x; Tween-20 0,1%; leche descremada 5% p/v) toda la noche a 4°C y con agitación suave. Posterior a la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron durante 30 min en TBS 1x; Tween-20 al 0,1%, y se incubaron nuevamente, durante 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario; anti-IgG de ratón o conejo conjugado con peroxidasa, según corresponda, en un título de 1:5.000 en tampón de bloqueo TBS 1x; Tween-20 al 0,1%. Para detectar las proteínas, las membranas, previamente lavadas, se incubaron durante 1 min en la solución quimioluminiscente ECL y se expusieron en una película de fotografía Kodak-Biomax. Las películas se digitalizaron y las imágenes se procesaron con la ayuda del programa computacional Image J. Después de realizar los ensayos de Western blot, las membranas de nitrocelulosa se incubaron por 1 h en una solución de stripping.

5.11. Citometria de flujo

Para estos experimentos se utilizaron placas de cultivo de 12 pocillos a una densidad de 3×10^5 células/pocillo. Se utilizó la sonda TMRM (excitación: 543 nm, emisión: sobre los 560 nm) como marcador del potencial de membrana mitocondrial, mientras que el mitotracker green-FM (excitación: 488 nm, emisión: 515-530 nm) se utilizó como marcador de masa mitocondrial, la sonda 1, 2,3 DHR (excitación 500 nM, emisión 536 nm) se utilizó para determinar los niveles intracelular de H_2O_2 . Las sondas se cargaron 30 min antes de la realización de las mediciones, a una concentración final de 200, 400 o 100 nM,

respectivamente. Una vez finalizados los estímulos correspondientes y la carga de la sonda, se removió el medio y las células se suspendieron utilizando 300 μ L de una solución de tripsina-EDTA 1x disuelta en PBS durante 5 min a 37°C. Una vez finalizados los 5 min de tripsinización, la reacción se detuvo utilizando FBS en una proporción 1:10. Posteriormente, las células ya cargadas se traspasaron a tubos BD para citometría.

En el caso de la viabilidad celular se determinó mediante la incorporación de yoduro de propidio (PI; 1 μ g/ml), las células son estimuladas y posteriormente el medio se traspasa a tubos BD para citometría, las células en la placa se suspendieron utilizando 300 μ L de una solución de tripsina-EDTA 1x disuelta en PBS durante 5 min a 37°C. Una vez finalizados los 5 min de tripsinización, la reacción se detuvo utilizando FBS en una proporción 1:10. Posteriormente, las células se traspasaron a los tubos BD para citometría correspondientes y se centrifugaron a 5000 RPM por 5 min. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 500 μ L de medio DMEM 10% FBS que contiene a la sonda PI a una concentración de 1 μ g/ml. Para los estudios de ciclo celular (sub G1), luego de triplicinar y centrifugar las células, estas se fijaron con Etanol 100%. Posteriormente se trataron con RNAasas, para finalmente adicionarle la sonda PI.

En todos los casos la fluorescencia se analizó utilizando un citómetro de flujo FACS-SCAN (Becton Dickinson, San Jose, CA, EEUU), cuantificando 5000 eventos en total. La disminución en la intensidad de la fluorescencia fue proporcional a la caída del potencial mitocondrial en el caso de la TMRM, así como la fluorescencia de la sonda Mitotracker Green-FM fue proporcional a la masa mitocondrial. Se utilizó el desacoplante CCCP 50 μ M durante 30 min como control positivo. Finalmente, los resultados se expresaron como los promedios de mediciones normalizadas con respecto a las células control o sin tratamiento (Muñoz *et al*, 2010).

5.12. Medición del Ca²⁺ intracelular

Para determinar los niveles de Ca²⁺ en las células Hela Sh-Luc y Sh-Herp, éstas se sembraron en placas de 35 mm sobre vidrios removibles de 25 mm a una densidad de 1,5 x 10⁶ células/placa. Se removió el medio y las células se trataron con las sondas Fluo-4 para la determinación del Ca²⁺ intracelular y Rhod-FF para la determinación del Ca²⁺

mitocondrial.

Las células se lavaron con el medio Krebs–Ringer modified buffer (KRB) (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 0.4 mM K₂HPO₄, 5.5 mM glucosa y 20 mM HEPES pH 7.4), suplementado con 1 mM CaCl₂ en el caso de las mediciones en medio con Ca²⁺. Las células sobre el vidrio se traspasaron a la cámara de perfusión con 500 µL de medio KRB y observadas usando el microscopio Zeiss LSM 5 Pascal/Axiovert 200.

5.13. Inmunofluorescencia indirecta

Se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de 2,5 x 10⁵ células/pocillo, sobre cubreobjetos de vidrio de 18 mm de diámetro. Luego del estímulo, las células se lavaron con PBS frío, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS por 20 min, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1% en PBS por 10 min y se bloquearon con BSA al 1% en PBS (filtrado) durante 1 h.

En el caso de los ensayos de citocromo c, las células se incubaron con el anticuerpo en PBS-BSA 1% durante toda la noche a 4°C. Finalmente, las células se montaron en los portaobjetos respectivos, utilizando DAKO como medio de montaje, el cual además retarda el decaimiento de la fluorescencia. Una vez montadas, las inmunofluorescencias se observaron en un microscopio confocal Carl Zeiss Pascal 5 (Carl Zeiss Microsystems, Oberkochen, Alemania). El análisis de las imágenes se realizó utilizando el programa Image J (NIH, EEUU), tal como se describirá más adelante.

5.14. Medición de los niveles intracelulares de ATP mediante luminometría

Para el caso de los ensayos que permiten estudiar los niveles relativos de ATP intracelular, se utilizaron placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de 2 x 10⁴ células/pocillo. Una vez finalizados los estímulos con insulina, se removió el medio de las placas y se agregaron 20 µL de medio Krebs con Ca²⁺ (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.0 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES-Na, 5.6 mM glucosa, pH 7.4). A continuación, se adicionó el tampón de lisis del kit Cell Titer-Glo® (Promega Corporation, Madison, WI, EEUU) en una relación 1:1. La placa se agitó durante 2 min con el fin de completar la

reacción. Posteriormente, las células se traspasaron a una placa opaca de 96 pocillos y se analizaron en un luminómetro TopCountNXT (Perkin-Elmer, Waltham, MA, EEUU), siendo la luminiscencia estable por un período de hasta 4 h. Finalmente, los resultados se expresaron como los promedios de medidas normalizadas a las células sin tratamiento o control (Villena *et al*, 2008; Marambio *et al*, 2010).

5.15. Oxigrafía de Clark

Para este tipo de ensayos se utilizaron placas de cultivo de 100 mm con una densidad celular de 1×10^7 células/placa. Una vez finalizados los estímulos, se procedió a remover el medio y lavar las células tres veces con solución PBS. Posteriormente, las células se soltaron utilizando 1 mL de solución tripsina-EDTA 1x disuelta en PBS, durante 5 min a 37°C, esta reacción luego se detuvo con FBS en una proporción 1:10. Una vez finalizada la tripsinización, las células se traspasaron a un tubo Eppendorf y se centrifugaron por 5 min a 1600 rpm. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y la pella se resuspendió en 200 μ L de PBS, los cuales se traspasaron a una cámara (volumen final de 600 μ L) acoplada al sistema de electrodos. La velocidad del consumo de oxígeno se registró en un electrodo de Clark 5331 (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH, EEUU), acoplado a un sistema de registro digital, mediante la utilización del programa WinDaq Data Acquisition Software (Akron, OH, EEUU) a 25°C. Los datos se guardaron en formato .csv y se analizaron utilizando el programa Origin Pro (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EEUU). Una vez que se extrajeron las pendientes de las curvas obtenidas para cada condición, los resultados se expresaron como promedios de las mediciones normalizadas con respecto a las proteínas totales de las muestras (Araya-Maturana y cols., 2002; Araya-Maturana y cols., 2006).

Adicionalmente y como un control interno de todos los experimentos realizados, antes de que las células consumieran el 100% del oxígeno presente en la cámara, se evaluó la velocidad de respiración desacoplada (Uncoupled Respiration Ratio, UCR), la cual corresponde al inverso de la denominada tasa de control respiratorio y que da cuenta de la capacidad total de la cadena transportadora de electrones en relación a la respiración basal parcialmente acoplada. Para ello, una vez que las células habían consumido aproximadamente el 75% del oxígeno de la cámara, se les agregó CCCP a una

concentración final de 200 nM (Brand y Nicholls, 2011).

5.16. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad InStat versión 3.05, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com. Se utilizó un análisis de la varianza de ANOVA de una o dos vía, según corresponda, seguido por el test de comparación múltiple Bonferroni. Los resultados se muestran como promedio \pm SEM, con un mínimo de 3-5 experimentos. Se aceptó como significativo un valor de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. La proteína Herp aumenta su expresión en células Hela tratadas con H₂O₂ de forma dependiente del tiempo y concentración

Utilizando H₂O₂ como agente productor de ROS, se midieron los niveles de la proteína Herp en células Hela tratadas con diferentes concentraciones de H₂O₂ y a diferentes tiempos. Se fijó una concentración inicial de 500 μ M de H₂O₂ dado que es una concentración lo suficientemente alta como para producir estrés en las células Hela pero no es una concentración letal a los tiempos de trabajo. Inicialmente se trataron células Hela con 500 μ M de H₂O₂ entre 0 a 12 h, en donde se observó un rápido aumento en la masa total de la proteína a los 30 min post-estímulo (Figura 3), seguido de una disminución a la hora post-estímulo y un nuevo aumento en la expresión de la proteína a partir de las 3 h que se mantuvo hasta las 12 h (Figura 3). Para definir qué tan rápido era el aumento inicial de la masa de Herp en respuesta al H₂O₂, se realizaron estímulos entre 0 y 60 min (Figura 4), observándose un aumento en la cantidad de la proteína Herp desde los 15 min post-estímulo con un máximo de expresión a los 30 min como se observó anteriormente este aumento en la proteína disminuye a la hora post estímulo (Figura 4). El aumento en la masa de Herp a los 30 min se observó tanto en células Hela como en células MEF a distintas concentraciones (0, 50 y 500 μ M) (Figura 5). Para comprender mejor los mecanismos por los cuales Herp aumenta en respuesta al H₂O₂, se realizó un qPCR de muestras de cDNA obtenidas de células Hela tratadas con diferentes concentraciones de H₂O₂. Como se puede observar en la Figura 6 existe un aumento significativo en el mRNA de Herp desde las 3 h post-estímulo, manteniéndose este aumento hasta las 12 h, lo que sugiere que el aumento en la masa de Herp observado desde las 3 h post estímulo es a través de un aumento en los niveles del mRNA de Herp. Finalmente, como control positivo, se realizó un qPCR en muestras de células Hela estimuladas con 500 μ M de H₂O₂ por 3 h preincubadas con catalasa, en estas condiciones no se observa aumentos en la expresión de Herp, demostrando así que los aumentos observados son realmente producto del tratamiento con H₂O₂ (Figura 6). En la figura S7 se muestra el control de la catalasa utilizada para demostrar que está realmente disminuye los niveles de H₂O₂, a las concentraciones de trabajo.

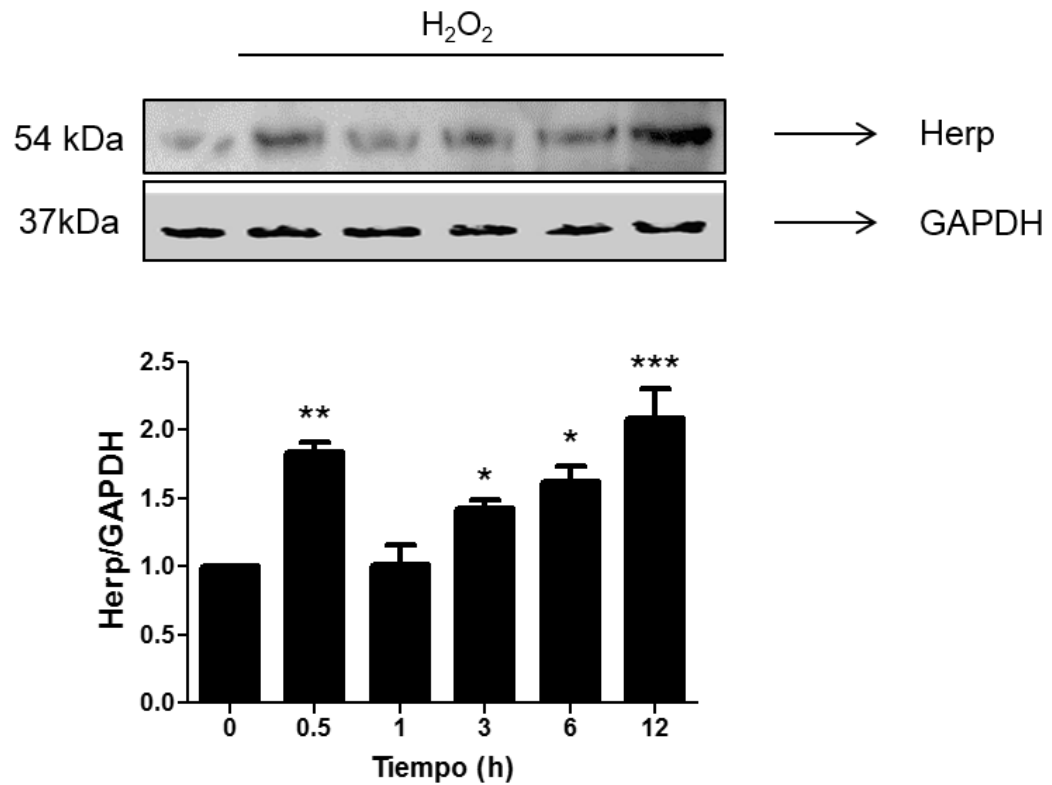


Figura 3. Aumento de los niveles totales de Herp inducido por el tratamiento con H₂O₂ en células HeLa. Células HeLa se trataron con H₂O₂ 500 μ M a los tiempos indicados y luego se prepararon extractos de proteínas totales. Los niveles de Herp y GAPDH se determinaron por Western blot, previa resolución mediante electroforesis SDS-PAGE en geles al 10%. El gráfico representa la cuantificación densitométrica utilizando el programa Imaje J. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$ respecto al control.

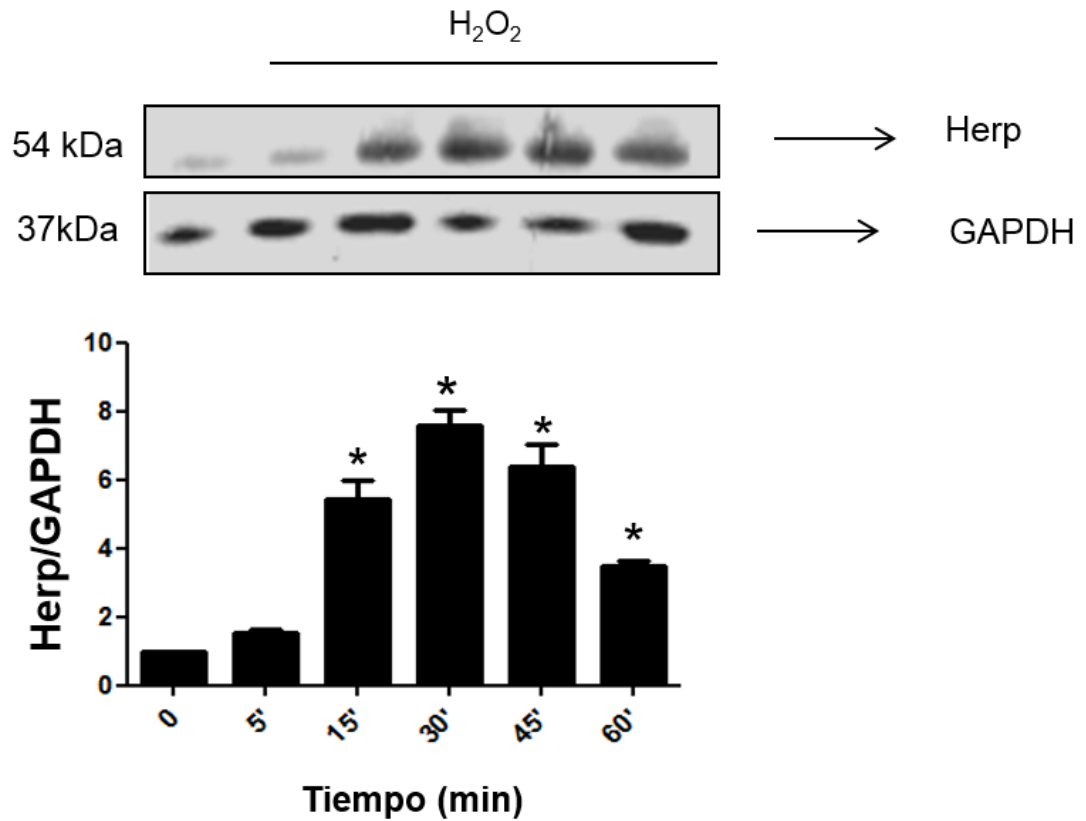


Figura 4. Rápido aumento de los niveles totales de Herp inducido en células Hela tratadas con H_2O_2 . Células Hela se trataron con H_2O_2 500 μ M a los tiempos indicados y luego se prepararon extractos de proteínas totales. Los niveles de Herp y GAPDH se determinaron por Western blot, previa resolución mediante electroforesis SDS-PAGE en geles al 10%. El grafico representa la cuantificación densitométrica utilizando el programa Imaje J. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, * $p < 0,05$ respecto al control.

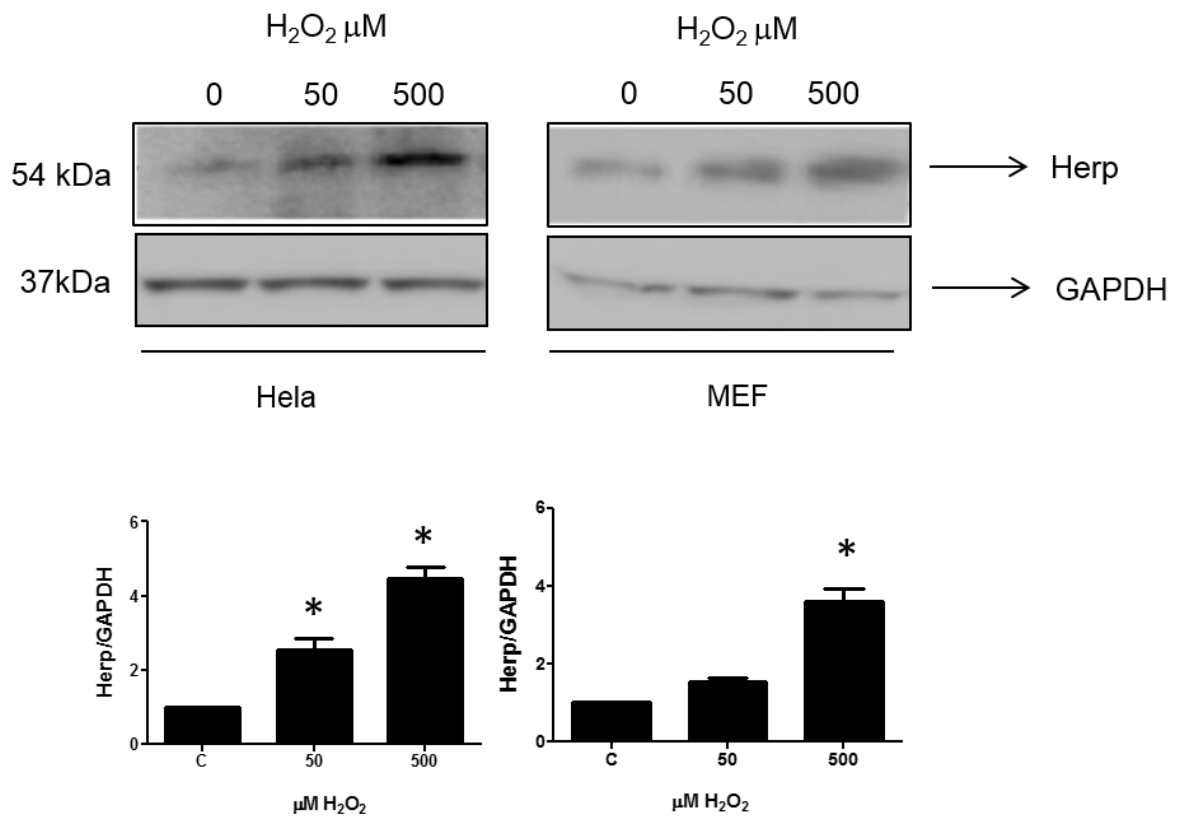


Figura 5. Aumento de los niveles totales de Herp inducido por el tratamiento con H₂O₂ en células HeLa y MEF. Células HeLa o MEF se trataron con H₂O₂ por 30 min a las concentraciones indicadas y luego se prepararon extractos de proteínas totales. Los niveles de Herp y GAPDH se determinaron por *Western blot*, previa resolución mediante electroforesis SDS-PAGE en geles al 10%. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, *p<0,05 respecto al control (C).

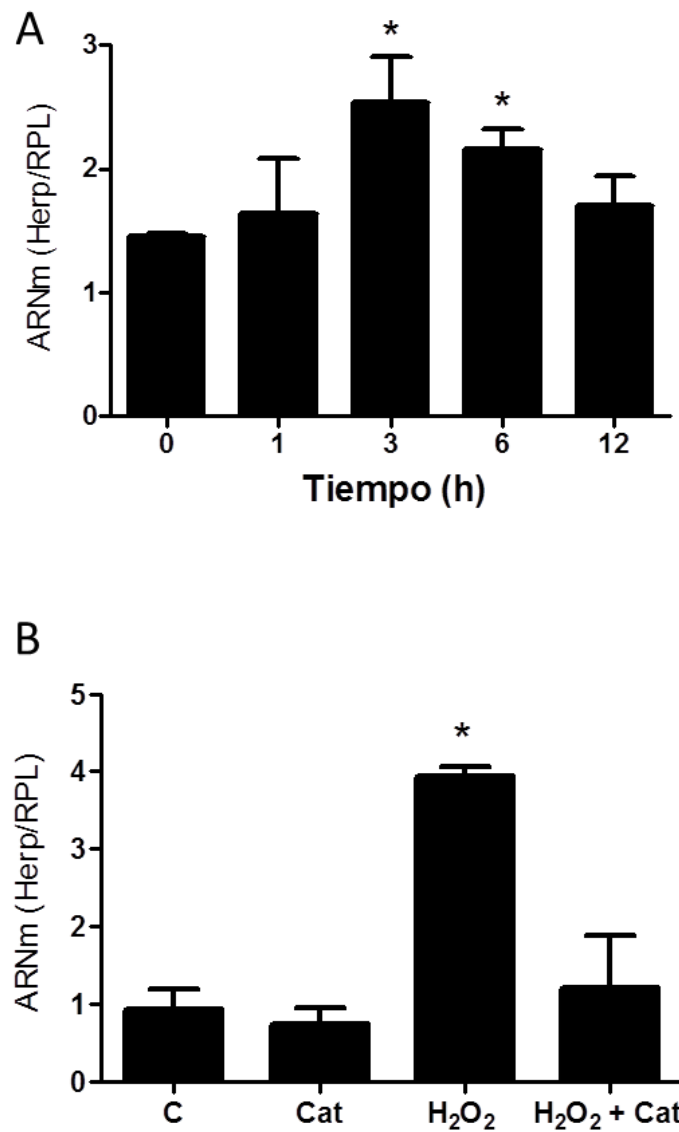


Figura 6. Aumento de los niveles de mRNA de Herp en células Hela tratadas con H₂O₂. Panel A: células Hela se trataron con 500 μ M de H₂O₂ a los tiempos indicados y fueron posteriormente lisadas para la extracción del mRNA que se utilizó como molde en la producción de cDNA. El grafico representa las unidades relativas de mRNA de Herp/RPL. Panel B: células Hela se preincubaron por 3 h con 2500 UI catalasa (Cat) y posteriormente tratadas con H₂O₂ 500 μ M por 3 h. El grafico representa las unidades relativas de mRNA de Herp/RPL. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, *p<0,05 respecto al control (C) o al tiempo 0.

6.2. Herp aumenta su expresión en respuesta al estrés oxidativo a tiempos cortos por un mecanismo dependiente de la traducción.

Dado que no se observaron cambios en los niveles de mRNA de Herp antes de las 3 h post-estimulo con H₂O₂, los datos sugieren que el aumento de la proteína durante la primera hora post-estimulo podría explicarse por una regulación a nivel traduccional. Para corroborar esta hipótesis, se utilizó actinomicina D, un inhibidor de transcripción, y cicloheximida, un inhibidor de la traducción, para definir a qué nivel se está desarrollando la regulación positiva de Herp en respuesta al H₂O₂. Como se observa en la [Figura 7](#), el tratamiento con cicloheximida inhibió completamente el aumento de Herp frente al tratamiento con H₂O₂, no así el tratamiento con actinomicina D, que solo lo hizo de forma parcial. Estos datos indican que el aumento rápido en la proteína Herp en la primera media hora post-estimulo se debe a un aumento en la traducción del mRNA de Herp preformados en la célula.

El eIF4E es un factor iniciador de la traducción que se ha visto envuelto en la respuesta rápida de la célula frente al estrés oxidativo, este factor aumenta la traducción de ciertas proteínas que cumplen funciones importantes en la respuesta redox. Al utilizar 4EGI-1, un inhibidor de la unión de eIF4E a eIF4G, interacción importante para realizar sus funciones en la traducción, se investigó la participación de este factor en la respuesta de Herp frente al estrés oxidativo. Para este fin, las células Hela se preincubaron con el inhibidor 4EGI-1 por 30 min antes de ser tratadas con 500 μM de H₂O₂ por 30 min. La [Figura 8](#) muestra que el inhibidor 4EGI-1 previno el aumento de los niveles de Herp inducido por H₂O₂. Este resultado demuestra la participación de este factor en la respuesta de Herp frente al estrés oxidativo y reafirma lo observado con cicloheximida. En conjunto estos resultados muestran que el aumento en los niveles totales de la proteína Herp en respuesta al H₂O₂ tiene dos componentes, una respuesta inicial rápida principalmente dependiente de la traducción y otra más lenta dependiente de la transcripción.

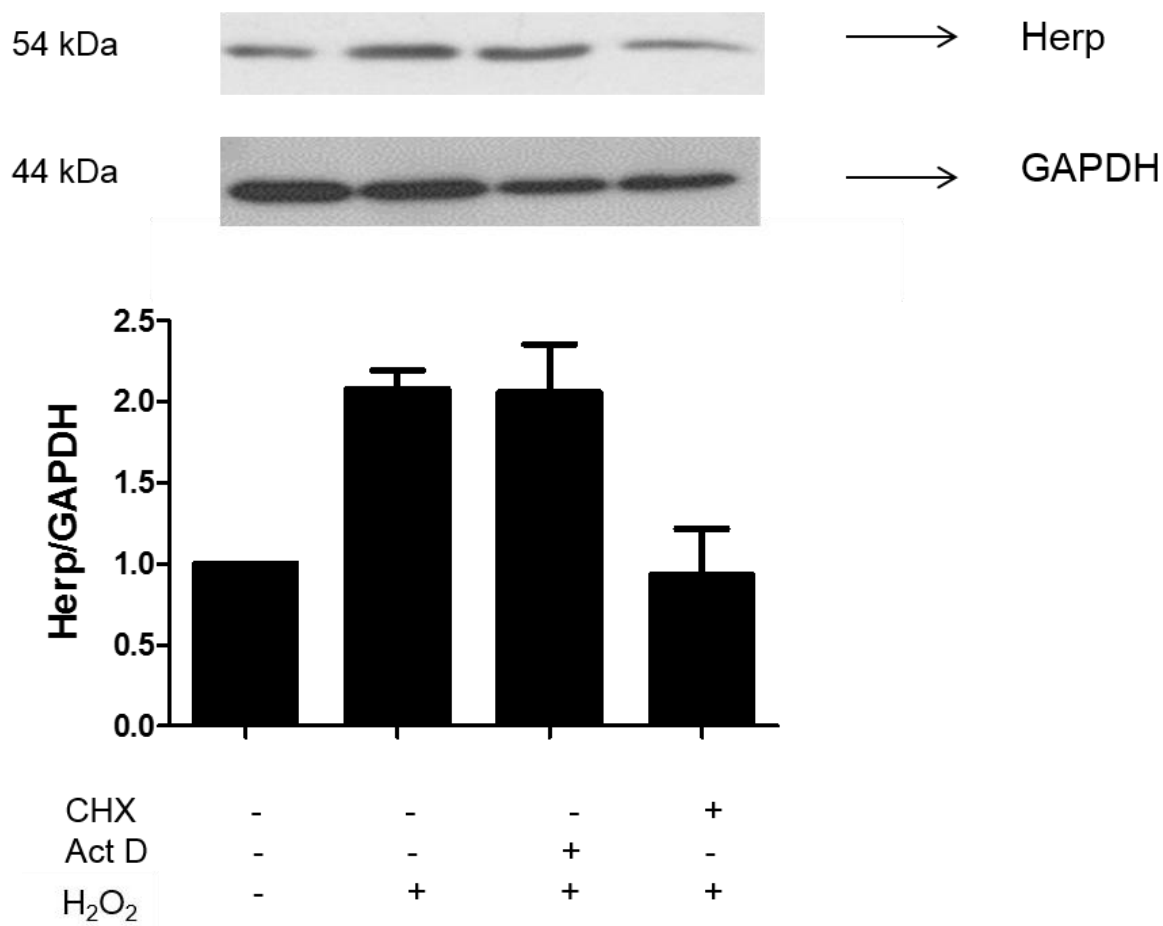


Figura 7. El aumento de los niveles totales de Herp inducido por H₂O₂ es prevenido por CHX. Las células Hela se preincubaron con o sin actinomicina D (ActD) o cicloheximida (CHX) y posteriormente tratadas con 500 μ M de H₂O₂ por 30 min. Los niveles de Herp y GAPDH se determinaron por Western blot, previa resolución mediante electroforesis SDS-PAGE en geles al 10%. Se muestra un resultado representativo de 3 experimentos independientes.

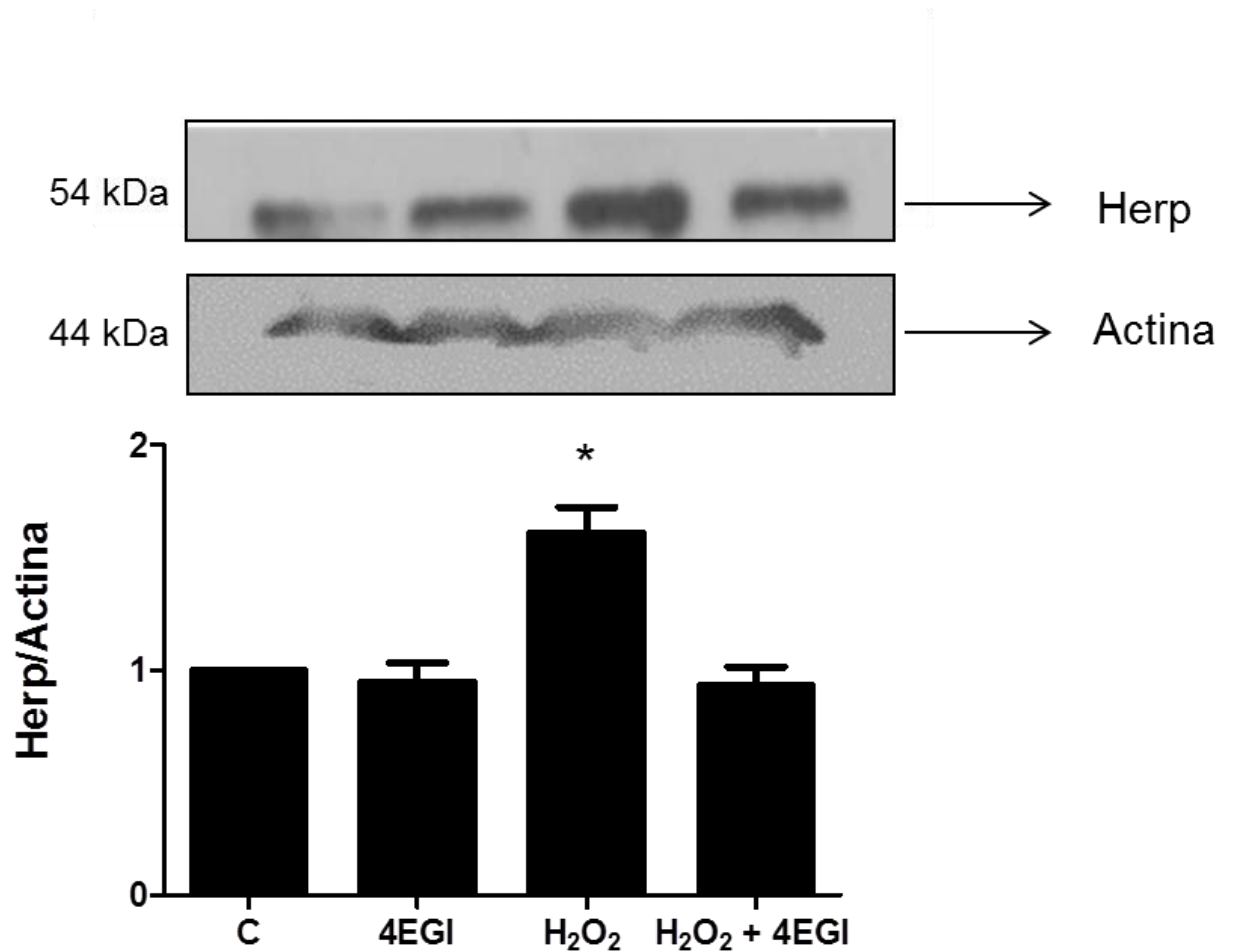


Figura 8. El aumento de los niveles totales de Herp inducido por el tratamiento con H₂O₂ es prevenido por 4EGI-1. Las células Hela se preincubaron con o sin 4EGI-1 (60 μ M) y fueron posteriormente tratadas con 500 μ M de H₂O₂ por 30 min. Los niveles de Herp y actina se determinaron por Western blot, previa resolución mediante electroforesis SDS-PAGE en geles al 10%. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, * $p < 0,05$ respecto al control (C).

6.3. Angiotensina II aumenta expresión de Herp por mecanismo dependiente de la generación intracelular de ROS.

Hasta el momento nuestros estudios han mostrado que Herp aumenta su expresión en respuesta a la adición exógena de H₂O₂, que esta respuesta es rápida y depende tanto de los procesos de transcripción como de traducción. La pregunta que nació frente a estas evidencias fue si Herp responde de la misma forma a la producción endógena de H₂O₂. Para responder esta interrogante, utilizamos angiotensina II (Ang II), un conocido inductor fisiológico de H₂O₂ en la célula, Ang II actúa vía activación de las NOX (Seshiah *et al*, 2002). Específicamente en las células Hela se ha descrito que Ang II activa a NOX1, generando H₂O₂ en forma endógena y activando vías de señalización dependientes de ROS al interior de la célula (Seshiah *et al*, 2002). La concentración normalmente usada de Ang II en la literatura es 100 nM (Seshiah *et al*, 2002), la cual es suficiente para producir H₂O₂ endógenamente en las células Hela y producir sus efectos conocidos.

Para evaluar la producción intracelular de H₂O₂ por Ang II en las células Hela, se utilizó la sonda Hyper que permite medir la producción de H₂O₂ en la célula. La [Figura 9](#) muestra que un pulso de Ang II generó H₂O₂ al interior de la célula de forma bastante rápida, ya desde los 3 min post-estimulo se observó la formación de vesículas en torno a la célula, señal inespecífica de la formación de peróxido en la célula. Inicialmente se trataron las células Hela con Ang II entre 0 a 6 h ([Figura 10](#)), observándose un aumento en la masa total de la proteína muy rápido a los 30 min post estímulo que se mantuvo hasta las 6 h y registrándose un máximo de expresión de la proteína a las 3 h ([Figura 10](#)). A diferencia del tratamiento con H₂O₂ no se observó una disminución de la respuesta a la hora post-estimulo, probablemente dado a las diferencias en las concentraciones de H₂O₂ alcanzadas con el tratamiento con Ang II.

La [Figura 11](#) muestra que el tratamiento de células Hela con Ang II aumentó los niveles del mRNA de Herp desde las 3 h post-estimulo, lo que sugiere que los aumentos vistos en la cantidad de la proteína desde las 3 h post-estimulo podría estar relacionado con aumentos en la transcripción. Para corroborar que el aumento inducido por Ang II a las 3 h era por la producción endógena de H₂O₂, las células Hela se preincubaron con 1500 UI de catalasa y los niveles de mRNA de Herp se determinaron por qPCR. Como se observa

en la [Figura 11b](#), en las células Hela preincubadas con catalasa no se observó el aumento de los niveles de mRNA de Herp por Ang II, lo que corrobora que este aumento depende de la generación de H₂O₂ al interior de la célula.

6.4. Herp aumenta su expresión en animales tratados con angiotensina II

Para definir si la respuesta de Herp frente al estrés oxidativo puede darse de forma fisiológica en organismos vivos se estudió la respuesta de la proteína en ratones tratados con Ang II por 2 semanas y se compararon con ratones no tratados y ratones tratados con Ang II que sobreexpresan catalasa, de esta manera pesquisar si la respuesta observada dependía de la producción intracelular de H₂O₂. Luego se extrajo el mRNA de células musculares lisas de aorta de ratones tratados con o sin Ang II y se determinaron los niveles de mRNA de Herp por qPCR. La [Figura 12](#) muestran que los niveles de Herp aumentan de manera significativa en los ratones tratados con Ang II en comparación a los ratones no tratados. Estos resultados muestran que la respuesta observada en las células Hela es extrapolable a un modelo *in vivo*. Los ratones que sobreexpresan catalasa y tratados con Ang II presentan un menor aumento en la expresión de Herp que no es diferente de los animales que sobreexpresan catalasa y no fueron tratados con Ang II. Estos resultados sugieren que Herp aumenta su expresión en respuesta a la producción de H₂O₂ intracelular en modelos *in vivo*.

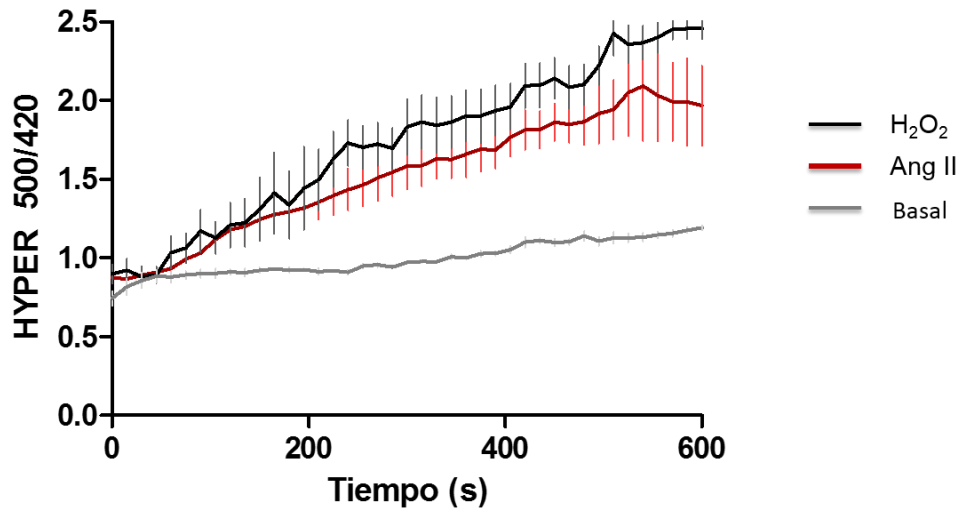


Figura 9. Ang II aumenta los niveles de peróxido intracelular en células Hela. Células Hela se transfecaron con un plásmido que expresa la sonda de peróxido HYPER, las células se colocaron en un microscopio y se les agregó un pulso de Ang II 100 nM (línea roja) o H₂O₂ 500 μ M (línea negra), como control se midió la actividad basal de la sonda sin agregar nada (línea gris). El gráfico representa 10 min de registro de la fluorescencia de la sonda del promedio de 3 repeticiones.

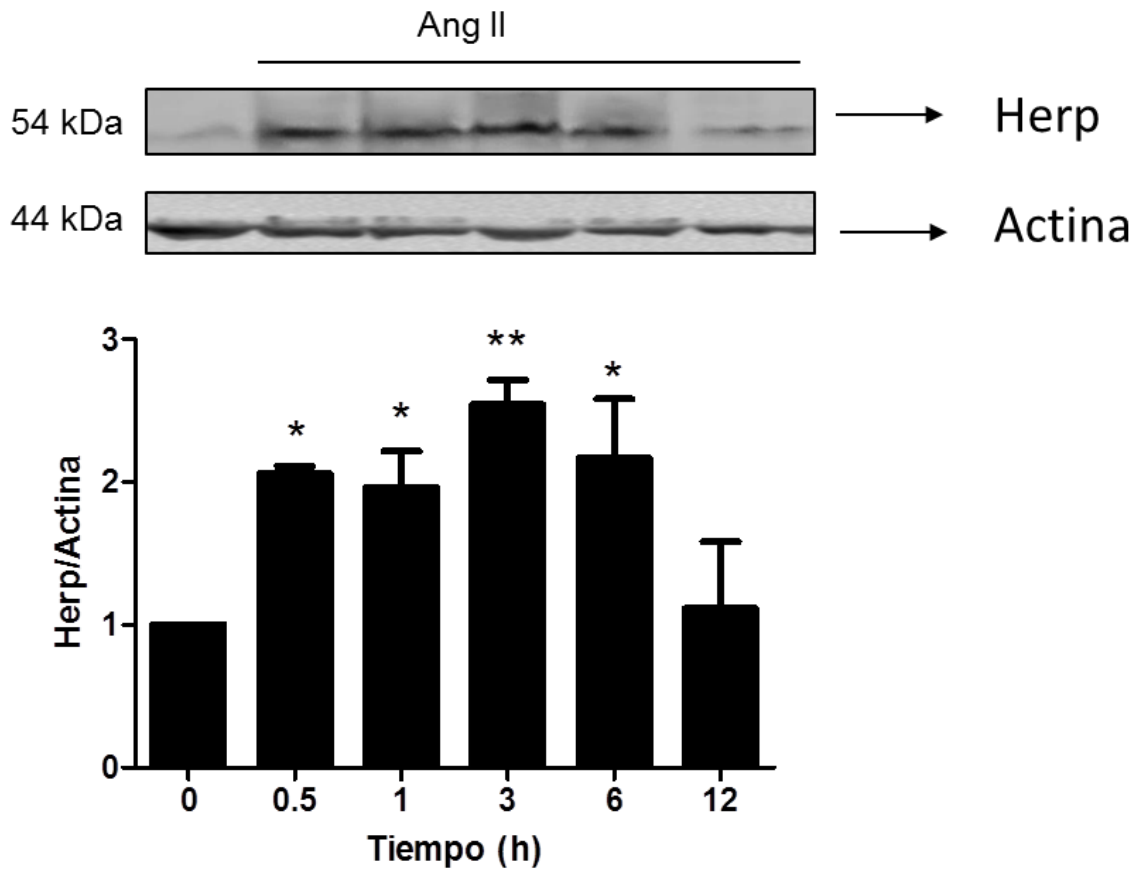


Figura 10. Aumento de los niveles totales de Herp inducido por Ang II en células HeLa. Células HeLa se trataron con Ang II 100 nM a los tiempos indicados y luego se prepararon extractos de proteínas totales. Los niveles de Herp y actina se determinaron por Western blot, previa resolución mediante electroforesis SDS-PAGE en geles al 10%. El gráfico representa la cuantificación densitométrica utilizando el programa Image J. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; respecto al tiempo 0.

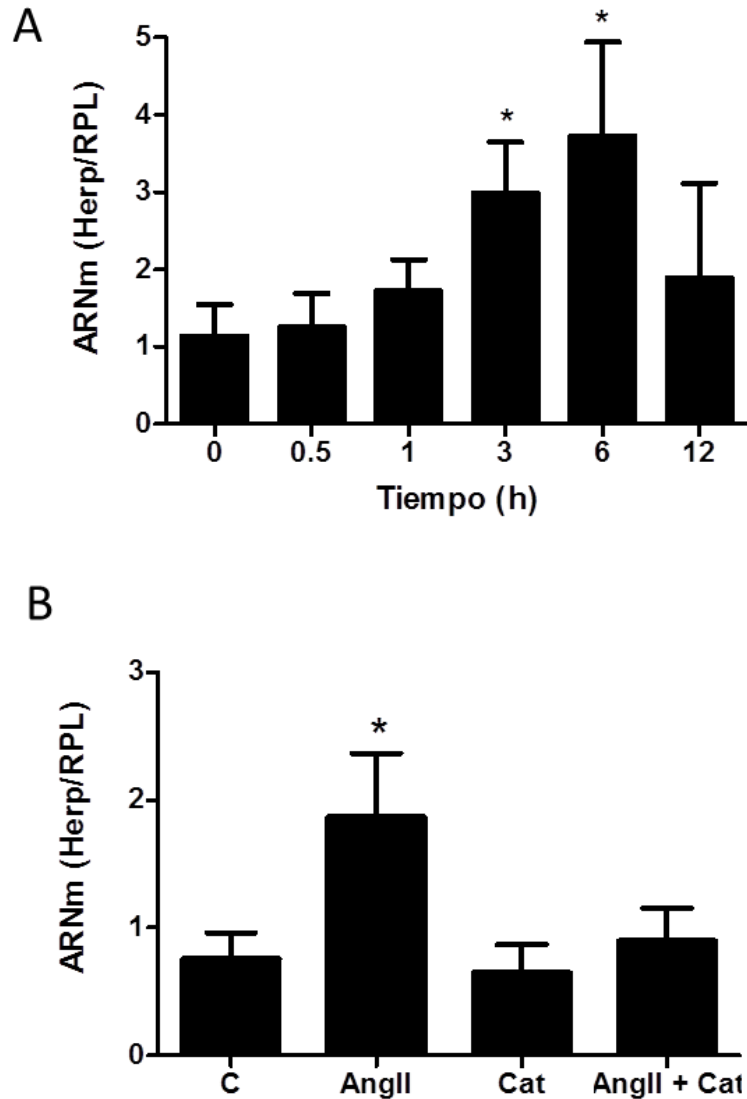
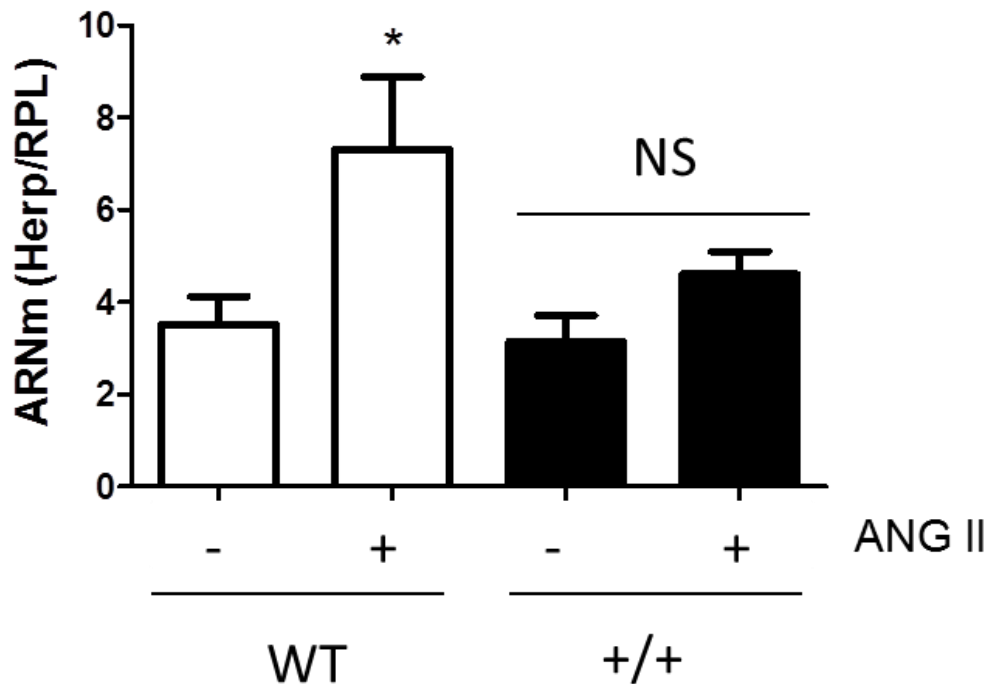


Figura 11. Ang II aumenta los niveles de mRNA de Herp en células Hela tratadas con Ang II. A- Células Hela se trataron con 100 nM de Ang II a los tiempos indicados y fueron posteriormente lisadas para la extracción del mRNA que fue utilizado como molde en la producción del cDNA. B- Células Hela se preincubaron por 3 h con 2500 UI de catalasa (Cat) y posteriormente tratadas con 100 nM de Ang II por 3 h. Los niveles de mARNs de Herp y RPL se determinaron por qPCR, utilizando primer específicos para cada producto. El grafico representa las unidades relativas de mRNA de Herp/RPL. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, * $p < 0,05$ respecto al control (c) o tiempo 0.



+/+ = animales que sobreexpresan catalasa

Figura 12. Efecto de Ang II en los niveles del mRNA de Herp en células musculares lisas de aorta de ratones silvestres (wild type) y que sobreexpresan catalasa. Ratones “Wild type” (Wt, barras blancas) o que sobreexpresan catalasa (+/+, barras negras) se trataron por 3 semanas con angiotensina II (Ang II). Posteriormente fueron sacrificados y se les extrajeron las células de músculo liso de aorta para obtener su mRNA. Los niveles de mRNA de Herp y RPL se determinaron por qPCR, utilizando primers específicos para cada producto. El gráfico representa las unidades relativas de mRNA de Herp/RPL. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, * $p < 0,05$ respecto al control; NS, no significativo.

6.5. El silenciamiento de Herp altera la cinética del Ca^{2+} intracelular generada por H_2O_2 en células Hela.

Para establecer el papel de Herp en respuesta al H_2O_2 se investigó la participación de Herp en la cinética de Ca^{2+} producida por H_2O_2 dado que se conoce que el estrés oxidativo produce aumentos en los niveles de Ca^{2+} intracelular y mitocondrial (Wang *et al*, 1999). Por otro lado, como se mencionó previamente la proteína Herp juega un papel importante en la regulación de la homeostasis de Ca^{2+} intracelular. Para estos estudios se utilizó Fluo-4AM, una sonda fluorescente sensible al Ca^{2+} que tiene una destinación preferentemente en el citosol y en la matriz nuclear. La [Figura 13](#) muestra la cinética de Ca^{2+} producida por la adición de 500 μM de H_2O_2 , observándose que el movimiento de Ca^{2+} producido en las células KD para Herp es diferente al de las células controles. Las células Sh-Luc presentan una cinética generada por H_2O_2 en las células Hela caracterizada por presentar un “peak” único, con un máximo a los 30 seg. Después de la adición del estímulo que regresa al estado basal alrededor de los 200 seg post-estimulo. La cinética de Ca^{2+} intracelular de las células Sh-Herp se diferencia de las células Sh-Luc principalmente por presentar un transitorio de Ca^{2+} más lento, que llega al máximo del “peak” 200 seg después de la adición de H_2O_2 y que se prolonga más en el tiempo, sugiriendo que podría liberar más Ca^{2+} y por mayor tiempo.

Para corroborar estos datos y saber si las Sh-Herp presentan mayores aumentos en los niveles de Ca^{2+} en respuesta a H_2O_2 que las células control, se utilizó la sonda Fura-2 que es radiométrica. Los gráficos obtenidos son similares a los observados con fluo-4. Las células Sh-Luc y Sh-Herp no presentan diferencias en las cantidades basales de Ca^{2+} intracelular lo que sugiere que las células Sh-Herp frente a un estímulo de H_2O_2 presentan un mayor aumento de calcio intracelular y que se sostiene por más tiempo que las células control Sh-Luc ([Figura S8](#)). Estos datos concuerdan con los descritos anteriormente en la literatura donde se muestra que Herp regula la homeostasis de Ca^{2+} intracelular (Chan *et al*, 2004). Estos resultados sirven como un importante antecedente que vincula a Herp como un regulador general de las cinéticas de Ca^{2+} intracelular tanto basalmente (Chan *et al*, 2004; Belal *et al*, 2012) como en respuesta a diferentes tipos de estrés como el estrés de retículo (Kokame *et al*, 2000) y el estrés oxidativo.

La literatura actual apunta a que Herp estaría regulando los niveles intracelulares de Ca^{2+} por un mecanismo dependiente del IP3R, por lo que para estudiar su participación en el proceso se utilizó el antagonista específico del IP3R xestospongina B (XeB). La [Figura 13B](#) muestra el efecto de la XeB en la cinética de Ca^{2+} producida por H_2O_2 en las células Hela Sh-Herp, observándose una disminución de la amplitud de la señal que no desaparece completamente, presumiblemente por la participación de otros canales de Ca^{2+} en la respuesta de estas células. Por otro lado, XeB disminuyó casi en su totalidad el transitorio de Ca^{2+} intracelular en las células Sh-Luc. Estos resultados muestran la participación del IP3R en las cinéticas de Ca^{2+} producidas por H_2O_2 y que Herp podría estar involucrado en su regulación. Para definir mejor la cinética observada se comparó con aquella producida por H_2O_2 en un medio de cultivo con y sin Ca^{2+} y así estudiar la participación del influjo del Ca^{2+} externo en las cinéticas. La [Figura 14](#) muestra que al utilizar el medio sin Ca^{2+} externo afecta la señal de Ca^{2+} y que ambos picos fueron de amplitud similar a las células Sh-Herp con Ca^{2+} externo pero más definido, que perduró por menos tiempo. Comparado con lo observado con las células Sh-Luc, los picos son similares pero en las células Sh-Herp se prolongó por mayor tiempo. Por otro lado al utilizar un medio sin Ca^{2+} externo no afectó la cinética de las células controles, mostrando que la cinética de Ca^{2+} producida por H_2O_2 en las células controles sólo depende de los reservorios internos de Ca^{2+} . Al parecer la cinética de Ca^{2+} producida en las células Sh-Herp tiene una doble componente, una interna dependiente del IP3R y otra dependiente del influjo extracelular de Ca^{2+} . Finalmente para evaluar esta posibilidad se estudió la cinética de Ca^{2+} en respuesta al H_2O_2 de las células Sh-Herp en un medio sin Ca^{2+} preincubadas con XeB. En estas condiciones, la señal de Ca^{2+} desapareció completamente, comprobando que Herp participa en la regulación del IP3R y además al parecer también regula los influjos de Ca^{2+} desde el exterior ([Figura 14](#)).

6.6. El silenciamiento de Herp altera la cinética del Ca^{2+} mitocondrial generada por H_2O_2 en células HeLa

Dado que el IP3R participa en el traspaso de Ca^{2+} entre el retículo endoplásmico y la mitocondria, se estudió el papel de Herp en el influjo de Ca^{2+} mitocondrial en respuesta al H_2O_2 . Para este objetivo se utilizaron células Hela Sh-Herp y controles preincubadas con Rhod-FF, una sonda de Ca^{2+} que preferentemente tiene una localización mitocondrial. La

Figura 15 muestra las cinéticas de Ca^{2+} mitocondrial producida por 500 μM de H_2O_2 . Tanto en las células Sh-Luc y Sh-Herp se observó una entrada constante de Ca^{2+} a la mitocondria en respuesta a H_2O_2 . Este influjo de Ca^{2+} es más rápido en las células KD para Herp que en las células controles, asumiendo niveles basales de calcio similares en las células Sh-Luc y Sh-Herp. Esto sugiere que Herp participaría en la regulación del influjo de Ca^{2+} mitocondrial. Ambas señales tanto en las células Sh-Herp como la de las células controles disminuyen casi totalmente al utilizar XeB (**Figura 15 B**), corroborando la importancia del IP3R en los movimientos de Ca^{2+} desde el RE a la mitocondria y que la desregulación del IP3R podría explicar las diferencias en el influjo de Ca^{2+} mitocondrial observadas en las células Hela Sh-Herp respecto a las células controles. Para corroborar la participación de la vía IP3/receptor de IP3R en las cinéticas de Ca^{2+} estudiadas, se utilizó histamina como un estímulo conocido que produce movimientos de Ca^{2+} desde el RE a la mitocondria vía IP3R (Decuyperre *et al*, 2011). Al tratar las células con un pulso de 100 μM de histamina se observó que las células Sh-Herp presentan una cinética de mayor amplitud y duración que las células control. La señal de Ca^{2+} producida se mantiene en el tiempo sin volver al basal de forma inmediata como en las células controles. Ambas señales tanto en las células Sh-Herp como controles son abolidas al utilizar XeB (**Figura 16**). Estos resultados corroboran finalmente que Herp regula al IP3R y que esta regulación es importante para regular la entrada de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmica a la mitocondria.

6.7. Las células Sh-Herp tienen más IP3R que las células control.

En el estudio de Belal *et al*, 2012 estipularon que Herp regularía el Ca^{2+} intracelular mediando la degradación del IP3R, por lo cual se estudió si en nuestro modelo de células Hela Sh-Herp se presentaban cambios en los niveles del IP3R. Como se observa en la **Figura 17**, las células Sh-Herp presentaron un aumento significativo en la cantidad de IP3R determinado por Western blot en comparación a las células Sh-Luc. Estos resultados mostrarían que las células Sh-Herp presentan basalmente mayor cantidad de IP3R y que posiblemente a través de este mecanismo Herp regularía el Ca^{2+} intracelular. En la **Figura 18** se muestran células Hela Sh-Luc y Sh-Herp que son tratadas por 4 h con el inhibidor de la actividad proteosomal MG132 (100 μM). Los resultados mostraron que Herp aumentó sus niveles en respuesta a MG132 como describieron Belal *et al*. (2012) dado que este compuesto genera estrés de retículo y Herp es una marcador temprano de este

proceso. Además Herp es una proteína que se degrada vía proteosoma. También se observó que el tratamiento con MG132 aumentó los niveles de IP3R dado que esta proteína se degrada por la vía proteosomal. Tanto en las células Sh-Luc como Sh-Herp se llegan a los mismos niveles de IP3R luego del tratamiento, lo que indicaría que Herp participaría en su degradación por vía proteosomal, lo cual concuerda con lo publicado por Belal *et al.* (2012).

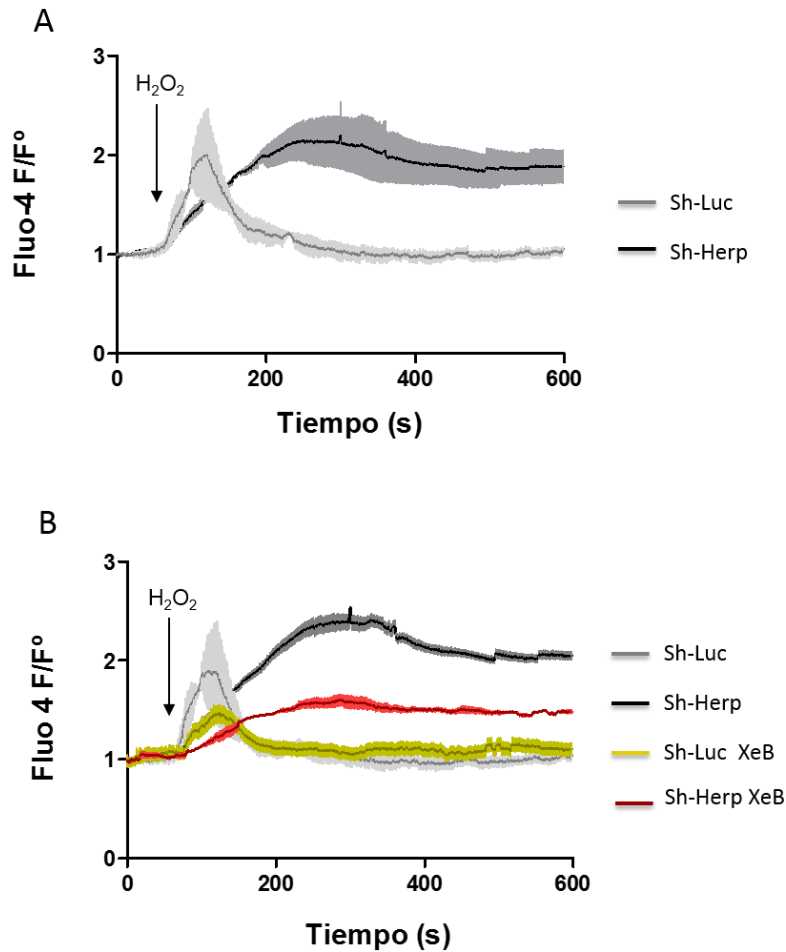


Figura 13. Células Sh-Herp presentan una cinética de Ca^{2+} diferencial en respuesta al H_2O_2 , la cual depende parcialmente del IP3R. Panel A: células Hela Sh-Luc (línea gris) y Sh-Herp (línea negra) se pre-trataron con la sonda Fluo-4. Posteriormente ellas se observaron bajo el microscopio confocal y se registró la fluorescencia basal (línea base de 60 s) y sus cambios en el tiempo (por 540 s) al adicionar un pulso de 500 μM de H_2O_2 . Panel B: células Hela Sh-Luc y Sh-Herp se incubaron con la sonda Fluo-4, luego con o sin XeB (100 μM) y posteriormente se observaron al microscopio, registrando una línea base de 60 s. y luego la cinética de Ca^{2+} producida por un pulso de 500 μM de H_2O_2 por 540 s. Los resultados se representan como fluorescencia relativa (F/F^0) y corresponden a al promedio de 3 experimentos independientes.

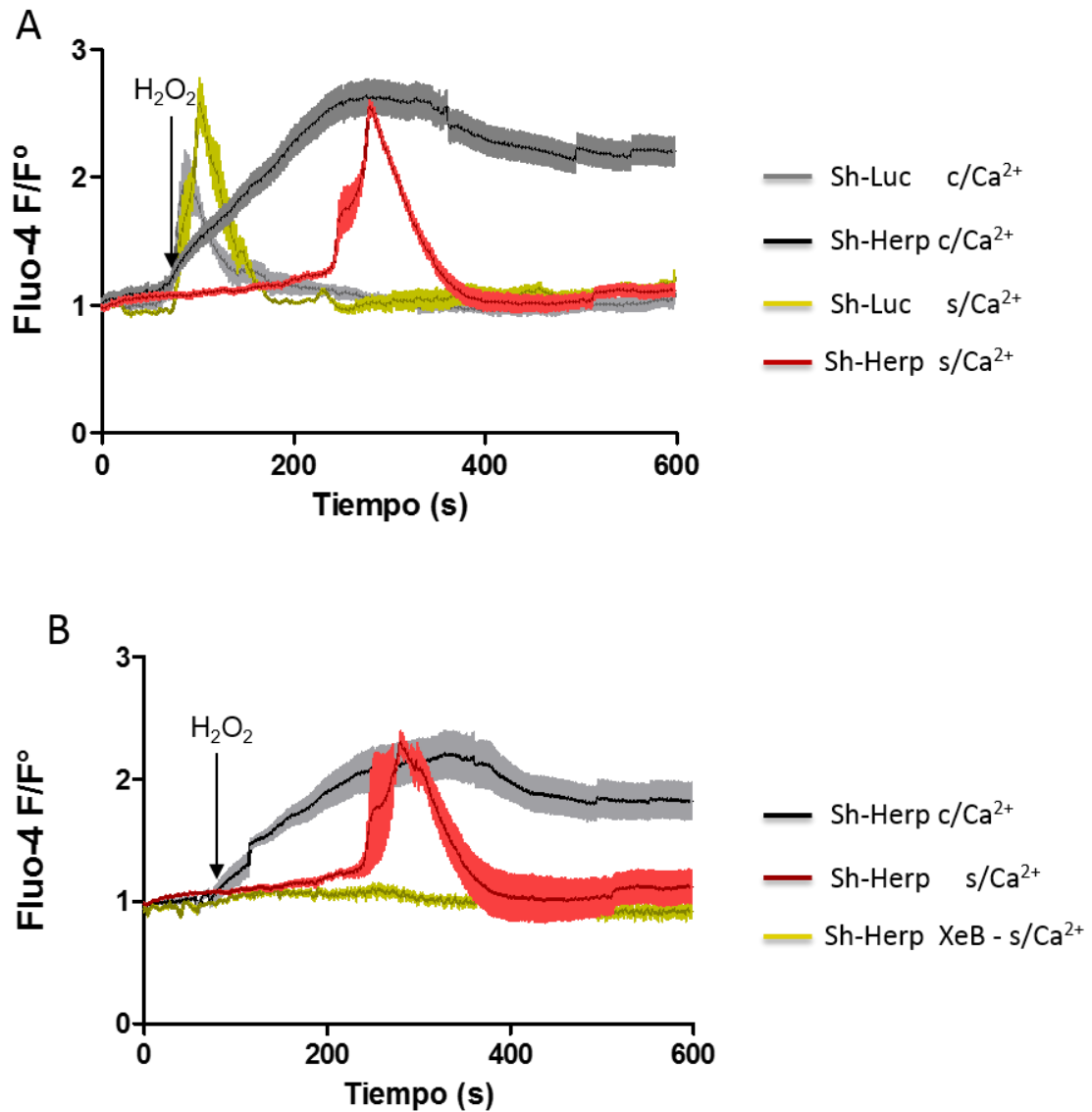


Figura 14. Cinética de Ca²⁺ en células Sh-Herp expuestas a H₂O₂ presentan dos componentes: Ca²⁺ liberado a través del IP3R y Ca²⁺ externo. Panel A: células Hela Sh-Luc y Sh-Herp fueron incubadas con la sonda Fluo-4, en un medio con Ca²⁺ (líneas gris y negra) o sin Ca²⁺ (líneas roja y verde) y posteriormente observadas al microscopio. Se registró la línea base de 60 s y luego se registró la cinética de Ca²⁺ producida por un pulso de 500 μ M de H₂O₂ por 540 s. Panel B: células Hela Sh-Herp fueron incubadas con la sonda Fluo-4 en un medio con Ca²⁺ (línea negra) o sin Ca²⁺ (línea roja) o sin Ca²⁺ y preincubadas con XeB 100 μ M (línea verde) y posteriormente observadas al microscopio. Se registró una línea base de 60 s. y luego se registró la cinética de Ca²⁺ producida por H₂O₂ por 540 s. Los resultados se representan como fluorescencia relativa (F/F⁰) y corresponden a al promedio de 3 experimentos independientes.

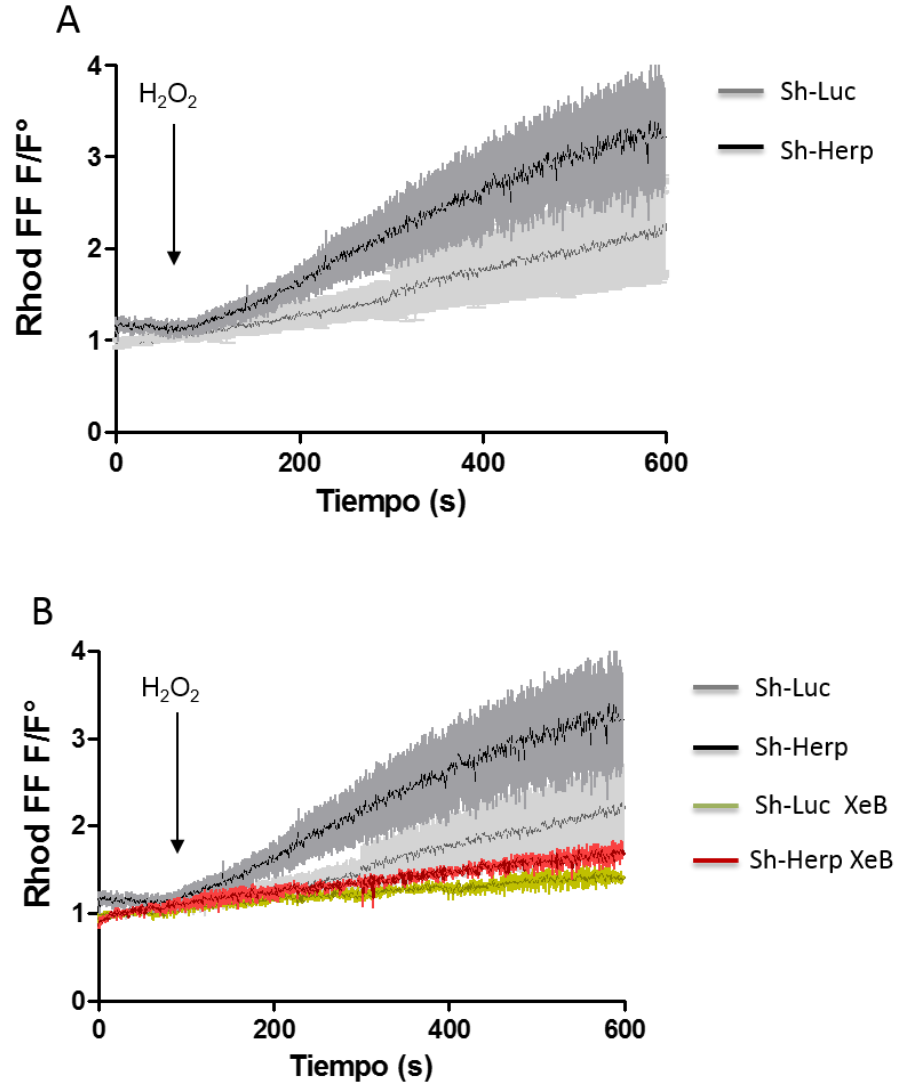


Figura 15. Células Sh-Herp presentan un mayor influjo de Ca²⁺ mitocondrial respuesta a H₂O₂ dependientes del IP3R. Panel A: células Hela Sh-Luc (línea gris) y Sh-Herp (línea negra) se incubaron con la sonda Rhod-FF y posteriormente observadas al microscopio. Se registró una línea base de 60 s y luego se registró el influjo de Ca²⁺ mitocondrial producido por un pulso de 500 μ M de H₂O₂ por 540 s. Panel B: células Hela Sh-Luc y Sh-Herp se incubaron con la sonda Fluo-4, preincubadas con XeB 100 μ M y posteriormente observadas al microscopio. Se registró una línea base de 60 s y luego se registró el influjo de Ca²⁺ mitocondrial producido por un pulso de 500 μ M de H₂O₂ por 540 s. Los resultados se representan como fluorescencia relativa (F/F⁰) y corresponden a al promedio de 3 experimentos independientes.

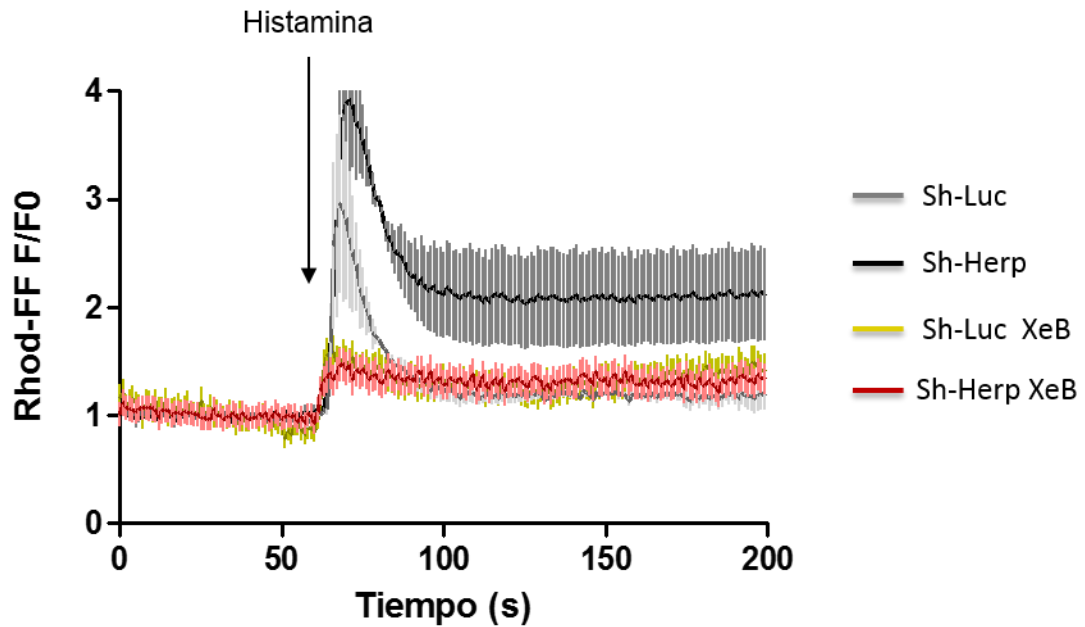


Figura 16. Las células Sh-Herp presentan un mayor influjo de Ca^{2+} mitocondrial en respuesta a un pulso de histamina dependiente del IP3R. Células Hela Sh-Luc y Sh-Herp se preincubaron con la sonda Rhod-FF y luego incubadas con XeB ($100 \mu\text{M}$) y posteriormente observadas al microscopio. Luego se registró la línea base de 60 s y se registraron el influjo de Ca^{2+} mitocondrial producido por un pulso de $100 \mu\text{M}$ de histamina por 540 s. Los resultados se representan como fluorescencia relativa (F/F^0) y corresponden al promedio de 3 experimentos independientes.

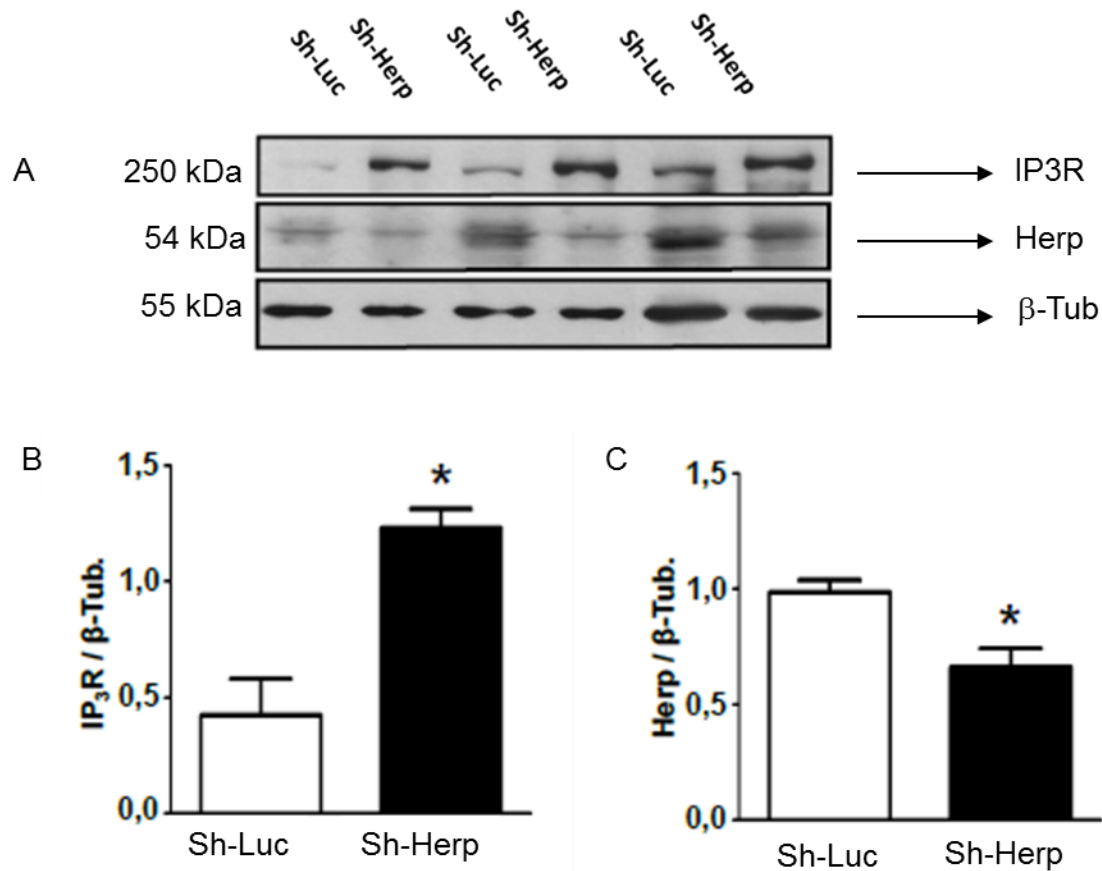


Figura 17. Células Hela Sh-Herp tienen más IP3R en comparación a las células controles. Panel A: células Hela Sh-Luc y Sh-Herp son cultivadas por 48 h, sin tratamiento y luego se prepararon extractos de proteínas totales. Los niveles de Herp, IP3R y beta-tubulina se determinaron por Western blot, previa resolución mediante electroforesis SDS-PAGE en geles en gradiente. Panel B: el gráfico representa la cuantificación densitométrica de la cantidad de IP3R/beta-tubulina. Panel C: gráfico representa la cuantificación densitométrica de la cantidad de Herp/beta-tubulina. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, * $p < 0,05$ y ** $p < 0,005$ respecto al control.

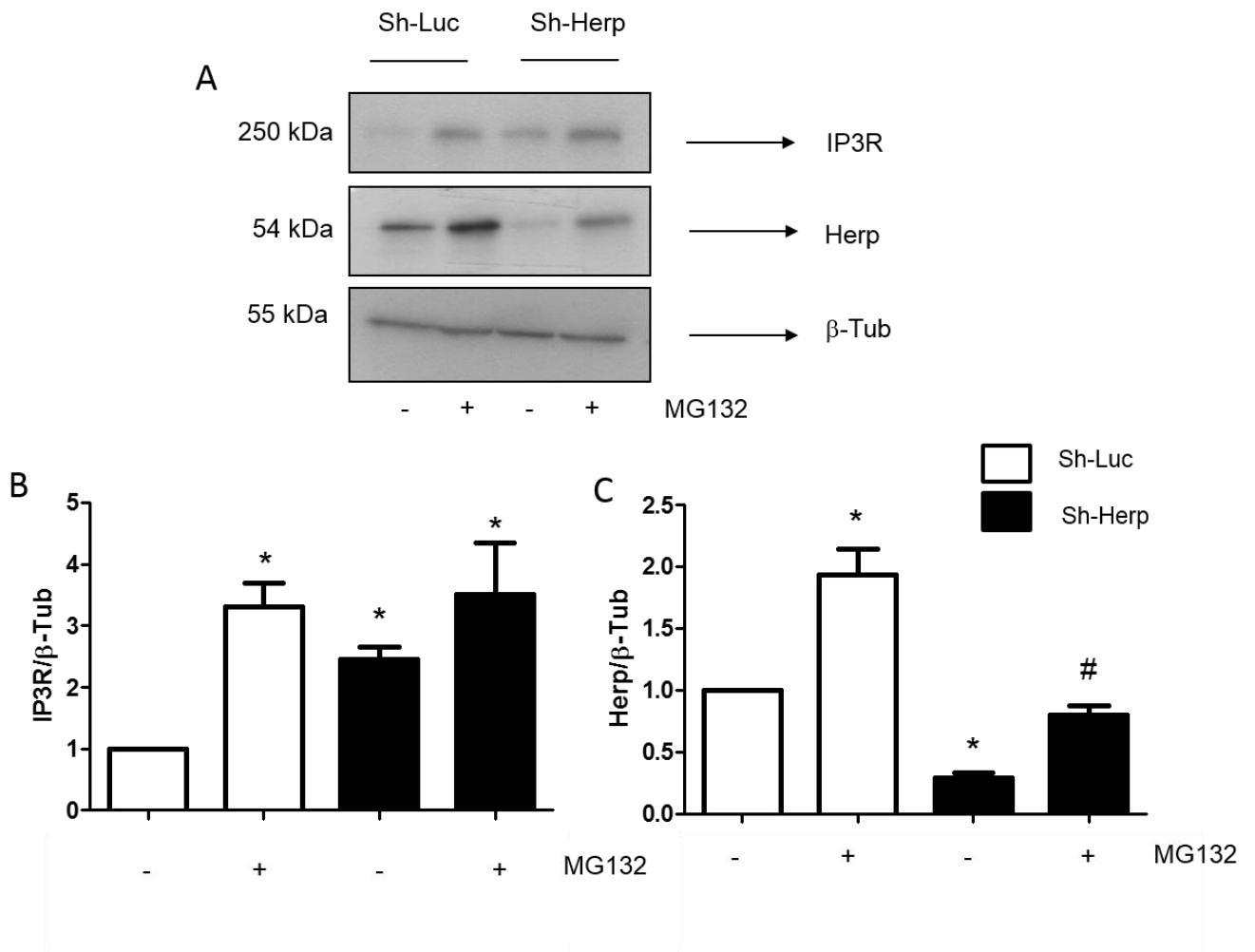


Figura 18. La mayor cantidad de IP3R en las células HeLa Sh-Herp se debe a una menor degradación del receptor por la vía proteosomal. Las células HeLa Sh-Luc y Sh-Herp son tratadas con MG132 (100 μ M) por 4 h y luego se prepararon extractos de proteínas totales. A. Los niveles de Herp, IP3R y beta-tubulina se determinaron por Western blot previa resolución mediante electroforesis SDS-PAGE en geles en gradiente. B. El gráfico representa la cuantificación densitométrica de los niveles de IP3R/ β -Tubulina. C. El gráfico representa la cuantificación densitométrica de los niveles de Herp/ β -Tubulina. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, * $p < 0,05$ respecto al control y # $p < 0,05$ con respecto a Sh-Luc con Mg132.

6.8. Papel citoprotector de Herp frente al tratamiento con H₂O₂.

Dado que tanto el aumento en la producción de ROS como la desregulación del Ca²⁺ intracelular son señales que alteran la supervivencia celular y que Herp se ha involucrado en la respuesta al estrés oxidativo y regulación del Ca²⁺ intracelular (Chan *et al*, 2004; Belal *et al*, 2012) se estudió el rol citoprotector de Herp frente al daño celular producido por el H₂O₂. Para establecer si Herp tenía algún efecto citoprotector al H₂O₂ se utilizaron células Hela *knock down* para Herp (Sh-Herp) y células control (Sh-Luc). La [Figura 19](#) muestra el curso temporal (entre 0 y 24 h) del efecto de la exposición de células Sh-Herp y Sh-Luc a 500 μM de H₂O₂ en la viabilidad celular. Se observó que a partir de las 3 h post-tratamiento hubo más muerte en las células KD para Herp que en los controles, manteniéndose estas diferencias hasta las 12 h post-tratamiento ([Figura 19 A](#), [Figura S2](#)). También se realizó una curva de concentración de H₂O₂ por 3 h de tratamiento, en donde se observó diferencias en la muerte de las células Sh-Herp vs las Sh-Luc desde concentraciones de 250 μM hasta 2 mM de H₂O₂. Estos datos indican que Herp ejerce un efecto citoprotector frente al estrés oxidativo producido por el tratamiento con H₂O₂. ([Figura 20](#)).

Resultados similares se observaron al tratar las células Sh-Herp y Sh-Luc con 100 y 200 nM de Ang II por 24 h. Como se muestra en la [Figura S9](#) células Sh-Herp son más sensibles a la muerte causada por Ang II a 100 y 200 nM por 24 h que las células control, lo que sugiere que la respuesta de Herp frente a un aumento de ROS intracelular ya sea por adición de H₂O₂ de forma exógena o por producción endógena de H₂O₂ es importante para la supervivencia celular.

Para corroborar la importancia de Herp en la citoprotección, células Sh-Herp se transfectaron en forma transitoria con un plásmido que sobreexpresa Herp. De esta manera como se muestra en la [Figura 21](#), las células Sh-Herp transfectadas recuperan los niveles basales de Herp. Estas células se trataron con 500 μM de H₂O₂ por 3 h, presentando menos muerte que en las células Sh-Herp transfectadas con un plásmido control (pGI3-vacio) ([Figura 21](#)). Esto ratifica la importancia de la proteína Herp en la respuesta frente al H₂O₂ y su rol en la citoprotección celular.

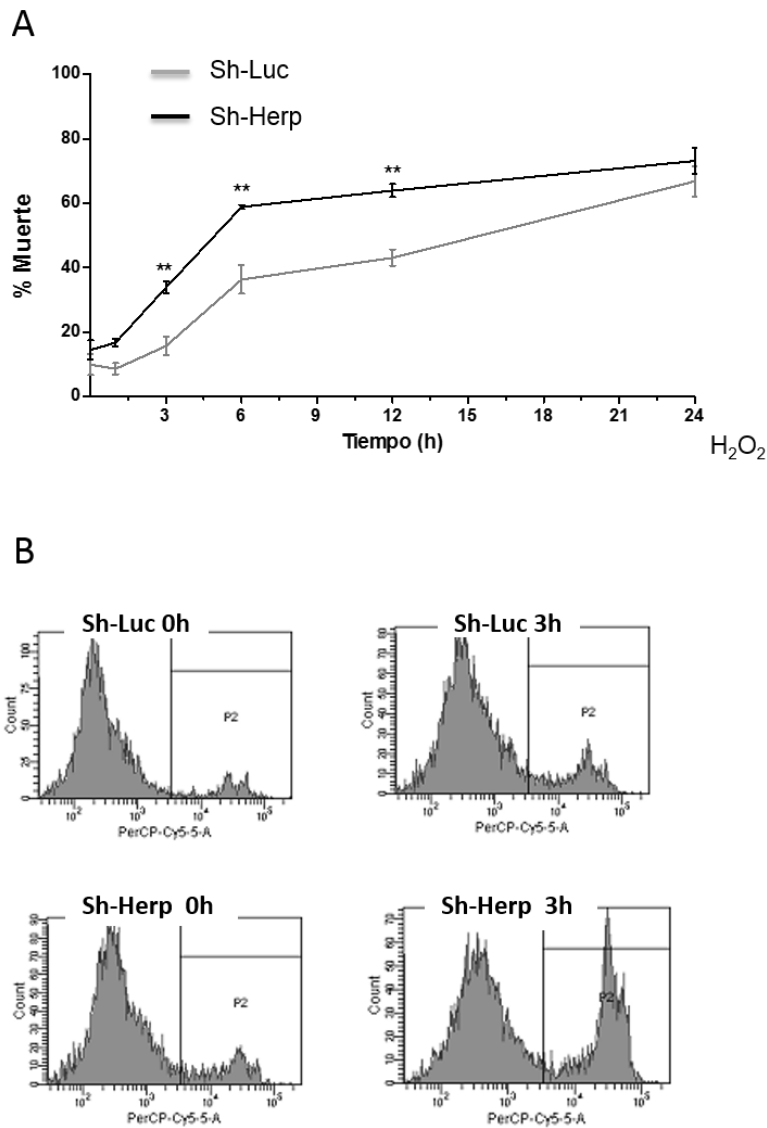


Figura 19. Células Hela *Knock down* para Herp (Sh-Herp) son más sensibles a la muerte producida por H_2O_2 . Panel A- Células Hela Sh-Herp (línea negra) o Sh-Luc (línea gris) fueron tratadas con $500 \mu M$ de H_2O_2 por los tiempos indicados. Para determinar el % de células muertas se utilizó el ensayo de incorporación de PI por citometría de flujo. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, * $p < 0,05$ respecto al control. B- Gráficos densitométricos representativos de A, se escogieron 0 y 3 h de tratamiento con $500 \mu M$ de H_2O_2 tanto de las células Hela Sh-Luc y Sh-Herp.

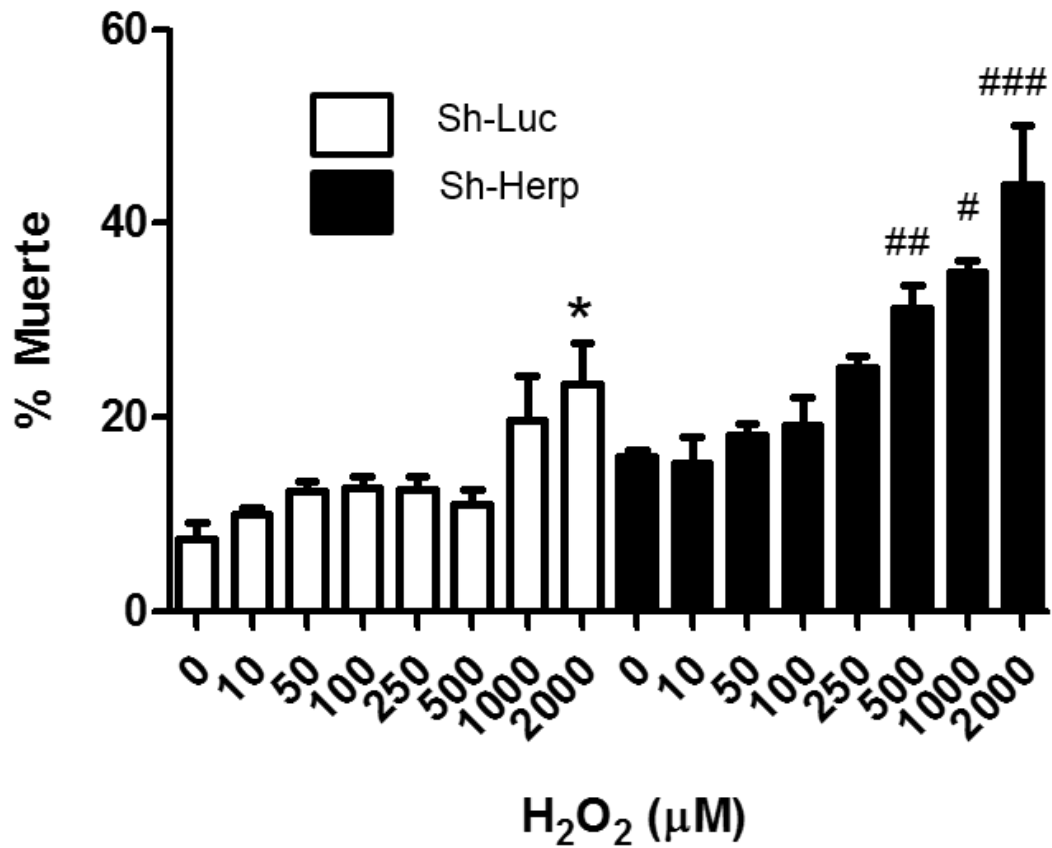


Figura 20. Células Hela *Knock down* para Herp (Sh-Herp) son más sensibles a la muerte producida por diferentes concentraciones de H₂O₂. Células Hela Sh-Herp (barras negras) o Sh-Luc (barras blancas) se trataron con H₂O₂ por 3 h con las concentraciones indicadas. Para determinar el % de células muertas se utilizó el ensayo de incorporación de PI por citometría de flujo. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, *p<0,05 respecto al control; #p<0,05; ##p<0,005; ###p<0,001 con respecto a la misma condición.

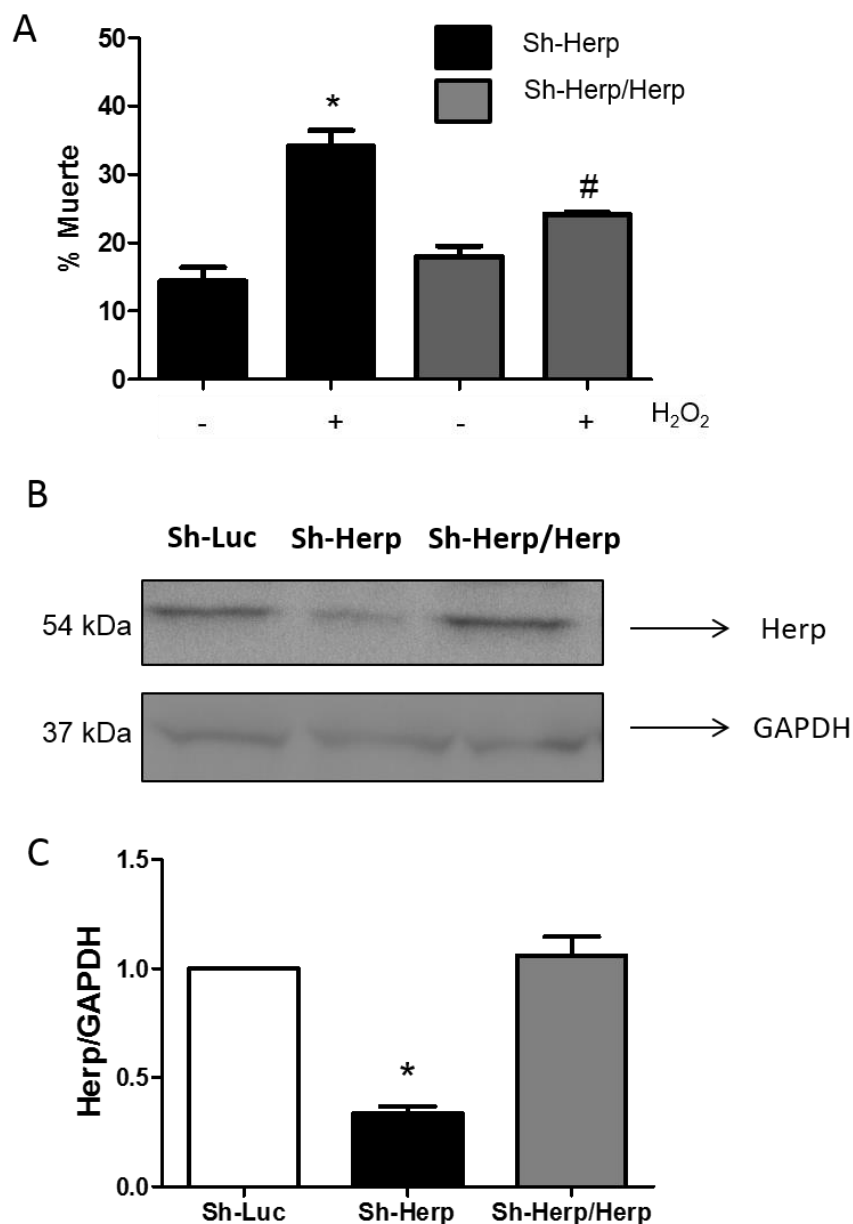


Figura 21. Células Hela Sh-Herp son menos sensibles al tratamiento con H₂O₂ cuando recuperan los niveles normales de Herp. A; células Hela Sh-Herp (barra negra) o Sh-Herp transfectadas con un plásmido que expresa la proteína Herp (Sh-Herp/Herp; barra gris) se trataron por 3 h con 500 μ M de H₂O₂. Para determinar el % de células muertas se utilizó el ensayo de incorporación de PI por citometría de flujo. B: células Hela Sh-Herp se transfectaron con un plásmido de expresión para la proteína Herp (Sh-Herp/Herp). Los niveles de Herp y GAPDH se determinaron por Western blot, previa resolución mediante electroforesis SDS-PAGE en geles al 10%. C: El gráfico representa la cuantificación densitométrica de los niveles de Herp/GAPDH. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, *p<0,05 respecto al control; #p<0,05 con respecto a la misma condición.

Para dilucidar el mecanismo por el cual las células Sh-Herp son más sensibles a la muerte frente al tratamiento con H₂O₂, se utilizaron una serie de inhibidores de vías de señalización que participan en la muerte mediada por ROS. Se utilizó ZVAD, un inhibidor de caspasas, E64D, un inhibidor de calpainas; y leupeptina, un inhibidor de proteasas, todos ellos previnieron la muerte producida por H₂O₂ en las células Sh-Herp (Figura 22). Estos datos sugieren que las células Sh-Herp tratadas con H₂O₂ mueren más vía apoptosis. Para corroborar este tipo de muerte se realizaron dos ensayos para determinar apoptosis y necrosis. Para evaluar la apoptosis se determinó el % de células en sub G por citometría de flujo. La Figura 23 muestra que las células Sh-Herp al ser tratadas con 500 μM H₂O₂ por 3 h presentan un mayor % de células con subG1 que las células Sh-Luc frente al mismo tratamiento, lo que sugiere que estas células están experimentando apoptosis. Para descartar necrosis se midió la cantidad de LDH liberada. A las 3 h de estímulo con 500 μM de H₂O₂ no observan diferencias significativas en los niveles de LDH producidos por las células Sh-Luc y Sh-Herp. Con 1 mM de H₂O₂, se observa un aumento en los niveles de LDH pero no existen diferencias entre las células Sh-Luc y Sh-Herp (Figura 24). En resumen, estos resultados muestran que las células Sh-Herp son más sensibles a la muerte producida por el H₂O₂ vía apoptosis.

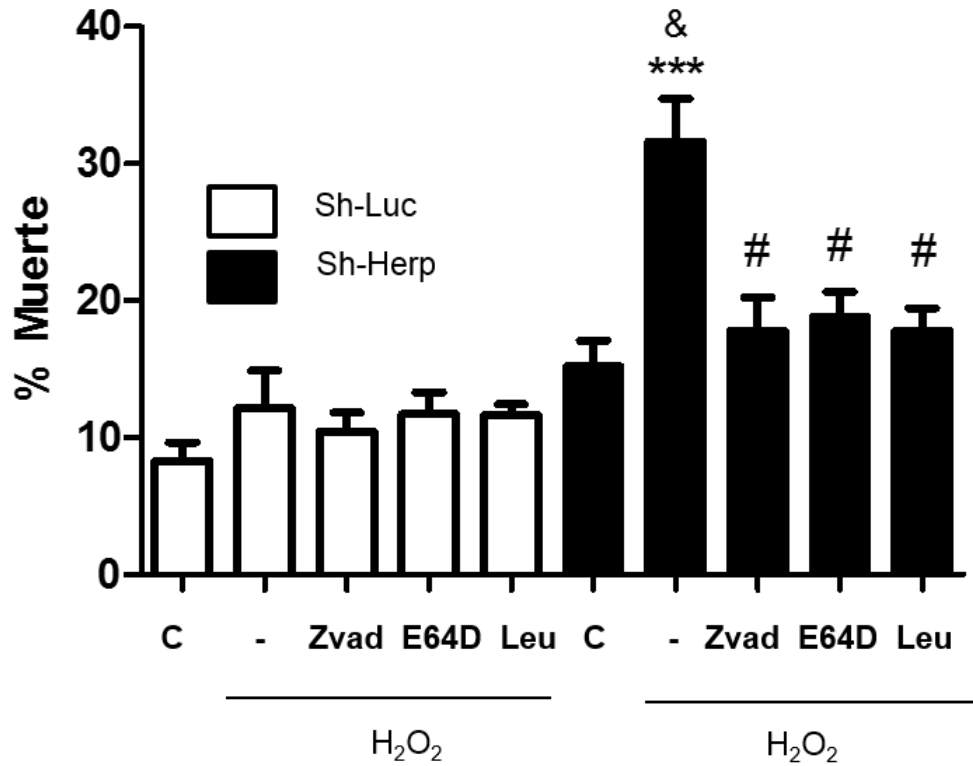


Figura 22. Células Hela Knock down para Herp (Sh-Herp) son más sensibles al H₂O₂ por una vía dependiente de la activación de caspasas y calpaina. Células Hela Sh-Herp (barras negras) o Sh-Luc (barras blancas) se preincubaron con distintos inhibidores Zvad (20 μM), E64D (10 μM) o Leupeptina (Leu, 5 μg/ml) y posteriormente tratadas por 3 h con 500 μM H₂O₂. Para determinar el % de células muertas se utilizó el ensayo de incorporación de PI por citometría de flujo. Los resultados corresponden a 5 repeticiones independientes, &p<0,05 con respecto a Sh-Herp; ***p<0,001 respecto a Sh-Luc H₂O₂; #p<0,05 con respecto a Sh-Herp H₂O₂.

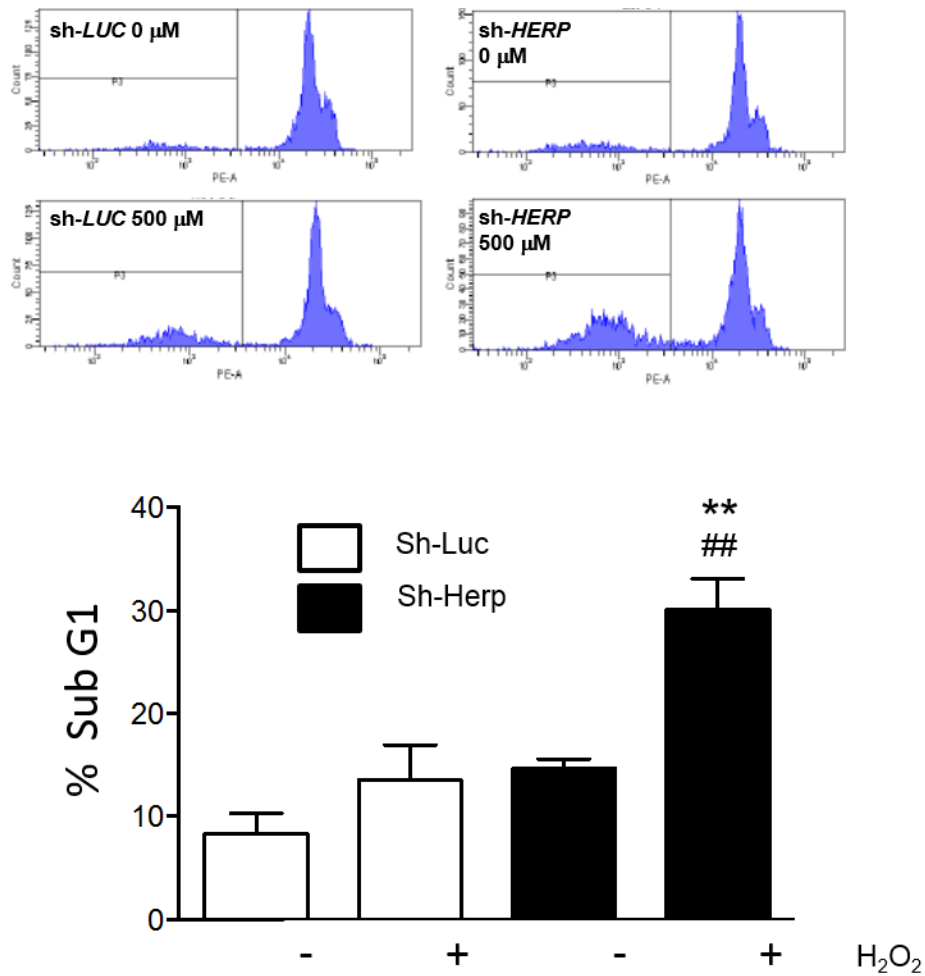


Figura 23. Células Herp (Sh-Herp) son más sensibles a la muerte por apoptosis producida por H₂O₂. Células Hela Sh-Herp (barras negras) o Sh-Luc (barras blancas) se trataron con 500 μM de H₂O₂ por 3 h. Para determinar el % de células muertas por apoptosis se determinó la fracción subG1 por citometría de flujo. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, **p<0,005 respecto a Sh-Herp control; ##p<0,005 respecto a Sh-Luc 500 μM H₂O₂

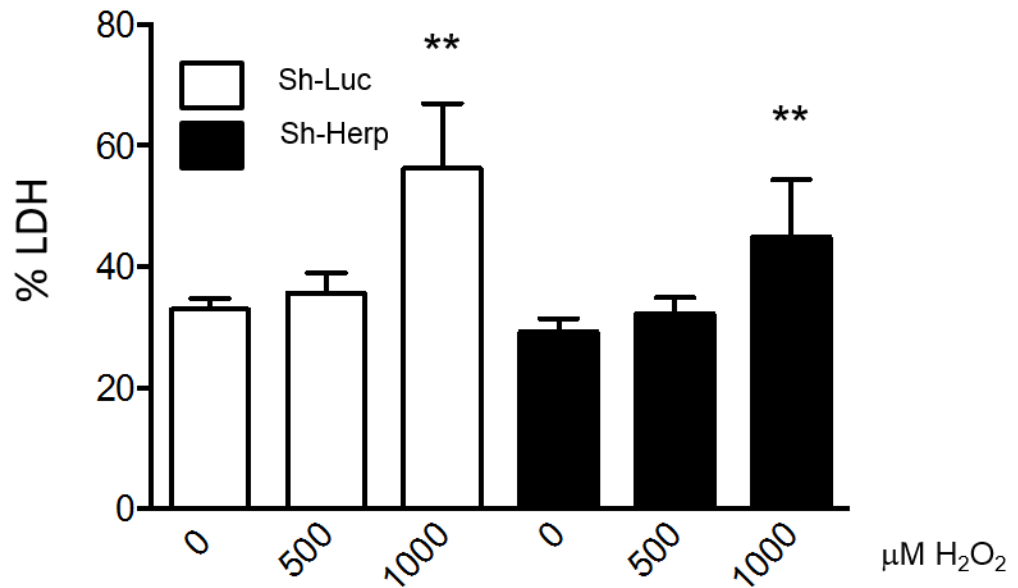


Figura 24. Células Herp (Sh-Herp) no mueren por necrosis en forma diferencial a las células Sh-Luc. Células Hela Sh-Herp (barras negras) o Sh-Luc (barras blancas) se trataron con 500 μM de H₂O₂ por 3 h. Para determinar el % de células muertas vía necrosis se determinó la cantidad de LDH. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, **p<0,005 respecto a Sh-Luc.

6.9. El efecto de la depleción de Herp en la sobrevida celular: rol del Ca^{2+}

Por otro lado se evaluó si BAPTA-AM, un conocido quelante del Ca^{2+} intracelular, podía afectar la viabilidad de las células Sh-Herp frente a los tratamientos con H_2O_2 . Las células Sh-Herp preincubadas con BAPTA-AM (20 μM) son menos sensibles a la muerte producida por H_2O_2 que las células controles (Figura 25). Estos datos indicarían que la mayor sensibilidad a la muerte observada en las células Sh-Herp se debe a una desregulación en el Ca^{2+} intracelular. Se utilizó además EGTA, un quelante de Ca^{2+} extracelular que no revertió los efectos en la muerte de las células Sh-Herp tratadas con H_2O_2 . Estos resultados indicarían que el proceso involucra solo una desregulación a nivel del Ca^{2+} intracelular y no a nivel del Ca^{2+} extracelular.

6.10. IP3R participa en la muerte de las células con menores niveles basales de Herp inducida por H_2O_2 .

El aumento de Ca^{2+} a nivel mitocondrial es una de las vías que gatilla la muerte en respuesta a un aumento en las ROS intracelular (Rizzuto *et al*, 1998; Apel *et al*, 2004; Hu *et al*, 2005; Kroemer *et al*, 2006; Greene *et al*, 2006; Festjens *et al*, 2006; Szabadkai *et al*, 2008; Szydłowska *et al*, 2010). Si el flujo de Ca^{2+} hacia la mitocondria es muy grande puede producir sobrecarga de Ca^{2+} , que afecta al metabolismo mitocondrial y culmina con la apertura del PTM, liberación de citocromo C y la consecutiva muerte de la célula (Brenner *et al*, 2012; Vianello *et al*, 2012). Dado que ya se estableció que el IP3R era el responsable de las cinéticas de Ca^{2+} mitocondrial y que éste está desregulado en las células Sh-Herp se estudió su participación en la mayor sensibilidad de las células Hela Sh-Herp al H_2O_2 . Para este fin se utilizó XeB como antagonista farmacológico específico del IP3R. Las células Hela Sh-Herp y Sh-Luc se pre-incubaron con 50 μM de XeB y luego tratadas con o sin 500 μM de H_2O_2 por 3 h. Como se había observado anteriormente las células Sh-Herp son más sensibles al H_2O_2 que las células controles. Las células Sh-Herp pre-incubadas con XeB mueren significativamente menos que las células Sh-Herp sin XeB después del tratamiento con H_2O_2 (Figura 26), lo que indica que las células Sh-Herp son más sensibles al tratamiento con H_2O_2 debido a una desregulación del Ca^{2+} intracelular posiblemente por un aumento en los niveles de IP3R.

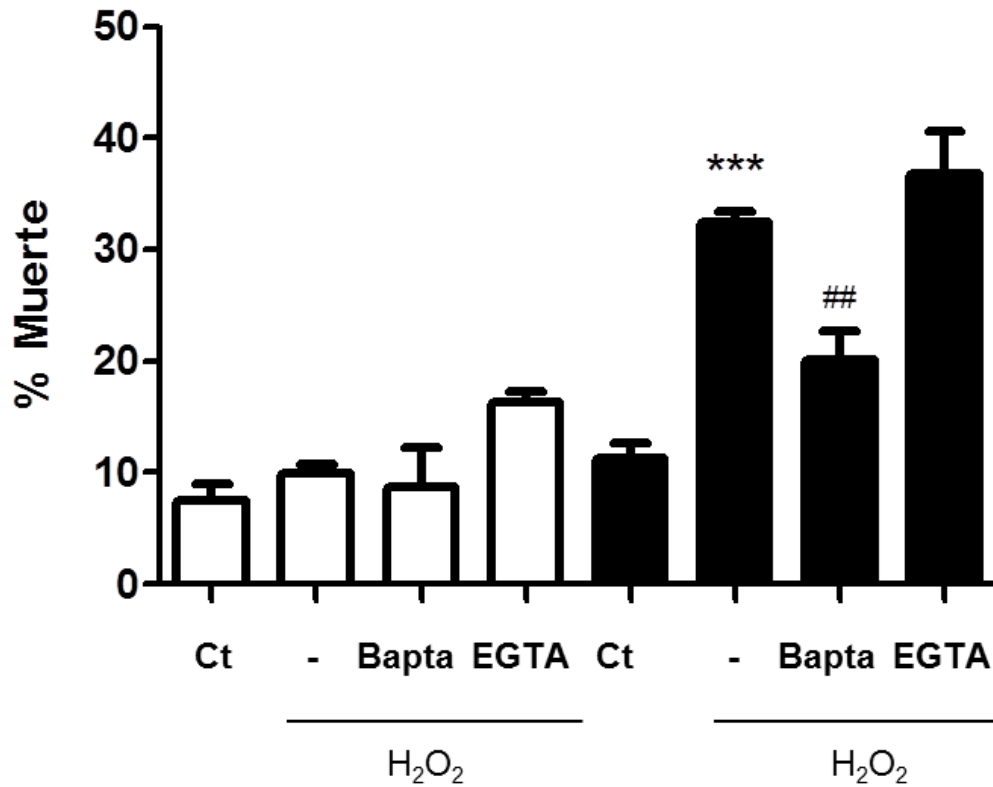


Figura 25. Células HeLa Sh-Herp son menos sensibles al tratamiento con H₂O₂ cuando son preincubadas con BAPTA-AM. Células HeLa Sh-Herp (barra negra) o Sh-Luc (barra blanca) se preincubaron con BAPTA-AM (20 μM) o EGTA (5 mM) y posteriormente tratadas por 3 h con 500 μM de H₂O₂. Para determinar el % de células muertas se utilizó el ensayo de incorporación de PI por citometría de flujo. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, *p<0,05 respecto al control (Ct); ##p<0,05 con respecto a Sh-Herp con H₂O₂.

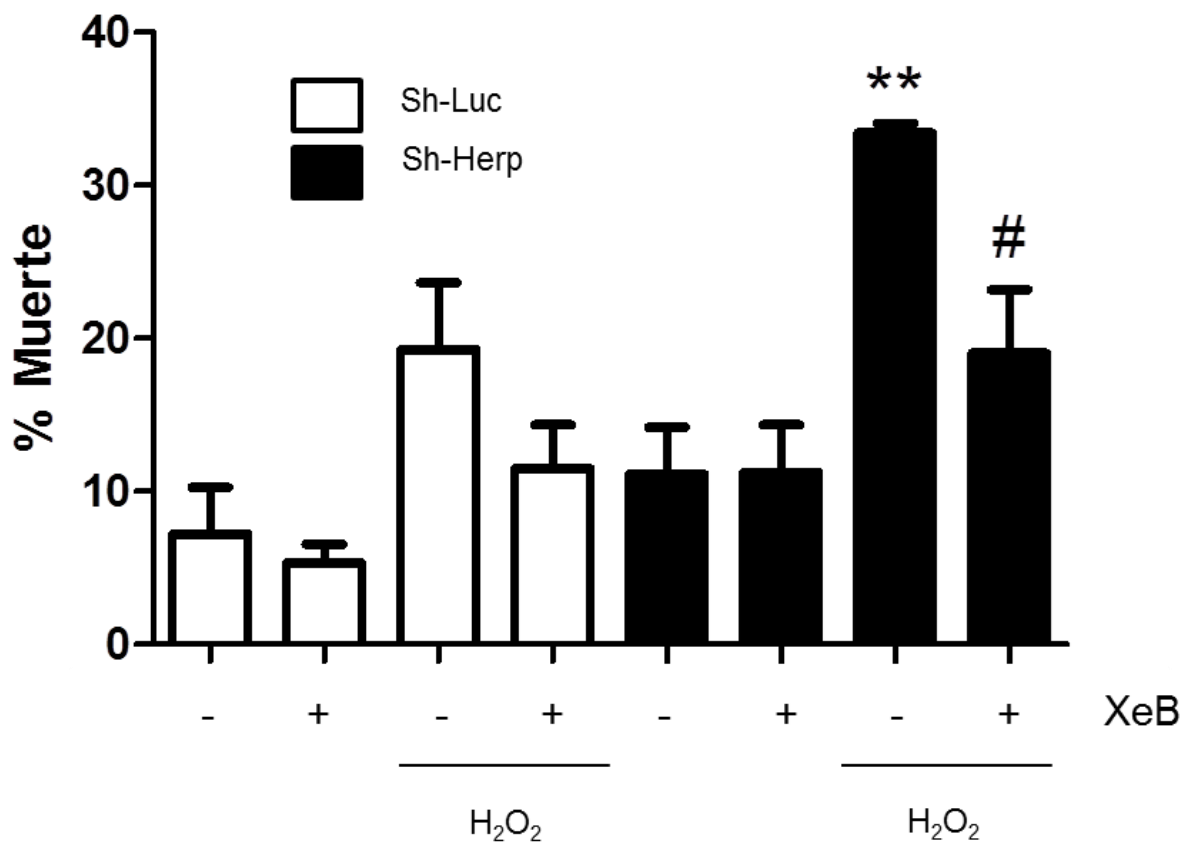


Figura 26. Células Herp (Sh-Herp) son más sensibles a la muerte producida por H₂O₂ por un mecanismo dependiente del IP3R. Células Hela Sh-Herp (barra negra) o Sh-Luc (barra Blanca) se preincubaron con Xestospongina B (XeB, 100 μM) por 30 min y posteriormente tratadas con 500 μM de H₂O₂ por 3 h. Para determinar el % de células muertas se utilizó el ensayo de incorporación de PI por citometría de flujo. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, **p<0,005 respecto a Sh-Herp control; #p<0,05 respecto a Sh-Herp tratadas con H₂O₂.

6.11. Las células Sh-Herp son más sensibles a la muerte producida por H₂O₂ por perdida en la permeabilidad de la membrana mitocondrial

Como se mencionó anteriormente, un importante mecanismo de muerte gatillado por aumentos de ROS en la célula involucra la sobrecarga de Ca²⁺ mitocondrial y subsecuente apertura del PTM que genera una pérdida en la permeabilidad de la membrana de la mitocondria y finalmente la muerte celular (Brenner *et al*, 2012; Vianello *et al*, 2012). Para estudiar la importancia del PTM se utilizó ciclosporina A (CsA), un inhibidor de la apertura del PTM. Células Hela Sh-Herp y Sh-Luc se pre-incubaron con 20 μM de CsA y luego tratadas o no con 500 μM de H₂O₂ por 3 h. Tal como se describió anteriormente las células Sh-Herp con más sensibles al tratamiento con H₂O₂ que los controles y mueren significativamente más. Sin embargo, se observó que las células Sh-Herp pre-incubadas con CsA mueren menos que las células Sh-Herp sin CsA después del tratamiento con H₂O₂ (Figura 27), lo que sugiere que las células Sh-Herp mueren a través de un mecanismo dependiente de la apertura del PTM. Este dato es muy importante dado que vincula la desregulación del IP3R, con aumentos en el Ca²⁺ mitocondrial y apertura del PTM, proporcionando un posible mecanismo por el cual las células Hela Sh-Herp son más sensibles a la muerte mediada por H₂O₂.

Para vincular estos procesos a la sobrecarga de Ca²⁺ mitocondrial se evaluó la liberación del citocromo C, un importante mediador de la apoptosis celular, que sirve como marcador de muerte dado que solo se encuentra en el citoplasma cuando hay una pérdida en la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Brenner *et al*, 2012; Vianello *et al*, 2012). Por lo tanto también es un buen marcador del estado en el cual se encuentra el metabolismo mitocondrial.

La figura 28 muestra que la inmunofluorecencia de citocromo c presenta un patrón punteado en la situación control en forma basal, característico de células normales sanas en donde el citocromo se encuentra en el interior de las mitocondrias. Al tratar las células Sh-Herp con 500 μM de H₂O₂ por 3 h se puede observar un patrón difuso total, característicos de células que se encuentran en proceso de muerte y está dado por la salida del citocromo c hacia el citoplasma por una pérdida en la permeabilidad mitocondrial por la apertura del PTM. Para corroborar esto último, las células se pre-incubaron con CsA,

ya que al inhibir la apertura del PTM impide pérdida en la permeabilidad mitocondrial y posterior salida del citocromo c. Como se puede observar en la [figura S5](#), las células control tratadas con CsA presentan un patrón punteado mucho más definido que las células Sh-Luc sin CsA, dado que basalmente las células están liberando pequeñas cantidades de citocromo C al citoplasma, lo que es bloqueado por la CsA. Como era de esperarse las células Sh-Herp pre-incubadas con CsA y posteriormente tratadas con H₂O₂ mantienen el patrón punteado de citocromo c, mostrando que no hay pérdida de la permeabilidad mitocondrial de estas células, lo que está de acuerdo a lo visto anteriormente en donde CsA disminuye la muerte celular en las células Sh-Herp tratadas con H₂O₂.

También se estudió si la desregulación del IP3R de las células Sh-Herp afectaba la permeabilidad mitocondrial y comprobar finalmente si éste es el mecanismo por el cual las células Sh-Herp son más sensibles a la muerte producida por H₂O₂. En concordancia con los datos anteriormente descritos, las células Sh-Herp que se preincubaron con XeB y trataron posteriormente con H₂O₂, presentaron un patrón punteado de citocromo c a diferencia de las células Sh-Herp no preincubadas con XeB y tratadas con H₂O₂ que presentaban un patrón difuso ([Figura 28](#)). Además como se observa en la [figuras S6](#), los observado con el citocromo C se condice con los resultados de potencial mitocondrial, en donde se observa que las células Sh-Herp tratadas con H₂O₂, presentan una caída en el potencial mitocondrial que es revertida al preincubar las células con XeB o CsA. Estos resultados muestran que las células Sh-Herp preincubadas con XeB y tratadas con H₂O₂ son menos sensibles a las ROS dado que hay una menor sobrecarga de Ca²⁺ mitocondrial y por consiguiente una menor pérdida en la permeabilidad mitocondrial, lo que conduce a menos muerte celular.

Finalmente podemos concluir que las células Sh-Herp presentan mayores niveles de IP3R lo que sensibiliza a estas células a la muerte producida por el H₂O₂, el mecanismo por el cual se produce esto involucra aumentos de Ca²⁺ mitocondrial, pérdida de la permeabilidad mitocondrial, salida de citocromo c y activación de vías apoptóticas. De esta manera podemos concluir que Herp cumple un rol citoprotector a través de la regulación de los niveles basales de IP3R, evitando así la sobrecarga de Ca²⁺ mitocondrial y posterior muerte frente a agentes nocivos como el H₂O₂.

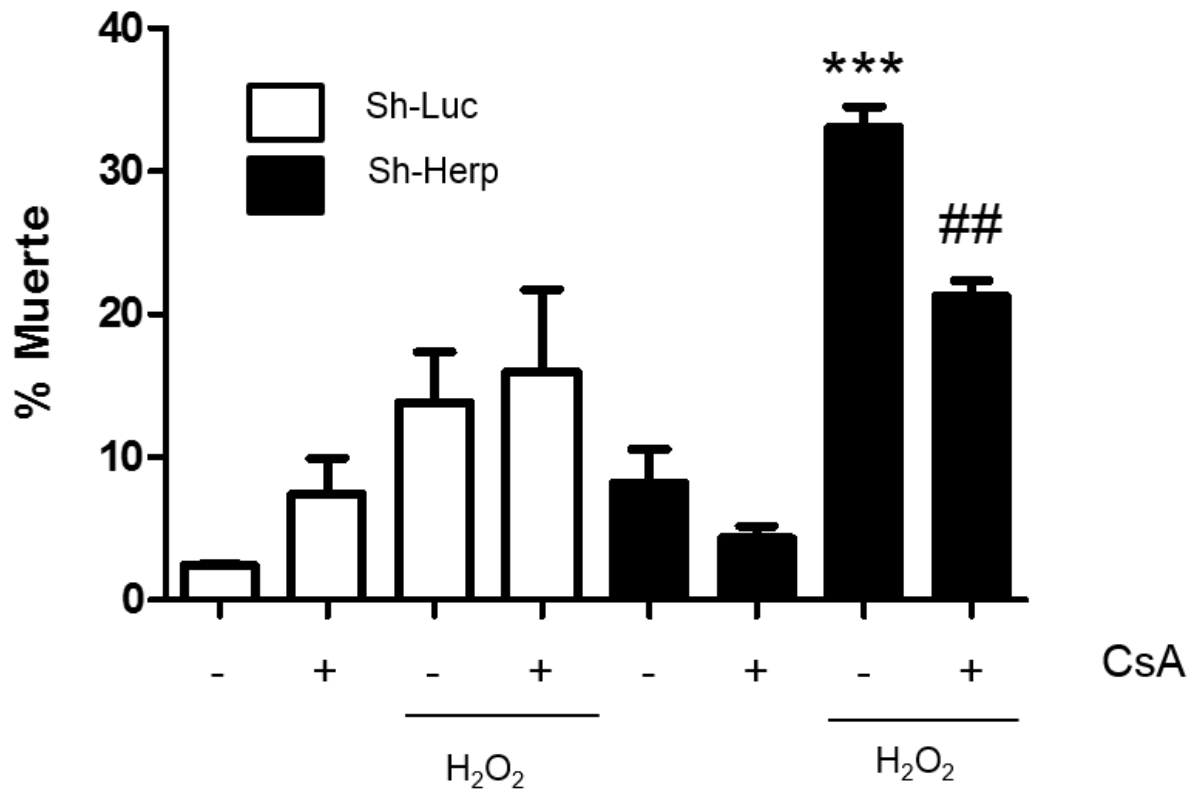


Figura 27. Células Herp (Sh-Herp) son más sensibles a la muerte producida por H₂O₂ por un mecanismo dependiente de la apertura del PTM. Células Hela Sh-Herp (barra negra) o Sh-Luc (barra blanca) se preincubaron con 100 μ M de Ciclosporina A (CsA) por 30 min. y posteriormente tratadas con 500 μ M de H₂O₂ por 3 h. Para determinar el % de células muertas se utilizó el ensayo de incorporación de PI por citometría de flujo. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, *** p <0,005 respecto a Sh-Herp control; # p <0,05 respecto a Sh-Herp 500 μ M H₂O₂.

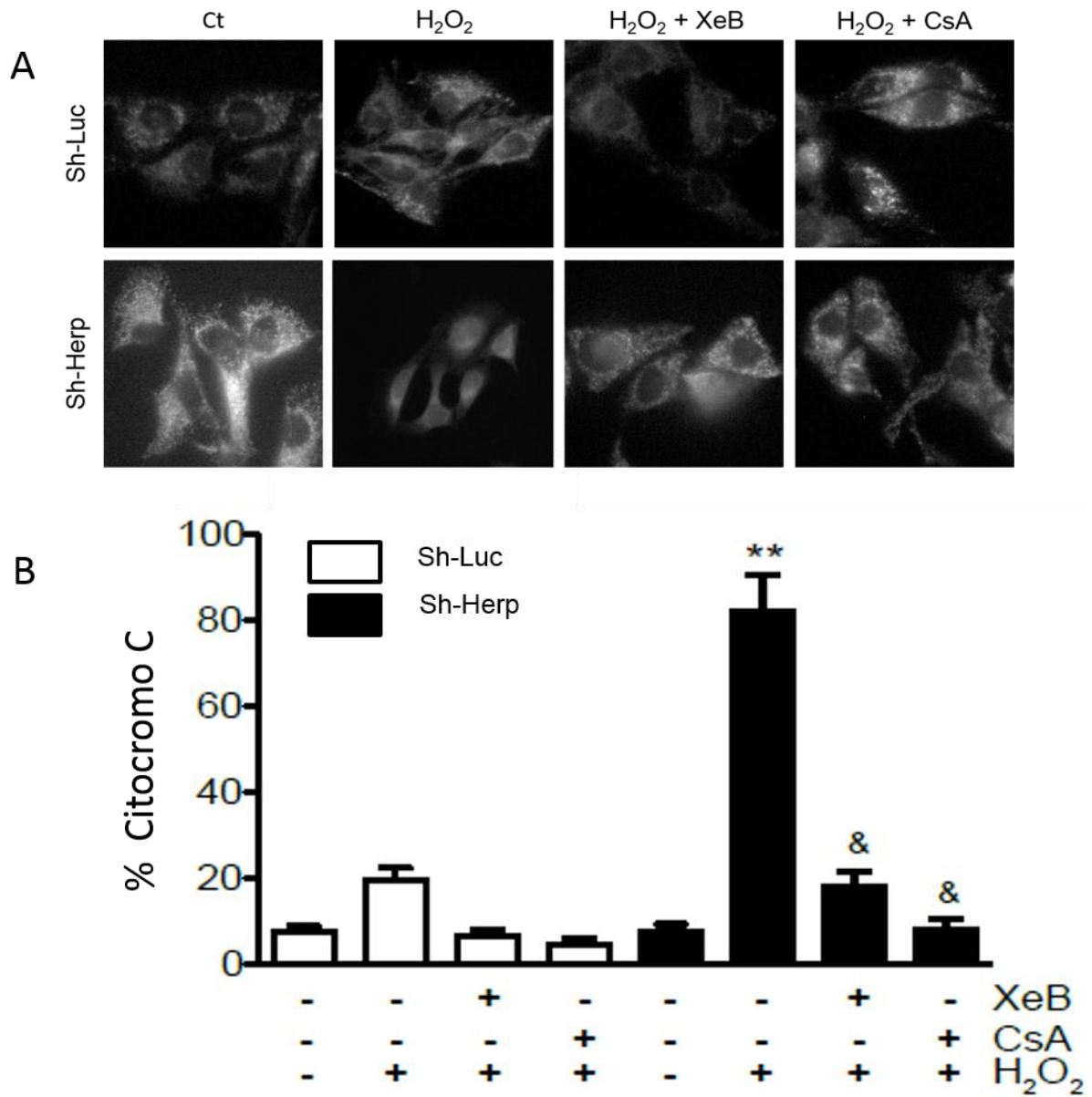


Figura 28. Células Herp (Sh-Herp) son más sensibles a la muerte producida por H₂O₂ por desregulación del IP3R y pérdida de la permeabilidad mitocondrial. **A.** Células Hela Sh-Herp o Sh-Luc se preincubaron con ciclosporina A (CsA, 20 μM) o con xestospongina B (XeB, 100 μM) por 30 min y posteriormente tratadas con 500 μM de H₂O₂ por 3 h. Para determinar la salida de citocromo C se evaluó la distribución subcelular del citocromo c por inmunofluorescencia. **B.** Cuantificación de la cantidad de citocromo C libre en el citoplasma representada en % de células con citocromo c libre. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes.

6.12. Herp regula el metabolismo energético celular.

Los niveles de Ca^{2+} mitocondrial son de vital importancia para el metabolismo en este organelo dado que ellos regulan la activación de enzimas claves en el proceso de síntesis de ATP. En general aumentos del Ca^{2+} mitocondrial se relacionan con aumentos en el metabolismo mitocondrial y síntesis de ATP (Rizzuto *et al*, 1998; Szabadkai *et al*, 2008; Rasola *et al*, 2011; Glancy *et al*, 2012). Por tanto el Ca^{2+} afecta a parámetros mitocondriales como la respiración y potencial mitocondrial (Rizzuto *et al*, 1998; Szabadkai *et al*, 2008). Dados los antecedentes anteriormente recopilados se evaluaron algunos parámetros mitocondriales como consumo de oxígeno, potencial mitocondrial y síntesis de ATP para investigar el papel de Herp en el metabolismo mitocondrial.

La [Figura 29](#) muestra el consumo de oxígeno mitocondrial de las células Sh-Luc y Sh-Herp, medido por oxigrafía de Clark, observándose que las células Sh-Herp tienen una mayor tasa de respiración basal (mayor consumo de oxígeno) que las células controles y además presenta un consumo de oxígeno máximo mayor. Esto último puede deberse a aumentos en la actividad de las enzimas o en la cantidad de mitocondrias.

La [Figura 30](#) muestra un Western blot de mtHSP70, proteína integral de la mitocondria utilizada como un marcador de la masa mitocondrial. Se observa que las células Sh-Herp no presentan cambios significativos en mtHSP70 en comparación a los controles, por otra parte se midieron los niveles de masa mitocondrial con la sonda MTG, en donde tampoco se ven cambios en los niveles de fluorescencia entre las células Sh-Luc y Sh-Herp ([Figura S4](#)). La disminución de Herp produce un aumento en la actividad enzimática de este organelo sin alterar su masa mitocondrial en forma significativa. Por otro lado en la [Figura 29](#) se muestra la diferencia de potencial mitocondrial basal de las células Sh-Herp y Sh-Luc, medido a través de citometría de flujo con la sonda TMRM. Se observa que las células Sh-Herp poseen una menor diferencia de potencial mitocondrial basal que las células control. El CCCP es utilizado para desacoplar la cadena transportadora de electrones, produciendo una pérdida en la diferencia potencial mitocondrial. Las células control tratadas con CCCP muestran una condición en la cual la mitocondria se encuentra completamente desacoplada. Dado que el potencial mitocondrial basal de las células Sh-Herp cae parcialmente en comparación a las células controles, se

puede sugerir que las mitocondrias de estas células se encuentran parcialmente desacopladas. Otro dato que apoya esta posibilidad son los niveles de H₂O₂ intracelular que se encuentran aumentados en las células Sh-Herp, dado que se asocia aumentos en la producción de ROS en mitocondrias más desacopladas (Figura 29). Dado que el desacoplamiento es solo parcial y no afecta la síntesis de ATP como se observa en la Figura 29, existe un aumento en la síntesis de ATP en las células Hela Sh-Herp en comparación a las células Sh-Luc. Al parecer este aumento se explica por un aumento de la síntesis mitocondrial de ATP. La oligomicina es un inhibidor de la síntesis de ATP mitocondrial, dado que inhibe a la ATPasa mitocondrial, por lo tanto no afecta la síntesis de ATP glicolítico. La Figura 29 muestra que oligomicina no afectó la síntesis de ATP en las células Sh-Luc, dado que el ATP se sintetiza principalmente por medio de la glicolisis. Sin embargo si se observaron diferencias en las células Sh-Herp que disminuyen los niveles de ATP a niveles similares que el control. Estos datos indican que el aumento en los niveles de ATP observados en las células Sh-Herp son causa de un aumento del ATP mitocondrial.

Al parecer las mitocondrias de las células Sh-Herp se encuentran más activas, posiblemente por aumentos en los niveles de Ca²⁺ mitocondrial que aumentan el consumo de oxígeno y por consiguiente producen aumentos en los niveles de ATP. Pero por otro parte estas mitocondrias se encuentran parcialmente desacopladas. Existen diferentes mecanismos por los cuales esto puede estar sucediendo, una posibilidad sería el escape de protones a través del PTM, que como se discutió anteriormente se encuentra más abierto en las células Sh-Herp. Esta hipótesis será abordada más adelante.

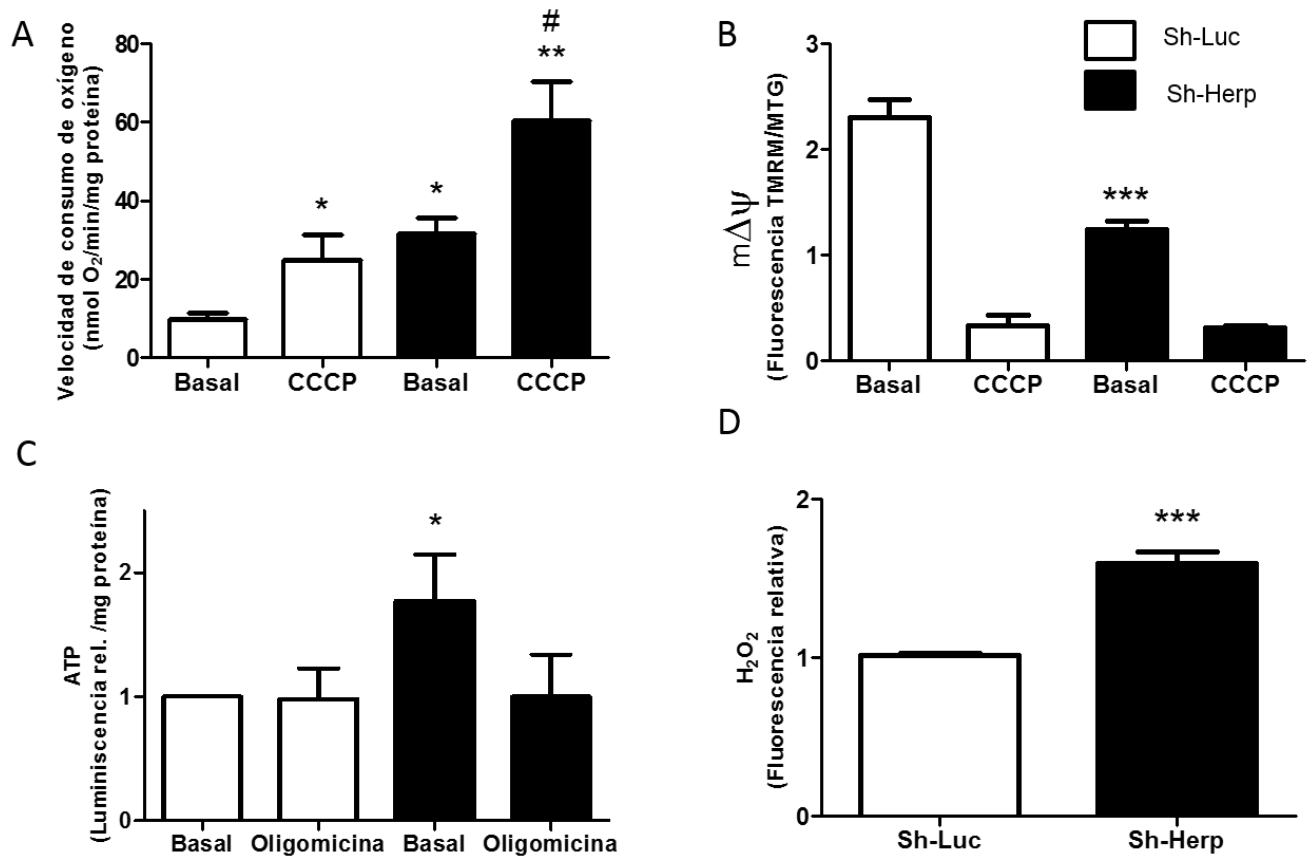


Figura 29. Herp regula el metabolismo mitocondrial. Panel A- Las velocidades de consumo de oxígeno basal y máximo (con CCCP) se midieron mediante el electrodo de Clark. Panel B: el $m\Delta\psi$ se determinó utilizando la sonda sensible al potencial TMRM y citometría de flujo. Como control positivo se utilizó el desacoplante de la cadena transportadora de electrones CCCP. Panel C: las concentraciones intracelulares de ATP se midieron mediante ensayo de luminiscencia. Panel D: los niveles de H₂O₂ intracelular se midió utilizando una sonda sensible al H₂O₂, 1,2,3 DHR y citometría de flujo. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$ respecto al control; # $p < 0,05$ respecto a Sh-Herp control.

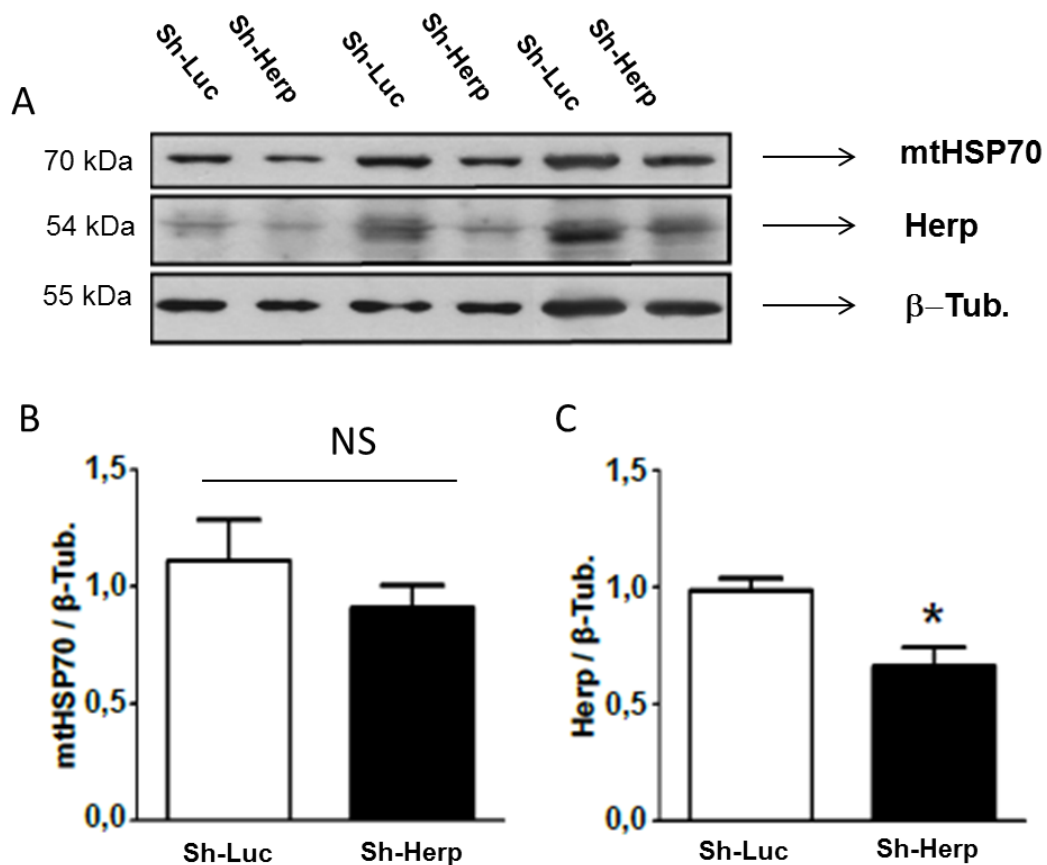


Figura 30. Células HeLa Sh-Herp no presentan cambios significativos en la cantidad de mtHSP70 en comparación a las células controles. A- Células HeLa Sh-Luc y Sh-Herp son cultivadas por 48 h sin tratamiento y luego se prepararon extractos de proteínas totales. Los niveles de Herp, mtHSP70 y β -Tubulina se determinaron por *Western blot*, previa resolución mediante electroforesis SDS-PAGE en geles en gradiente. B- El gráfico representa la cuantificación densitométrica de la cantidad de mtHSP70 / β -tubulina. C- El gráfico representa la cuantificación densitométrica de la cantidad de Herp/ β -tubulina. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, * $p < 0,05$ respecto al control.

6.13. Reexpresión de Herp revierte los efectos metabólicos en células Sh-Herp.

Para corroborar la participación de Herp en los procesos anteriormente discutidos se utilizó como estrategia experimental la transfección de Herp en las células Sh-Herp, con un plásmido de expresión que codifica para la proteína. De esta manera se recuperaron los niveles normales de expresión de la proteína Herp en las células KD para Herp. Algunos de los parámetros alterados en las células Sh-Herp como potencial mitocondrial y producción de ATP (Figura 31) son revertidos al recuperar los niveles de Herp, mostrando así, que las alteraciones metabólicas observadas en las células Sh-Herp se deben a la disminución en la proteína Herp y no otro efecto secundario. Adicionalmente, células Hela (wild-type) se transfectaron con el plásmido de Herp para sobreexpresar la proteína y ver sus efectos en el metabolismo. Las células Hela que sobreexpresan Herp, al contrario de las células Sh-Herp, presentan un aumento en el potencial mitocondrial y una disminución en la síntesis de ATP (Figura 32). Estos datos sugieren la importancia de la proteína Herp en la regulación de estos parámetros metabólicos y que Herp a través de sus niveles podría estar regulando el metabolismo celular.

6.14. Herp regula la función mitocondrial a través regulación del Ca²⁺ intracelular dependiente del IP3R.

Dado que como se mencionó anteriormente Herp es un importante regulador de la homeostasis del Ca²⁺ intracelular y que este ión también modula la función mitocondrial, se investigó si la regulación del Ca²⁺ intracelular era importante en los efectos mitocondriales observados en las células Sh-Herp. Al tratar las células Sh-Herp con 20 μ M de BAPTA por 3 h se observó que hubo una recuperación en los niveles basales de potencial mitocondrial y una disminución en la producción de H₂O₂ (Figura 33). Estos datos indicarían que las alteraciones en los niveles de Ca²⁺ intracelular son responsables de los cambios metabólicos observados en las células Sh-Herp. A continuación se investigó la función del IP3R en los efectos de la proteína Herp sobre el metabolismo mitocondrial. Se observó que basalmente el tratamiento por 3 h con XeB recupera el potencial mitocondrial de las células Sh-Herp (Figura 34), este mismo tratamiento no afecta de forma significativa el potencial mitocondrial de las células control.

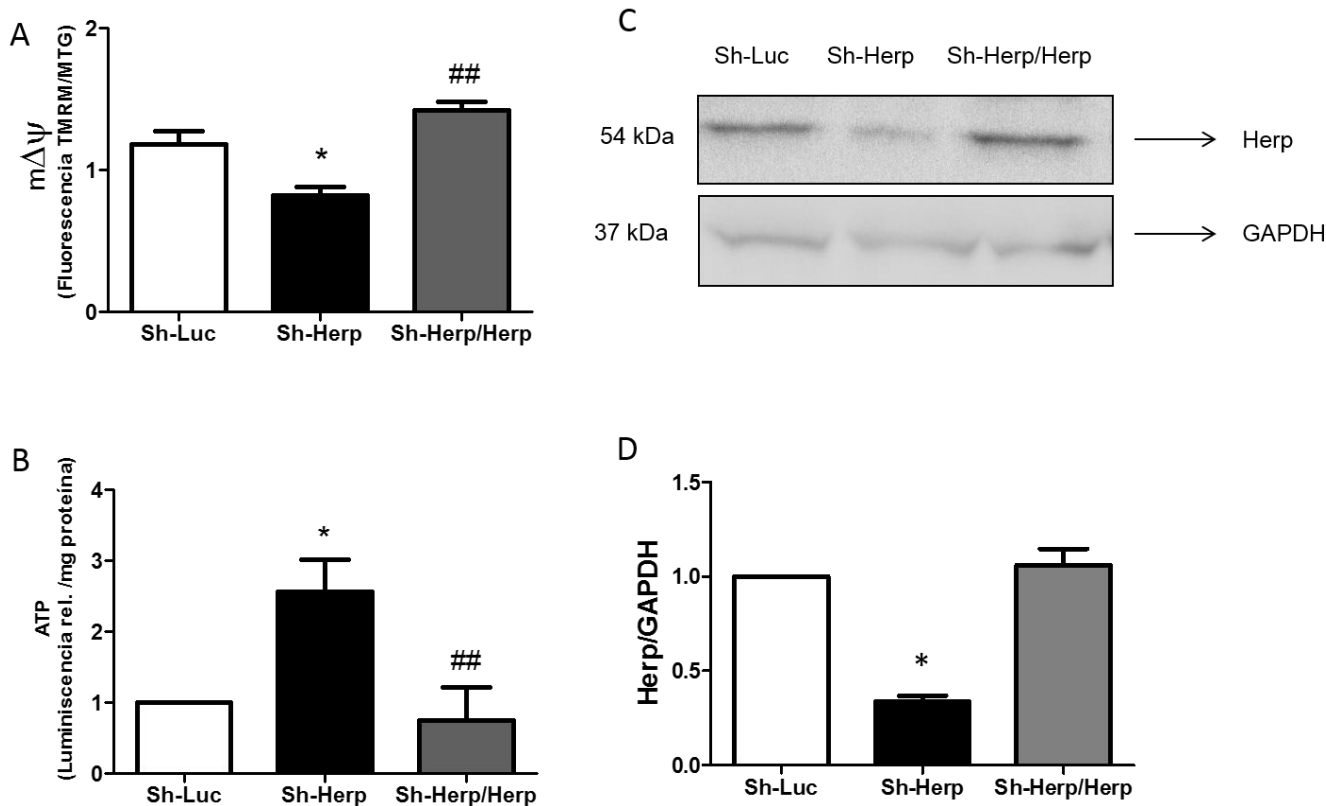


Figura 31. La recuperación de los niveles de Herp en células Sh-Herp revierte los cambios en el metabolismo mitocondrial. Células Hela Sh-Herp se transfectaron con un plásmido de expresión para la proteína Herp (Sh-Herp/Herp) Panel A. El $m\Delta\psi$ se determinó utilizando la sonda sensible al potencial TMRM y citometría de flujo. Como control positivo se utilizó el desacoplante de la cadena transportadora de electrones CCCP. Panel B: Las concentraciones intracelulares de ATP se midieron mediante ensayo de luminiscencia. Panel C: Blot representativo que muestra la recuperación de los niveles de Herp en las células Sh-Herp. GAPDH se utiliza como control de carga. Los datos corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, * $p < 0,05$ respecto a Sh-Luc control; ## $p < 0,005$ respecto a Sh-Herp.

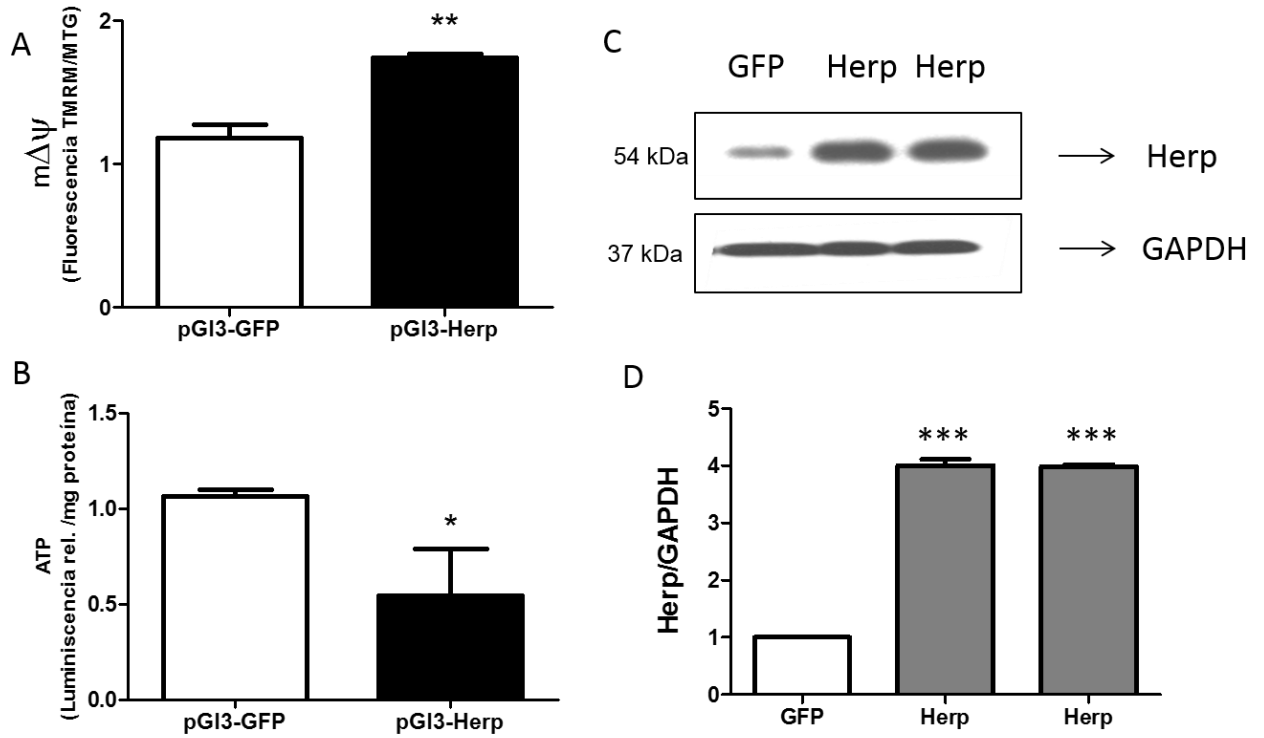


Figura 32. Sobreexpresión de Herp en células HeLa Wt afecta el metabolismo mitocondrial. Células HeLa Wt se transfectaron con un plásmido de expresión para la proteína Herp (pGI3-Herp, barra negra) o con plásmido de expresión para una proteína no relacionada como control (pGI3-GFP, barra blanca). Panel A: El $m\Delta\Psi$ se determinó utilizando la sonda sensible al potencial TMRM y citometría de flujo. Como control positivo se utilizó el desacoplante de la cadena transportadora de electrones CCCP. Panel B: Las concentraciones intracelulares de ATP se midieron mediante ensayo de luminiscencia. Panel C: Blot representativo de la sobreexpresión de Herp. GAPDH se utiliza como control de carga. Los datos corresponden al promedio de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ respecto a Sh-Luc control, ** $p < 0,005$ y *** $p < 0,001$ respecto a Sh-Herp control.

Similar a lo anterior, se midió la producción de H_2O_2 intracelulares, en donde el tratamiento con XeB por 3 h disminuyó la producción de H_2O_2 a nivel basal en las células Sh-Herp (Figura 34), mientras que en las células controles no hubo mayores cambios. Por otro lado, también se midió la producción de ATP en las células. El tratamiento de las células Sh-Herp por 3 h con XeB redujo la cantidad de ATP en las células a niveles similares a los controles. Estos resultados indican que las alteraciones metabólicas observadas en las células Sh-Herp involucran al IP3R, al parecer la desregulación en la degradación del receptor produce alteraciones en los niveles de Ca^{2+} intracelular y por consiguiente altera el metabolismo mitocondrial de la célula.

6.15. Células Sh-Herp presentan una caída en el potencial mitocondrial debido a la apertura del PTM.

Como se mencionó anteriormente, la apertura del PTM es uno de los mecanismos por los cuales se regula el potencial mitocondrial y que depende de los niveles de Ca^{2+} . Por este motivo se estudió cómo la apertura del PTM podía estar afectando el potencial mitocondrial en las células Sh-Herp. Las células Sh-Herp tratadas con CsA por 3 h mostraron una clara recuperación del potencial mitocondrial (Figura 35). Estos datos en conjunto con lo visto anteriormente, en donde se mostraba que las células Sh-Herp presentaban una pérdida en la permeabilidad basal de la célula por apertura del PTM, muestran que la caída en el potencial mitocondrial observada en las células KD para Herp se debe a la apertura del PTM.

En resumen el aumento en los niveles de IP3R en las células Sh-Herp produce una desregulación en los niveles de Ca^{2+} intracelular y por consiguiente una desregulación de los niveles de Ca^{2+} mitocondrial. Aumentos en el Ca^{2+} mitocondrial producen aumentos en el consumo de oxígeno por activación de las enzimas mitocondriales pero si este aumento no es bien regulado produce apertura del PTM y caída en el potencial mitocondrial. Es posible que en este estado las células Sh-Herp se encuentren metabólicamente más activas pero a la vez son más sensibles al estrés que las células controles.

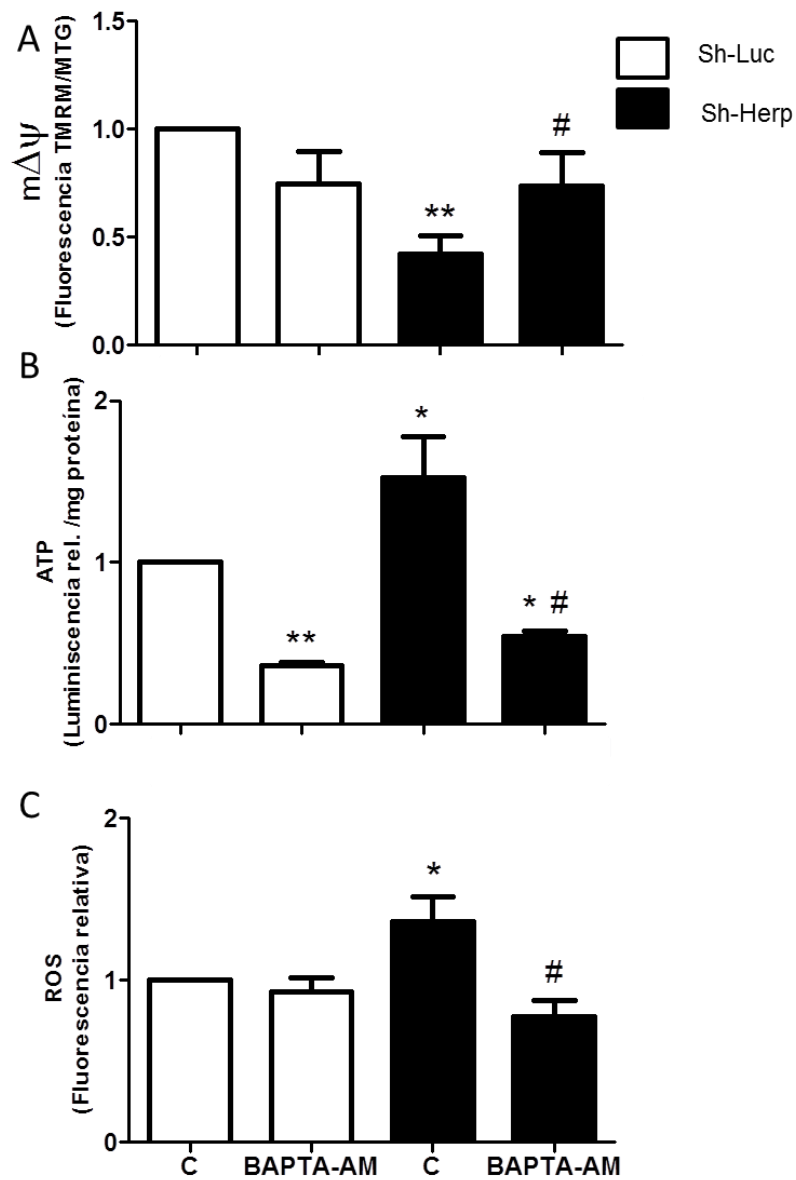


Figura 33. Herp regula el metabolismo mitocondrial por un mecanismo dependiente del Ca^{2+} intracelular. Células Hela Sh-Luc (barras blancas) o Sh-Herp (barras negras) son tratadas con BAPTA-AM 20 μM por 3 h antes de las respectivas mediciones. Panel A: $m\Delta\psi$ se determinó utilizando la sonda sensible al potencial TMRM y citometría de flujo. Como control positivo se utilizó el desacoplante de la cadena transportadora de electrones CCCP. Panel B: Las concentraciones intracelulares de ATP se midieron mediante ensayo de luminiscencia. Panel C: producción de H_2O_2 intracelular se midió utilizando una sonda sensible al H_2O_2 , 1,2,3 DHR y citometría de flujo. Los datos corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ respecto al control; # $p < 0,05$ respecto a Sh-Herp control (C).

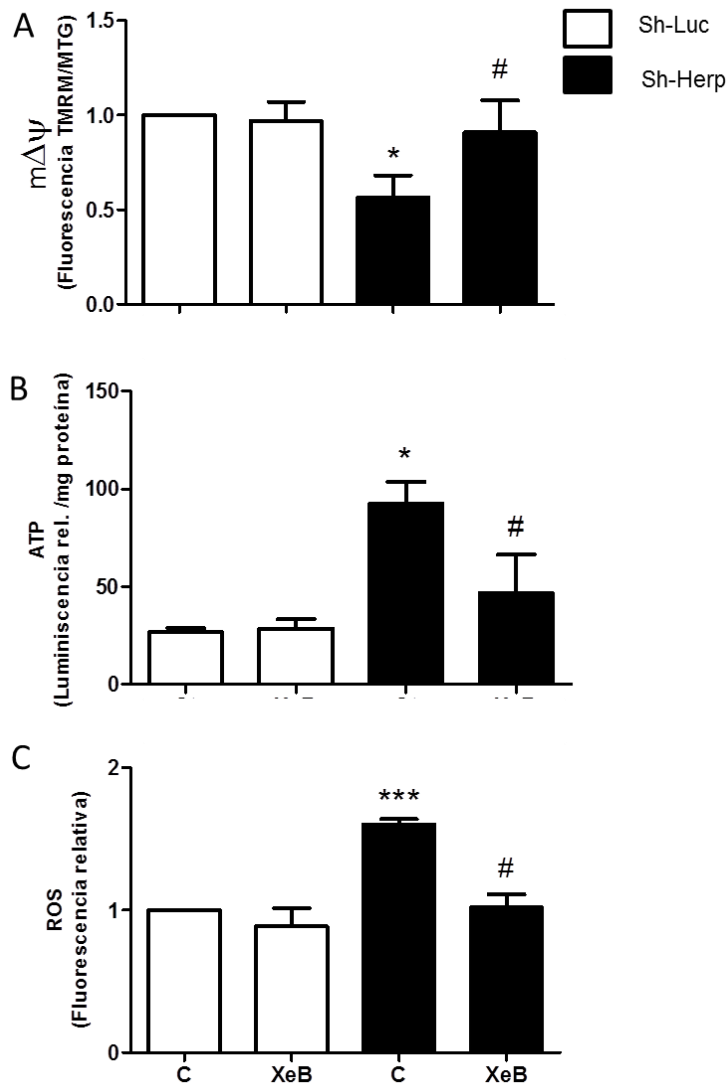


Figura 34. Herp regula el metabolismo mitocondrial por un mecanismo dependiente del IP3R. Células Hela Sh-Luc (barras blancas) o Sh-Herp (barras negras) se trataron con XeB 100 μ M por 3 h antes de las respectivas mediciones. Panel A: $m\Delta\psi$ se determinó utilizando la sonda sensible al potencial TMRM y citometría de flujo. Como control positivo se utilizó el desacoplante de la cadena transportadora de electrones CCCP. Panel B: Las concentraciones intracelulares de ATP se midieron mediante ensayo de luminiscencia. Panel C: los niveles de H_2O_2 intracelular se midió utilizando una sonda sensible al H_2O_2 , 1,2,3 DHR y citometría de flujo. Los datos corresponden al promedio de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ respecto al control; # $p < 0,05$ respecto a Sh-Herp control (C).

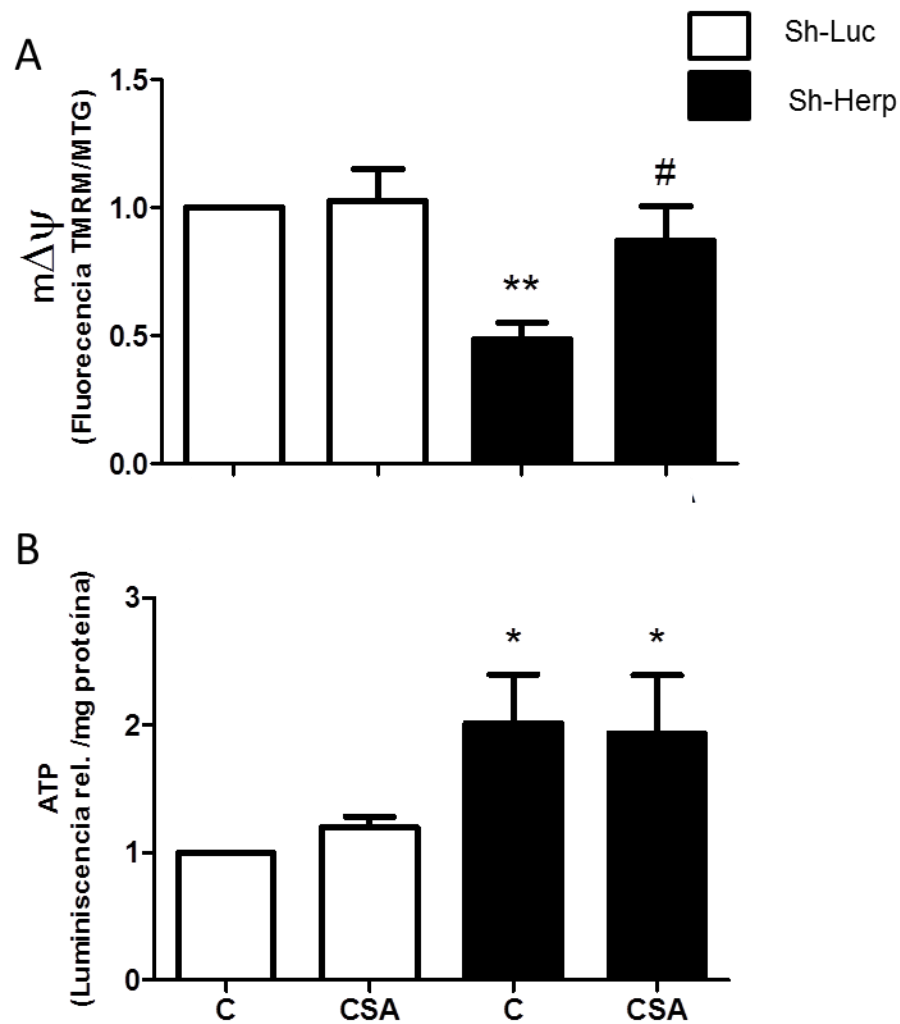


Figura 35. Células Sh-Herp presentan una caída en el potencial mitocondrial debido a apertura del PTM. Células Hela Sh-Luc (barras blancas) o Sh-Herp (barras negras) se trataron con CsA 20 μ M por 3 h antes de las respectivas mediciones. Panel A: $m\Delta\Psi$ se determinó utilizando la sonda sensible al potencial TMRM y citometría de flujo. Panel B: Las concentraciones intracelulares de ATP se midieron mediante ensayo de luminiscencia. Los datos corresponden al promedio de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ respecto al control; # $p < 0,05$ respecto a Sh-Herp control (C).

6.16. Las células Sh-Herp son más sensibles a los antineoplásicos que las células controles

Dado que las células Hela Sh-Herp aparentemente aumentan su actividad mitocondrial, como muestran los datos de consumo de oxígeno y ATP que se encuentran aumentados, sumado a los datos de proliferación que muestran que las células Sh-Herp proliferan menos que las células controles, nos llevó a pensar que estas células experimentaron un “switch metabólico” y revirtieron el efecto Warburg de las células Hela. Por este motivo se estudió la sensibilidad de las células Sh-Herp a distintos antineoplásicos.

En la [Figura 37](#) se muestra un gráfico que representa la incorporación de PI determinada por citometría de flujo en células Sh-Herp y Sh-Luc tratadas con taxol (A), cisplatino (B), etopósido (C) y vinblastina (D). Como se puede observar las células KD para Herp en general son más sensibles al tratamiento con el fármaco antineoplásico que las células controles. En el caso del taxol se observó que a las 48 h de tratamiento, las células Sh-Herp mueren alrededor de un 65% vs 35 % de las células controles. Por otro lado, el cisplatino a las 24 h de tratamiento produjo una muerte de un 35-50% en las células Sh-Herp y solo un 18% en las células Sh-Luc. A las 48 h de tratamiento, estas diferencias fueron aún más grandes, alcanzando casi un 60% de muerte en las células Sh-Herp y un apenas 20% en las células Sh-Luc. Por otro lado, etopósido y vinblastina aunque no generan diferencias tan dramáticas como el taxol y el cisplatino, se pueden observar diferencias significativas a las 24 h de tratamiento. Estos datos sugieren que las células Hela Sh-Herp son más sensibles a los antineoplásicos que las células Hela control.

Para corroborar que la generación de células KD para Herp genera cambios metabólicos en las células antineoplásicas y que aumenta su sensibilidad a los antineoplásicos de forma generalizada, se generaron células derivadas de tejido óseo de osteosarcoma U2OS (cáncer óseo), KD para Herp de forma similar a como se realizó con las células Hela. Las células U2OS Sh-Herp presentan un aumento en el consumo de oxígeno en comparación a su control (U2OS Sh-Luc), de forma similar a los ya observado en las células Hela Sh-Herp ([Figura 38](#)). Estos datos sugieren que estas células también presentan los cambios metabólicos similares a los observados en las células Hela Sh-Herp.

Se estudió la sensibilidad de las células U2OS frente al tratamiento con los mismos antineoplásicos que se trataron las células Hela, observándose las mismas diferencias en la sensibilidad hacia ellos. Taxol produce alrededor de un 35% de muerte en las células U2OS Sh-Herp vs un 20% en las células controles. Cisplatino produjo un 30% de muerte en las células U2OS Sh-Herp a las 24 h post-tratamiento mientras que las células U2OS Sh-Luc al mismo periodo de tratamiento solo generó un 15% de muerte. Etopósido y vinblastina al igual que en las células Hela no generaron grandes cambios en la sensibilidad frente al antineoplásico a las 24 h de tratamiento, pero los cambios son significativos (Figura 39). Estos resultados sitúan a Herp como un futuro blanco terapéutico para investigar y generar nuevos fármacos antineoplásicos.

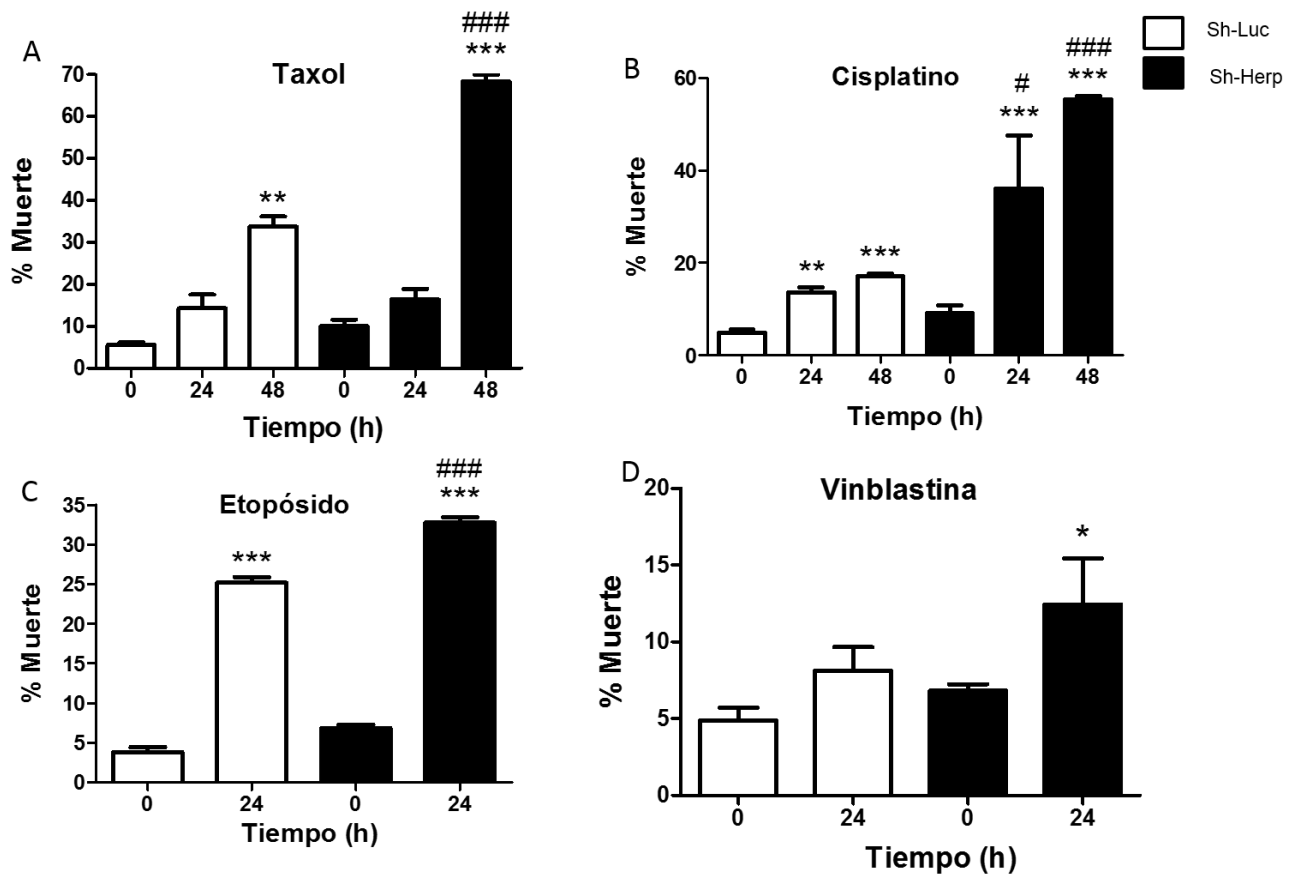


Figura 36. Células Hela Sh-Herp son más sensibles al tratamiento con antineoplásicos que las células controles. Células Hela Sh-Herp (barras negras) o Sh-Luc (barras blancas) se trataron con una serie de antineoplásicos. Panel A: Taxol. Panel B: cisplatino. Panel C: etopósido. Panel D: vinblastina por 24 ó 48 h. Para determinar el % de células muertas se utilizó el ensayo de incorporación de PI por citometría de flujo. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes- * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$ respecto a Sh-Luc control; # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$ respecto a la misma condición.

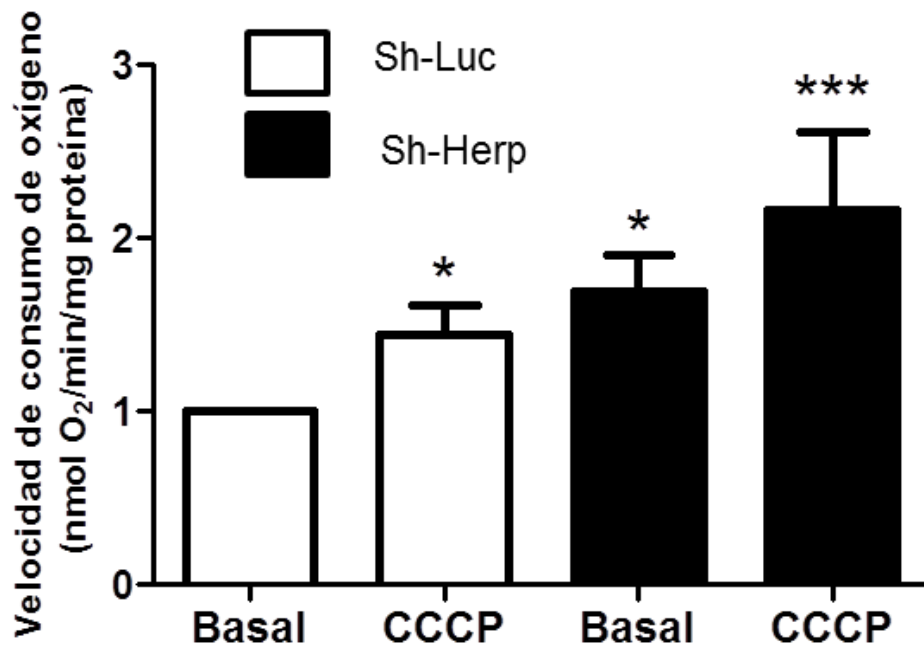


Figura 37. Células U2OS Sh-Herp presentan un mayor consumo de oxígeno que las células U2OS controles. Las velocidades de consumo de oxígeno basal y máximo (con CCCP) se midieron mediante el uso de un electrodo de Clark. Los datos corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, * $p < 0,05$; *** $p < 0.001$ respecto al Basal.

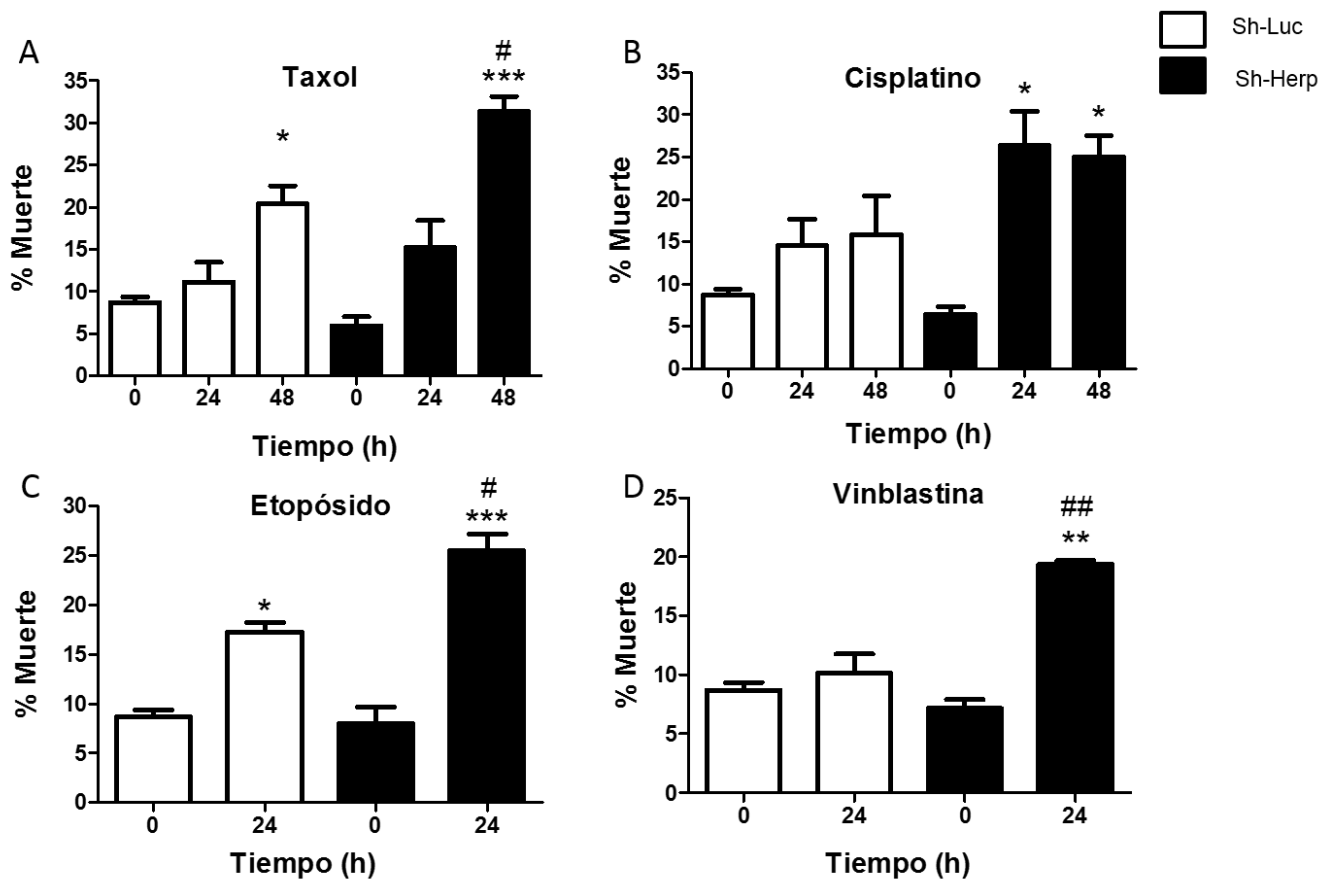


Figura 38. Células U2OS Sh-Herp son más sensibles al tratamiento con antineoplásicos que las células controles. Células U2OS Sh-Herp (barras negras) o Sh-Luc (barras blancas) se trataron con una serie de antineoplásicos: taxol (A), cisplatino (B), etopósido (C) y vinblastina (D) por 24 o 48 h. Para determinar el % de células muertas se utilizó el ensayo de incorporación de PI por citometría de flujo. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$ respecto a Sh-Luc control; # $p < 0,05$; ## $p < 0,005$ respecto a la misma condición.

7. DISCUSIÓN

Herp se describió originalmente como una proteína de respuesta frente al estrés de RE que participa en la degradación de proteínas por vía proteosomal (Kokame *et al* 2000; Schulze *et al*, 2005; Okuda-Shimizu *et al*, 2007; Kny *et al*, 2011; Marutani *et al*, 2011). Hoy en día sabemos mucho más acerca de esta proteína y sus diferentes roles en la mantención de la homeostasis celular. Herp regula de múltiples maneras al complejo ERAD, controlando así la degradación de variadas proteínas tanto glicosiladas como no-glicosiladas por la vía proteosomal (Kny *et al*, 2011; Marutani *et al*, 2011). Herp inicia el reclutamiento de HRD1 y de los diferentes componentes del ERAD. Este reclutamiento es importante para la formación del complejo y su función; en condiciones de estrés aumenta la interacción entre Herp y HRD1, de manera dependiente a su segmento ULD (Liang *et al*, 2008). Herp también regula la degradación de HRD1 y su propia degradación, de esta forma mantiene a través de esta vía los niveles de los componentes necesarios para la formación del ERAD, dependiendo de las necesidades celulares (Huang *et al*, 2013, Bernasconi *et al*, 2013; Leitman *et al*, 2014). Por otro lado, Herp es importante para el reclutamiento de los diferentes sustratos del ERAD, lo que tiene como consecuencia un aumento en la ubiquitinación de proteínas y su consecuente degradación (Kny *et al*, 2011). Por otro lado, las proteínas que son degradadas por esta vía tienen relevancia con otro proceso de degradación de proteínas conocido autofagia, un ejemplo de esto son las proteínas Beclin y ATG5 (Quiroga *et al*, 2013). Esto indicaría que finalmente Herp puede modular ambas vías de degradación de proteínas (Quiroga *et al*, 2013).

También se ha descrito que Herp podría regular la degradación de proteínas involucradas en la regulación de los niveles de Ca^{2+} intracelular, pudiendo modular los niveles de IP3R (Chang *et al*, 2004; Belal *et al*, 2012). Herp forma un complejo con el IP3R1 y el RYR (Belal *et al*, 2012) y aumentos en la expresión de Herp resultan en una reducción de los niveles proteicos de ambos receptores, efecto que se revierte al inhibir la actividad del proteosoma (Belal *et al*, 2012).

La participación de Herp en la degradación de proteínas y mantención de la homeostasis del Ca^{2+} se suman a su rol más conocido, el de respuesta frente al estrés de RE (Kokame *et al*, 2001; Sai *et al*, 2002; Chan *et al*, 2004; Hori *et al*, 2004). Herp confiere

resistencia a la muerte celular gatillada por este tipo de estrés, pudiendo así las células degradar proteínas mal plegadas y modular sus niveles de Ca^{2+} y evitar así procesos de apoptosis y necrosis.

En esta tesis se reveló el papel de Herp frente al estrés oxidativo, otro tipo de estrés de gran relevancia fisiopatológica, y cómo protege a las células de la muerte producida por este tipo de estrés, pero además se descubrió que Herp puede regular el metabolismo mitocondrial basal y, por ende, el metabolismo energético. Estos resultados sitúan a Herp no solo como una proteína de respuesta frente al estrés sino además como un importante regulador de la homeostasis energética celular. Además también se encontró que las células que carecen de la proteína Herp, son más sensibles al tratamiento con antineoplásicos, lo que posiciona a Herp como un posible blanco terapéutico para el tratamiento del cáncer.

Discutiendo con más detalle cada uno de estos hallazgos, primero partiremos con la relación Herp y estrés oxidativo. Nuestros resultados mostraron que los niveles de la proteína Herp aumentaban en forma rápida ya a los 30 min de exposición a H_2O_2 . Sin embargo este aumento no es sostenido en el tiempo dado que los niveles proteicos disminuyen a la hora post estímulo y se observa un nuevo aumento a las 3 h, el cual se mantiene hasta las 12 h del tratamiento. El aumento observado a la media hora de estímulo es producido por activación del factor de traducción eIF4E, conocido por ser activado por las ROS y por activar la traducción (Rocic *et al*, 2003). Esta respuesta es bastante rápida y parece ser la responsable del aumento de la proteína Herp, dado que al inhibir la unión de este factor a otros componentes de la maquinaria traduccional no se observan aumentos en la proteína Herp en respuesta al H_2O_2 . Se descartó que la degradación de la proteína este alterada por efecto del H_2O_2 , dado que tanto CHX como eIF4E inhiben completamente el aumento de los niveles de la proteína frente a este estímulo sugiriendo que los cambios observados son dados por alteraciones a nivel traduccional. Si hubiera una disminución en la degradación esperaríamos que el efecto de inhibir la traducción fuera solo parcial.

Por otra parte, los aumentos de la proteína a las 3 h parecen ser consecuencia del aumento en la transcripción del mRNA de Herp ya que coincide con cambios significativos en los niveles de mRNA de Herp desde las 3 h post-tratamiento.

Existen antecedentes que Herp aumenta su expresión en respuesta a H₂O₂ en células Hela (Van Laar et al, 2000). Pero existen otros que descartan a la proteína como una proteína de respuesta frente al estrés oxidativo (Ya et al, 2014). Estos últimos estudios utilizan concentraciones menores de H₂O₂ a las usadas en este trabajo y a tiempos largos superiores a las 4 h de estímulo (Ya et al, 2014). Este mecanismo está dado por mRNA preformados de la proteína Herp que se traducen por aumentos en la activación del factor eIF4E. Aumentos de la proteína a tiempos posteriores se debe a aumentos en la transcripción del mensajero de Herp (figura 39).

Nuestros resultados muestran que Herp no solo aumenta sus niveles en respuesta al tratamiento con H₂O₂, exógena sino también en respuesta a la generación endógena de ROS intracelulares vía Ang II. Estos aumentos tanto en los niveles de Herp a nivel de mRNA y proteína se observaron tanto *in vitro* como *in vivo*. Este aumento no se observa en células que son preincubadas con catalasa y posteriormente tratadas con angiotensina II, ni tampoco en animales que sobreexpresan catalasa. Estos resultados muestran de forma sólida que Herp es una proteína de respuesta a la generación de ROS.

Para poder definir la importancia de la proteína Herp en respuesta a la generación de ROS, se generaron células *knock down* para Herp, utilizando infección con lentivirus como técnica de producción de células Sh-Herp estables. En el artículo publicado por Belal et al (2012) se describe que la capacidad reguladora del Ca²⁺ intracelular por Herp está dada por la regulación de la degradación del IP3R (Belal et al, 2012). Estos resultados se reprodujeron en nuestro modelo ya que las células Sh-Herp presentan mayores niveles de IP3R que las células controles. El tratamiento de las células Sh-Herp con MG132 mostró que ellas tienen niveles de IP3R, similares a las células controles, indicando que Herp participa en la degradación de la proteína a través del proteosoma. Estos hallazgos corroboran por descrito en la literatura (Belal et al, 2012) y muestran que Herp regula la homeostasis del Ca²⁺ intracelular a través de la regulación de los niveles de IP3R.

Las cinéticas de Ca²⁺ producidas por el H₂O₂ en las células Sh-Herp mostraron alteraciones tanto a nivel intracelular como mitocondrial. Al parecer las células Sh-Herp presentan una liberación más prolongada de Ca²⁺ que las células controles en respuesta a

H₂O₂, que en parte depende del IP3R ya que al tratar las células con XeB se modificaron las cinéticas en las células Sh-Herp y controles. En el caso de los controles, la señal desaparece completamente pues sólo depende del IP3R. Sin embargo en el caso de las Sh-Herp se registró una caída en la amplitud de la señal pero que no desaparece por completo. Al parecer esta cinética depende también de un componente extracelular de Ca²⁺.

La revisión de la literatura muestra que Herp podría tener un rol en la regulación de los niveles basales del Ca²⁺ reticular y es controversial si esto se debe a que Herp regularía la fuga o “leak” del Ca²⁺ reticular o la incorporación de Ca²⁺ al RE desde el exterior (Chang *et al*, 2004). Desde ese punto de vista, los próximos estudios deberían esclarecer que canales de Ca²⁺ participan en el llenado de Ca²⁺ reticular y el mecanismo por el cual Herp regula estos canales.

Por otra parte, las cinéticas del Ca²⁺ mitocondrial en respuesta al H₂O₂ también se encuentran alteradas en las células Sh-Herp, observándose un aumento en el flujo de Ca²⁺ hacia la mitocondria. La entrada del Ca²⁺ a la mitocondria es totalmente dependiente del IP3R tanto en las células Sh-Luc como Sh-Herp. Estos datos sugieren que Herp regula los niveles intracelulares de Ca²⁺ y el flujo del Ca²⁺ hacia la mitocondria a través de la regulación de los niveles de IP3R.

Para corroborar esta hipótesis, se usó histamina como un estímulo positivo para activar el IP3R vía la generación de IP3 (Decuyper *et al*, 2011) y se estudiaron las cinéticas de Ca²⁺ mitocondrial generadas por un pulso de histamina. En este caso se observó una mayor entrada de Ca²⁺ hacia la mitocondria en las células Sh-Herp que en las células controles, siendo este ingreso de Ca²⁺ mediado por el IP3R. Estos resultados sugieren que Herp regula la entrada de Ca²⁺ desde el retículo sarcoplásmico a la mitocondria a través del IP3R.

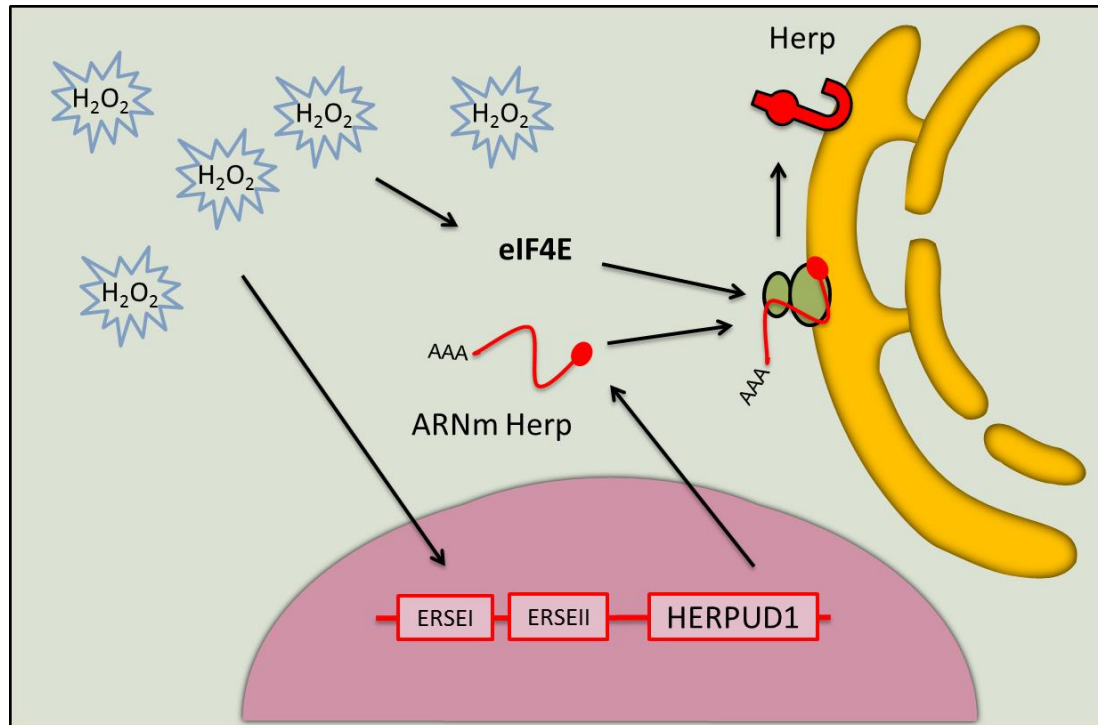


Figura 39. La proteína Herp aumenta su expresión en respuesta al H_2O_2 por mecanismos traduccional y transcripcional. Herp aumenta su expresión en respuesta a un aumento en las ROS intracelulares (H_2O_2), este aumento está dado por dos mecanismos. Una respuesta rápida observable a los 30 min de estímulo, que depende de la actividad traduccional y la actividad del factor traduccional eIF4E y una segunda más lenta, detectable a las 3 h de tratamiento que depende principalmente de la actividad transcripcional y el aumento del mRNA de Herp

Chigurupati *et al* (2009) observaron que células que sobreexpresan Herp tienen un menor influjo de Ca^{2+} hacia la mitocondria tras el tratamiento con MPP⁺⁺, en este artículo se discute que la acción del fármaco está dada principalmente por su capacidad de aumentar las ROS intracelular. Estos datos apoyan la idea de que Herp es un importante regulador de la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria y que es una proteína de respuesta al estrés oxidativo. Por otro lado, el traspaso de Ca^{2+} a la mitocondria desde el RE está mediada por el IP3R (Szabadkai *et al*, 2008). En nuestro modelo como se mencionó anteriormente el influjo de Ca^{2+} a la mitocondria es totalmente de pendiente del IP3R, por lo que Herp regula los niveles del receptor por degradación y de esta manera regular el traspaso de Ca^{2+} a la mitocondria. Chigurupati *et al* (2009) mencionaron que el rol de Herp como regulador del Ca^{2+} intracelular es dependiente de su segmento ULD y la vía proteosomal lo que apoya la hipótesis de que Herp regula el influjo de Ca^{2+} mitocondrial por regulación de la degradación de IP3R.

Para estudiar el rol de Herp como citoprotector frente a la respuesta a la generación de ROS, las células Hela controles y Sh-Herp se trataron con H_2O_2 a diferentes concentraciones y tiempos y se evaluó la muerte celular, observándose una mayor sensibilidad a la muerte en las células con menores niveles de Herp. Al recuperar la proteína Herp en las células Sh-Herp disminuyó la muerte celular dependiente de ROS. Estos datos indican que Herp cumple un rol citoprotector frente al estrés oxidativo y los rápidos incrementos de la proteína es respuesta a las ROS son importantes para la sobrevivencia celular.

El H_2O_2 puede conducir a la muerte celular por apoptosis o necrosis, a través de varios mecanismos bien conocidos (Golstein *et al*, 2006; Zong *et al*, 2006, (Saito *et al*, 2006). En nuestro estudio se ensayaron inhibidores de la apoptosis como caspasas, calpains y proteasas para dilucidar el mecanismo por el cual Herp ejerce su efecto citoprotector frente al estrés oxidativo. Todos estos inhibidores disminuyeron la sensibilidad a la muerte de las células Sh-Herp producida por 500 μM de H_2O_2 . Estos resultados sugieren que la muerte podría estar produciéndose por apoptosis. Para corroborar esta posibilidad, se evaluó la población Sub G1 como ensayo para apoptosis y la liberación de LDH para evaluar necrosis. Solo se observaron diferencias significativas entre las células

Sh-Herp y Sh-Luc tratadas con H₂O₂, al medir los niveles de sub G1, por lo cual definimos que el mecanismo por el cual mueren más células Sh-Herp que Sh-Luc es apoptosis.

Adicionalmente se evaluó si el Ca²⁺ intracelular tenía alguna participación en este proceso dado que hay antecedentes que el estrés oxidativo estimula la movilización del Ca²⁺ intracelular, su traspaso desde el RE a la mitocondria, pudiendo producir sobrecarga del Ca²⁺ mitocondrial, apertura del PTM y finalmente la muerte celular (Rizzuto *et al*, 1998; Szabadkai *et al*, 2008; Rasola *et al*, 2011; Glancy *et al*, 2012). Ya que Herp es un importante regulador de la homeostasis del Ca²⁺ intracelular se investigó si el efecto citoprotector de Herp dependía de su función reguladora de Ca²⁺. Las células Hela controles y Sh-Herp pre-tratadas con BAPTA-AM (usado como quelante de Ca²⁺ intracelular) y EGTA (usado como quelante del Ca²⁺ extracelular) y posteriormente expuestas a H₂O₂ mostraron que sólo el BAPTA-AM pero no EGTA protegió a las células Sh-Herp de la muerte producida por H₂O₂. De estos resultados se deduce que el efecto citoprotector de Herp depende de la capacidad reguladora de Ca²⁺ intracelular que posee la proteína. El mecanismo más probable por el cual Herp protege a las células del estrés oxidativo es por regulación de los niveles de IP3R y regulación de la entrada de Ca²⁺ a la mitocondria. Esta posibilidad se comprobó con el uso del antagonista del receptor de IP3 XeB, observándose una drástica disminución en la muerte producida por H₂O₂ al inhibir el IP3R similar a lo observado con el bloqueador del PTM CsA. Dado que la apertura del PTM es regulada por los niveles de Ca²⁺ mitocondrial, es probable que Herp a través de la regulación del influjo de Ca²⁺ a la mitocondria por modulación de los niveles IP3R, inhiba la apertura del PTM y de esta manera ejerce su rol citoprotector. Para corroborar esta hipótesis medimos los niveles de citocromo C libres en el citoplasma, dado que cuando hay pérdida en la permeabilidad mitocondrial éste abandona la mitocondria hacia el citoplasma, activando una serie de vías apoptóticas que llevan a la muerte celular. Como era de esperarse las células Sh-Herp tratadas con H₂O₂ tienen mayores niveles de citocromo c en el citoplasma que las células control. Estas diferencias son revertidas al preincubar las células con XeB y CsA, lo que sugiere que el mecanismo propuesto por nosotros para explicar la muerte de las células Sh-Luc que involucra aumentos de calcio mitocondrial y pérdida de la permeabilidad celular son correctos.

En conclusión, el incremento de los niveles de Herp por estrés oxidativo es importante para la regulación de los niveles de IP3R y de Ca^{2+} intracelular y mitocondrial frente a la situación de estrés. Herp disminuye la sensibilidad de las células al estrés oxidativo, impidiendo que se produzca una sobrecarga de Ca^{2+} en la mitocondria, apertura del PTM, salida de citocromo c y finalmente la muerte vía apoptosis (Figura 40).

Chan *et al* (2004) plantearon que Herp tiene un rol citoprotector frente al estrés de RE por un mecanismo que involucra a la vía de las JNK, BCL-2 y activación de caspasas. En el artículo se planteó que el Ca^{2+} es un mediador fundamental del proceso. No describen el mecanismo completo por el cual esto sucede pero se puede observar en una de sus figuras que las células que sobreexpresan Herp tiene menor liberación de citocromo C frente a situaciones de estrés, lo que indicaría que Herp tiene alguna influencia en la regulación de la permeabilidad mitocondrial, lo cual fue comprobado en nuestro estudio. Herp regulando los niveles de entrada de Ca^{2+} a la mitocondria regularía la apertura del PTM y con esto la salida del citocromo C al citoplasma. Otro antecedente que apoya este mecanismo es lo descrito por Chigurupati *et al* (2009), ellos vieron que las células tratadas con siRNA para Herp eran más sensibles al MPP++ que las células control por un mecanismo que involucra Ca^{2+} y que además involucra la capacidad de Herp de degradar proteínas. Además discuten que el mecanismo por el cual MPP++ produce muerte celular es por pérdida de la función mitocondrial.

Yan *et al* (2014), por otro lado, estudiaron el efecto de la sobreexpresión de Herp en distintas condiciones de estrés, encontrando que protege a las células del estrés de retículo pero no así del estrés oxidativo. Tanto con H_2O_2 y paraquat se observa una disminución en la sobrevivencia al sobreexpresar Herp, estos datos aunque controversiales fueron replicados también por nosotros. Estos datos indican que el mecanismo por el cual Herp protege a las células del estrés de RE y el estrés oxidativo aunque tienen puntos similares no son los mismos.

Es sabido que Herp protege a las células de cualquier tipo de estrés de forma dependiente de su función en la degradación de proteínas (Chan *et al* 2004; Chigurupati *et al*, 2009; Belal *et al*, 2012, Quiroga *et al*, 2013). En el caso del estrés de retículo esta función es fundamental para evitar la formación de agregados de proteínas tóxicos para la

célula (Belal et al, 2012). En el caso del estrés nutricional Herp regularía los niveles de las proteínas relacionadas con la autofagia y con esto regularía la degradación de proteínas por autofagia de forma indirecta (Quiroga et al, 2013). En el caso del estrés oxidativo Herp estaría evitando la sobrecarga de calcio y apertura del PTM por regulación de los niveles de IP3R. Yan et al, 2014 discuten en su artículo que Herp sería una proteína que tiene como función mantener la homeostasis celular, variaciones en sus niveles causan desbalance celular y podría sensibilizar a las células al estrés.

En conclusión frente a un aumento en los ROS intracelulares Herp aumenta sus niveles, siendo este aumento importante para la regulación de los niveles de IP3R y de esta forma para mantener los niveles de Ca^{2+} intracelular y mitocondrial frente a la situación de estrés. Herp disminuye la sensibilidad de las células al estrés oxidativo, dado que impide que se produzca una sobrecarga de Ca^{2+} en la mitocondria, impidiendo así que haya una pérdida de la permeabilidad mitocondrial por apertura del PTM.

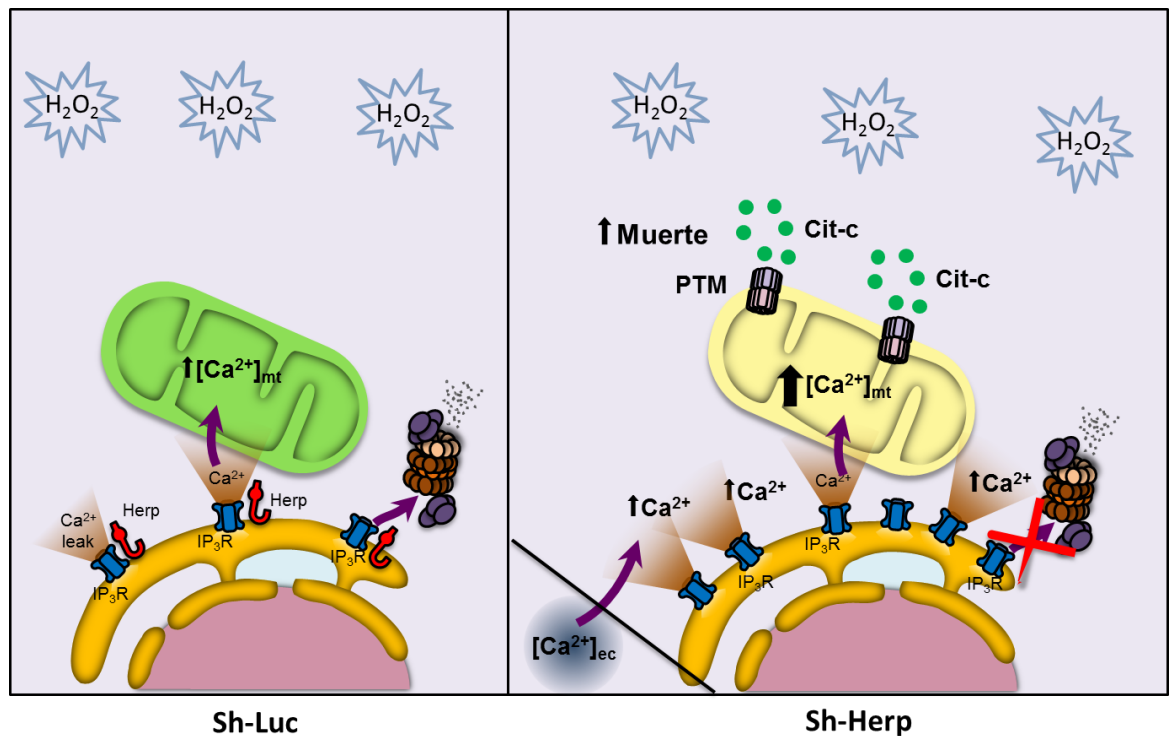


Figura 40. Herp ejerce un efecto citoprotector frente al estrés oxidativo por regulación de la liberación de Ca^{2+} vía IP₃R. Herp normalmente está regulando los niveles de IP₃R a través de su degradación por la vía proteosomal. En situación de estrés, Herp aumenta su expresión y mantiene un adecuado nivel de IP₃R para regular el influjo de Ca^{2+} hacia la mitocondria, previniendo así la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial y muerte celular. En cambio, las células con niveles reducidos de herp (Sh-Herp) presentan un aumento en los niveles de IP₃R. Frente a una situación de estrés oxidativo (H_2O_2) se genera una sobrecarga de Ca^{2+} en la mitocondria con apertura del poro de transición mitocondrial (PTM) y pérdida de su permeabilidad y salida de citocromo C (cit-c), lo que finalmente lleva a la muerte celular.

Además de este rol citoprotector de Herp frente al estrés oxidativo, los resultados también mostraron que Herp regula en el metabolismo mitocondrial, probablemente por regulación basal de los niveles de IP3R, Ca^{2+} intracelular y por consiguiente de la función mitocondrial. Las células Hela Sh-Herp presentan un metabolismo mitocondrial mayor que las células controles, encontrándose aumentos en el consumo de oxígeno y síntesis de ATP mitocondrial, pero por otro lado se encuentra con un potencial mitocondrial disminuido. Esta disminución en el potencial podría explicarse a una mayor apertura del PTM basal en las mitocondrias de las células Sh-Herp, lo que causa una disipación del potencial.

El PTM ha sido descrito como un importante regulador de la homeostasis del Ca^{2+} mitocondrial (De Marchi *et al*, 2014) y aumenta su apertura en respuesta a sobrecarga de calcio y aumentos en las ROS intracelular (Rao *et al*, 2014). En general la apertura del PTM produce caída en el potencial de membrana mitocondrial, aumento en la producción de ROS mitocondrial y salida de citocromo C desde la mitocondria al citoplasma (Bonora *et al*, 2013). La apertura sostenida del PTM puede conducir a las células a la muerte ya sea por necrosis o apoptosis, dependiendo del tipo celular y de la razón ATP/ADP (Bonora *et al*, 2013).

En nuestro modelo la pérdida del potencial mitocondrial de las células Sh-Herp es recuperado al tratar las células con CsA, no así los niveles de ATP, por lo cual asumimos que la apertura del PTM afecta al potencial de membrana mitocondrial pero no la síntesis de ATP. Como se observó anteriormente en los experimentos con H_2O_2 , Las células Sh-Herp presentan una mayor salida de citocromo C frente a estímulos tóxicos que las células control, que es bloqueado por CsA. Finalmente nosotros también observamos que el aumento en los niveles de H_2O_2 intracelular en las células Sh-Herp son revertidos al tratar las células con CsA, todos estos datos en conjunto sugieren que las células Sh-Herp presentan una mayor apertura del PTM de forma basal, que podría estar jugando un papel importante en el rol de Herp como regulador del metabolismo mitocondrial y como se vio anteriormente juega un rol fundamental para la sobrevivencia celular.

Los cambios metabólicos observados en las células Sh-Herp fueron prevenidos al recuperar los niveles de la proteína a través de transfección transitoria de un plásmido que codifica para la proteína Herp. Por otro lado, la sobreexpresión de la proteína en células

Hela WT produjo cambios en el metabolismo contrarios a los detectados en las células Sh-Herp. Estos resultados sugieren que Herp es importante en la mantención del metabolismo mitocondrial normal. Al preincubar las células con BAPTA-AM o XeB, los cambios en el metabolismo mitocondrial observados en las células Sh-Herp se revierten. Por lo tanto, Herp regula el metabolismo mitocondrial por regulación de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular y la regulación de IP3R. Estos datos sugieren que Herp regula las señales de Ca^{2+} intracelular de forma basal y no solo en respuesta a algún estímulo y, por otro lado, Herp también regula el flujo de Ca^{2+} mitocondrial vía IP3R y, de esta manera, mantiene la función mitocondrial normal. Finalmente el aumento en el influjo basal del Ca^{2+} mitocondrial está aumentado en las células Sh-Herp, lo que activa a varias enzimas del ciclo de Krebs lo que tiene por consecuencia un aumento en el consumo de oxígeno. Este aumento finalmente se traduce en un aumento en la síntesis de ATP mitocondrial. La pérdida en la regulación de los niveles de IP3R debido a la reducción de los niveles de Hero produce un aumento de los niveles de Ca^{2+} mitocondrial poco regulados, lo que produce una mayor apertura del PTM y pérdida en el potencial mitocondrial. Esta pérdida al parecer no afecta la síntesis de ATP mitocondrial. Entonces parece lógico sugerir que el aumento de la función mitocondrial en las células Sh-Herp produzca un “switch” metabólico y que este cambio metabólico hace a estas células más sensible al estrés. Esta idea nos llevó a pensar que las células Sh-Herp frente al cambio metabólico podían estar revirtiendo el efecto Warburg. Varios antecedentes sugieren que esta hipótesis podría ser correcta. Primero, el aumento en la actividad mitocondrial, principalmente el consumo de oxígeno es indicativo del cambio en el metabolismo y, por otra parte, el aumento en la síntesis de ATP mitocondrial (Xie *et al*, 2011). Estos datos indican que las células Hela que normalmente presentan un metabolismo glicolítico y que no utilizan a la mitocondria como fuente principal de ATP, al disminuir los niveles de Herp cambian este metabolismo a uno más dependiente de la actividad mitocondrial. Otros datos interesantes fueron la disminución en la proliferación de las células Sh-Herp respecto a las células controles y el aumento en su sensibilidad a los antineoplásicos. Tanto en células Hela y U2OS *knock down* para Herp hubo diferencias significativas en la sensibilidad a distintos antineoplásicos (Taxol, Cisplatino, Etopósido y Vinblastina). Por otra parte, las células Sh-Luc y Sh-Herp tratadas dicloroacetato (Figura S3) mostraron que ambas se hacen más sensibles al tratamiento con H_2O_2 . Esto corrobora la idea de que los cambios metabólicos y el revertir el efecto Warburg son relevantes en la sensibilidad celular frente a agentes que inducen muerte celular (Xie *et*

al, 2011). Además muestra que el disminuir la proteína Herp en células neoplásicas tiene efectos similares en la viabilidad al uso de drogas que revierten el efecto Warburg (Figura 42).

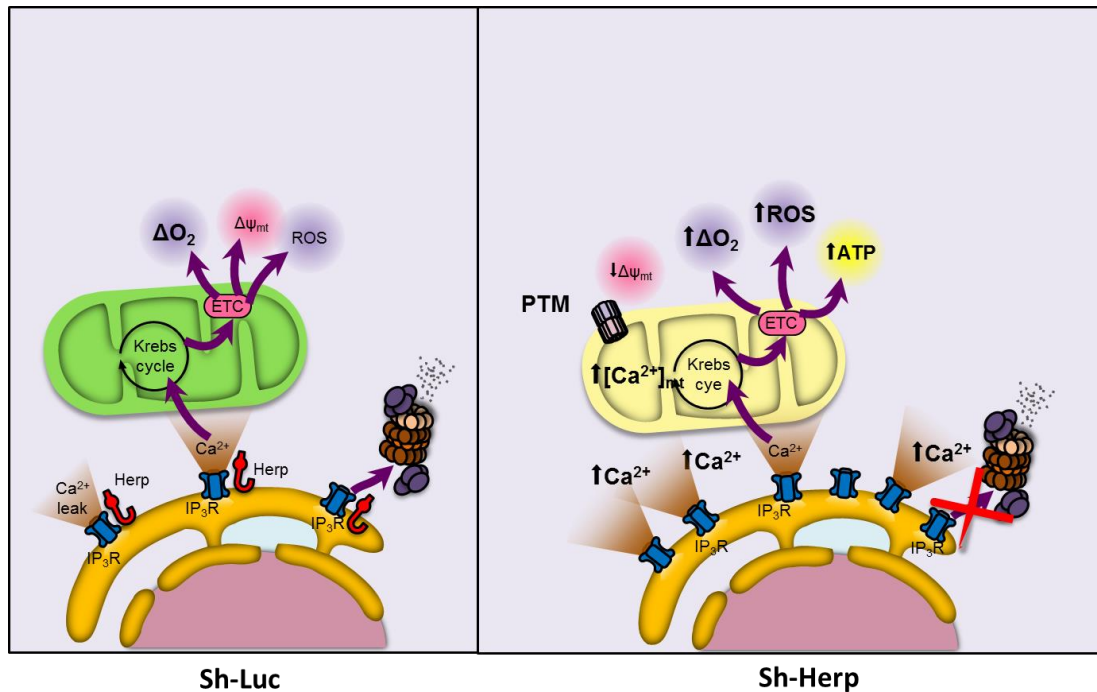


Figura 41. Células Sh-Herp presentan un aumento en la función mitocondrial caracterizada por aumentos en el consumo de oxígeno, síntesis de ATP y producción intracelular de ROS. Estos cambios son debidos a una desregulación en los niveles de IP₃R y aumentos de Ca²⁺ mitocondrial. Por otro lado también se observa una disminución en el potencial mitocondrial debido a una mayor apertura del poro de transición mitocondrial (PTM) que no afecta la síntesis de ATP. Herp basalmente regula el metabolismo energético mediante la regulación de los niveles de IP₃R.

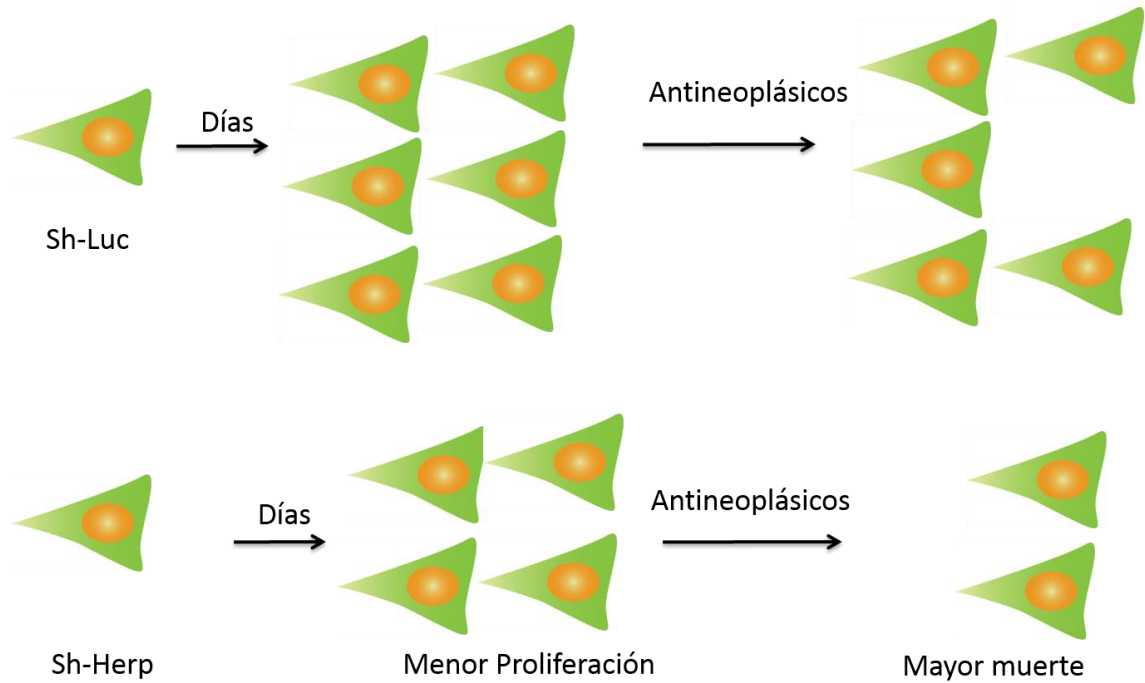


Figura 42. Células Sh-Herp proliferan menos y son más sensibles a la muerte producida por los antineoplásicos: Células Hela y U2OS proliferan menos cuando se disminuyen los niveles de Herp. Al mismo tiempo se mostró que las células Sh-Herp son más sensibles a la muerte causada por antineoplásicos. Este efecto se podría deber a que la disminución de Herp produce cambios metabólicos que revierten el efecto Warburg en las células neoplásicas.

7.5. Modelo final y proyecciones

Esta tesis aunque está dividida en dos partes, por un lado la respuesta de Herp frente a las ROS y su relevancia como citoprotector frente a este estímulo y, por otro lado, la función basal de Herp en la mantención del metabolismo mitocondrial estable, es parte de una sola idea central que se ha discutido en los últimos años en los diferentes artículos referidos a las funciones de la proteína Herp. Esta idea describe a la proteína Herp como un regulador de la homeostasis celular y que desregulaciones en sus niveles, ya sea disminuyendo o aumentando los niveles proteicos, tiene como consecuencia cambios metabólicos.

La [Figura 43](#) resume en un modelo los principales hallazgos del presente trabajo. En ella se observa Herp regula basalmente el metabolismo energético a través de su capacidad de mantener la homeostasis del Ca^{2+} por un mecanismo dependiente de su función reguladora de la degradación de proteínas. Frente a situaciones de estrés, en nuestro caso aumento en las ROS, Herp aumenta sus niveles para contrarrestar sus efectos sobre el metabolismo de manera de mantener los niveles de Ca^{2+} intracelular y mitocondrial para así evitar apertura del PTM y muerte celular. Por lo tanto Herp además de ser una proteína importante en la mantención de la homeostasis celular también es una proteína de respuesta muy rápida (pocas horas) al estrés como quedó demostrado en esta tesis y se describe en otros artículos relacionados. Por otro lado, dada su función en la mantención del metabolismo describimos que en las células neoplásicas es importante para la mantención del metabolismo glicolítico y el efecto Warburg. En base a estos hallazgos se propone a Herp como futuro blanco terapéutico en el desarrollo de fármacos antineoplásicos.

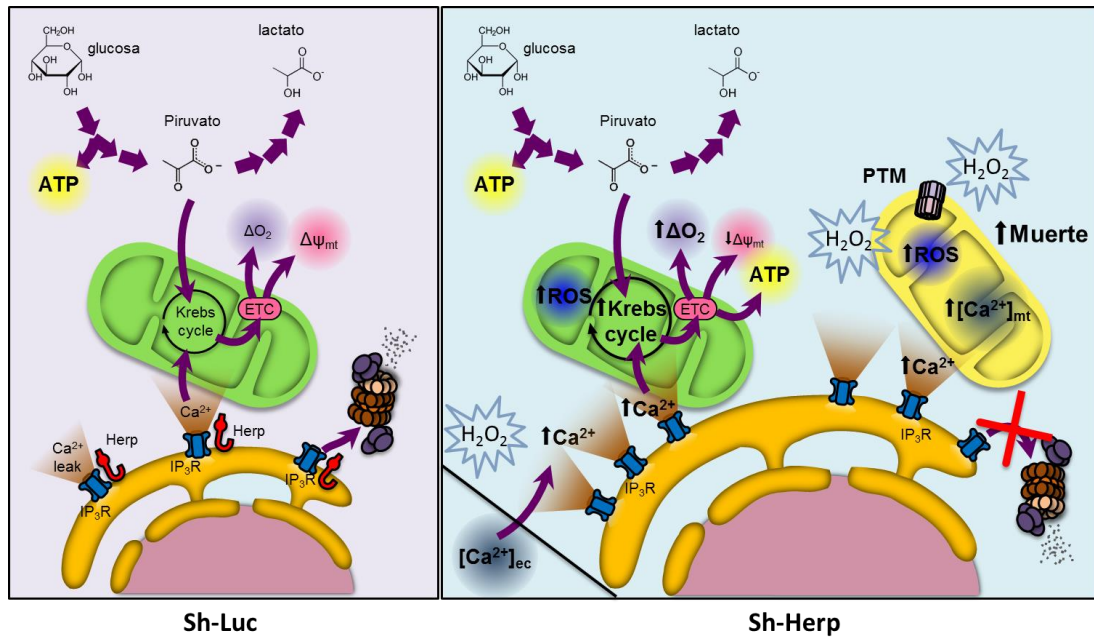


Figura 43. Modelo final. Herp regula la degradación del IP3R y de esta manera el metabolismo celular y la respuesta celular al estrés oxidativo. Herp modula así los niveles del Ca^{2+} intracelular y el influjo de Ca^{2+} a la mitocondria, manteniendo el metabolismo en condiciones basales y de estrés. Las células con bajos niveles de Herp (Sh-Herp) presentan un aumento en los niveles de IP3R, produciendo mayor entrada de Ca^{2+} hacia la mitocondria de forma basal, aumentando la función mitocondrial. En condiciones de estrés oxidativo, Herp aumenta su expresión protegiendo a las células de la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial y la muerte.

8. CONCLUSIONES

- Los niveles de Herp aumentan en respuesta a la exposición exógena o generación intracelular de H₂O₂ tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*.
- Esta respuesta se caracteriza por ser rápida y dependiente de la maquinaria de traducción y transcripción génica.
- Herp ejerce un efecto citoprotector frente a agentes que producen estrés oxidativo, siendo este efecto dependiente de la regulación de los niveles intracelulares de Ca²⁺.
- Herp regula los niveles del Ca²⁺ intracelular y mitocondrial por regulación de los niveles de IP3R.
- Herp protege de la muerte celular por regulación en la apertura del PTM debido a sus efectos en el influjo del Ca²⁺ mitocondrial dependientes del IP3R.
- Herp controla basalmente el metabolismo mitocondrial
- La disminución de los niveles de Herp en células HeLa conducen a aumentos en el consumo de oxígeno y síntesis de ATP y a una disminución en el potencial de membrana mitocondrial y mayor sensibilidad al tratamiento con antineoplásicos.

9. BIBLIOGRAFÍA

Arnoult D. Mitochondrial fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 17:6-12, 2007.

Akram M. Mini-review on glycolysis and cancer. *J Cancer Educ.* 28:454-7, 2013.

Aon MA, Cortassa S. Mitochondrial network energetics in the heart. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 4:599-613, 2012.

Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:373–99, 2004.

Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 87:245-313, 2007.

Belal C, Ameli NJ, Kommos A, Bezalel S, Al'Khafaji AM, Mughal MR, Mattson MP, Kyriazis GA, Tyrberg B, Chan SL. The homocysteine-inducible endoplasmic reticulum (ER) stress protein Herp counteracts mutant α -synuclein-induced ER stress via the homeostatic regulation of ER-resident calcium release channel proteins. *Hum Mol Genet.* 21:963-77, 2012.

Berridge MJ. Calcium signalling and Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* 36:1149-56, 2010.

Brand MD. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp. Gerontol.* 45, 466-472, 2010.

Bernasconi R, Galli C, Kokame K, Molinari M. Autoadaptive ER-associated degradation defines a preemptive unfolded protein response pathway. *Mol Cell.* 52: 1-11, 2013.

Boggy GJ, Woolf PJ. A mechanistic model of PCR for accurate quantification of quantitative PCR data. *PLoS One.*, 5:12355, 2010.

Bonora M, Bononi A, De Marchi E, Giorgi C, Lebedzinska M, Marchi S, Patergnani S, Rimessi A, Suski JM, Wojtala A, Wieckowski MR, Kroemer G, Galluzzi L, Pinton P. Role of the c subunit of the FO ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Cell Cycle*. 15;12:674-83, 2013.

Brenner C, Moulin M. Physiological roles of the permeability transition pore. *Circ Res*. 111:1237-1247, 2012.

Brown EM. Role of the calcium-sensing receptor in extracellular calcium homeostasis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 27:333-43, 2013

Castro J, Bittner CX, Humeres A, Montecinos VP, Vera JC, Barros LF. A cytosolic source of calcium unveiled by hydrogen peroxide with relevance for epithelial cell death. *Cell Death Differ*. 11:468–478, 2004.

Chan S. L, Fu W, Zhang P, Cheng A, Lee J, Kokame K, and Mattson M. P Herp stabilizes neuronal Ca²⁺ homeostasis and mitochondrial function during endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*. 279: 28733-28743, 2004.

Chen KC, Zhou Y, Xing K, Krysan K, Lou MF. Platelet derived growth factor (PDGF)-induced reactive oxygen species in the lens epithelial cells: the redox signaling. *Exp Eye Res*. 78:1057-1067, 2004.

Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene*. 1269:131-40, 2001

Chetsawang B, Kooncumchoo P, Govitrapong P, Ebadi M. 1-Methyl-4-phenyl-pyridinium ion-induced oxidative stress, c-Jun phosphorylation and DNA fragmentation factor-45 cleavage in SK-N-SH cells are averted by selegiline. *Neurochem Int*. 53:283–288, 2008.

Chigurupati S, Wei Z, Belal C, Vandermeij M, Kyriazis GA, Arumugam TV, Chan SL. The Homocysteine-inducible endoplasmic reticulum stress protein counteracts calcium store depletion and induction of CCAAT enhancer-binding protein homologous protein in a neurotoxin model of Parkinson disease. *J Biol Chem*, 284:18323-18333, 2009.

Chong SJ, Low IC, Pervaiz S. Mitochondrial ROS and involvement of Bcl-2 as a mitochondrial ROS regulator. *Mitochondrion*. JS1567-7249:00087-7, 2014.

Criollo A, Maiuri M.C, Tasdemir E, Vitale I, Fiebig A.A, Andrews D, Molgó J, Díaz J, Lavandero S, Harper F, Pierron G, di Stefano D, Rizzuto R, Szabadkai G, Kroemer G. Regulation of autophagy by the inositol trisphosphate receptor. *Cell Death Differ*. 14:1029-39, 2007.

Curtin JF, Donovan M, Cotter TG. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J. Immunol Methods*. 265, 49–72, 2002.

D'Auréaux B, Toledano M.B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:813-824, 2007

Davies K.J.A. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life*. 48:41–47, 1999.

De Marchi E, Bonora M, Giorgi C, Pinton P. The mitochondrial permeability transition pore is a dispensable element for mitochondrial calcium efflux. *Cell Calcium*. 56:1-13, 2014.

Decuypere J, Monaco G, Bultynck G, Missiaen L, Smedt H.D, Parys J.B. The IP3 receptor–mitochondria connection in apoptosis and autophagy. *Biochem Biophys Res Commun* 1813:1003-1013, 2011.

Decuypere J, Monaco G, Missiaen L, Smedt H.D, Parys J.B, Bultynck G. IP3 receptors, mitochondria, and Ca²⁺ signaling: implications for aging. *J Aging Res*, 2011:1-20, 2011.

Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*. 10:369-377, 2000.

Dikalova A, Clempus R, Lassègue B, Cheng G, McCoy J, Dikalov S, San Martin AI, Lyle A, Weber D.S, Weiss D, Taylor W.R, Schmidt H.H.W, Owens Gary K, J. Lambeth D, Griendling K.K, Nox1 overexpression potentiates angiotensin II-induced hypertension and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice. *Circ Res*. 112:2668-2676, 2005.

Doan T.N, Gentry D.L, Taylor A.A, Elliott S.J. Hydrogen peroxide activates agonist-sensitive Ca²⁺-flux pathways in canine venous endothelial cells. *Biochem J*. 297: 209–215, 1994.

Espinosa A, García A, Hartel S, Hidalgo C, Jaimovich E. NADPH oxidase and hydrogen peroxide mediate insulin-induced calcium increase in skeletal muscle cells. *J Biol Chem*, 284:2568-2575, 2009.

Feng W, Liu G, Allen PD, Pessah IN. Transmembrane redox sensor of ryanodine receptor complex. *J Biol Chem*, 275: 35902–35907, 2000.

Ferrero-Gutiérrez A, Pérez-Gómez A, Novelli A, Fernández-Sánchez M.T. Inhibition of protein phosphatases impairs the ability of astrocytes to detoxify hydrogen peroxide. *Free Rad Biol Med*. 44:1806–1816; 2008.

Festjens N, Berghe TV, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochem Biophys Res Commun*. 1757:1371-1387, 2006.

Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL, Youle RJ. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell*. 1:515-525, 2001.

Geiszt M. NADPH oxidases: new kids on the block. *Cardiovasc Res*. 71:289-99, 2006.

Germain M, Mathai JP, McBride HM, Shore GC. Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis. *EMBO J*. 24:1546-1556, 2005.

Glancy B, Balaban RS. Role of mitochondrial Ca^{2+} in the regulation of cellular energetics. *Biochemistry*. 51: 2959–2973, 2012.

Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*. 32:37-43, 2006.

Greene V, Birk A, Szeto H. Mitochondria-targeted peptide inhibits H_2O_2 -induced mitochondrial Ca^{2+} overload in HeLa cells. *FASEB J*. 20:1118, 2006.

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II Stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*.74:1141-1148, 1994.

Guo J, Lemire BD. The ubiquinone-binding site of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate-ubiquinone oxidoreductase is a source of superoxide. *J. Biol. Chem.* 278, 47629-47635, 2003.

Hackenbrock CR. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. II. Electron transport-linked ultrastructural transformations in mitochondria. *J Cell Biol.* 37:345-369, 1968.

Hidalgo C, Donoso P, Carrasco M.A. The ryanodine receptors Ca^{2+} release channels: cellular redox sensors?. *IUBMB Life.* 57: 315–322, 2005.

Hidalgo C. Cross talk between Ca^{2+} and redox signaling cascades in muscle and neurons through the combined activation of ryanodine receptors/ Ca^{2+} release channels. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 360: 2237–2246, 2005.

Hirschhaeuser F, Sattler UG, Mueller-Klieser W. Lactate: a metabolic key player in cancer. *Cancer Res.* 15;71:6921-5, 2011.

Hori O, Ichinoda F, Yamaguchi A, Tamatani T, Taniguchi M, Koyama Y, Katayama T, Tohyama M, Stern D.M, Ozawa K, Kitao Y, Ogawa S. Role of Herp in the endoplasmic reticulum stress response. *Gen Cell.* 9: 457-469, 2004.

Hu Q, Chang J, Tao L, Yan G, Xie M, Wang Z. Endoplasmic reticulum mediated necrosis-like apoptosis of Hela cells induced by Ca^{2+} oscillation. *J Biochem Mol Biol.* 38: 709-716, 2005.

Huang C, Chu Y, Ye Y, Chen X. Role of HERP and a HERP-related protein in HRD1-dependent protein degradation at the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 289:4444-54, 2014.

Jagasia R, Grote P, Westermann B, Conradt B. DRP-1-mediated mitochondrial fragmentation during EGL-1-induced cell death in *C. elegans*. *Nature.* 433:754-760, 2005.

Jiang F, Zhang Y, Dusting GJ. NADPH Oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. *Pharmacol Rev.* 63:218–242, 2011.

Kankotia S, Stacpoole PW. Dichloroacetate and cancer: New home for an orphan drug? *Biochim Biophys Acta.* 419: 00079-1, 2014.

Kaufman RJ, Malhotra JD. Calcium trafficking integrates endoplasmic reticulum function with mitochondrial bioenergetics. *Biochim Biophys Acta*. 1843:2233-9. 2014.

Kiley PJ, Storz G. Exploiting thiol modifications. *PLoS Biol*, 2:1714-1717, 2004.

Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab*. 3:177-185, 2006.

Kima T, Kimb E, Yoon SK, Yoon J. Herp enhances ER-associated protein degradation by recruiting ubiquilins. *Biochem Biophys Res Commun*. 369:741–746, 2008.

Kny M, Standera S, Hartmann-Petersen R, Kloetzel PM, Seeger M. Domain-dependent Manner Ubiquitylation in a Ubiquitin-like Herp Regulates Hrd1-mediated. *J. Biol. Chem*. 286:5151-5156, 2011

Kohen, R, Nyska A. Oxidation of Biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantitation. *Toxicol Pathol*. 30: 620-650, 2002.

Kokame K, Agarwala KL, Kato H, Miyata T. Herp, a new ubiquitin-like membrane protein induced by endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*. 275: 32846-32853, 2000.

Kokame K, Kato H, Miyata T. Identification of ERSE-II, a new cis-acting element responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response. *J Biol Chem*, 276: 9199-9205, 2001.

Krippel-Drews P, Haberland C, Fingerle J, Drews G, Lang F. Effects of H₂O₂ on membrane potential and Ca²⁺ of cultured rat arterial smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 209:139–145, 1995.

Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial permeabilization in cell death. *Physiol. Rev*. 87: 99-163, 2006.

Kuzmicic J, Del Campo A, Lopez-Crisosto C, Morales PE, Pennanen C, Bravo-Sagua R, Hechenleitner J, Zepeda R, Castro PF, Verdejo HE, Parra V, Chiong M, Lavandero S. Mitochondrial dynamics and function: a potential new therapeutic target for heart failure. *Rev Esp Cardiol.* 64:916-23, 2011

Lassègue B, Sorescu D, Szöcs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant S.L, Lambeth J. D, Griendling K.K. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res.* 88:888-894, 2001.

Lee Y, Jeong S, Karbowski M, Smith C, Youle RJ. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell.* 15:5001-5011, 2004.

Leitmana J, Shenkmana M, Gofmanb Y, Shterna NO, Ben-Talb N, Hendershotc LM, Lederkremera GZ. Herp coordinates compartmentalization and recruitment of HRD1 and misfolded proteins for ERAD. *Mol Biol Cell.* 25:1050-60, 2014.

Lenzen S. A fresh view of glycolysis and glucokinase regulation: history and current status. *J Biol Chem.* 289:12189-94, 2014.

Liang G, Audas TE, Li Y, Cockram GP, Dean JD, Martyn AC, Kokame K, Lu, R. Luman/CREB3 induces transcription of the endoplasmic reticulum (ER) stress response protein herp through an ER stress response element. *Mol Cell Biol,* 26:7999–8010, 2006.

Liang G, Li Q, Tang Y, Kokame K, Kikuchi T, Wu G, Chen XZ. Polycystin-2 is regulated by endoplasmic reticulum-associated degradation. *Hum Mol Gen.* 17: 1109–1119, 2008.

Lina HJ, Wangb X, Shaffera KM, Carl YS, Maa W. Characterization of H₂O₂-induced acute apoptosis in cultured neural stem/progenitor cells. *FEBS Lett.* 570: 102-106, 2004.

Linden A, Gulden M, Martin H.J, Maser E, Seibert H. Peroxide-induced cell death and lipid peroxidation in C6 glioma cells. *Toxicol.* 22:1371–1376; 2008.

Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 27:441-64, 2011.

- Ma Y, Hendershot LM. Herp is dually regulated by both the endoplasmic reticulum stress-specific branch of the unfolded protein response and a branch that is shared with other cellular stress pathways. *J Biol Chem.* 279: 13792-13799, 2004.
- Malka F, Guillery O, Cifuentes-Diaz C, Guillou E, Belenguer P, Lombès A, Rojo M Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Rep.* 6:853-859, 2005.
- Mancini M, Anderson BO, Caldwell E, Sedghinasab M, Paty PB, Hockenbery DM Mitochondrial proliferation and paradoxical membrane depolarization during terminal differentiation and apoptosis in a human colon carcinoma cell line. *J Cell Biol.* 138:449-469, 1997.
- Mannella CA, Marko M, Penczek P, Barnard D, Frank J. The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: tomographic study using the high-voltage transmission electron microscope. *Microsc Res Tech.* 27:278-283, 1994.
- Martindale J, Holbrook N. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol.* 192:1-15, 2002.
- Martinou JC, Youle RJ. Which came first, the cytochrome c release or the mitochondrial fission? *Cell Death Differ.* 13:1291-1295, 2006.
- Marutani T, Maeda T, Tanabe C, Zou K, Araki W, Kokame K, Michikawa M, Komano H. ER-stress-inducible Herp, facilitates the degradation of immature nicastrin. *Biochim Biophys Acta.* 1810:790-8, 2011.
- Matsuno K, Yamada H, Iwata K, Jin D, Katsuyama M, Matsuki M, Takai S, Yamanishi K, Miyazaki M, Matsubara H, Yabe-Nishimura C. Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice. *Circ Res.* 2005;112:2677-2685.
- Mazat JP, Ransac S, Heiske M, Devin A, Rigoulet M. Mitochondrial energetic metabolism-some general principles. *IUBMB Life.* 65:171-9, 2013.
- Nagase T, Ishikawa K, Suyama M, Kikuno R, Hirose M, Miyajima N, Tanaka A, Kotani H, Nomura N, Ohara O. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XII.

The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res.* 5: 355-364, 1998.

Okuda-Shimizu Y, Hendershot LM. Characterization of an ERAD pathway for nonglycosylated BiP substrates, which require Herp. *Mol Cell.* 28: 544-554, 2007.

Orzechowski A, Lokociejewska M, Muras P, Hocquette J.F. Preconditioning with millimolar concentrations of vitamin C or N-acetylcysteine protects L6 muscle cells insulin-stimulated viability and DNA synthesis under oxidative stress. *Life Sci.* 71:1793-1808, 2002.

Pallepati P, Averill-Bates D.A. Activation of ER stress and apoptosis by hydrogen peroxide in HeLa cells: Protective role of mild heat preconditioning at 40 °C. *Biochem. Biophys.* 1813:1987–1999, 2011

Pan Q, Qiu W, Huo Y, Yao Y, Lou M.F. Low levels of hydrogen peroxide stimulate corneal epithelial cell adhesion, migration, and wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52:1723-34, 2011.

Paranagama MP, Sakamoto K, Amino H, Awano M, Miyoshi H, Kita K. Contribution of the FAD and quinone binding sites to the production of reactive oxygen species from *Ascaris suum* mitochondrial complex II. *Mitochondrion.* 10:158-165, 2010.

Peden DB, Dailey L, DeGraff W. Hydrogen peroxide effects on rat mast cell function. *Am J Physiol.* 267:L85-L93, 1994.

Pierre N, Barbé C, Gilson H, Deldicque L, Raymackers JM, Francaux M. Activation of ER stress by hydrogen peroxide in C2C12 myotubes. *Biochem Biophys Res Commun.* 18;450:459-63, 2014

Pinton P, Ferrari D, Rapizzi E, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R. The Ca²⁺ concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *EMBO J.* 20:2690-2701, 2001.

Pletjushkina OY, Lyamzaev KG, Popova EN, Nepryakhina OK, Ivanova OY, Domnina LV, Chernyak BV, Skulachev VP. Effect of oxidative stress on dynamics of mitochondrial reticulum. *Bioch Biophys Acta.* 1757:518-524, 2006.

Quirion JC, Sevenet T, Husson HP, Weniger B, Debitus C. Two new alkaloids from *Xestospongia* Sp., a new caledonian sponge. *J. Nat. Prod.*, 55: 1505-1508, 1992.

Quiroga C, Gatica D, Paredes F, Bravo R, Troncoso R, Pedrozo Z, Rodriguez AE, Toro B, Chiong M, Vicencio JM, Hetz C, Lavandero S. Herp depletion protects from protein aggregation by up-regulating autophagy. *Biochim Biophys Acta.* 1833:3295-305, 2013.

Rao VK, Carlson EA, Yan SS. Mitochondrial permeability transition pore is a potential drug target for neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta.* 1842:1267-72, 2014.

Rasola A. and Bernardi P. Mitochondrial permeability transition in Ca^{2+} -dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium.* 50:222– 233, 2011.

Redondo PC, Salido GM, Rosado J.A , Pariente J.A. Effect of hydrogen peroxide on Ca^{2+} mobilisation in human platelets through sulphhydryl oxidation dependent and independent mechanisms. *Biochem Pharm.* 67:491–502, 2004.

Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, Tuft RA, Pozzan T. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses. *Science.* 280:1763-1263, 1998.

Rocic P, Seshiah P, Griendling KK. Reactive oxygen species sensitivity of angiotensin II-dependent translation initiation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.*19;278:36973-9, 2003

Rueda CB, Traba J, Amigo I, Llorente-Folch I, González-Sánchez P, Pardo B, Esteban JA, Del Arco A, Satrústegui J. Mitochondrial ATP-Mg/Pi Carrier S_{Ca}MC-3/Slc25a23 Counteracts PARP-1-Dependent Fall in Mitochondrial ATP Caused by Excitotoxic Insults in Neurons. *J Neurosci.* 35:3566-81, 2015.

Sai X, Kawamura Y, Kokame K, Yamaguchi H, Shiraishi H, Suzuki R, Suzuki T, Kawaichi M, Miyata T, Kitamura T, De Strooper B, Yanagisawa K, Komano H. Endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, enhances presenilin-mediated generation of amyloid beta-protein. *J Biol Chem.* 277: 12915-12920, 2002.

Sai X, Kokameb K, Shiraishi H, Kawamura Y, Miyatab T, Yanagisawaa K, Komano H. The ubiquitin-like domain of Herp is involved in Herp degradation, but not necessary for its enhancement of amyloid L-protein generation. *FEBS Lett.* 553:151-156, 2003.

Saito Y, Nishio K, Ogawa Y, Kimata J, Kinumi T, Yoshida Y, Noguchi N, Niki E. Turning point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide. *Free Rad Res.* 40:619–630, 2006

Saris N.E, Carafoli E. A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria. *Biochesmistry.* 70: 187–194. 2005.

Scalettar BA, Abney JR, Hackenbrock CR. Dynamics, structure, and function are coupled in themitochondrial matrix. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:8057-8061, 1991.

Scheffler IE. A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion.* 1:3-31, 2001.

Schulze A, Standera S, Buerger E, Kikkert M, van Voorden S, Wiertz E, Koning F, Kloetzel PM, Seeger M. The ubiquitin-domain protein HERP forms a complex with components of the endoplasmic reticulum associated degradation pathway. *J Mol Biol.* 354: 1021-1027, 2005.

Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA, Korsmeyer SJ. A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell.* 2:55-67, 2002.

Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity upstream mediators. *Circ Res.* 91:406-413, 2002.

Singh M, Sharma H, Singh, N. Hydrogen peroxide induces apoptosis in HeLa cells through mitochondrial pathway. *Mitochondrion.* 7:367–373, 2007.

Sitia R, Molteni SN. Stress, protein (mis) folding, and signaling: The redox connection. *Sci STKE.* 239: 1-5, 2004.

Stathopoulos PB, Ikura M. Structural aspects of calcium-release activated calcium channel function. *Channels.* 7:344-353, 2013

- Strehler EE, Treiman M. Calcium pumps of plasma membrane and cell interior. *Curr. Mol. Med.* 4: 323–335. 2004.
- Szabadkai G, Simoni AM, Rizzuto R. Mitochondrial Ca^{2+} uptake requires sustained Ca^{2+} release from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 278:15153-15161, 2008.
- Szydlowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium.* 47:122-129, 2010.
- Van Laar T, Schouten T, Hoogervorst E, van Eck M, Van der Eb AJ, Terleth C. The novel MMS-inducible gene Mif1/KIAA0025 is a target of the unfolded protein response pathway. *FEBS Lett.* 469:123-131, 2000.
- Van Laar T, van der Eb AJ, Terleth C. Mif1: a missing link between the unfolded protein response pathway and ER-associated protein degradation?. *Curr Protein Pept Sci.* 2:169-190, 2001.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 22;324:1029-33, 2009.
- Varadi A, Cirulli V, Rutte GA. Mitochondrial localization as a determinant of capacitative Ca^{2+} entry in HeLa cells. *Cell Cal.* 36:499–508, 2004.
- Vianello A, Casolo V, Petrusa E, Peresson C, Patui S, Bertolini A, Passamonti S, Braidot E, Zancani M. The mitochondrial permeability transition pore (PTP) - An example of multiple molecular exaptation?. *Biochim Biophys Acta.* 1817: 2072–2086, 2012.
- Wang X, Takeda S, Mochizuki S, Jindal R, Dhalla N.S. Mechanisms of hydrogen peroxide-induced increase in intracellular calcium in cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 4:41–48, 1999.
- Westermann B. Merging mitochondria matters: cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion. *EMBO Rep.* 3:527-531, 2002.
- Whittemore ER, Loo DT, Watt JA, Cotman CW. A detailed analysis of hydrogen peroxide-induced cell death in primary neuronal culture. *Neurosci.* 67: 921–932, 1995.

Wiese AG, Pacifici RE, Davies KJA. Transient adaptation to oxidative stress in mammalian cells. *Biochem. Biophys.* 318:231–240; 1995.

Wong N, Morahan G, Stathopoulos M, Proietto J, Andrikopoulos S. A novel mechanism regulating insulin secretion involving Herpud1 in mice. *Diabetologia.* 7:1569-1576, 2013.

Xie J, Wang BS, Yu DH, Lu Q, Ma J, Qi H, Fang C, Chen HZ. Dichloroacetate shifts the metabolism from glycolysis to glucose oxidation and exhibits synergistic growth inhibition with cisplatin in HeLa cells *Int J Oncol.* 38:409-17, 2011.

Yamashima T, Kohda Y, Tsuchiya K, Ueno T, Yamashita J, Yoshioka T, Kominami E. Inhibition of ischaemic hippocampal neuronal death in primates with cathepsin B inhibitor CA-074: a novel strategy for neuroprotection based on 'calpain–cathepsin hypothesis'. *Eur.J. Neurosci.* 10:1723-1733, 1998.

Yankovskaya V, Horsefield R, Tornroth S, Luna-Chavez C, Miyoshi H, Leger C, Byrne B, Cecchini G, Iwata S. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science.* 299, 700-704, 2003.

Yan L, Liu W, Zhang H, Liu C, Shang Y, Ye Y, Zhang X, Li W. Ube2g2–gp78-mediated HERP polyubiquitylation is involved in ER stress recovery. *J Cell Sci.* 127:1417-27, 2014.

Youle RJ, Karbowski M. Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:657-663, 2005.

Yuka E, Hiroji Y, Yuji A, Tomohiko O, Toshiyuki M, Koichi K. Derlin-1 deficiency is embryonic lethal, derlin-3 deficiency appears normal, and herp deficiency is intolerant to glucose load and ischemia in mice. *Plos One.* 7:3 1-9, 2012.

Zhang Y, Griendling KK, Dikalova A, Owens GA, Taylor WR. Vascular hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension is mediated by vascular smooth muscle cell-derived H₂O₂. *Hypertension.* 46:732-737, 2005.

Zheng Y, Shen X. H₂O₂ directly activates inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in endothelial cells. *Redox Rep.* 10:29-36, 2005.

Zong W, Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.* 20: 1-15 2006.

Zorov DB , Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ros-induced ros release. *Physiol Rev.* 94: 909–950, 2014.

11. Figuras Suplementarias:

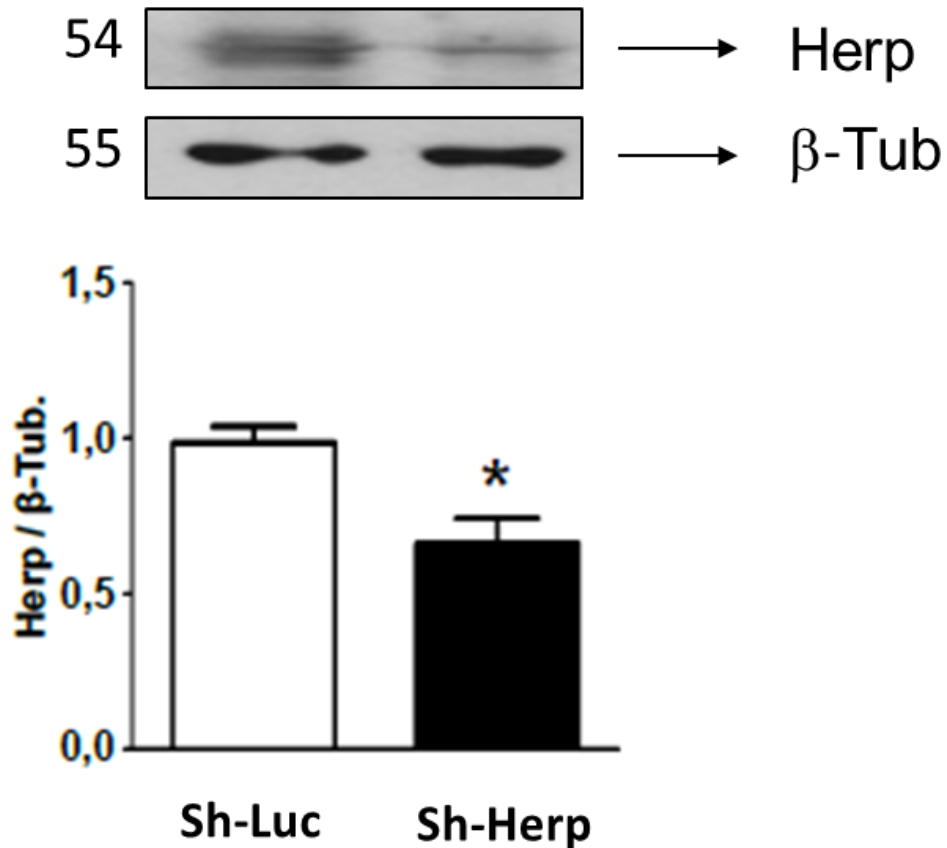


Figura S1. Células Hela *Knock down* para Herp (Sh-Herp) y células Hela control (Sh-Luc). Células Hela fueron infectadas con un lentivirus que contiene una secuencia de Short herping de Herp (Sh-Herp, barra negra) o una secuencia de Short herping para Luciferasa como control (Sh-Luc, barra blanca), las células fueron seleccionadas con puromicina para luego se prepararon extractos de proteínas totales. Los niveles de Herp y b-Tubulina se determinaron por *Western blot*, previa resolución mediante electroforesis SDS-PAGE en geles al 10%. El grafico representa la cuantificación densitométrica utilizando el programa Imaje J. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, * $p < 0,05$ respecto al Sh-Luc.

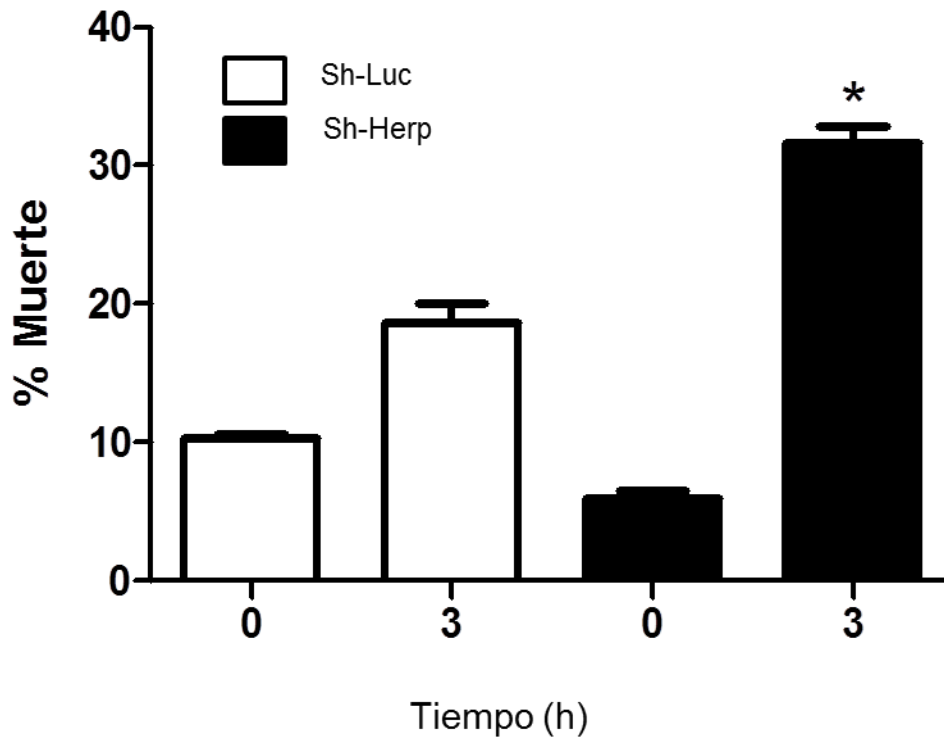


Figura S2. Muerte de células Sh-Luc y Sh-Herp vista por azul de tripan. Células Hela Sh-Herp, barra negra) o Sh-Luc son tratadas con 500 μ M de H_2O_2 por 3 h para luego ser teñidas con azul de tripan y vistas bajo microscopio óptico en cámara de Neubauer. El grafico representa la cuantificación densitométrica utilizando el programa Imaje J. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, * $p < 0,05$ respecto al tiempo 0.

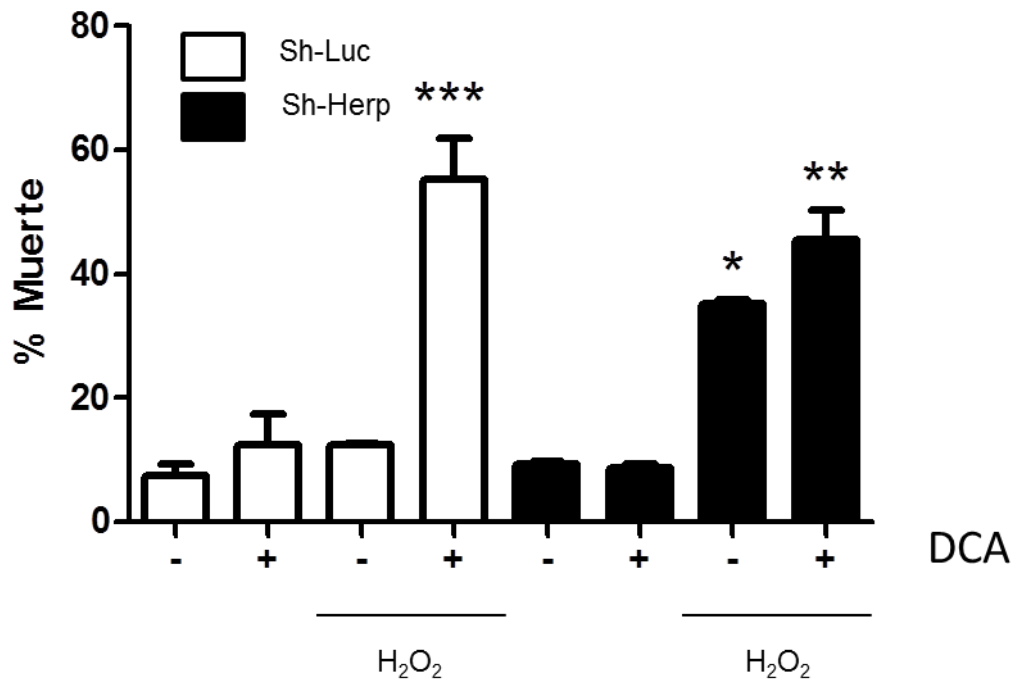


Figura S3. Células control (Sh-Luc) son más sensibles a la muerte producida por H₂O₂ si las células son pretratadas con dicloroacetato. Células Hela Sh-Herp (barras negras) o Sh-Luc (barras blancas) fueron preincubadas con 100 μM de Dicloroacetato (DCA) por 30 min. y posteriormente tratadas con 500 μM de H₂O₂ por 3 h. Para determinar el % de células muertas se utilizó el ensayo de incorporación de PI por citometría de flujo. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, ***p<0,001; **p<0,005; *p<0,05 respecto al control (C).

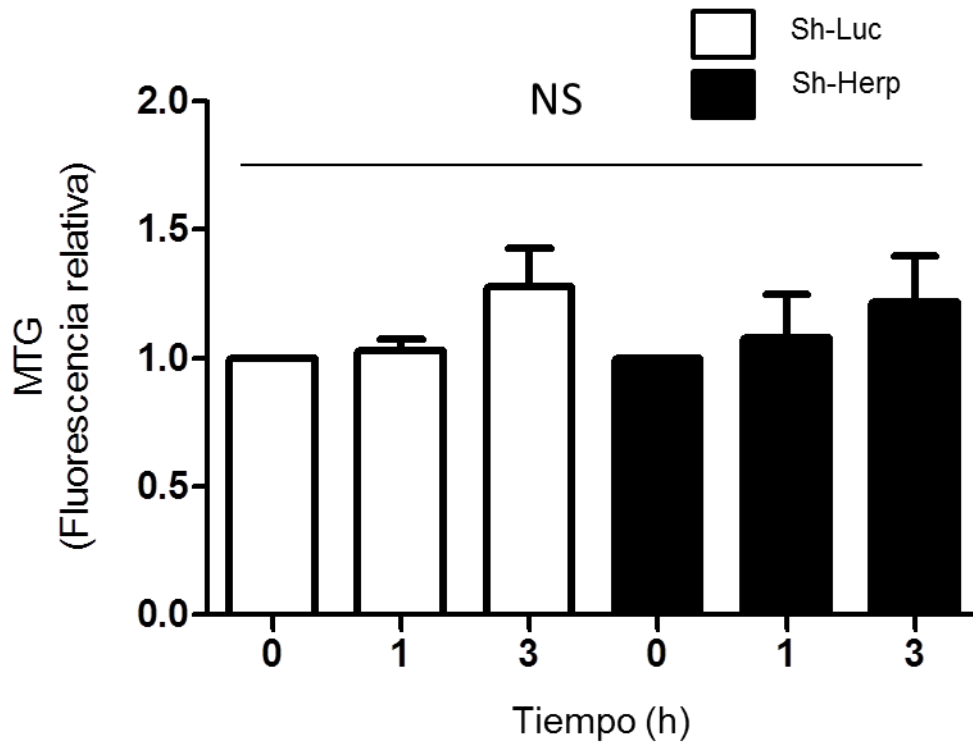


Figura S4. Células Hela Sh-Herp y Sh-Luc, presentan iguales niveles de mitocondrias. Células Hela Sh-luc (barras blancas) y Sh-Herp (barras negras) son tratadas con la sonda MTG, que tiñe las mitocondrias. La fluorescencia es medida por citometría de flujo contando un total de 5000 eventos por punto. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, NS = no significativo

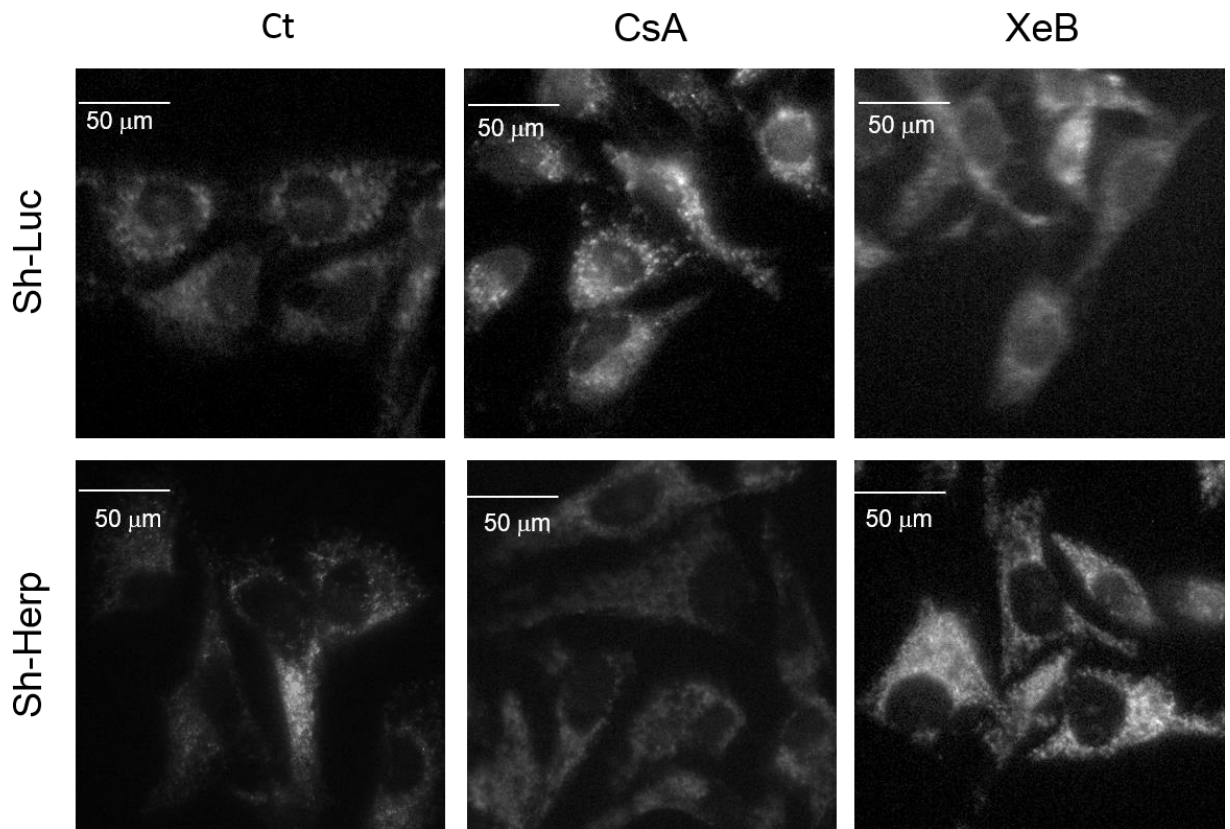


Figura S5. Controles de inmunocitoquímica para Citocromo C. Células Hela Sh-Herp (inferior) o Sh-Luc (superior) fueron preincubadas con 20 μM de Ciclosporina A (CsA) o con 100 μM de Xestospongina B (XeB) por 3 h. Para determinar pérdida en la permeabilidad mitocondrial se hizo un inmunofluorecencia de Citocromo C. Los resultados corresponden a fotos representativas de 3 experimentos independientes.

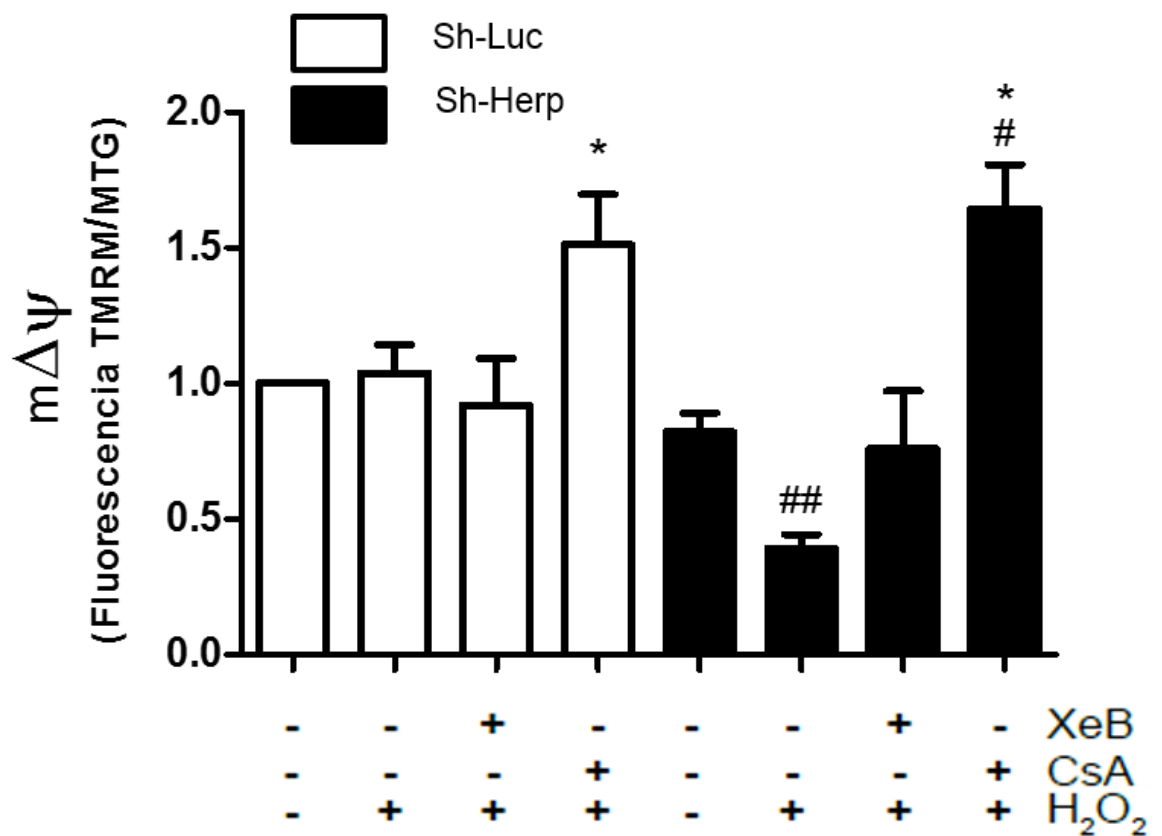


Figura S6. Células Herp (Sh-Herp) presentan una caída en el potencial mitocondrial al ser tratadas con H₂O₂ por desregulación del IP3R y pérdida de la permeabilidad mitocondrial. Células Hela Sh-Herp (superior) o Sh-Luc (inferior) fueron preincubadas con 20 mM de Ciclosporina A (CSA) o con 100 mM de Xestospongina B (XeB) por 30 min. y posteriormente tratadas con 500 mM de H₂O₂ por 3 hrs. Para determinar el potencial mitocondrial se utilizó la sonda TMRM y se midió por citometría de flujo. Los resultados corresponden a fotos representativas de 3 experimentos independientes. *p<0,05 respecto a Sh-Luc control; #p<0,05 y ##p<0,005 con respecto a Sh-Herp control.

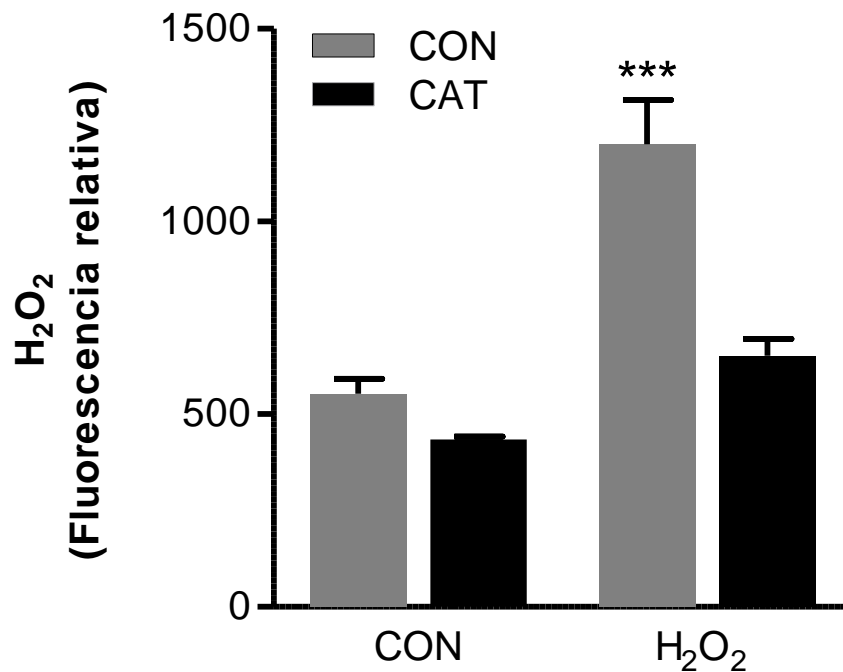


Figura S7. Tratamiento con catalasa disminuye los niveles de H₂O₂. Células HeLa fueron estimuladas con H₂O₂ 500 μ M por 3 h y pretratadas con catalasa (2500 unidades) media hora antes del estímulo. Utilizando la sonda, 1,2,3 DHR y citometría de flujo se establecieron los niveles H₂O₂. Datos representan 3 experimentos independientes donde *** $p < 0.001$ respecto al control.

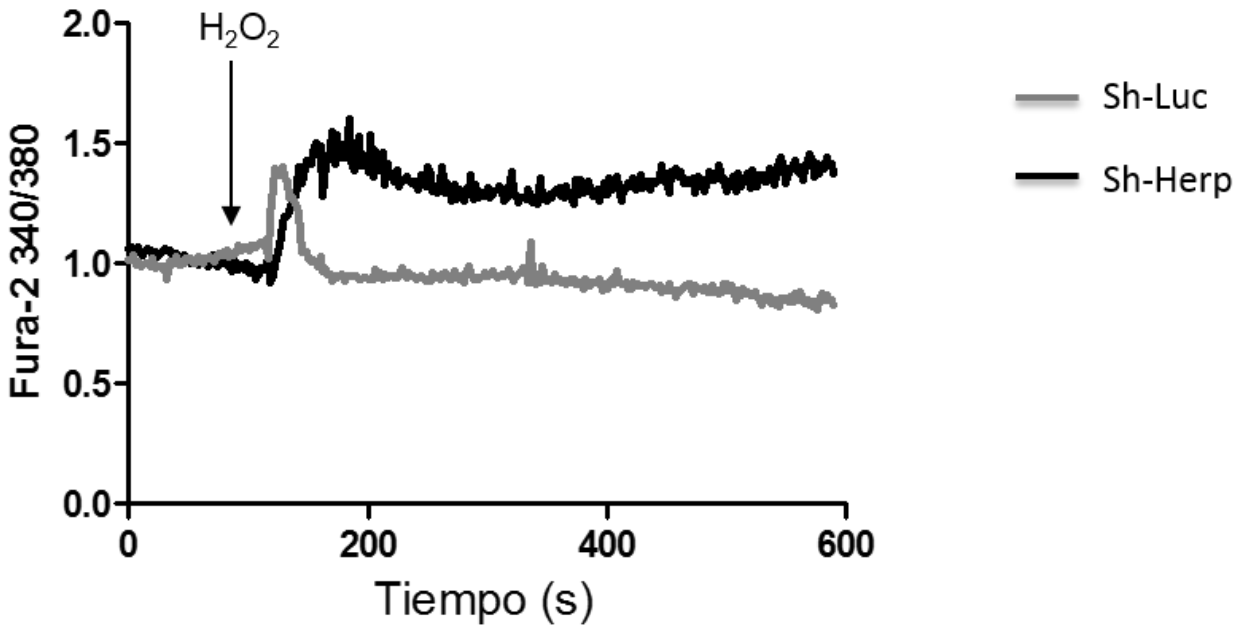


Figura S8. Células Sh-Herp presentan un aumento en el calcio intracelular mayor al de las células control Sh-Luc en respuesta a un estímulo de H₂O₂. Células Hela Sh-Luc (línea gris) y Sh-Herp (línea negra) son cargadas con la sonda Fura-2 y posteriormente observadas al microscopio. Se registra una línea base de 60 seg. y luego se registran la cinética de calcio producida por un pulso de 500 μ M de H₂O₂ por 540 seg. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes.

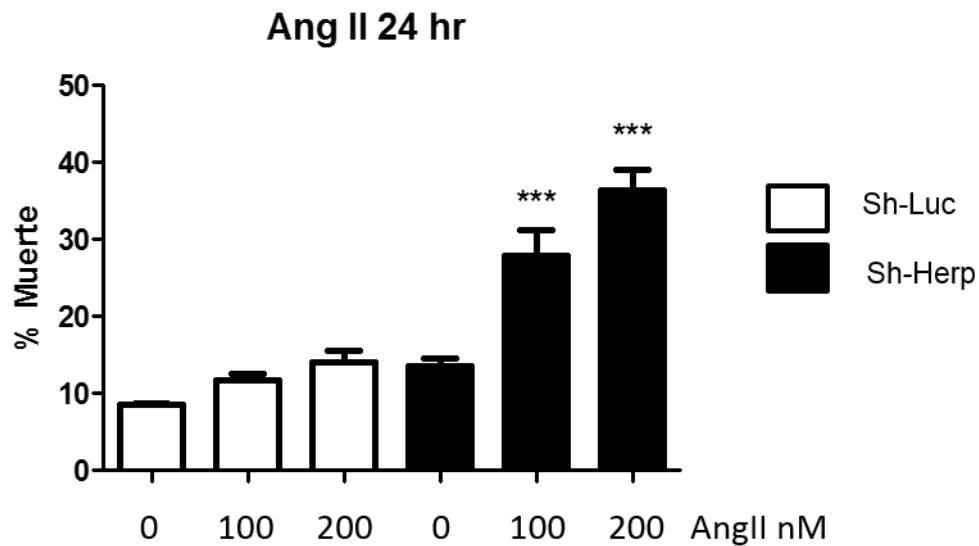


Figura S9. Células Hela “Knock down” para Herp (Sh-Herp) son más sensibles a la muerte producida por ANGII. A- Células Hela Sh-Herp (barra negra) o Sh-Luc (barra blanca) fueron tratadas con 100 y 200 nM de ANGII por los tiempos 24hrs. Para determinar el % de células muertas se utilizó el ensayo de incorporación de PI por citometría de flujo. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes, *** $p < 0,001$ respecto al control.

Materiales y métodos suplementarios:

1- Elección de controles de carga para Wester Blot:

Se realizó una curva de concentración de H₂O₂ en células Hela a concentraciones de 10, 50, 100, 250, 500 y 1000 μ M. Se extrajeron proteínas y se realizó un Western Blot como se indica en materiales y métodos. Se utilizó como anticuerpo 3 diferentes controles de carga β -Tubulina y GAPDH observándose que no existía diferencias los niveles de estas proteínas.

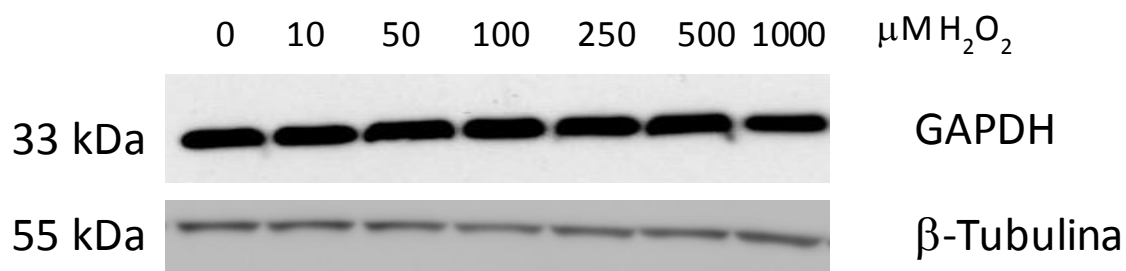


Figura S10: Western blot de controles de carga. Células Hela fueron tratadas con diferentes concentraciones de H₂O₂ para posteriormente ser lisadas. Los niveles de beta-tubulina y GAPDH se determinaron por *Western blot*, previa resolución mediante electroforesis SDS-PAGE en geles al 10%.

Se utilizó GAPDH como control de carga preferencial, dado que β -Tubulina posee un peso parecido al de la proteína Herp. En algunos experimentos se utilizó β -Tubulina en vez de GAPDH por la disponibilidad del anticuerpo en el momento del experimento.

En los experimentos realizados en el laboratorio de la Dra. San Martin en la universidad de Emory, USA se utilizó Actina como control de carga, dado que no se encontraban disponibles los otros anticuerpos. Se realizó un control similar utilizando diferentes concentraciones de H₂O₂ para probar la utilidad de actina como control de carga, no hubo variaciones en el nivel de actina a diferentes concentraciones de H₂O₂ (datos no mostrados).

2- Elección de controles de carga para PCR:

Para la realización de los qPCR se probaron una serie de genes housekeeping (control de carga), con el fin de utilizar el mejor para los estímulos de H₂O₂ y ANGII. En el caso de muestras de cDNA humanos se utilizaron los genes housekeeping de la tabla 1 y en el caso de los cDNA de origen de los ratones se utilizaron los de la tabla 2.

Se hicieron curvas de concentración de H₂O₂ y ANGII y se realizaron los PCR de cada uno de los genes housekeeping, eligiendo como genes control solo aquellos que no variaran frente a las diferentes concentraciones de los estímulos y que tuvieran curvas de melting (temperatura) con un pick único.

De esta forma se consideró en el caso de las muestras humanas a B2M, RPL y PGK como buenos house keeping para el experimento. En el caso de las muestras de ratón se consideró a PPIA, RPL y B2M como buenos housekeeping para el experimento. En general todos los housekeeping elegidos arrojaron resultados similares. En esta tesis se presentaron los datos relativizados por RPL dado que eran consistentes entre ambas especies.

Tabla 1

Forward	reverse	Nombre	primer	producto
GGACTTCGAGCAAGAGATGG	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	actin, beta	ACTB+3-4	234 bp
TGCTGTCTCCATGTTTGATGTA TCT	TCTCTGCTCCCCA CCTCTAAGT	beta-2 microglobulin	B2M+3-4	86 bp
GAGTCAACGGATTTGGTCGT	TTGATTTTGGAGGGA TCTCG	glyceraldehyde phosphate dehydrogenase	GP+23-24	238 bp
AAACGATTGCAGGGTTTCAC	CTCTCGTCGGT GACTGTTCA	glucuronidase, beta	GUSB+3-4	171 bp
TGACACTGGCAAACAATGCA	GGTCCTTTTCA CCAGCAAGCT	hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1	HPRT+3-4	94 bp
CTGTGGGGGTATTTGAA TGG	CTCCAGGAGCTCCAAACTG	phosphoglycerate kinase 1	PGK+13-14	198 bp
TTCATCTGCACTGCCAAGAC	TCGAGTTGTCCACAGTCAGC	peptidylprolyl isomerase A	PPIA+3-4	158 bp
CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA	TTGAGGACCTCTGTGTA TTTGTCAA	ribosomal protein L13a	RPL+3-4	126 bp
TATAATCCCAAGCGGTTTGC	GCTGGAAAACCCA ACTTCTG	TATA box binding protein	TBP+3-4	170 bp
CGCTGGTCA GTTCGTGATTA	GCATTCCCGAAATCTGTTGT	transferrin receptor 1	TFRC+3-4	210 bp

Tabla 2

Forward	reverse	nombre	primer	producto
AAGAGCTATGAGCTGCCTGA	TACGGATGTCAACGT CACAC	actin, beta	ACTB+1-2	160 bp
GGCCTGTATGCTATCCAGAA	GAAAGACCAGTCCTTGCTGA	beta-2 microglobulin	B2M+1-2	198 bp
CTGGAGAAACCTGCCAAGTA	TGTTGCTGTAGCCGTA TTCA	glyceraldehyde phosphate dehydrogenase	GP+21-22	223 bp
AATGAGCCTTCCTCTGCTCT	AACTGGCTATTCAGCTGTGG	glucuronidase, beta	GUSB+1-2	227 bp
GCTGACCTGCTGGATTACAT	TTGGGGCTGTACTGCTTAAC	hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1	HPRT+1-2	242 bp
GCAGATTGTTTGGAATGGTC	TGCTCACATGGCTGACTTTA	phosphoglycerate kinase 1	PGK+11-12	185 bp
AGCTCTGAGCACTGGAGAGA	GCCAGGACCTGTATGCTTTA	peptidylprolyl isomerase A	PPIA+1-2	178 bp
ATGACAAGAAAAAGCGGATG	CTTTTCTGCCTGTTTCCGTA	ribosomal protein L13a	RPL+1-2	215 bp

