

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas**



**“ACOPLAMIENTO ESPACIAL ENTRE EL RETÍCULO  
ENDOPLÁSMICO Y LA RED MITOCONDRIAL DURANTE  
EL ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO”**

**Tesis para optar al grado académico de Magíster en  
Bioquímica,  
área de especialización Toxicología y Diagnóstico Molecular,  
y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:**

**ROBERTO FRANCISCO BRAVO SAGUA**

**Director de Tesis  
Dr. Sergio Lavandero González**

**Santiago, Chile  
2009**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN**  
**TESIS DE MAGISTER Y TÍTULO DE BIOQUÍMICO**

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

**ROBERTO FRANCISCO BRAVO SAGUA**

Ha sido aprobada por la comisión informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, área de especialización Toxicología y Diagnóstico Molecular y al título de Bioquímico, en el examen de defensa de tesis rendido el día

\_\_\_\_\_.

**Director de Tesis:**

Dr. Sergio Lavandero González

\_\_\_\_\_

**Comisión Informante de Tesis:**

Dra. Jenny Fiedler (Presidenta)

\_\_\_\_\_

Dra. Daniela Seelenfreund

\_\_\_\_\_

Dr. Jorge Ferreira

\_\_\_\_\_

*Dedicada a mis hermanos Francisco y  
Cristóbal, y a mi ahijado Benjamín*

La presente tesis de magister y memoria de pregrado ha dado origen a las siguientes actividades de difusión:

**a) Presentaciones a congreso:**

**Bravo R**, Lavandero S. “Remodelado subcelular como respuesta adaptativa al estrés de retículo endoplásmico”. XXII Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile, 5 - 9 Octubre, 2008. Pucón, Chile.

**b) Publicaciones:**

**Bravo R**, Parra V, Contreras A, Pennanen C, Lavandero S. “Simple method to analyze subcellular radial distributions”. Manuscrito en preparación.

**Bravo R**, Parra V, Lavandero S. “Increased spatial coupling between endoplasmic reticulum and mitochondria during ER stress”. Manuscrito en preparación.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi director de tesis, Dr. Sergio Lavandero por su apoyo y comprensión durante los 4 años que he estado trabajando en su laboratorio. Aprecio mucho la guía que ha dado a mi crecimiento tanto personal como profesional.

Agradezco a los profesores que han enriquecido mi formación, por la calidez que han puesto en su labor, su esfuerzo en la entrega de conocimiento y la cercanía que siempre han mostrado con sus alumnos.

Agradezco a mis compañeros de Universidad, con quienes compartí experiencias muy gratificantes. Junto a ellos aprendí no sólo de bioquímica, sino también de cariño, perseverancia, alegría y compañerismo.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio, de quienes he aprendido mucho gracias a su cariño, dedicación buena disposición y tolerancia. Siempre con pensamiento crítico y a la vez festivo han ayudado muchísimo a que esta tesis llegue a completarse.

Agradezco a mis amigas y amigos, quienes me han acompañado en mi vida y la han llenado de alegría. Constantemente me han apoyado, y juntos hemos crecido para llegar a ser adultos leales y más felices.

Agradezco a mi familia, quienes a través de su incondicional amor, preocupación y buenos deseos me han permitido salir adelante y llegar tan lejos como mis capacidades me lo permitan, e incluso más lejos.

## **FINANCIAMIENTO**

Esta Tesis y Memoria se realizó en el Laboratorio de Transducción de Señales del Centro FONDAP Estudios Moleculares de la Célula (CEMC), Facultades de Ciencias Químicas y Farmacéuticas y Medicina, Universidad de Chile y contó con el financiamiento del Proyecto FONDAP 1501006

## TABLA DE CONTENIDO

|   |      |
|---|------|
| DEDICATORIA.....  | ii   |
| AGRADECIMIENTOS .....   | iv   |
| FINANCIAMIENTO.....   | v    |
| TABLA DE CONTENIDO.....   | vi   |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....   | viii |
| RESUMEN .....   | x    |
| SUMMARY.....  | xi   |
| <br>  |      |
| 1. INTRODUCCIÓN .....   | 1    |
| 1.1. Estructura y función del retículo endoplásmico.....  | 1    |
| 1.2. Estructura y función mitocondrial.....   | 4    |
| 1.3. Acoplamiento funcional entre retículo endoplásmico y red mitocondrial .....                      | 7    |
| 1.4. Determinantes estructurales de la interfase retículo endoplásmico-red<br>mitocondrial.....       | 9    |
| <br>  |      |
| 2. HIPÓTESIS .....  | 13   |
| 3. OBJETIVO GENERAL.....  | 13   |
| 4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 13   |
| <br>  |      |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS .....   | 14   |
| 5.1. Reactivos y soluciones .....   | 14   |
| 5.2. Cultivo celular.....   | 14   |
| 5.3. Evaluación de la red mitocondrial en células vivas mediante microscopía<br>confocal.....         | 15   |
| 5.4. Evaluación de la red del retículo endoplásmico en células vivas por<br>microscopía confocal..... | 15   |
| 5.5. Evaluación del potencial mitocondrial en células vivas por microscopía<br>confocal.....          | 16   |
| 5.6. Procesamiento de imágenes .....  | 17   |

|   |    |
|---|----|
| 5.7. Evaluación del poder reductor mitocondrial mediante ensayo MTT .....                       | 17 |
| 5.8. Evaluación de viabilidad celular e integridad mitocondrial por citometría de flujo.....    | 18 |
| 5.9. Evaluación del potencial mitocondrial por citometría de flujo .....                        | 18 |
| 5.10. Medición de ATP .....   | 18 |
| 5.11. Determinación del consumo de oxígeno en células vivas .....                               | 19 |
| 5.12. Western blot .....  | 19 |
| 5.13. Análisis estadístico .....  | 20 |
| <br>  |    |
| 6. RESULTADOS.....  | 21 |
| 6.1. Durante las etapas tempranas de estrés de RE se estimula el metabolismo mitocondrial ..... | 21 |
| 6.2. Durante las etapas tempranas de estrés de RE ocurre remodelado organelar .....             | 26 |
| 6.3. Involucramiento del citoesqueleto en el remodelado organelar.....                          | 35 |
| <br>  |    |
| 7. DISCUSIÓN .....  | 41 |
| <br>  |    |
| 8. CONCLUSIONES.....  | 48 |
| <br>  |    |
| 9. REFERENCIAS.....   | 51 |



## ÍNDICE DE FIGURAS

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| FIGURA 1  | Distribución celular del retículo endoplásmico .....                                      | 1  |
| FIGURA 2  | Regiones del retículo endoplásmico .....  | 2  |
| FIGURA 3  | Red mitocondrial en el espacio celular .....  | 4  |
| FIGURA 4  | Inducción de estrés de RE por tunicamicina .....  | 21 |
| FIGURA 5  | Cambios en el poder reductor celular por estrés de RE.....                                | 22 |
| FIGURA 6  | Cambios en el contenido celular de ATP por estrés de RE.....                              | 22 |
| FIGURA 7  | Glicólisis anaeróbica y contenido celular de ATP durante estrés<br>de RE .....            | 24 |
| FIGURA 8  | Potencial mitocondrial y ATP celular durante estrés de RE .....                           | 24 |
| FIGURA 9  | ATP sintasa mitocondrial y ATP celular durante estrés de RE.....                          | 25 |
| FIGURA 10 | Cambios en el potencial mitocondrial durante estrés de RE .....                           | 25 |
| FIGURA 11 | Cambios en el consumo de oxígeno durante estrés de RE .....                               | 26 |
| FIGURA 12 | Análisis de extensión de la red mitocondrial .....  | 27 |
| FIGURA 13 | Efecto del estrés de RE en la redistribución mitocondrial .....                           | 28 |
| FIGURA 14 | Análisis radial .....   | 29 |
| FIGURA 15 | Máxima intensidad mitocondrial .....  | 30 |
| FIGURA 16 | Segmentación del perfil mitocondrial .....  | 30 |
| FIGURA 17 | Distribución del perfil mitocondrial .....  | 31 |
| FIGURA 18 | Distribución del perfil de las mitocondrias metabólicamente activas                       | 32 |
| FIGURA 19 | Distribución del perfil del retículo endoplásmico .....                                   | 33 |
| FIGURA 20 | Coeficientes de Manders del retículo endoplásmico .....                                   | 33 |
| FIGURA 21 | Coeficientes de Manders de la red mitocondrial .....                                      | 34 |
| FIGURA 22 | Distribución del RE en presencia de citocalasina B .....                                  | 35 |
| FIGURA 23 | Distribución mitocondrial en presencia de citocalasina B.....                             | 36 |
| FIGURA 24 | Citocalasina B no afecta la interfase entre organelos .....                               | 36 |
| FIGURA 25 | Citocalasina B no afecta la estimulación metabólica producida por<br>el estrés de RE..... | 37 |
| FIGURA 26 | Distribución del RE en presencia de nocodazol.....  | 38 |
| FIGURA 27 | Distribución de la mitocondria en presencia de nocodazol .....                            | 39 |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| FIGURA 28 | Efecto del nocodazol en la interfase entre organelos.....   | 39 |
| FIGURA 29 | Nocodazol y el incremento de ATP durante estrés de RE ..... | 40 |
| FIGURA 30 | Cercanía RE-mitocondria y generación de ATP .....           | 49 |

## RESUMEN

El estrés en el retículo endoplásmico (RE) genera señales hacia el núcleo y citoplasma, reorganizando la homeostasis proteica e interviniendo en la decisión de vida o muerte celular. A pesar de ser ampliamente estudiada, aún se desconocen los mecanismos adaptativos iniciados en la mitocondria ante esta condición. En este trabajo se evaluó si el estrés de RE modula el acoplamiento entre la red mitocondrial y el RE, y si el cambio en esta interacción tiene repercusiones sobre el estado metabólico energético celular.

Para inducir estrés de RE, células HeLa se trataron con tunicamicina (inhibidor de la glicosilación en el RE) por 1, 4 y 20 h. El contenido de ATP intracelular, el poder reductor, el potencial mitocondrial y el consumo de oxígeno se midieron para determinar el estado metabólico celular. La red mitocondrial y el RE se marcaron fluorescentemente y a las imágenes de microscopía confocal se les analizó la colocalización mediante los coeficientes de Manders. Para analizar la participación del citoesqueleto se utilizaron los agentes despolimerizadores nocodazol (microtúbulos) y citocalasina B (microfilamentos de actina).

Tras 4 h, el estrés de RE aumentó los niveles intracelulares de ATP, el poder reductor, el potencial mitocondrial y el consumo de oxígeno en las células HeLa. Esta estimulación metabólica resultó transitoria, dado que el ATP, poder reductor y potencial mitocondrial disminuyeron después de 20 h de estrés. A las 4 h se observó también una redistribución mitocondrial y reticular hacia la región perinuclear, que llevó a un aumento en el acoplamiento entre ambos organelos. Esta mayor cercanía, así como la estimulación metabólica no se previnieron por citocalasina, pero sí por nocodazol.

Se puede concluir entonces que el estrés de RE, en sus etapas tempranas indujo una mayor capacidad funcional de la mitocondria, asociada a su mayor cercanía con el RE. Estos cambios se llevan a cabo a través del movimiento de los organelos a lo largo de la red de microtúbulos.

## **SUMMARY**

### **SPATIAL COUPLING BETWEEN ENDOPLASMIC RETICULUM AND MITOCHONDRIA DURING ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS**

Endoplasmic reticulum (ER) stress triggers signals to the nucleus and cytoplasm, reorganizing protein homeostasis and intervening in the decision of life or death. Despite being highly studied nowadays, the adaptative mechanisms initiated by mitochondria upon this condition remain unknown. This work studies whether ER stress modulates the spatial coupling between the mitochondrial network and the ER, and the consequences of this interaction on the energetic cell state.

To induce ER stress in HeLa cells, they were treated with tunicamycin (inhibitor of protein glycosylation at the ER) for 1, 4 and 20 h. Intracellular ATP content, intracellular reducing level, mitochondrial potential and oxygen consumption were measured to determine the metabolic cell state. The mitochondrial network and the ER were stained with fluorescent markers. Images were taken with a confocal microscope, and colocalization was analyzed with Manders' coefficients. To determine cytoskeleton participation, two depolymerizing agents were used: nocodazole (for microtubules) and cytochalasin B (for actin microfilaments).

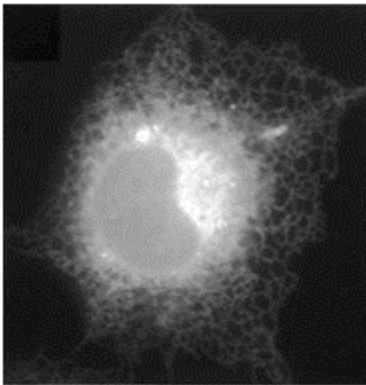
Upon 4 h of ER stress, ATP, reducing power, mitochondrial potential and oxygen consumption increased in HeLa cells. This metabolic stimulation was transient due to ATP, reducing power and mitochondrial potential diminished upon 20 h of stress. At 4 h there was a mitochondrial and reticular redistribution towards the perinuclear region, which lead to an increase in organelle coupling. Both enhanced interaction and metabolic stimulation were prevented by nocodazole, but not by cytochalasin.

In conclusion, mitochondrial function is enhanced in early states of ER stress, which is associated with enhanced spatial coupling with the ER. These changes take place by the movement of organelles along the microtubule network.

## 1. INTRODUCCIÓN

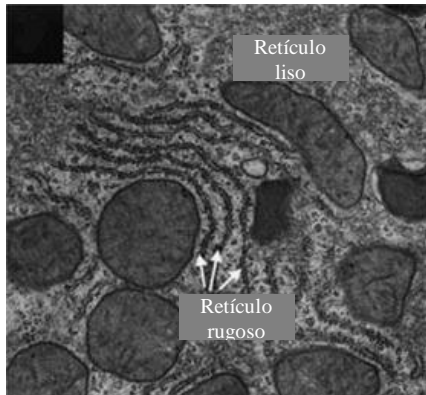
### 1.1. Estructura y función del retículo endoplásmico

El retículo endoplásmico (RE) es un compartimento presente en todas las células eucariontes, siendo el organelo individual más grande intracelularmente. Sus dimensiones pueden abarcar más del 10 % del volumen celular total, y constituye más de la mitad del contenido total de membrana de una célula animal promedio. Está delimitado por una membrana única, y forma una red tridimensional continua que se extiende a través de toda la célula, desde la envoltura nuclear hasta regiones cercanas a la membrana plasmática [Alberts *et al.*, 2008]. La Figura 1 muestra como se observa el RE por microscopía de fluorescencia.



**Figura 1. Distribución celular del retículo endoplásmico.** Imagen de microscopía de epifluorescencia muestra la distribución de una proteína fluorescente verde (GFP) destinada a la superficie del retículo. Puede apreciarse la extensión del organelo, así como los túbulos interconectados que lo conforman en sus zonas más periféricas (Voeltz *et al.*, 2002).

A pesar de ser un compartimento dotado de continuidad luminal, el RE presenta heterogeneidad a lo largo de su estructura, lo cual hace que presente diversas regiones con funcionalidades características. La principal característica que permite distinguir entre regiones del RE es la presencia de ribosomas unidos a su superficie. Por un lado está el RE rugoso, dotado de ribosomas, y por el otro está el RE liso, desprovisto de ellos (Figura 2). El RE liso se encuentra asociado al metabolismo lipídico y al almacenamiento y señalización por calcio; mientras que el RE rugoso tiene por función la síntesis y plegamiento proteico [Voeltz *et al.*, 2002].



**Figura 2. Regiones del retículo endoplásmico.**

Imagen de microscopía electrónica muestra el retículo endoplásmico en sus dos formas: rugoso y liso. El primero se presenta más definido, con bordes más oscuros por la presencia de ribosomas, mientras que el segundo aparece más difuso y menos delineado (Voeltz *et al.*, 2002).

El plegamiento proteico en el RE ha atraído poderosamente la atención por su importancia para diversos procesos fisiológicos dado que en este organelo se sintetizan todas las proteínas de transmembrana y de secreción de la célula, las que se dirigen luego hacia sus compartimentos de destino.

Durante el plegamiento, deben cumplirse ciertas condiciones en el lumen del RE, así como la participación de proteínas que favorecen el proceso termodinámicamente y colaboran en el control de calidad del proceso. Desde el momento en que una proteína ingresa al lumen del RE, ésta se encuentra en un estado desplegado y debe pasar progresivamente por distintos intermediarios de plegamiento para alcanzar su conformación nativa. Las proteínas llamadas chaperonas tienen por función estabilizar los intermediarios de plegamiento de una proteína, para que éstos no se agreguen, y de este modo, garantizar que el proceso de plegamiento se ejecute a cabalidad. La actividad de las chaperonas es crucial para el proceso y requiere de ATP para desarrollarse así como de la presencia de altas concentraciones de calcio [Schröder & Kaufman, 2005].

Por otro lado, las enzimas foldasas catalizan ciertos pasos del plegamiento para hacerlo más veloz. Ejemplos de este tipo de reacciones son la isomerización *cis-trans* de enlaces peptídicos de prolina y la formación o ruptura de puentes disulfuro. Esta última, de tipo oxido-reducción, necesita de un ambiente oxidante para ocurrir, el cual es logrado en el lumen del RE mediante glutatión. La razón glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG) es de 1:1 a 3:1, contrastando con el citosol, donde la razón

toma valores de 100:1 a 30:1 [Schröder & Kaufman, 2005]. Un tercer grupo de proteínas residentes en el RE son las encargadas de la N-glicosilación. Este proceso es muy importante pues el oligosacárido transferido a las proteínas cumple una función tanto estructural así como de señalización. Una vez que el oligosacárido se añade a la estructura peptídica, éste sufre modificaciones según el estado de plegamiento de la proteína. Así, el oligosacárido reflejará si la proteína se encuentra bien plegada, en tránsito a plegarse o terminalmente mal plegada. Las lectinas reconocen este lenguaje y podrán retener las proteínas en el lumen del RE o bien destinarlas a otros compartimentos [Schröder & Kaufman, 2005].

Toda célula presenta una capacidad de plegamiento determinada, según el tamaño de su RE y las condiciones homeostáticas presentes. Cuando la capacidad de plegamiento de la célula se ve sobrepasada, las proteínas mal plegadas comienzan a acumularse y se inicia una señalización de alarma. Bajo estas condiciones, la célula está experimentando “estrés de RE”. Diversas son las perturbaciones que causan estrés de RE. Ejemplos de ellas son la síntesis excesiva de proteínas, producto de una infección viral, el impedimento en la glicosilación proteica por falta de glucosa, y la perturbación en la regulación del calcio intraluminal. Cuando la célula experimenta estrés de RE, inicia una respuesta que busca restablecer su capacidad de plegamiento, llamada *respuesta a proteínas mal plegadas (Unfolded Protein Response, UPR)* [Xu *et al.*, 2005].

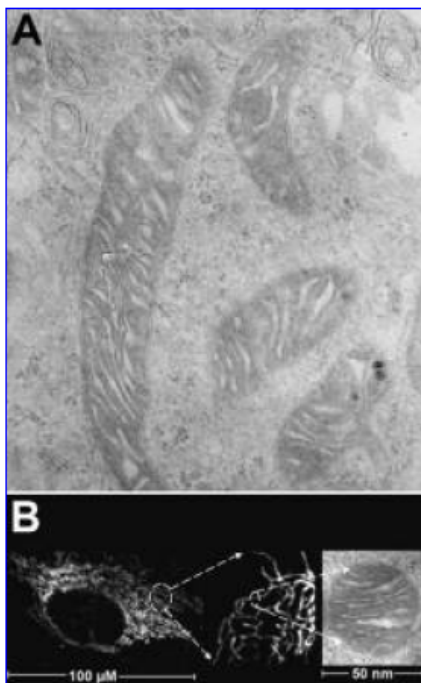
La UPR busca inicialmente restablecer la homeostasis celular, disminuyendo la síntesis de proteínas, aumentando la expresión de chaperonas y promoviendo la degradación de proteínas mal plegadas. Sin embargo, si el estrés de RE es muy intenso o prolongado en el tiempo, la célula inicia una cascada de alarma que la lleva a la muerte celular por apoptosis [Xu *et al.*, 2005]. Esta vía apoptótica, iniciada en el RE, recluta a la mitocondria, la cual amplifica la señal de muerte al cambiar la permeabilidad de su membrana [Deniaud *et al.*, 2007].

Así, la condición de estrés de RE constituye un buen modelo biológico para estudiar la conversación cruzada entre dos organelos: el retículo endoplásmico y la mitocondria.

Las señales se inician en el retículo endoplásmico, que no actúa como una unidad transduccional aislada, sino que transmite la alarma a la mitocondria, la cual tendrá un papel determinante en el desenlace de la situación.

## 1.2. Estructura y función mitocondrial

Las mitocondrias están delimitadas por dos membranas: una membrana externa, permeable a pequeñas moléculas, y una membrana interna, mucho más selectiva al paso de solutos. La membrana interna se encuentra plegada sobre sí misma, formando las denominadas crestas mitocondriales, donde se organizan los complejos encargados de la síntesis de ATP. De esta forma, las membranas delimitan 2 espacios al interior de las mitocondrias: un espacio intermembrana, de composición muy similar al citosol, y una matriz mitocondrial, de composición muy selecta, que contiene entre otras moléculas, al DNA mitocondrial [Alberts *et al.*, 2008]. Imágenes de la mitocondria pueden apreciarse en la Figura 3A.



**Figura 3. Red mitocondrial en el espacio celular.**

Panel A muestra varias mitocondrias en un corte transversal de microscopía electrónica (Benard & Rossignol, 2008). Su interior está cruzado por varias estructuras delgadas que corresponden a las crestas mitocondriales. La matriz corresponde a la región interior menos electrón-densa entre las crestas. La región intermembrana no es visible en esta imagen. Panel B muestra la red mitocondrial teñida con GFP destinada a la matriz, observándose que las mitocondrias no se encuentran aisladas sino que forman una red interconectada a lo largo de toda la célula (Benard & Rossignol, 2008).



La Figura 3B muestra una tinción de todas las mitocondrias de una célula viva, éstas no se encuentran como entidades individuales en una célula. Existe entre las mitocondrias una continuidad luminal, similar a la del retículo endoplásmico. Sin embargo, la red que forman las mitocondrias es dinámica respecto a su continuidad, la cual está gobernada por eventos de fusión y fisión, los cuales hacen que las mitocondrias estén más interconectadas, o bien más fragmentadas, respectivamente. De este modo, cuando los eventos de fusión son preponderantes, las mitocondrias adquieren un aspecto alargado, similar a tallarines. En cambio, cuando predominan los fenómenos de fisión, las mitocondrias se ven más numerosas y pequeñas, similares a balines [Chen & Chan, 2005].

La mitocondria es el escenario donde ocurren reacciones metabólicas clave. El acetil-CoA producido a partir de glucosa o ácidos grasos ingresa a la matriz mitocondrial y así, puede participar en el ciclo de Krebs. La energía química almacenada en la molécula de acetil-CoA se utiliza para generar poder reductor, en forma de NADH y FADH<sub>2</sub>. Posteriormente en la membrana mitocondrial interna, ambas moléculas ceden sus electrones de alta energía a una serie de complejos respiratorios. El paso de los electrones a través de distintas reacciones de oxido-reducción va liberando gradualmente la energía, la cual es usada para bombear protones al espacio intermembrana. Los electrones que han transitado por la cadena respiratoria terminan en la molécula de oxígeno como aceptor final, formándose agua en el proceso. Finalmente, se forma un gradiente de protones hacia el interior de la matriz mitocondrial, cuya fuerza motriz permite la síntesis de ATP a partir de ADP [Alberts *et al.*, 2008].

Es así como la mitocondria se transforma en una fuente eficiente de ATP, necesario para alimentar bombas de transporte iónico, eventos de señalización, procesos mecánicos mediados por motores moleculares, síntesis y plegamiento de macromoléculas, entre otros. Sin embargo, la mitocondria no es sólo un importante centro energético celular, sino que también repercute sobre la decisión de vida o muerte, escenario en que adquiere un papel central.

Apoptosis es un término para referirse a una forma de suicidio celular, que se caracteriza por un desmantelamiento programado de las estructuras, vía condensación del citosol, fragmentación nuclear y vesiculación de la membrana plasmática. La decisión de entrar en apoptosis es un proceso altamente regulado, que depende tanto de señales del medio extracelular como de señales del medio interno. Es por ello que las rutas conducentes a apoptosis se han dividido clásicamente en dos: “vía intrínseca” y “vía extrínseca”, según donde provengan las señales de inicio. Sin embargo, estas rutas de señalización no son completamente independientes, sino que conversan entre sí, de modo de tomar una decisión de muerte integrada [Perl *et al.*, 2005].

La mitocondria tiene la función de recibir distintas señales, ponderándolas antes de permitir la ejecución a la apoptosis. Entre estas señales están las proteínas de la familia Bcl-2, que actúan como un verdaderos sensores del estado general de la célula. En esta familia existen miembros antiapoptóticos, como Bcl-2, y miembros proapoptóticos, como Bax y Bak. Cuando las condiciones internas y externas son propicias, los componentes antiapoptóticos antagonizan a los proapoptóticos, protegiendo así a la viabilidad celular. Pero cuando hay condiciones que favorecen la muerte celular, como daño al DNA, señales exógenas, o malfuncionamiento organelar, las proteínas proapoptóticas superan el control ejercido por las antiapoptóticas, volviendo a la célula más susceptible a la muerte. Un evento importante en esta señalización es la formación de multímeros de Bak y Bax, en la superficie de la mitocondria. Sin embargo, las proteínas no son los únicos mensajeros que confluyen en la mitocondria. Ceramida y calcio se van acumulando en este organelo a medida que los estímulos proapoptóticos van en aumento [Kim *et al.*, 2006].

En conjunto, la sobrecarga de calcio, la ceramida y los multímeros Bax/Bak contribuyen a la permeabilización mitocondrial. Durante este evento se forma un poro en la superficie de la mitocondria, conocido como poro de transición de permeabilidad (*Permeability Transition Pore*, PTP), que altera la compartimentalización normal de este organelo, permitiendo el paso de grandes moléculas hacia el citosol. Ocurre entonces pérdida del potencial mitocondrial, generación de especies oxidantes y liberación de proteínas apoptogénicas. Entre éstas últimas se encuentra el citocromo c,

componente de la cadena respiratoria y a la vez, una de las más poderosas señales proapoptóticas. Una vez en el citoplasma, el citocromo c forma un complejo con otras proteínas, denominado apoptosoma. Éste tiene la propiedad de activar a una familia de proteasas, las caspasas, que son las encargadas de desencadenar la apoptosis subsecuente [Kroemer *et al.*, 2007].

De esta manera, la mitocondria se vuelve uno de los actores más importantes de la escena celular, tanto por su acción en la mantención de los procesos fisiológicos, como por su función integradora durante la señalización de la muerte celular programada.

### **1.3. Acoplamiento funcional entre retículo endoplásmico y red mitocondrial**

Como ya se ha planteado, el retículo endoplásmico y la mitocondria son dos organelos que poseen una rica maquinaria metabólica y en especial, transduccional, que los hacen responsables de la generación, amplificación, reclutamiento y contención de señales. Sin embargo, el RE y la mitocondria no son centros transduccionales aislados; al contrario, interactúan en una intensa y continua conversación, cuyas bases moleculares son diversas, y aún están siendo descifradas.

Existen diversos lenguajes que estos dos organelos utilizan para comunicarse. Por un lado, están las proteínas, capaces de traslocarse de un compartimento al otro frente a condiciones de estrés, como por ejemplo, la kinasa c-Abl [Ito *et al.*, 2001]. También están los lípidos, como la ceramida [Stiban *et al.*, 2001] o fosfolípidos [Vance *et al.*, 1990] que son sintetizados en el retículo endoplásmico y transferidos a la mitocondria a través de contactos entre membranas. Por su parte, el ATP también es una moneda de intercambio energético, pues sale de la mitocondria en forma canalizada, constituyendo microdominios de alta concentración en la superficie del retículo endoplásmico, sirviendo de energía para las bombas iónicas que allí se encuentran [Kaasik *et al.*, 2001]. Además, el calcio también tiene un papel clave en esta conversación ya que este sale del retículo endoplásmico y es capturado por la mitocondria, modulando su actividad a distintos niveles: favorece la generación de ATP por estimulación del ciclo de Krebs [Jouaville *et al.*, 1999], conduce a fragmentación de la red mitocondrial

[Szabadkai *et al.*, 2004], disminuye su motilidad a lo largo de los microtúbulos [Yi *et al.*, 2004] o provoca la apertura del PTP y así, a la disfunción mitocondrial y a la apoptosis [Hajnóczky *et al.*, 2003].

De entre los mensajeros moleculares recién mencionados, el calcio es uno de los que más llama la atención. A pesar de tener una naturaleza iónica, su capacidad de transmitir señales a través de complejos patrones espacio-temporales es asombrosa. Además, el RE y la mitocondria juegan un papel fundamental en la modulación de sus señales. El RE está constantemente acumulando el calcio intracelular en su lumen, a través de la bomba ATPasa SERCA, para luego dejarlo salir controladamente por canales específicos, el receptor de IP3 (IP3R) y el receptor de ryanodina (RyR). De esta forma, ante un estímulo, el calcio logra ingresar rápidamente al citoplasma, aumentando su concentración unas 10 veces, activa sus procesos diana, y luego es recaptado por el mismo RE vía SERCA [Berridge *et al.*, 2000]. Por su parte, el potencial de membrana de la mitocondria, negativo respecto al citoplasma, genera una fuerza motriz suficiente para ingresar el catión a la matriz mitocondrial, favoreciendo su regreso a los niveles basales. De este modo, las señales de calcio no son de naturaleza unilateral: así como el calcio modula la actividad de los organelos, son el RE y la red mitocondrial los agentes encargados de dar forma a sus señales.

Debido a su capacidad captadora del calcio intracelular, las mitocondrias están encargadas de modular las señales generadas por el RE. De esta forma, actúan como amortiguadores de los niveles de calcio, evitando la dispersión de las señales por el espacio, o su prolongación excesiva en el tiempo [Duchen *et al.*, 2000]. Esta función es lograda gracias a dos propiedades que están constantemente siendo moduladas: la continuidad luminal de la red mitocondrial, y su distribución dentro del espacio intracelular. Por un lado, en una red mitocondrial más fragmentada, hay un menor ingreso de calcio, producto del bloqueo en la difusión del ión en el espacio intraorganelar [Szabadkai *et al.*, 2004]. Por otro lado, aquellas mitocondrias ubicadas en la periferia celular interactúan preferentemente con la membrana plasmática, favoreciendo la captación de calcio desde el medio extracelular, mientras que aquellas en la región perinuclear son las que tienen mayor número de contactos con el RE

[Varadi *et al.*, 2004].

Se ha teorizado que las regiones de estrecha proximidad entre la mitocondria y el RE son imprescindibles para el ingreso de calcio a la matriz mitocondrial. Ello se debe a que VDAC1, el canal por el cual el calcio entra a la mitocondria, presenta baja afinidad por este catión, requiriendo altísimas concentraciones para explicar la rapidez con que ocurre su paso transmembrana. Estas altas concentraciones de calcio ocurren en microdominios en la vecindad de cada canal IP3R tras su apertura, siendo los eventos elementales en la señalización de este ión [Berridge, 2006]. Gracias a ciertos puntos de contacto con el RE, la red mitocondrial se expone a estos microdominios, logrando así en su superficie las concentraciones de calcio apropiadas [Rizzuto *et al.*, 1998].

#### **1.4. Determinantes estructurales de la interfase retículo endoplásmico-red mitocondrial**

El primer determinante de la interfase entre RE y mitocondria es la distribución de ambos en el espacio intracelular, regulando la distancia entre sus superficies. Este parámetro está dado por el movimiento de los organelos a lo largo de los microtúbulos por motores moleculares [Varadi *et al.*, 2004]. Estudios al respecto han comprobado que ambos compartimentos presentan una mayor confluencia cuando están ubicados en la región perinuclear, alrededor del centrosoma, mientras que en la región más periférica su agrupamiento es menor [Darios *et al.*, 2005]. Sin embargo, la sobreexpresión de la proteína dinamitina, encargada del movimiento retrógrado de la mitocondria, la desplaza hacia la región perinuclear, aunque sin generar cambios en su capacidad de captar calcio salido del RE [Varadi *et al.*, 2004]. Estas evidencias implican que la sola proximidad no es condición suficiente para favorecer la entrada de calcio a la matriz mitocondrial.

Otras entidades moleculares que den estructura a los contactos RE-mitocondria aún no se conocen del todo, así como los mecanismos que los regulan. Recientemente, mediante microscopía electrónica, se ha observado un puente proteico

que ancla ambos organelos, tanto en las regiones del RE rugoso (más perinuclear), como del RE liso (más periférico) [Csordás *et al.*, 2006]; sin embargo, la identidad de las proteínas involucradas todavía no se conoce.

En cuanto al acoplamiento funcional que permite el traspaso de calcio, los canales que realizan este proceso, IP3R en el RE, y VDAC1 en la mitocondria, se han encontrado formando un complejo con la chaperona grp75 [Szabadkai *et al.*, 2006]. La presencia de esta proteína en el citoplasma facilita el intercambio iónico, favoreciendo la interacción entre los canales, estructurándose así dominios especializados de señalización (“hot spots”).

Estudios sobre la regulación de la interfase RE-mitocondria, todos ellos muy recientes, revelan que C<sub>2</sub>-ceramida, un estímulo de muerte celular, lleva a un agrupamiento de los organelos en la región perinuclear, concomitante con un aumento en la transferencia de calcio entre ambos [Darios *et al.*, 2005]. Del mismo modo, tanto la privación de suero como el estrés de retículo endoplásmico llevan a un estrechamiento de la interfase RE-mitocondria, al menos a tiempos largos [Csordás *et al.*, 2006].

De los antecedentes mencionados surgen ciertas relaciones que dan forma a la idea central de este proyecto. Tanto el estrés de retículo endoplásmico como la ceramida conducen a muerte celular a través de disfunción mitocondrial, producto de un ingreso excesivo de calcio a la matriz mitocondrial [Demaurex *et al.*, 2003]. Por su parte, la autofagia -canónicamente estimulada por la privación de suero- es inducida durante el estrés de retículo endoplásmico [Yorimitsu *et al.*, 2006] y su activación es dependiente del incremento en el calcio citoplasmático [Høyer-Hansen *et al.*, 2007]. Este incremento puede ser evitado por la captación mitocondrial; sin embargo, una liberación sostenida de calcio desde el RE (como ocurre en el estrés de retículo endoplásmico) conduce a disfunción mitocondrial y, de esta forma, al vaciamiento del ión al citoplasma y activación de sus efectores [Csordás *et al.*, 2006].

Desde el punto de vista energético, tanto la condición de estrés de retículo

endoplásmico como de privación de nutrientes, suponen para la célula un aumento en los requerimientos de ATP, para lograr adaptarse a la situación adversa en la que se encuentra. Ello explica el por qué la célula activa la autofagia bajo esas condiciones, como fuente de nutrientes. Para el caso de la privación de glucosa (que conduce tanto a estrés de retículo endoplásmico como autofagia) se ha observado una estimulación temprana del metabolismo, con incremento en los niveles celulares de ATP [Liu *et al.*, 2005], así como un aumento en la masa de la chaperona grp75 [Heal *et al.*, 1997]. Sin embargo, los efectos de esta condición sobre el acoplamiento RE-mitocondria, y su relación con el estado metabólico de la célula no han sido estudiados a la fecha.

De todo lo anterior se desprende la noción de que el acercamiento entre RE y mitocondria, y el consecuente incremento en la captación de calcio por esta última, forman parte de una respuesta dual frente a estímulos de estrés celular: por una parte, favoreciendo la generación de energía como mecanismo adaptativo de sobrevivencia, y por otro lado, llevando a la disfunción mitocondrial como mecanismo de muerte celular, en caso que la condición de estrés no se vea aliviada.

La presente propuesta de investigación consiste en estudiar los cambios en la relación espacial entre el RE y la mitocondria, como un mecanismo de adaptación frente al estrés de retículo endoplásmico. Con ello se espera establecer un nexo entre el agrupamiento perinuclear, la generación de energía en la mitocondria y la resistencia frente a la condición de estrés.

En los últimos años, la respuesta ante el estrés de retículo endoplásmico ha sido blanco de numerosas investigaciones, tendientes a desentrañar sus mecanismos transduccionales, su papel en la decisión de sobrevivencia o apoptosis y su entrecruzamiento con otras rutas de la fisiología celular. Este interés se fundamenta en la importancia que tiene el RE en la mantención de la homeostasis tanto en procesos fisiológicos como patológicos. Su función ha sido relacionada con enfermedades neurodegenerativas, diabetes mellitus, aterosclerosis, hipertrofia cardíaca, hepatocarcinogénesis e infecciones virales, entre otros [Yoshida, 2007]. Esta tesis apunta a caracterizar una arista aún no investigada del estrés de retículo

endoplásmico, para entender mejor este proceso, transversal para la biología de la célula.



## **2. HIPOTESIS**

“En la etapa temprana de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), la producción mitocondrial de ATP aumenta debido al acercamiento entre el retículo endoplásmico y la red mitocondrial”.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Investigar si existe un acercamiento temprano entre retículo endoplásmico y la red mitocondrial bajo condición de estrés de retículo endoplásmico, lo que favorece la producción mitocondrial de ATP en las células HeLa.

## **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estudiar si existe acercamiento del retículo endoplásmico y la red mitocondrial en la región perinuclear bajo condición de estrés de retículo endoplásmico en células HeLa.
- Cuantificar el metabolismo mitocondrial en etapas tempranas de estrés de retículo endoplásmico en células HeLa.
- Establecer la importancia de la confluencia del retículo endoplásmico y la red mitocondrial en el metabolismo mitocondrial y supervivencia celular bajo condición de estrés de retículo endoplásmico.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Reactivos y soluciones**

El medio de cultivo en que se mantuvieron las células corresponde a medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con un 5 % suero fetal bovino (FBS). El DMEM fue adquirido de Sigma Chemical Co, y el FBS de Hyclone. De Sigma Chemical Co. también se obtuvieron: azul de tripán, nocodazol, carboxi-cianuro-3-clorofenilhidrazona (CCCP), oligomicina y yoduro de propidio. Citocalasina B y 2-desoxiglucosa (2DG) se obtuvieron de Calbiochem.

La tripsina se obtuvo de GIBCO. El sistema comercial para medir ATP, CellTiter Glo®, se obtuvo de Promega. De Invitrogen se adquirieron: MTT, DiOC<sub>6</sub>, Lipofectamine 2000®, MitoTracker Green® y Tetrametilrodamina metil éster (TMRM). La tunicamicina se obtuvo de Biomol.

El anticuerpo contra la forma fosforilada de eIF2 $\alpha$  (p-eIF2 $\alpha$ ) se obtuvo de Cell Signaling Technology. Los anticuerpos contra CHOP, JNK y JNK fosforilado (p-JNK) se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology. Todos los anticuerpos fueron usados en un título de 1:1000.

### **5.2. Cultivo celular**

Para el presente trabajo se usaron células HeLa (donación del Dr Guido Kroemer, Institute Gustave Roussy, Villejuif, Francia) entre los pasajes 15 y 40. Estas células adherentes se mantuvieron cubiertas por medio de cultivo, en un incubador a 37°C y atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire. El cultivo se realizó bajo condiciones de esterilidad, manipulando las células en una campana de flujo laminar. Las células se sembraron en placas de 100 mm a baja confluencia para permitir su proliferación. Al alcanzar una confluencia entre 70-90%, las células se desprendieron de la placa para su posterior utilización. Para ello, el medio de cultivo se removió por aspiración y la

placa se lavó dos veces con 1 mL de PBS. Luego, la placa se trató con 1 mL de tripsina entre 5 y 10 min a 37 °C. La tripsinización se detuvo añadiendo 5 mL de medio fresco. Luego, las células se colectaron en un tubo de centrifuga. Una alícuota (20 µL) de la suspensión celular se mezcló con igual volumen de azul de tripán. La mezcla resultante se colocó en una cámara de Neubauer y se determinó bajo un microscopio el número de células vivas por unidad de volumen. Una porción de la suspensión celular se sembró en las placas correspondientes, según el experimento, y otra porción se sembró nuevamente a baja confluencia en placa de 100 mm, para poder repetir el proceso en el siguiente ciclo.

### **5.3. Evaluación de la red mitocondrial en células vivas por microscopía confocal**

Para evaluar la red mitocondrial se utilizó la sonda fluorescente MitoTracker Green, la cual se une a las mitocondrias en forma independiente de su potencial. Para este propósito, las células se sembraron en placas de 6 pocillos con cubreobjetos de 0,17 mm de grosor, usando una confluencia entre 10-30%. Tras de someterlas a las condiciones experimentales deseadas, el medio de cultivo se reemplazó por medio fresco que contenía la sonda fluorescente 200 nM de MitoTracker Green®. La sonda se incubó con las células por 20 min a 37 °C. Posteriormente, el cubreobjetos se ubicó en una cámara para microscopía y se lavó con medio Krebs dos veces. Las células se mantuvieron en la cámara con medio Krebs y luego se montaron en el microscopio. Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal Zeiss LSM-5, Pascal 5 Axiovert 200, con un objetivo Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC, usando un láser de excitación de 488 nm, y un filtro de emisión BP 506-530. Por cada experimento independiente se registró la señal de 10 a 15 células. Para realizar la estadística, se tomaron en cuenta los valores de todas las células registradas.

### **5.4. Evaluación de la red del retículo endoplásmico en células vivas por microscopía confocal**

Para evaluar la red reticular se utilizó la proteína fluorescente roja (*red fluorescent protein*, RFP) destinada a la superficie del retículo endoplásmico, previa transfección

con el plasmidio ER-RFP donado por el Dr. Guido Kroemer (Institute Gustave Roussy, Villejuif, Francia). Con este objetivo, se usaron placas de 6 pocillos con cubreobjetos para realizar la transfección con un plasmidio. Las células HeLa se sembraron a una confluencia entre 50-70%. Luego, el medio de cultivo se reemplazó por DMEM sin suero y sin antibióticos y así se mantuvieron por 2 h. Posteriormente, a cada pocillo se le agregó una mezcla de 1 µg de plasmidio y 2 µL de Lipofectamine 2000®, en DMEM sin suero ni antibióticos, preparada 20 min antes de su uso. Luego de 5 h, el medio se reemplazó por medio de cultivo fresco y las células se dejaron por 24 h para permitir la expresión de la proteína. Pasado ese tiempo, las células se expusieron a la condición experimental deseada y luego se observaron en un microscopio confocal Zeiss LSM-5, Pascal 5 Axiovert 200, con un objetivo Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC, usándose un láser de excitación de 543 nm y un filtro de emisión LP 560. Por cada experimento independiente se registró la señal de 15 células. Para realizar la estadística, se tomaron en cuenta los valores de todas las células registradas.

### **5.5. Evaluación del potencial mitocondrial en células vivas por microscopía confocal**

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos con cubreobjetos de 0,17 mm de grosor a una confluencia entre 10-30%. Tras someterlas a las condiciones experimentales deseadas, el medio de cultivo se reemplazó por medio fresco que contenía la sonda fluorescente 200 nM de tetrametilrodamina. La sonda se incubó con las células por 20 min a 37 °C. Posteriormente, el cubreobjetos se ubicó en una cámara para microscopía y se lavó dos veces con medio Krebs. Las células se mantuvieron en la cámara con medio Krebs y luego se montó en el microscopio. Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal Zeiss LSM-5, Pascal 5 Axiovert 200, con un objetivo Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC, usándose un láser de excitación de 543 nm y un filtro de emisión LP 560. Por cada experimento independiente se registró la señal de 15 células. Para realizar la estadística, se tomaron en cuenta los valores de todas las células registradas.

## **5.6. Procesamiento de imágenes**

Para analizar la distribución mitocondrial, usando MitoTracker Green® o tetrametilrodamina, se tomó un registro de la totalidad celular, esto es, 8 a 12 planos focales en el eje z, todos ellos con un solapamiento del 50 % (criterio de Nyquist). Estas imágenes se deconvolucionaron y sumadas, utilizando el programa ImageJ. Las imágenes compilatorias obtenidas se usaron para medir área mitocondrial y perfil radial mitocondrial.

Para analizar la red mitocondrial y el retículo endoplásmico en su conjunto, se analizó un solo plano focal en z, debido a la necesidad de optimizar las condiciones de captura de imagen. Para ello, se incrementó el tiempo de barrido con el láser, lo que implicó disminuir el número de barridos en z para evitar fotoblanqueamiento y tiempos excesivos de captura. Las imágenes obtenidas luego se deconvolucionaron y se les restó el ruido de fondo utilizando el programa ImageJ. Con estas imágenes se determinó el perfil de distribución del retículo endoplásmico, así como la colocación entre ambos organelos.

## **5.7. Evaluación del poder reductor mitocondrial mediante ensayo MTT**

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una confluencia del 50 a 70 %. Luego de exponerlas a las condiciones experimentales deseadas, el medio de cultivo se removió por aspiración y los pocillos se lavaron con 100  $\mu$ L de PBS. Tras remover el PBS, se agregaron 100  $\mu$ L de solución de MTT por pocillo y la placa se dejó en un incubador a 37°C durante 4 h. Transcurrido el tiempo, la solución de MTT se reemplazó por 100  $\mu$ L de isopropanol. La placa se incubó a 37 °C por 10 min y se determinó la absorbancia de cada pocillo en un espectrofotómetro de placa. Los resultados obtenidos corresponden a la razón entre las absorbancias a 550 y 655 nm.

### **5.8. Evaluación de viabilidad celular e integridad mitocondrial por citometría de flujo**

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una confluencia entre 50-70%. Tras de someterlas a las condiciones experimentales deseadas, el medio de cultivo se extrajo y se conservó aparte, mientras que los pocillos vacíos se lavaron dos veces con 100  $\mu$ L de PBS. Luego, los pocillos se trataron con 100  $\mu$ L de tripsina, tras lo cual la placa se incubó durante 5 a 10 min a 37 °C. La tripsinización se detuvo con 10  $\mu$ L de FBS y las células resuspendidas se centrifugaron a 235 g por 5 min junto con el medio extraído en pasos anteriores. El sobrenadante se descartó y la pella se resuspendió en 200 a 400  $\mu$ L de medio de cultivo conteniendo la sonda fluorescente DiOC<sub>6</sub> (40 nM). La suspensión se incubó a 37 °C por 20 min. Para los casos en que se usó yoduro de propidio, este reactivo se agregó a una concentración final de 10  $\mu$ g/mL después de la última incubación, por un período de 1 a 5 min. Finalmente, la fluorescencia de las células se leyó en un citómetro FACS Canto II, BD Biosciences.

### **5.9. Evaluación del potencial mitocondrial por citometría de flujo**

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una confluencia entre 50-70%. Tras someterlas a las condiciones experimentales deseadas, el medio de cultivo se extrajo y se conservó aparte, mientras que los pocillos vacíos se lavaron dos veces con 100  $\mu$ L de PBS. Luego, los pocillos se trataron con 100  $\mu$ L de tripsina, tras lo cual la placa se incubó durante 5 a 10 min a 37 °C. La tripsinización se detuvo con 10  $\mu$ L de FBS y las células resuspendidas se centrifugaron a 235 g por 5 min junto con el medio extraído en pasos anteriores. El sobrenadante se descartó y la pella se resuspendió en 200 a 400  $\mu$ L de medio de cultivo conteniendo la sonda fluorescente tetrametilrodamina (200 nM). La suspensión se incubó a 37 °C por 20 min. Finalmente, la fluorescencia de las células se leyó en un citómetro FACS Canto II, BD Biosciences.

### **5.10. Medición de ATP**

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una confluencia del 50 a 70 %.

Tras someterlas a las condiciones experimentales deseadas, el medio de cultivo se removió por aspiración, y los pocillos se lavaron con 50  $\mu$ L de PBS. Luego de aspirar el PBS del lavado, se agregaron 20  $\mu$ L de PBS por pocillo, tras lo cual se añadió igual volumen de reactivo CellTiter Glo®. La placa se incubó entonces a temperatura ambiente con agitación por 5 a 10 min y se determinó su luminiscencia en un luminómetro de placa Topcount NXT, Perkin Elmer (Waltham, MA).

### **5.11. Determinación del consumo de oxígeno en células vivas**

Para este experimento, las células se sembraron en placas de 60 mm a una confluencia entre 70-90%. Tras someterlas a las condiciones experimentales deseadas, el medio de cultivo se removió por aspiración y los pocillos se lavaron dos veces con 1 mL de PBS. Luego, las placas se trataron con 1 mL de tripsina e incubaron por 5-10 min a 37 °C. La tripsinización se detuvo con 100  $\mu$ L de FBS y las células resuspendidas se centrifugaron a 200 g por 5 min. Después de descartar el sobrenadante, la pella se resuspendió en PBS. La suspensión se colocó en una cámara a 25°C, acoplada a un electrodo de Clark 5331 (Yellow Springs Instruments). Los datos obtenidos correspondieron a la cantidad de oxígeno remanente en la cámara a lo largo del tiempo. Para calcular la velocidad con que las células consumían el oxígeno de la cámara, éstas se incubaron durante 20 min.

### **5.12. Western blot**

Las células se sembraron en placas de 60 mm a una confluencia del 70-90%. Tras someterlas a las condiciones experimentales deseadas, las placas se lavaron tres veces con PBS 1X frío, y se lisaron con 100  $\mu$ L de tampón de lisis RIPA. Los homogeneizados fueron centrifugados a 8000 g por 10 min. Los sobrenadantes (extracto de proteínas totales) fueron rescatados y su concentración fue medida por el método de Bradford. Los extractos de proteínas fueron desnaturaladas en tampón SDS-PAGE 4x por 5 min a 100°C, y las muestras posteriormente fueron almacenadas a -20°C.

La separación de proteínas obtenidas de los extractos totales se realizó en condiciones desnaturalantes en geles de SDS-PAGE al 12%. Una vez realizada la electrofore-

sis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,2  $\mu\text{m}$  durante 90 min a 0,45 A en tampón de transferencia 1X.

Las membranas de nitrocelulosa se incubaron por 1 h a temperatura ambiente con una solución de bloqueo consistente en leche descremada al 5% en solución salina de TBS-Tween-20 (0,01% v/v) (TTBS). Luego las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos correspondientes. Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces por 15 min con TTBS y luego se incubaron por 2h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti IgG conjugado a peroxidasa, disuelto en la misma solución de bloqueo. Al término de la incubación, las membranas se lavaron exhaustivamente y se detectaron las proteínas por un método quimioluminiscente (ECL) el cual consiste en incubar por 1 min la membrana en 1 mL de la mezcla de reacción “Western Lightning” (Perkin Elmer) y exponerla en películas Kodak-BioMax. Las intensidades de las bandas resultantes se determinaron por densitometría.

### **5.13. Análisis estadístico**

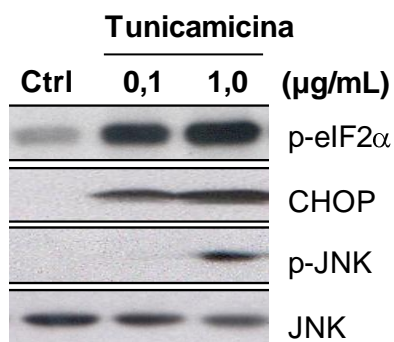
Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  error estándar (*Standard Error of the Mean*, SEM). Se realizaron al menos tres experimentos independientes para comprobar la hipótesis estadística. Los datos se analizaron por ANOVA de una vía o de dos vías, según corresponda, seguido por un post-test de Bonferroni. Mediante esta prueba se determinó la significancia estadística de los resultados, considerándose como significativo un valor  $p < 0,05$ .



## 6. RESULTADOS

### 6.1. Durante las etapas tempranas de estrés de RE se estimula el metabolismo mitocondrial

El uso de tunicamicina como agente inductor de estrés de RE está ampliamente extendido. Este alcaloide inhibe la glicosilación de proteínas en el RE, llevando así a la acumulación de intermediarios de plegamiento proteico y a la saturación de la capacidad plegadora del organelo. La tunicamicina induce estrés de RE a partir de concentraciones tan bajas como 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En el Laboratorio se comprobó que células HeLa sometidas a tunicamicina muestran marcadores de estrés de RE a partir de tiempos tan tempranos como 6 h (Figura 4).

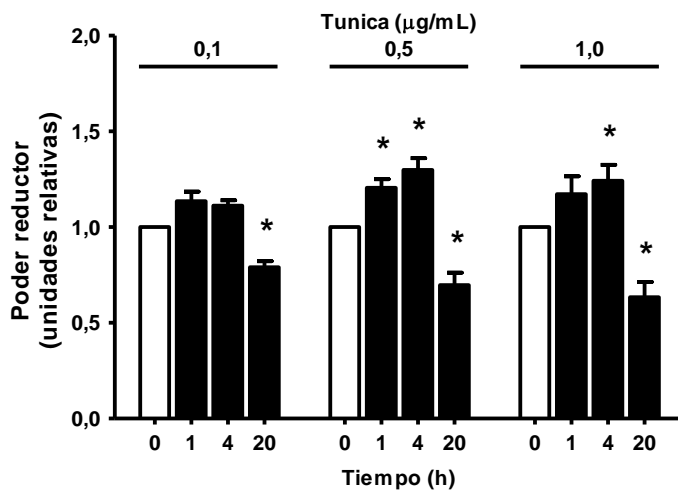


**Figura 4. Inducción de estrés de RE por tunicamicina.** Células HeLa se sometieron a condición control o con tunicamicina 0,1 y 1,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 6 h. Luego, se analizaron los niveles de proteínas marcadoras de estrés de RE por Western blot: eIF2 $\alpha$  fosforilado, CHOP y JNK fosforilado. Se presenta en la figura una imagen representativa de los niveles proteicos obtenidos.

A modo de exploración inicial, las células HeLa se trataron con concentraciones bajas de tunicamicina (0,1, 0,5 y 1,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 1, 4 y 20 h, de modo de obtener un barrido tanto temporal como de intensidad del estrés. Para conocer a grandes rasgos los cambios metabólicos inducidos por el estrés de retículo, se midieron dos parámetros celulares: el poder reductor, mediante un ensayo de MTT, y la cantidad de ATP.

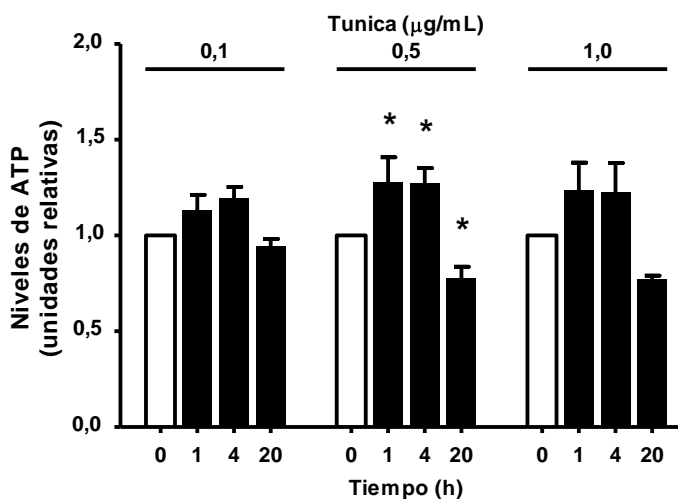
Los resultados obtenidos indican que a tiempos tempranos (1 y 4 h) ocurre un incremento tanto en el poder reductor como en el ATP celular de alrededor del 20%.

Posteriormente, a las 20 h, hubo una disminución respecto al control no tratado de aproximadamente un 20%. Este comportamiento se apreció con las tres concentraciones usadas, pero sólo con 0,5  $\mu\text{g/mL}$  se obtienen diferencias estadísticamente significativas en todos los tiempos analizados. Las Figuras 5 y 6 muestran las cinéticas de los cambios obtenidos.



**Figura 5. Cambios en el poder reductor celular por estrés de RE.** Células HeLa se trataron con tunicamicina por los tiempos y concentraciones indicadas en el gráfico, y se midió el poder reductor por ensayo de MTT. Puede observarse para cada concentración una elevación temprana del poder reductor, que da pie luego a una caída a las 20 h. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n = 5). \* indica una diferencia significativa respecto al control ( $p < 0,05$ ).

temprana del poder reductor, que da pie luego a una caída a las 20 h. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n = 5). \* indica una diferencia significativa respecto al control ( $p < 0,05$ ).



**Figura 6. Cambios en el contenido celular de ATP por estrés de RE.** Células HeLa se trataron con tunicamicina por los tiempos y concentraciones indicadas en el gráfico, y se les midió el contenido de ATP por ensayo de luciferasa. Hay un aumento temprano (1 y 4 h) del ATP para cada concentración

usada, que luego da lugar a una caída a las 20 h. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n = 5). \* indica una diferencia significativa respecto al control ( $p < 0,05$ ).

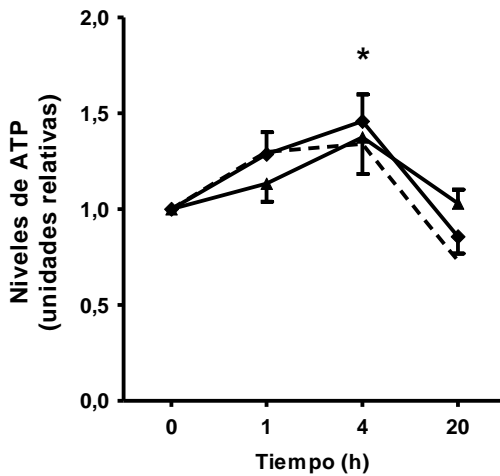
Luego de realizar estos ensayos preliminares, en los siguientes experimentos en que se utilizó tunicamicina, esta se ocupó a la concentración de 0,5 µg/mL.

Para descartar que la caída en el ATP y en el poder reductor se deba a muerte celular, se midió la viabilidad mediante citometría de flujo, sin encontrarse cambios significativos a ninguno de los tiempos evaluados (datos no mostrados).

Posteriormente, para discernir si el incremento de ATP se debe a un aumento en el metabolismo mitocondrial, o bien, a un incremento en la actividad glicolítica en el citoplasma, se usaron una serie de inhibidores de ambos procesos.

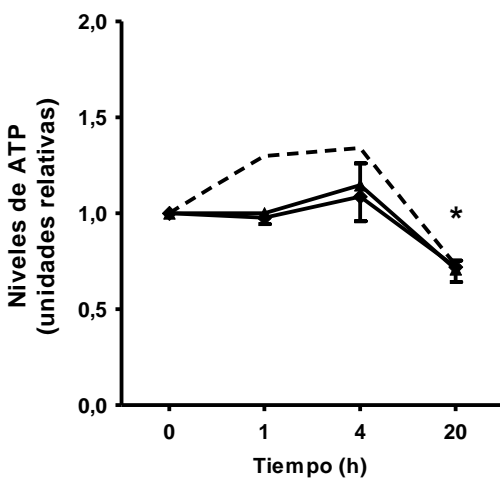
Para descartar que la glicólisis anaeróbica fuese responsable del incremento en el ATP, se utilizó un análogo de la glucosa, la 2-desoxiglucosa (2DG) a una concentración 20 mM. Ésta ingresa a la célula y se fosforila por la hexokinasa, pero debido a la falta del grupo hidroxilo en posición 2, no puede proseguir la ruta glicolítica, actuando así como un inhibidor de ésta.

El uso de 2DG no impidió que ocurra el incremento de ATP inducido por tunicamicina, sugiriendo que la glicólisis en el citoplasma no es un actor fundamental en esta estimulación metabólica. Sin embargo, como puede observarse en la Figura 7, la 2DG por sí sola indujo un aumento de ATP. Esta observación puede explicarse por el hecho que la 2DG, al ser un análogo de la glucosa, interfiere no sólo con la glicólisis, sino también con la glicosilación de proteínas, induciendo estrés de RE y generando una respuesta similar a la tunicamicina. Además, en otros tipos celulares, la privación de glucosa induce un aumento temprano en los niveles de ATP [Liu y cols., 2005], evento que en este caso estaría siendo imitado por la 2DG.

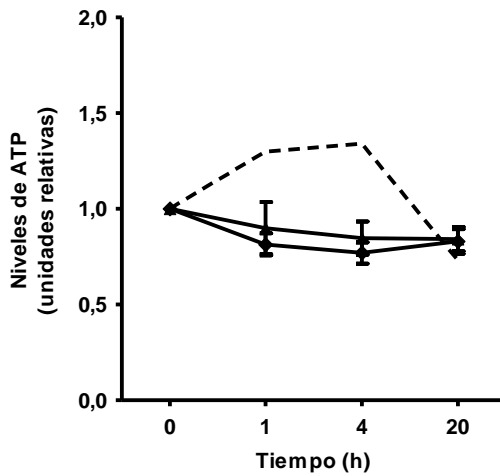


**Figura 7. Glicólisis anaeróbica y contenido celular de ATP durante estrés de RE.** Se trataron células HeLa con 2DG por los tiempos indicados en el gráfico, en ausencia (▲) o presencia (◆) de tunicamicina. Posteriormente, se midió el contenido de ATP por ensayo de luciferasa. La línea punteada representa el aumento de ATP que ocurre por tunicamicina sola. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). \* indica una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) respecto al control (tiempo 0 h).

Por otro lado, para comprobar que la mitocondria era responsable del incremento de ATP, se usaron dos inhibidores de la actividad de este organelo: el agente desacoplante de la cadena respiratoria, CCCP 20  $\mu$ M; y oligomicina 1  $\mu$ g/mL, inhibidor de la ATP sintasa mitocondrial. Como puede observarse en las Figuras 8 y 9, tanto CCCP como oligomicina inhibieron el aumento de ATP inducido por tunicamicina. Este resultado sugiere a la mitocondria como principal responsable de esta estimulación metabólica temprana por estrés de RE.



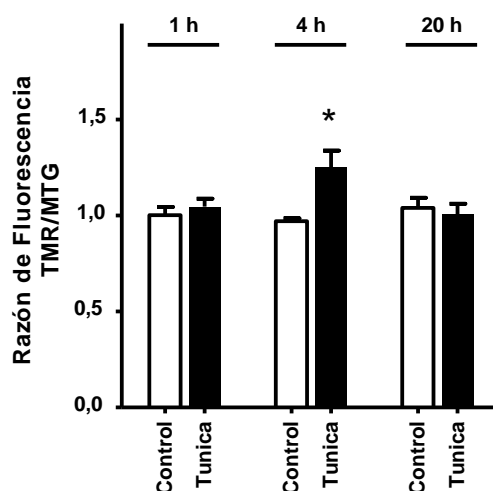
**Figura 8. Potencial mitocondrial y ATP celular durante estrés de RE.** Células HeLa se trataron con CCCP por los tiempos indicados en el gráfico, en ausencia (▲) o presencia (◆) de tunicamicina. Posteriormente, se midió el contenido de ATP por ensayo de luciferasa. La línea punteada representa el aumento de ATP que ocurre por tunicamicina sola. Los resultados son promedio  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). \* indica una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) respecto al control (tiempo 0 h).



**Figura 9. ATP sintasa mitocondrial y ATP celular durante estrés de RE.** Células HeLa fueron tratadas con oligomicina por los tiempos indicados en el gráfico, en ausencia (▲) o presencia (◆) de tunicamicina. Posteriormente, se midió el contenido de ATP por ensayo de luciferasa. La línea punteada representa el aumento de ATP que ocurre por tunicamicina sola. N = 5. Los resultados son promedio  $\pm$  SEM.

Para tener más evidencias de la participación mitocondrial en la estimulación metabólica, se midieron los cambios en el potencial mitocondrial y en el consumo de oxígeno. Para ello, se recurrió a citometría de flujo y electrodo de Clark, respectivamente.

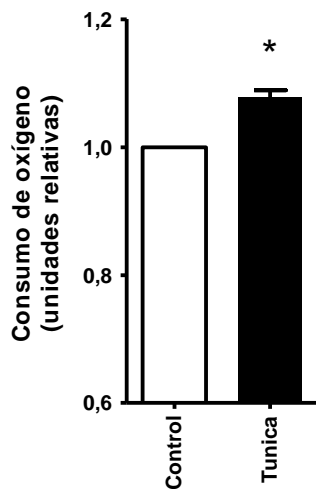
Para determinar el potencial mitocondrial (Figura 10), se calculó la razón entre la fluorescencia de 2 sondas mitocondriales: tetrametilrodamina (TMR), que indica el potencial mitocondrial, y Mitotracker Green® (MTG), que indica la masa mitocondrial. Así se obtiene una medida de la eficiencia de las mitocondrias para los tiempos en estudio. Como se ve en la gráfica, hay un incremento temprano en la eficiencia mitocondrial (4h), que coincide con el aumento de ATP observado con similar temporalidad.



**Figura 10. Cambios en el potencial mitocondrial durante estrés de RE.** Las barras blancas muestran células HeLa sin tratar, mientras que las negras (Tunica) representan a las células tratadas con tunicamicina por los tiempos indicados. El potencial mitocondrial se determinó por citometría de flujo, usando la razón entre la fluorescencia de tetrametilrodamina (TMR) y Mitotracker Green® (MTG). Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM.

SEM (n = 5). \* indica una diferencia significativa respecto al control ( $p < 0,05$ ).

En cuanto a los cambios ocurridos con el consumo de oxígeno, éstos se midieron sólo a las 4 h de exposición a tunicamicina, ya que en este tiempo ocurrieron los eventos de interés. Como se observa en la Figura 11, el consumo de oxígeno por parte de las células se incrementa alrededor de un 10% producto de la adición de tunicamicina.

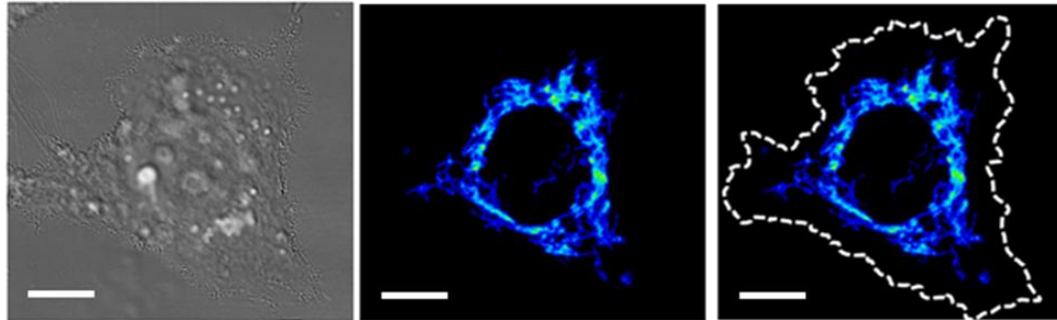


**Figura 11. Cambios en el consumo de oxígeno durante estrés de RE.** La barra blanca muestra células HeLa sin tratar, mientras que la negra (Tunica) representa a las células tratadas con tunicamicina por 4 h. A las muestras se les determinó la velocidad del consumo de oxígeno mediante un electrodo de Clark. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n = 3). \* indica una diferencia significativa respecto al control ( $p < 0,05$ ).

## 6.2. Durante las etapas tempranas de estrés de RE ocurre remodelado organelar

Primeramente, para describir los cambios morfológicos que tienen lugar durante el estrés de RE, se analizó la distribución espacial de la mitocondria por microscopía confocal. Para ello, se analizaron imágenes de células HeLa cargadas con Mitotracker Green®, en condición control o tratadas con tunicamicina durante 1, 4 y 20 h. A cada espécimen se registró la fluorescencia a lo largo de 8 a 12 planos en el eje z, a fin de captar la totalidad de la célula. Además, se registró la luz transmitida, de modo de obtener una visualización de los contornos de la célula. Las imágenes fluorescentes de la sonda mitocondrial se deconvolucionaron previo al análisis, y posteriormente sumadas, para obtener en una sola imagen la compilación de toda la red mitocondrial de las células.

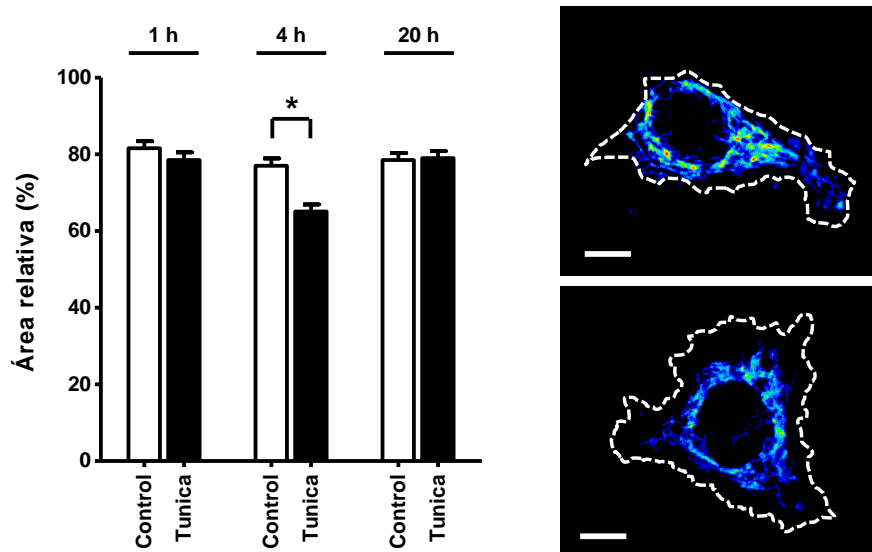
El primer análisis desarrollado fue la estimación de cuán extendida está la red mitocondrial sobre la superficie celular. Para ello, se midió el área que ocupa la red mitocondrial (en  $\mu\text{m}^2$ ) y se relativizó por el área de la célula (Figura 12). Así, se obtuvo el porcentaje del espacio celular sobre el cual se extienden las mitocondrias.



**Figura 12. Análisis de extensión de la red mitocondrial.** La fotografía izquierda representa la imagen de la luz transmitida de una célula. La fotografía central muestra la imagen compilatoria de la fluorescencia del Mitotracker Green® de la misma célula. La imagen derecha muestra la fluorescencia verde junto con el trazado del contorno celular, obtenido de la imagen de luz transmitida. Para el caso de esta célula, la red mitocondrial ocupa un 58% del área total. Longitud de la barra: 10  $\mu\text{m}$ .

El análisis indica que la ocupación mitocondrial promedio en estado basal es cercana a un 80%, la cual disminuye a un 65% tras 4 h de estrés de RE, para luego retornar a los valores basales a las 20 h (Figura 13). Resulta importante notar que la temporalidad de estos cambios morfológicos coincide con los cambios en el metabolismo mitocondrial, lo que sugiere una interrelación entre ambos procesos.

Como control de que este cambio se deba a una retracción en las mitocondrias y no a un aumento en tamaño celular, éste último se comparó en las distintas condiciones. Mediante un ANOVA de 2 vías seguido por un test de Bonferroni (dato no mostrado) se observó que no existen diferencias significativas. En consecuencia, esta menor ocupación es un proceso que tiene lugar en la mitocondria misma.

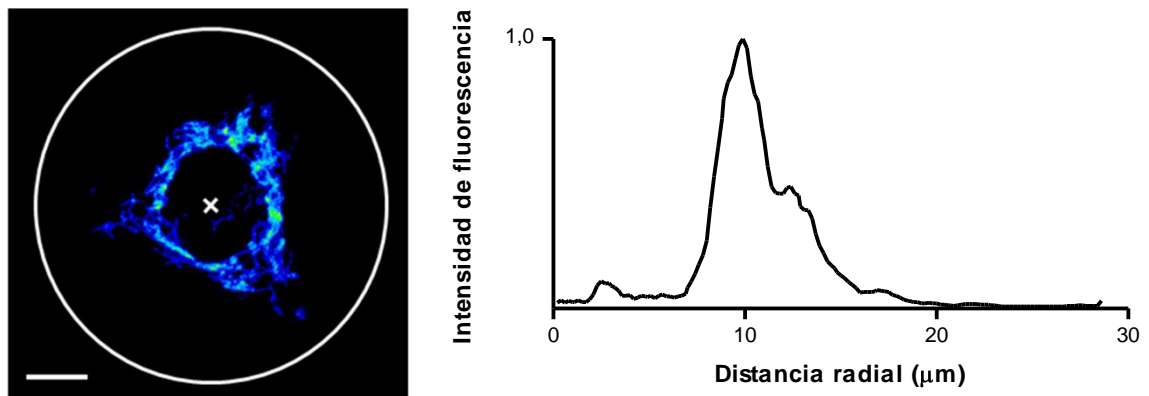


**Figura 13. Efecto del estrés de RE en la redistribución mitocondrial.** El gráfico muestra el porcentaje del área celular ocupado por la red mitocondrial en condición sin tratar (Control) y tratadas con tunicamicina (Tunica) por los tiempos indicados. Los datos corresponden a la razón área mitocondrial:área celular, determinadas por microscopía confocal como se muestra en la Figura 12. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). Se analizaron entre 25 y 45 células por condición. \* indica una diferencia significativa respecto al control ( $p < 0,05$ ). En tanto, las fotografías de la derecha muestran una célula en condición control, con una ocupación mitocondrial del 80% (superior), y otra tratada con tunicamicina por 4 h (inferior), con un 58% de ocupación mitocondrial. Longitud de la barra: 10  $\mu\text{m}$ .

Además de este tipo de estudio basado en los contornos de la red mitocondrial, se desarrolló un segundo análisis que examina la distribución de la intensidad de fluorescencia a lo largo de la masa mitocondrial. Para ello, se midió el perfil de fluorescencia radial de cada célula, desde el centro del núcleo hacia la periferia, en  $360^\circ$  (Figura 14). Con ello, se obtiene una gráfica de la distribución mitocondrial, cuyo eje X representa la distancia radial, y el eje Y indica la cantidad de masa mitocondrial presente en aquella posición. La forma de la curva es similar para todas las células: en las regiones más cercanas al 0 hay escasa población mitocondrial, que corresponde a la ubicada en los planos por sobre y bajo el núcleo; luego viene una señal intensa que decae a medida



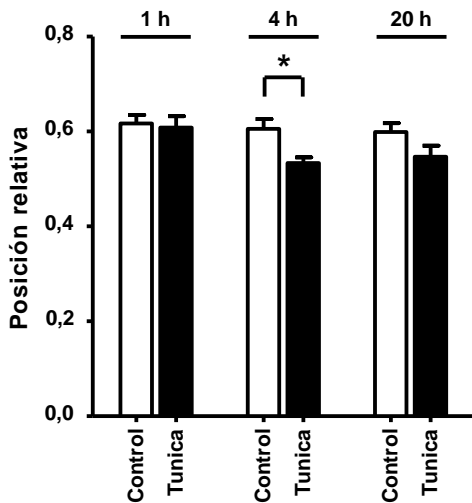
que se aleja radialmente.



**Figura 14. Análisis radial.** La foto de la izquierda muestra la imagen compilatoria de la red mitocondrial de una célula. La cruz indica el origen del análisis, y la circunferencia indica hasta dónde éste se extiende ( $r = 200 \text{ px} = 28,6 \text{ μm}$ ). Longitud de la barra:  $10 \text{ μm}$ . El perfil radial consiste en la sumatoria de la intensidad de fluorescencia de todos los pixeles ubicados a una distancia dada del origen de análisis. La gráfica de la derecha muestra el perfil de intensidad radial obtenido para la foto de la izquierda.

Para relativizar la posición mitocondrial respecto al tamaño de cada célula, la distancia radial se expresa en función de la extensión radial media de la célula, calculada a partir del área de ésta. La extensión radial media ( $r_{\text{rms}}$ ) corresponde a una estimación de la distancia media que existe entre el centro del núcleo y los contornos de la célula (en  $\mu\text{m}$ ).

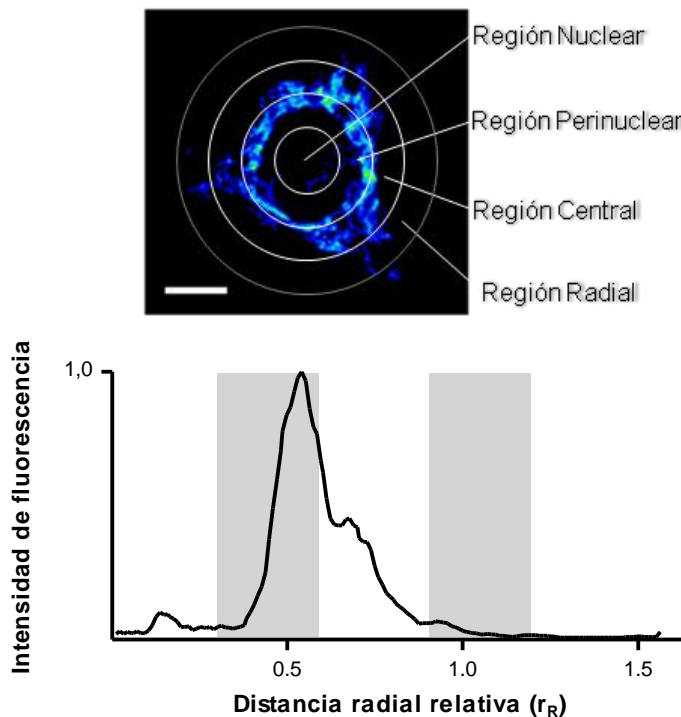
Como indicador de redistribución mitocondrial, se midió la distancia entre el origen y el peak de intensidad de señal. La Figura 15 muestra que la posición donde se encuentra la máxima masa mitocondrial no varió ante estrés de RE luego de 1 h. En cambio, a las 4 h, ésta disminuyó significativamente respecto al control. Esta diferencia desaparece luego a las 20 h. De este resultado podemos concluir que a las 4 h de estrés de RE hay una retracción mitocondrial hacia la región perinuclear, que no ocurre sólo por movimiento de las mitocondrias en la periferia de la célula. Ocurre más bien una reestructuración general de la red, tanto a nivel de su extensión como de su posición.



**Figura 15. Máxima intensidad mitocondrial.**

Células HeLa se sometieron a condición control (barras blancas) o tratadas con tunicamicina (barras negras) por los tiempos indicados. Se grafica la posición relativa del *peak* del perfil radial mitocondrial, como el obtenido en la Figura 14. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). \* indica una diferencia significativa respecto al control ( $p < 0,05$ ).

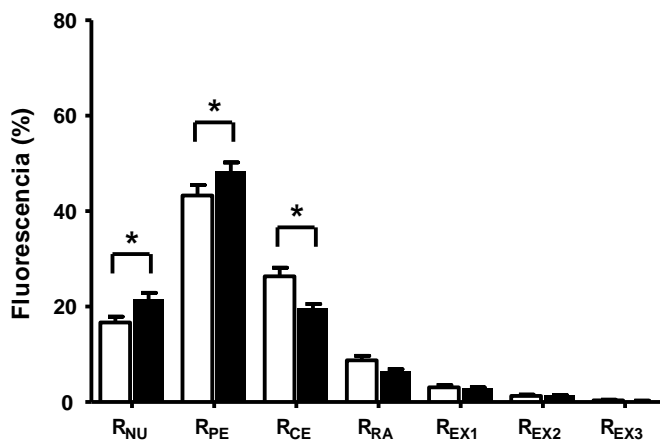
Para caracterizar esta redistribución en el perfil mitocondrial, la distancia radial se dividió en intervalos de 0,3 unidades relativas ( $r_R$ ), y se cuantificó la integral de la curva para cada célula en cada uno de los intervalos (Figura 16). El área total bajo la cada curva se normalizó con un valor de 100 %, de modo que las integrales parciales indiquen el porcentaje de la masa mitocondrial que se ubica en el intervalo.



**Figura 16. Segmentación del perfil mitocondrial.**

En la parte superior se muestra la imagen compilatoria de la red mitocondrial de una célula, teñida con Mitotracker Green. La imagen se dividió en distintas regiones, relativas al tamaño celular. La gráfica inferior muestra el perfil de fluorescencia de la misma célula, apreciándose cómo se distribuye la señal en las regiones señaladas.

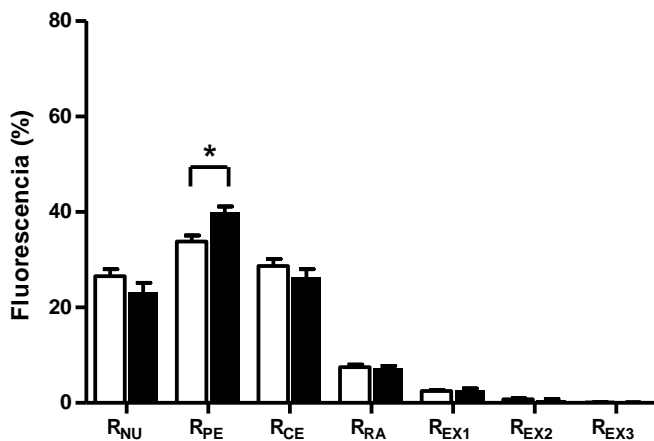
Se analizó la distribución del perfil mitocondrial a los tres tiempos de interés (1, 4 y 20 h); sin embargo, la Figura 17 muestra sólo los cambios que ocurren a las 4 h, pues en los otros dos tiempos, los cambios respecto al control son muy sutiles, o inexistentes. Como puede verse en la gráfica, la fluorescencia mitocondrial se incrementa en las dos primeras regiones (denominadas nuclear y perinuclear). Por otro lado, la fluorescencia se pierde un poco en la tercera región celular (central). Por su parte, no se aprecian cambios en las regiones siguientes (radial, exteriores), probablemente debido a la poca cantidad de señal que hay en ellas.



**Figura 17. Distribución del perfil mitocondrial.** Se muestra el porcentaje de fluorescencia emitida en cada una de las regiones ya designadas. En blanco están las barras de células control, mientras que en negro están las de las tratadas con tunicamicina por 4 h. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). \* indica una diferencia significativa respecto al control ( $p < 0,05$ ).

Los datos están expresados como promedio  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). \* indica una diferencia significativa respecto al control ( $p < 0,05$ ).

Para confirmar este resultado, se realizó el mismo análisis, pero esta vez con células teñidas con tetrametilrodamina, de modo de visualizar preferentemente a aquellas mitocondrias metabólicamente activas. Este análisis se llevó a cabo sólo para el tiempo de 4 h, y, como se muestra en la Figura 18, arroja resultados similares a aquellos obtenidos con Mitotracker Green®. Se aprecia que la fracción de mitocondrias metabólicamente activas se ve enriquecida en la región perinuclear, de manera estadísticamente significativa.

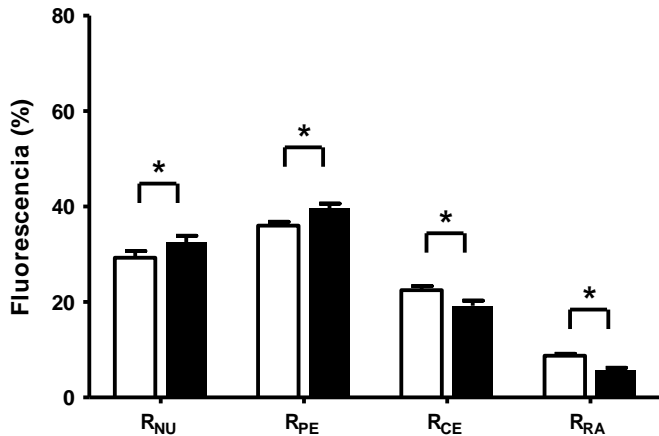


**Figura 18. Distribución del perfil de las mitocondrias metabólicamente activas.** Se muestra en la gráfica el porcentaje de fluorescencia emitida en cada una de las regiones celulares. Blancas son las barras de las células control, y negras las células tratadas con tunicamicina por 4 h. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  SEM (n = 3). \* indica una diferencia significativa respecto al control ( $p < 0,05$ ).

expresados como promedio  $\pm$  SEM (n = 3). \* indica una diferencia significativa respecto al control ( $p < 0,05$ ).

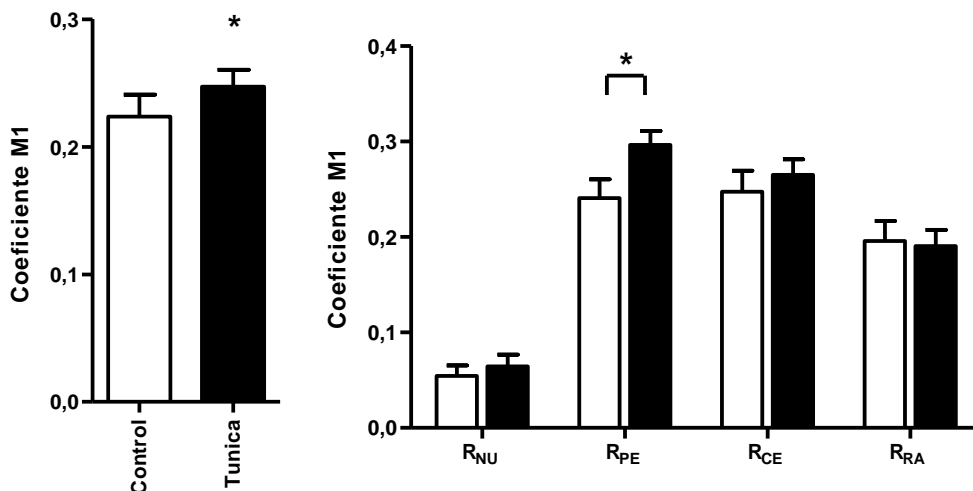
Una vez descritos los cambios en la red mitocondrial, gracias al desarrollo de los análisis morfológicos ya explicados, se procedió a estudiar las características del RE en conjunto con la mitocondria. Para ello, se analizaron por microscopía confocal células HeLa incubadas con Mitotracker Green® y transfectadas con proteína fluorescente roja (*Red Fluorescent Protein*, RFP) destinada a la superficie del retículo endoplásmico. En esta ocasión, las células estuvieron sin tratar o tratadas con tunicamicina por 4 h solamente, y a cada espécimen se registró la fluorescencia de un solo plano en el eje z, siempre a la misma altura respecto al cubreobjetos. Además, se registró la luz transmitida, de modo de obtener una visualización de los contornos de la célula. Las imágenes fluorescentes roja y verde se deconvolucionaron previo al análisis.

Primeramente, se analizó si concomitantemente con los cambios en la red mitocondrial, ocurren cambios en la distribución del RE. Para ello, se realizó el análisis de la distribución del perfil de fluorescencia según regiones, tal como se ejemplifica en la Figura 16. Se muestra en la Figura 19 la distribución del RE, y cómo ésta cambia con el estrés de RE, enriqueciéndose en la región perinuclear en desmedro de las regiones más exteriores. De este modo, durante el estrés de RE, tanto la mitocondria como el RE experimentan desplazamientos, hacia la misma región celular.



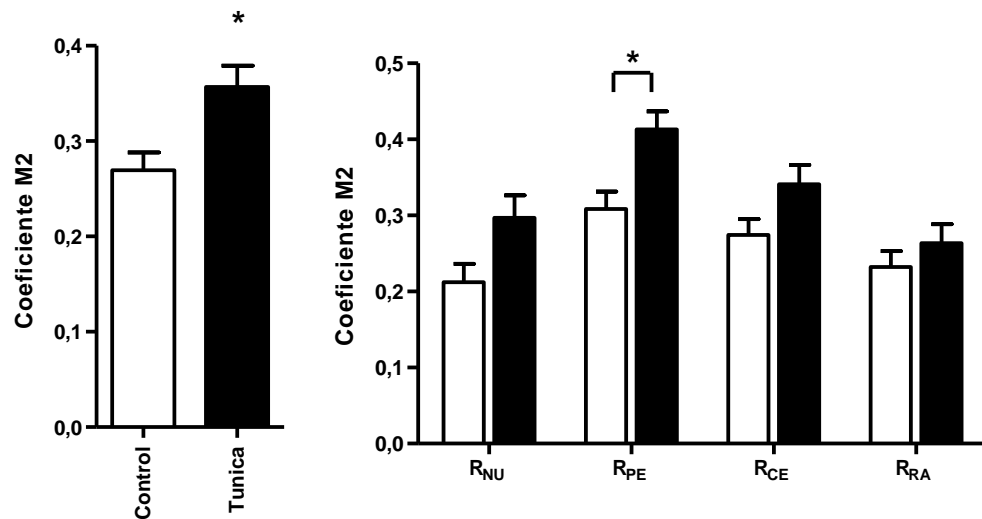
**Figura 19. Distribución del perfil del retículo endoplásmico.** El gráfico muestra el porcentaje de fluorescencia del marcador reticular en cada una de las regiones celulares. En blanco están las barras del control, y en negro las de las células tratadas con tunicamicina por 4 h. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  SEM (n = 4). \* indica una diferencia significativa respecto al control ( $p < 0,05$ ).

Posteriormente, para comprobar que este desplazamiento está asociado con un mayor acoplamiento RE-mitocondria, se procedió a medir la colocalización entre las señales emitidas por ambos organelos. Como medida de colocalización se eligió a los coeficientes de Manders, que miden la fracción de pixeles de una estructura que colocaliza con la otra estructura. Las Figuras 20 y 21 muestran los coeficientes de Manders obtenidos en condición control y sometido a 4 h de tunicamicina.



**Figura 20. Coeficientes de Manders del retículo endoplásmico.** La gráfica de la izquierda muestra los coeficientes de Manders correspondientes al RE (M1), es decir la fracción del total de RE que está colocalizando con la red mitocondrial. Por su parte, la

gráfica de la derecha muestra los coeficientes de Manders del RE (M1), pero esta vez correspondientes a cada una de las regiones predefinidas. En blanco están representadas las células sometidas a la condición control, y en negro las sometidas a tunicamicina por 4 h. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  SEM (n = 4). \* indica una diferencia significativa respecto al control ( $p < 0,05$ ).



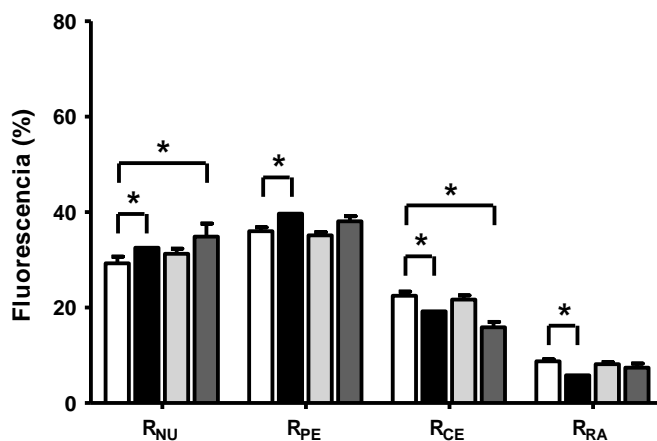
**Figura 21. Coeficientes de Manders de la red mitocondrial.** La gráfica de la izquierda muestra los coeficientes de Manders correspondientes a la mitocondria (M2), esto es, la fracción del total de mitocondria que está colocalizando con el RE. Por su parte, la gráfica de la derecha muestra los coeficientes de Manders de la mitocondria (M2), pero esta vez correspondientes a cada una de las regiones predefinidas. Las barras blancas representan las células control, en tanto que las negras representan las células tratadas con tunicamicina por 4 h. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  SEM (n = 4). \* indica una diferencia significativa respecto al control ( $p < 0,05$ ).

Entonces, tenemos que durante el estrés de RE hay no sólo un desplazamiento, sino también un estrechamiento en los contactos entre retículo endoplásmico y mitocondria, el cual ocurre principalmente en la región perinuclear.

### 6.3. Involucramiento del citoesqueleto en el remodelado organelar

Una vez descritos los eventos que ocurren durante el remodelado organelar en el estrés de RE, se decidió establecer si éstos son responsables de la estimulación metabólica que ocurre también a tiempos tempranos. Para ello, se intervino en el citoesqueleto, debido a que es esta estructura la que sostiene y permite el movimiento tanto del RE como de la mitocondria.

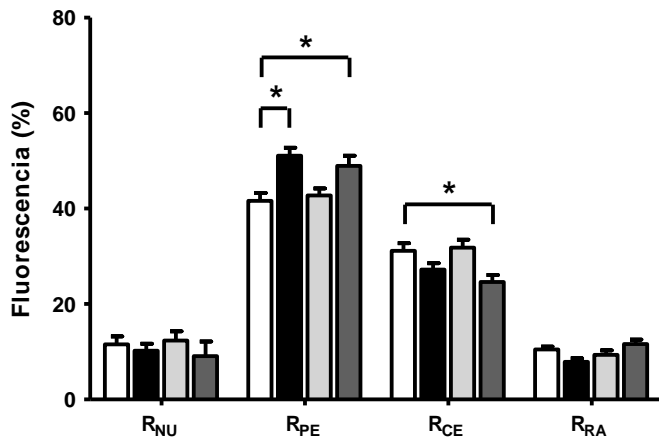
Primeramente, se analizó la importancia de los microfilamentos de actina en el remodelamiento de los organelos. Así, se utilizó citocalasina B por su capacidad de impedir la polimerización de la actina. El tiempo seleccionado para el análisis fue nuevamente 4 h. La citocalasina se usó tanto sola como con tunicamicina, para comprobar si es capaz de impedir la reorganización del RE y de la mitocondria. Las Figuras 22 y 23 muestran que para ambos organelos, la presencia de citocalasina por sí sola no afecta la distribución de fluorescencia, mientras que en presencia de tunicamicina, sigue ocurriendo el remodelado sin problemas. De ello se desprende que el citoesqueleto de actina no es responsable de los cambios organelares que se observan producto de estrés de RE.



**Figura 22. Distribución del RE en presencia de citocalasina B.**

Se muestra la fluorescencia del RE en las distintas regiones celulares. En blanco están las células control, en negro las tratadas con tunicamicina durante 4 h, en gris claro las tratadas con citocalasina B, y en gris oscuro las tratadas con citocalasina y tunicamicina. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n = 3).

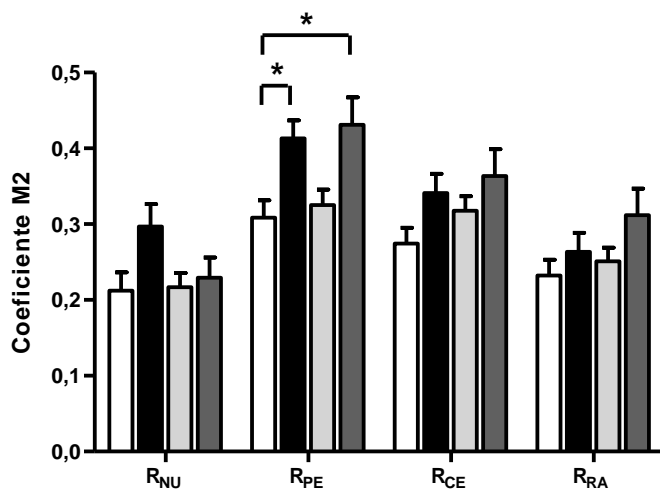
\* indica una diferencia significativa respecto al control.



**Figura 23. Distribución mitocondrial en presencia de citocalasina B.** Se grafica la señal mitocondrial según las regiones celulares. Las barras blancas representan el control no tratado, negras representan el tratado con tunicamicina, en gris claro el tratado con citocalasina B, y en gris oscuro el tratado con citocalasina y tunicamicina. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n = 3). \* indica una diferencia significativa respecto al control.

Posteriormente, a las imágenes de RE y mitocondria ya analizadas se les midió la colocalización. Ello, para determinar cuál es el efecto de la citocalasina sobre el acoplamiento de los organelos, más allá de su capacidad de desplazarse. Como puede apreciarse en la Figura 24, la presencia de citocalasina por sí sola no tuvo efecto sobre la colocalización de ambos organelos. En cambio, en presencia de citocalasina B y tunicamicina, de todas formas ocurre el acercamiento RE-mitocondria en la región perinuclear que es inducido por el estrés de RE, descartando así la participación de microfilamentos de actina en la formación de la interfase interorganelos.

Posteriormente, a las imágenes de RE y mitocondria ya analizadas se les midió la colocalización. Ello, para determinar cuál es el efecto de la citocalasina sobre el acoplamiento de los organelos, más allá de su capacidad de desplazarse. Como puede apreciarse en la Figura 24, la presencia de citocalasina por sí sola no tuvo efecto sobre la colocalización de ambos organelos. En cambio, en presencia de citocalasina B y tunicamicina, de todas formas ocurre el acercamiento RE-mitocondria en la región perinuclear que es inducido por el estrés de RE, descartando así la participación de microfilamentos de actina en la formación de la interfase interorganelos.



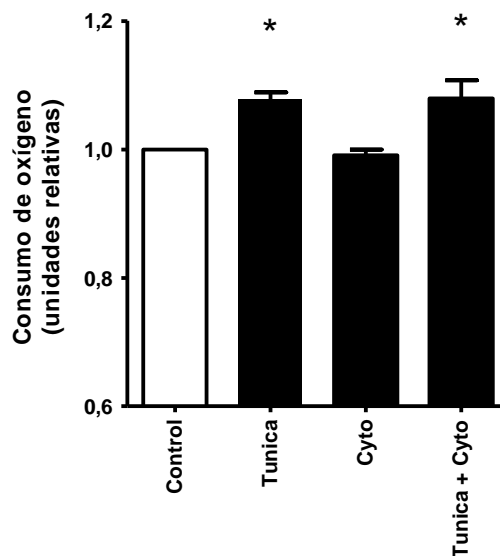
**Figura 24. Citocalasina B no afecta la interfase entre organelos.** La gráfica muestra los coeficientes de Manders correspondientes a la mitocondria (M2), esto es, la fracción del total de mitocondria que está colocalizando con el RE, para cada una de las regiones preestablecidas. En blanco están las células no tratadas, en negro las tratadas con tunicamicina por 4 h, en gris claro, las tratadas con cito-

das, en negro las tratadas con tunicamicina por 4 h, en gris claro, las tratadas con cito-



calasina B sola, y en gris oscuro, las tratadas con tunicamicina y citocalasina. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). \* indica una diferencia significativa respecto al control.

Para comprobar el efecto de citocalasina B sobre el metabolismo, se procedió a medir el consumo de oxígeno en presencia y ausencia de este inhibidor. Nuevamente, el tiempo elegido para el análisis fue de 4h. Para esta determinación hubiese sido lo óptimo medir más bien la cantidad de ATP celular, para tener así una idea general del metabolismo energético. Sin embargo, citocalasina B tiene como efecto aparte, la inhibición de la entrada de glucosa a la célula a través de sus transportadores. Es por ello que la adición del inhibidor afecta de por sí el metabolismo general, y se debió optar por una medición más específica de la mitocondria. La Figura 25 muestra los resultados del experimento, en que se ve que la citocalasina no afecta los niveles basales de respiración mitocondrial, mientras que en presencia de tunicamicina, la citocalasina es incapaz de afectar la estimulación metabólica producida.

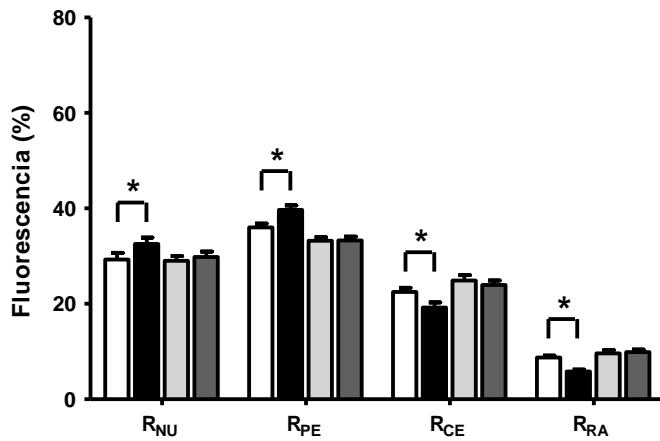


**Figura 25. Citocalasina B no afecta la estimulación metabólica producida por el estrés de RE.** Se muestra la velocidad relativa de consumo de oxígeno, para las distintas condiciones: control no tratado, células con tunicamicina por 4 h (Tunica), citocalasina B (Cyto), o bien tunicamicina y citocalasina en conjunto (Tunica + Cyto). Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM. ( $n = 3$ ). \* indica una diferencia significativa respecto al control.

Ya determinado el rol de los microfilamentos en el acoplamiento RE-mitocondria, se procedió a estudiar cómo los microtúbulos intervienen en el fenómeno. Para ello, se observó nuevamente la redistribución de los organelos inducida por tunicamicina, pero esta vez en presencia o ausencia de nocodazol, un inhibidor de la polimerización de la

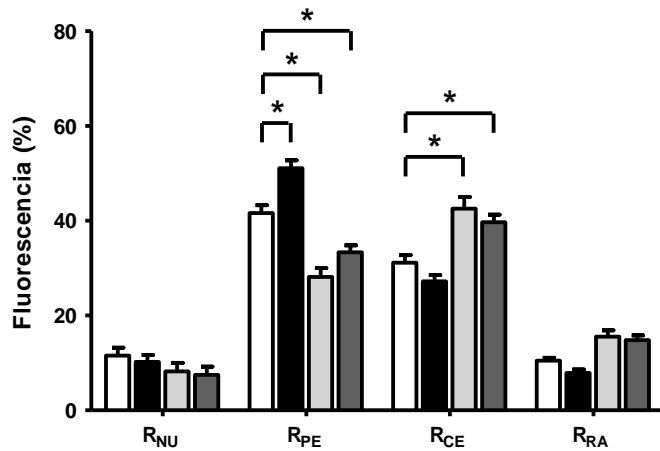
tubulina.

Como puede observarse en las Figuras 26 y 27, a diferencia de la citocalasina, el nocodazol sí afecta la distribución de los organelos. Por parte del RE (Figura 26), éste no se ve afectado por el nocodazol solo; sin embargo, en presencia de tunicamicina, el nocodazol abolió la reorganización inducida por estrés de RE (Figura 19). Para la mitocondria, en cambio, el efecto del nocodazol es más drástico. Se ve en la Figura 27 que el nocodazol por sí solo altera la distribución mitocondrial, disminuyendo su presencia en la región perinuclear y aumentándola en regiones más periféricas. El tratamiento de las células tanto con nocodazol como tunicamicina perturba la distribución mitocondrial de igual manera que el nocodazol solo. Esto significa que los microtúbulos son importantes no sólo para la distribución de la red mitocondrial, sino que también para la reorganización que ocurre en ella producto del estrés de RE.



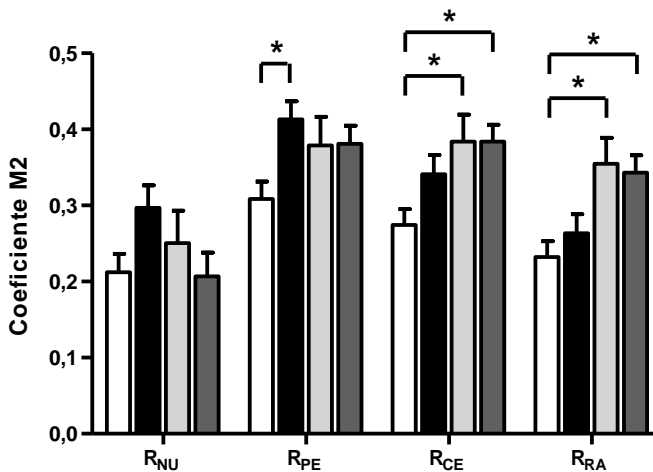
**Figura 26. Distribución del RE en presencia de nocodazol.** Se muestra la fluorescencia del RE según región celular. En blanco se presentan las células no tratadas, en negro las tratadas con tunicamicina por 4 h, en gris claro las tratadas con nocodazol, y en gris oscuro las tratadas con nocodazol y tunicamicina. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). \* indica una diferencia significativa respecto al control.

Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). \* indica una diferencia significativa respecto al control.



**Figura 27. Distribución de la mitocondria en presencia de nocodazol.** Se muestra la fluorescencia mitocondrial en las distintas regiones celulares. En blanco está el control no tratado, en negro el tratado con tunicamicina por 4 h, en gris claro el tratado con nocodazol, y en gris oscuro el tratado con nocodazol y tunicamicina. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n = 3). \* indica una diferencia significativa respecto al control.

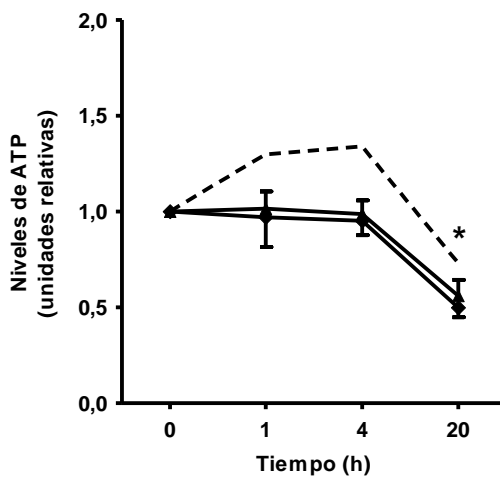
Luego, se midió cómo la colocalización entre los organelos es afectada por el nocodazol, dada su capacidad de alterar su distribución. La Figura 28 muestra los coeficientes de Manders de la mitocondria con el RE, y puede observarse que el nocodazol de por sí ya tiene la capacidad de alterar el acoplamiento entre ambos organelos. La inhibición de la polimerización de microtúbulos hace que la cercanía RE-mitocondria aumente en las regiones más periféricas. Este mismo fenómeno se aprecia en células tratadas con nocodazol y tunicamicina, perdiéndose el estrechamiento perinuclear que ocurre durante el estrés de RE.



**Figura 28. Efecto del nocodazol en la interfase entre organelos.** Se encuentran graficados los coeficientes de Manders correspondientes a la mitocondria (M2). Esto es, la fracción del total de mitocondria que está colocalizando con el RE, para cada una de las regiones designadas. En blanco están las células no tratadas, en negro las tratadas con tunicamicina por 4 h, en gris claro, las tratadas con nocodazol, y en gris

oscuro, las tratadas con tunicamicina y nocodazol a la vez. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). \* indica una diferencia significativa respecto al control.

Ya sabido que el nocodazol altera la distribución mitocondrial, así como el acoplamiento mitocondria-RE, la última tarea fue comprobar el efecto de nocodazol sobre la estimulación metabólica celular. Para ello, se midió la cantidad de ATP en células tratadas con nocodazol en presencia y ausencia de tunicamicina (Figura 29). Los resultados indican que a tiempo largo (20 h), el nocodazol provoca una caída de ATP, probablemente debido a cambios en la viabilidad celular. A tiempos cortos, el nocodazol solo no altera el contenido de ATP celular, al igual que en presencia de tunicamicina. Ello quiere decir que el nocodazol impide el incremento de ATP que se induce producto del estrés de RE. Por lo tanto, los microtúbulos serían una parte importante en la estimulación metabólica, probablemente a través del acercamiento entre los organelos.



**Figura 29. Nocodazol y el incremento de ATP durante estrés de RE.** (▲) indica aquellas células tratadas con nocodazol por 4 h, mientras que (◆) representa a las células tratadas tanto con nocodazol como tunicamicina. La línea punteada representa el aumento de ATP que ocurre por tunicamicina sola.  $N = 4$ . Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). \* indica una diferencia significativa respecto al control ( $p < 0,05$ ).

## 7. DISCUSIÓN

La relevancia de la presente tesis para el estado actual del conocimiento, es que expone el acercamiento de los organelos como una parte de su fisiología relacionada con la adaptación a las condiciones adversas, y por tanto, a la sobrevivencia. Ello, debido a la capacidad mitocondrial de suplir a la célula de la energía necesaria, y del RE para señalizar a través del calcio. Sin embargo, en los últimos años, la interfase RE-mitocondria ha sido estudiada principalmente como una vía de ejecución de la apoptosis, debido al papel que tiene la mitocondria en la decisión de vida y muerte.

Uno de los trabajos más relevantes para analizar, en el contexto de esta tesis, es el de Chami *et al.*, 2008, en el cual se explora el acoplamiento estructural y funcional del RE y mitocondria. El modelo de estudio que utilizan es el estrés de RE inducido en células HeLa por brefeldina A, un compuesto que inhibe el tráfico vesicular entre el RE y el aparato de Golgi, llevando así al acumulación de proteínas en el RE, saturando su capacidad de plegamiento. Esta aproximación es similar a la usada en este trabajo, dado que el inductor de estrés no perturba la homeostasis del calcio celular. En este escenario, los autores observan un incremento temprano en la cercanía RE-mitocondria (a las 3 h), lo cual sería similar a las observaciones realizadas en este trabajo. Junto con ello, los investigadores encontraron un incremento en la transferencia de calcio hacia la mitocondria, que ocurre más bien a tiempos tardíos (16 h). Estos acontecimientos los atribuyen a una proteína del RE S1T, una isoforma truncada de SERCA1, que aumenta los contactos RE-mitocondria gracias a la liberación de calcio que genera, al actuar como una especie de canal.

S1T es una proteína que es inducida por el estrés de RE en una forma bifásica: a un tiempo bastante temprano (1 h) aumenta su masa, pero vuelve rápidamente a sus niveles basales; luego, a un tiempo más tardío (16 h) vuelve a inducirse por segunda vez. Esta nueva aparición sería, al parecer, responsable en gran medida de la comunicación proapoptótica hacia la mitocondria. Estos datos se complementan con

los obtenidos en el presente trabajo, permitiendo formular un modelo integrado sobre el comportamiento celular frente al estrés de RE. Primeramente, la célula incrementa los contactos RE-mitocondria, y favorece la transferencia de calcio entre ambos organelos, como una medida pro-vida, que conduce a la generación de energía y a sobreponerse a la condición de estrés. Si la condición de estrés se vuelve crónica, entonces la entrada de calcio a la mitocondria se vuelve sostenida y excesiva, llevando a la permeabilidad mitocondrial y así a la apoptosis.

Dado este modelo, se postula en este trabajo que la comunicación RE-mitocondria que ocurre en las etapas tempranas del estrés de RE es a través de la transferencia de calcio. Ello se ve fuertemente apoyado por el hecho que el calcio es uno de los estimuladores del ciclo de Krebs [Jouaville *et al.*, 1999], y así, permitiría el aumento en el ATP y en el consumo de oxígeno aquí observados. Además, es un hecho conocido que durante el estrés de RE hay un incremento en el calcio mitocondrial, que se vuelve proapoptótico a tiempos tardíos. Sin embargo, aún falta por demostrarse que sea el calcio la vía de señalización que ocurre durante los tiempos tempranos de estrés de RE. Para ello, se requeriría de nuevos experimentos, como por ejemplo, comparar las señales de calcio mitocondrial generadas desde el RE tanto en condición control como ante estrés de RE. Se esperaría que la eficiencia de la transferencia de calcio se vea incrementada durante las etapas tempranas de estrés de RE. Otro experimento necesario será observar si la estimulación metabólica que ocurre por estrés de RE se ve abolida al inhibir el ingreso de calcio a la mitocondria. De esta forma, se podría discernir si es realmente el calcio el responsable de la activación energética que experimenta la mitocondria.

La posibilidad de que el calcio esté involucrado tanto en la promoción de la apoptosis como de la supervivencia celular no es para nada extraña. Después de todo, el calcio es un ión usado por todas las células para entregar una cantidad bien diversa de mensajes. En ese sentido, podemos considerar al calcio como un mensajero intracelular, pero los verdaderos responsables de qué mensaje será codificado, son las proteínas encargadas de producir las señales y también aquellas encargadas de ejecutar las acciones evocadas por el ión. En ese sentido, se puede suponer que el

calcio es un actor que participa en la señalización temprana del estrés de RE, debido al hallazgo de Chami *et al.*, 2008. El hecho que la proteína S1T varíe en cantidad a tiempos cortos sugiere que los mecanismos encargados de la homeostasis del calcio están siendo remodelados, y por tanto, los mensajes que el calcio transmite también varían a lo largo del tiempo.

Sin embargo, no son sólo proteínas las que determinan la forma de las señales de calcio. Éste también está moldeado por aspectos espacio-temporales, que son los que finalmente darán coherencia al mensaje transmitido. Es por ello que, en la transferencia de calcio RE-mitocondria, si se varía el acoplamiento espacial entre ambos organelos, se espera por supuesto una remodelación en la eficiencia con que ocurre esta conversación. Sin embargo, para que el remodelado transduccional tenga sentido, tanto las proteínas como los aspectos espacio-temporales deben actuar en forma conjunta. Esa es la situación que se espera para la condición de estrés de RE, en la cual, por un lado hay un estrechamiento en la interfase RE-mitocondria, que es concomitante con el aumento de S1T, encargada de liberar calcio hacia la mitocondria.

Uno de los aspectos abordados en esta tesis, que han sido poco considerados hoy en día es la distribución radial con que ocurren los cambios subcelulares. Esto es, el uso de regiones radiales para evaluar tanto la posición como la colocación de los organelos. Esta aproximación permite darse cuenta que los eventos dentro de la célula presentan una heterogeneidad espacial, de los cuales a veces no es posible percatarse si se analiza la célula como un todo. Ejemplo de ello ocurrió al evaluar colocación entre organelos (Figuras 20 y 21). Al analizar los coeficientes de Manders de la célula total se aprecia que existe un aumento en el acoplamiento interorganelar; sin embargo, al analizar las regiones radiales, uno puede darse cuenta que este enriquecimiento en acoplamiento espacial ocurre con preferencia en cierta región. No sólo eso, esta aproximación entrega un indicador cuantitativo del aumento en asociación, aspecto que es muy valioso, pues los métodos más populares usados hoy en día para analizar espacialidad de distribuciones subcelulares son poco rigurosos, pues se basan en criterios cualitativos evaluados a simple vista.

Este análisis radial, a pesar de ser ésta la primera vez que es usado, ha arrojado un resultado que tiene asidero en la literatura. En este trabajo se ha encontrado que el acoplamiento RE-mitocondria se ve favorecido en la región perinuclear ante la condición de estrés de RE, similar a lo encontrado en Darios *et al.*, 2005, donde también se encontró un acercamiento perinuclear frente a una condición adversa, como lo es la exposición a ceramida.

Otro aspecto de la biología celular que se aborda en la presente tesis es la relevancia del citoesqueleto en la distribución del RE y de la mitocondria. Del primero, se conoce ya que descansa sobre los microtúbulos, aunque mantiene su estructura hasta cierto punto en forma independiente. Además, su movimiento (extensión-retracción) también está dado por los microtúbulos como guías [Terasaki *et al.*, 1986]. Por su parte, la mitocondria en células eucariontes también utiliza los microtúbulos para dirigir su movimiento, tanto para alejarse del centro celular (movimiento anterógrado), como para dirigirse hacia él (movimiento retrógrado). Además, la mitocondria se vale en cierta medida de los microfilamentos de actina para lograr su desplazamiento, usándolos como guías de desplazamiento o como puntos de anclaje [Frederick & Shaw, 2007]. En este trabajo se observó que la disrupción del citoesqueleto de actina durante 4 h no afecta visiblemente la distribución de los organelos. Ello sería indicativo de que la distribución organelar depende principalmente de los microtúbulos, apoyando lo que ya se sabe por literatura, mientras que los microfilamentos tendrían un rol que puede ser compensado por los microtúbulos, o bien, que atañe a otros aspectos de la topología subcelular. Por ejemplo, podemos decir que el análisis realizado se centra en la distribución radial de los organelos, esto es, su posición basada en la distancia al núcleo. Por ello, se escapan de este análisis los eventos relacionados con la distribución lateral del RE y la mitocondria, como por ejemplo la ramificación de los túbulos del RE, o el movimiento mitocondrial no dirigido en el eje núcleo-periferia. Entonces, no se puede descartar por completo la participación de la actina en la interfase RE-mitocondria, aunque claramente son los microtúbulos las grandes estrellas en cuanto a su establecimiento.

La disrupción de los microtúbulos de por sí condujo a cambios en la distribución



mitocondrial, desplazándola hacia la región periférica. Del mismo modo, los contactos RE-mitocondria se vieron enriquecidos en las zonas periféricas. Sin embargo, estos contactos probaron no ser útiles para aumentar la generación de energía, como ocurrió con el estrechamiento perinuclear. Esto debe ser consecuencia de que el RE presenta heterogeneidad en su estructura, y por tanto las regiones periféricas que la mitocondria contactó no tienen la misma actividad transduccional que las regiones perinucleares, perdiéndose así la estimulación metabólica observada. Frente a este resultado, surgen dos nuevas preguntas: ¿por qué las mitocondrias migran hacia la región periférica?, y ¿por qué en esas zonas se contactan de todas formas con el RE?. En cuanto a la primera interrogante, tenemos por un lado que las mitocondrias se distribuyen gracias a los microtúbulos, y además, que éstas están concentradas en la región perinuclear en forma basal (Figura 17). Entonces, al desorganizar la red de microtúbulos, se pierde este enriquecimiento normal en la región perinuclear, y las mitocondrias se distribuyen en forma más homogénea dentro de la célula (Figura 27). Respecto al enriquecimiento periférico de los contactos RE-mitocondria, se debe pensar que este estrechamiento no ocurre por simple cercanía entre membranas, sino que existe un conjunto de proteínas y mensajeros que organizan la interfase. Así, con el estrés de RE, los complejos de acoplamiento se van ensamblando en la superficie de los organelos a lo largo de toda la célula. Entonces, las zonas de contacto entre RE-mitocondria se forman donde los organelos se encuentren, y como las mitocondrias se han enriquecido en las regiones periféricas, es allí donde se va a observar el mayor aumento en contactos.

El hecho que sean las regiones perinucleares las involucradas en la generación de energía en vez que las regiones periféricas puede dar una pista acerca de cuál es el principal destino de ese ATP. Por un lado está el plegamiento proteico en el RE, que como ya se estableció, requiere energía. Por tanto, una opción para explicar el movimiento mitocondrial a la región perinuclear sería para dispensar ATP a las zonas del RE rugoso, donde toma lugar el plegamiento de las proteínas nacientes. Además, durante el estrés de RE, la síntesis proteica se ve disminuida, lo que haría que la demanda de ATP sea menor. De esta forma, la mitocondria aporta mayor energía, mientras el RE disminuye sus requerimientos en forma simultánea, lo que produce que el ATP se acumule, que es el efecto observado finalmente. Sin embargo, el

plegamiento de proteínas clientes del RE no es el único proceso que podría dar cuenta del requerimiento aumentado de ATP en la región perinuclear. Durante el estrés de RE se producen una serie de cambios en la expresión génica, dando pie a la expresión de chaperonas, proteínas de respuestas a estrés, proteínas involucradas en la decisión de vida o muerte y factores de crecimiento. Todo este proceso transcripcional en el núcleo y posteriormente traduccional en las regiones perinucleares podría contribuir a las necesidades aumentadas de ATP.

Reconocer a qué fenómenos atribuir el mayor requerimiento de ATP es una de las proyecciones de esta tesis. Para poder discernir cuál de las posibilidades tiene más peso, se puede realizar una inhibición de los procesos de transcripción y traducción, resolviendo así si éstos son importantes consumidores de ATP durante el estrés de RE, o están más bien apagados frente a condiciones adversas. Otra aproximación interesante sería realizar el análisis radial para ver en qué zonas efectivamente es donde la cantidad de ATP aumenta, como por ejemplo la región perinuclear o el núcleo celular mismo. Para ello se requiere de un indicador de ATP que sea sensible por microscopía, como por ejemplo una luciferasa que se distribuya a lo largo de toda la célula, a la vez de poseer un equipo óptico adecuado.

Desde un punto de vista más fisiológico, esta tesis aborda no sólo el remodelado subcelular frente a una condición de estrés, sino que estudia el comportamiento de una línea celular tumoral sometida a un ambiente adverso. Desde esta óptica, la condición de estrés de RE cobra un sentido bastante valioso. Es sabido que los tumores sólidos al crecer en forma exagerada en condiciones no apropiadas, ven reducida su irrigación sanguínea. Así, el aporte de nutrientes se ve disminuido, así como la remoción de desechos, lo que finalmente llevará a la condición de hipoxia [Denko, 2008]. Por su parte, es sabido que la hipoxia es un agente inductor de estrés de retículo, pues afecta las condiciones de plegamiento en el retículo endoplásmico. Así, al usar una línea celular cancerígena para estudiar los mecanismos de defensa contra el estrés de RE, se están estudiando las vías que tiene el cáncer para adaptarse a sus etapas tempranas como tumor.

Resulta entonces contradictorio de este trabajo el hecho de que la mitocondria esté implicada en la adaptación de la célula tumoral. Ello, debido a que los tumores más agresivos, esto es, los más eficientes en cuanto a proliferación, son los que tienen su actividad mitocondrial disminuida. Como mecanismo de defensa contra la hipoxia, se establece una situación en que se favorece la obtención de energía a través de la glicólisis anaeróbica en el citoplasma, en desmedro de la fosforilación oxidativa en la mitocondria [Denko, 2008]. De esta forma, los tumores logran disminuir el consumo de oxígeno, y así, proliferar en forma más eficiente e independiente de este gas. Este paradigma, ampliamente aceptado, ve en este trabajo una nueva arista inexplorada. La mitocondria, si bien puede estar relegada a un segundo plano, retiene su capacidad plástica, y se adapta a las necesidades de la célula. La arquitectura organelar es capaz de moldearse para dispensar energía en lugares estratégicos durante las etapas tempranas del estrés de RE. Posteriormente, la mitocondria pierde protagonismo, lo cual se aprecia en lo transitoria que es la estimulación mitocondrial (Figuras 6 y 10). Lo que probablemente ocurra sea que esta inicial remodelación RE-mitocondria aporte la energía para realizar cambios generales en la célula, a nivel de expresión génica, permitiendo así la reestructuración metabólica necesaria para mantener el funcionamiento a largo plazo ante condiciones adversas.

## 8. CONCLUSIONES

Del presente trabajo se pueden concluir ciertos aspectos de la fisiología celular que permanecían inexplorados hasta ahora. Primeramente, se describió un incremento en el metabolismo celular que ocurre tempranamente ante la condición de estrés de RE. Esta estimulación energética tiene por responsable a la mitocondria, que aumenta su potencial, producción de ATP y consumo de oxígeno, probablemente para compensar la mayor demanda homeostática impuesta por la condición de estrés. Sin embargo, los experimentos realizados no pueden descartar que la glicólisis anaeróbica haga cierta contribución al fenómeno. Para explorar esta posibilidad, se vuelven necesarios nuevos experimentos, usando otros inhibidores de la glicólisis.

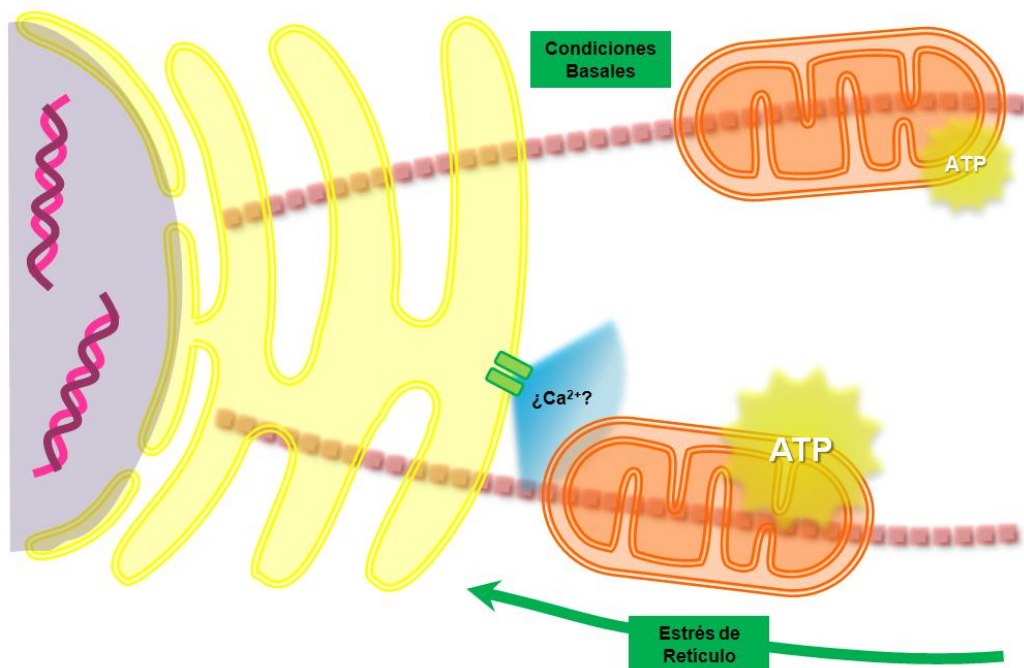
Además de los cambios energéticos, la adaptación al estrés trae consigo un remodelado intracelular que involucra tanto al RE como a la mitocondria. Ambos organelos, gracias a su capacidad plástica y de desplazamiento, presentaron un desplazamiento hacia la región perinuclear, alejándose de los extremos celulares. Este enriquecimiento alrededor del núcleo, no corresponde sólo a la masa de ambos compartimentos, sino también a los contactos que establecen entre sí. Así se evidenció por los coeficientes de Manders aplicados a regiones radiales, que es un método de análisis desarrollado especialmente para esta tesis.

Junto con explorar la interfase entre RE y mitocondria, se estudiaron sus determinantes del citoesqueleto, y su importancia para la estimulación metabólica descrita inicialmente. Se observó que al alterar los filamentos de actina no se ve comprometida ni la estimulación metabólica ni el desplazamiento ni el acoplamiento entre organelos, descartándose así como un componente imprescindible para la estructuración de los contactos RE-mitocondria. Los microtúbulos formados por tubulina, en cambio, demostraron ser de importancia capital para la estructuración de los organelos. La disrupción de los microtúbulos con nocodazol impidió la activación metabólica impuesta por el estrés de RE. Además, su uso alteró la distribución de la

mitocondria, llevándola hacia las zonas más periféricas de la célula. Del mismo modo, los contactos entre los organelos se vieron desplazados también hacia los contornos celulares, contrario a lo que ocurre normalmente frente a estrés de RE. Ello se puede explicar por el hecho que los microtúbulos son importantes para el anclaje de los organelos [Estrada de Martin *et al.*, 2005; Frederick & Shaw, 2007], por lo tanto, al desorganizarlos, se desorganiza también la arquitectura celular, y con ello, la interfase RE-mitocondria.

De esta forma, se ha descrito cómo varía la cercanía entre dos de los organelos más importantes de la célula, cómo esta cercanía es importante para la respuesta celular al estrés de RE, y cómo depende del soporte brindado por los microtúbulos.

La Figura 30 muestra un esquema de las conclusiones obtenidas en este trabajo.



**Figura 30. Cercanía RE-mitocondria y generación de ATP.** En condiciones basales (parte superior) la producción de ATP por parte de la mitocondria obedece a las necesidades básicas de la célula. Ante estrés de RE (parte inferior), la distancia entre la mitocondria y el RE se estrecha, para permitir una mayor producción de ATP en la mi-

tocondria, acorde con los mayores requerimientos energéticos de la célula. El desplazamiento de los organelos ocurre a lo largo de los microtúbulos, hacia la región perinuclear. Se postula que el acercamiento de los organelos ocurre para favorecer la transferencia de calcio desde el RE a la mitocondria, el cual tiene actividad estimulante sobre el ciclo de Krebs.

## 9. REFERENCIAS

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 5<sup>a</sup> ed. New York, Garland Sciences, 2008. 1392p.
2. Benard G, Rossignol R. Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics. *Antioxid Redox Signal* 10:1313-42, 2008.
3. Berridge MJ. Calcium microdomains: Organization and function. *Cell Calcium* 40:405-412, 2006.
4. Chami M, Oulès B, Szabadkai G, Tacine R, Rizzuto R, Partelini-Bréchet P. Role of SERCA1 truncated isoform in the proapoptotic calcium transfer from ER to mitochondria during ER stress. *Mol Cell* 32:641-51, 2008.
5. Chen H, Chan DC. Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum Mol Genet* 14:283-9, 2005.
6. Csordás G, Renken C, Várnai P, Walter L, Weaver D, Buttle KF, Balla T, Mannella CA, Hajnóczky G. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J Cell Biol* 174:915-21, 2006.
7. Darios F, Muriel MP, Khondiker ME, Brice A, Ruberg M. Neurotoxic calcium transfer from endoplasmic reticulum to mitochondria is regulated by cyclin-dependent kinase 5-dependent phosphorylation of Tau. *J Neurosci* 25:4159-68, 2005.
8. Demarex N, Distelhorst C. Cell biology. Apoptosis-the calcium connection. *Science* 300:135-9, 2003.
9. Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer* 8:705-13, 2008.
10. Deniaud A, Sharaf el dein O, Maillier E, Poncet D, Kroemer G, Lemaire C, Brenner C. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene* 27:285-99, 2007.
11. Duchen MR. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol* 529:57-68, 2000.
12. Estrada de Martin P, Novick P, Ferro-Novick S. The organization, structure, and inheritance of the ER in higher and lower eukaryotes. *Biochem Cell Biol* 83:752-61, 2005.
13. Frederick RL, Shaw JM. Moving mitochondria: establishing distribution of an essential organelle. *Traffic* 8:1668-75, 2007.
14. Hajnóczky G, Davies E, Madesh M. Calcium signaling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 304:445-54, 2003.
15. Heal RD, McGivan JD. Induction of the stress protein Grp75 by amino acid

- deprivation in CHO cells does not involve an increase in Grp75 mRNA levels. *Biochim Biophys Acta* 1357:31-40, 1997.
16. Høyer-Hansen M, Bastholm L, Szyniarowski P, Campanella M, Szabadkai G, Farkas T, Bianchi K, Fehrenbacher N, Elling F, Rizzuto R, Mathiasen IS, Jäättelä M. Control of macroautophagy by calcium, Calmodulin-Dependent Kinase Kinase-b, and Bcl-2. *Mol Cell* 25:193-205, 2007.
  17. Ito Y, Pandey P, Mishra N, Kumar S, Narula N, Kharbanda S, Saxena S, Kufe D. Targeting of the c-Abl tyrosine kinase to mitochondria in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 21:6233-42, 2001.
  18. Jouaville LS, Pinton P, Bastianutto C, Rutter GA, Rizzuto R. Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: Evidence for a long-term metabolic priming. *PNAS* 96:13807-12, 1999.
  19. Kaasik A, Veksler V, Boehm E, Novotova M, Minajeva A, Ventura-Clapier R. Energetic crosstalk between organelles: architectural integration of energy production and utilization. *Circ Res* 89:153-9, 2001.
  20. Kim R, Emi M, Tanabe K. Role of mitochondria as the gardens of cell death. *Cancer Chemother Pharmacol* 57:545-53, 2006.
  21. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87:99-163, 2007.
  22. Liu Y, Liu W, Song XD, Zuo J. Effect of GRP75/mthsp70/PBP74/mortalin overexpression on intracellular ATP level, mitochondrial membrane potential and ROS accumulation following glucose deprivation in PC12 cells. *Mol Cell Biol* 268:45-51, 2005.
  23. Perl M, Chung C, Ayala A. Apoptosis. *Crit Care Med* 33:S526-9, 2005.
  24. 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<sup>2+</sup> responses. *Science* 280:1763-6, 1998.
  25. Schröder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mut Res* 569:29-63, 2005.
  26. Stiban J, Caputo L, Colombini M. Ceramide synthesis in the endoplasmic reticulum can permeabilize mitochondria to proapoptotic proteins. *J Lipid Res* 49:625-34, 2008.
  27. Szabadkai G, Simoni AM, Chami M, Wieckowski MR, Youle RJ, Rizzuto R. Drp-1-dependent division of the mitochondrial network blocks intraorganellar Ca<sup>2+</sup> waves and protects against Ca<sup>2+</sup>-mediated apoptosis. *Mol Cell* 16:59-68, 2004.
  28. Szabadkai G, Bianchi K, Várnai P, De Stefani D, Wieckowski MR, Cavagna D, Nagy AI, Balla T, Rizzuto R. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> channels. *J Cell Biol* 175:901-11, 2006.
  29. Terasaki M, Chen LB, Fujiwara K. Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. *J Cell Biol* 103:1557-68, 1986.



30. Vance JE. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J Biol Chem* 256:7248-56, 1990.
31. Varadi A, Cirullib V, Rutter GA. Mitochondrial localization as a determinant of capacitative Ca<sup>2+</sup> entry in HeLa cells. *Cell Calcium* 36:499-508, 2004.
32. Voeltz GK, Rolls MM, Rapoport TA. Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep* 3:944-50, 2002.
33. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 115:2656-64, 2005.
34. Yi M, Weaver D, Hajnóczky G. Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: a homeostatic circuit. *J Cell Biol* 167: 661-72, 2004.
35. Yorimitsu T, Nair U, Yang Z, Klionsky DJ. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J Biol Chem* 281:30299-304, 2006.
36. Yoshida H. ER stress and diseases. *FEBS J* 274:630-58, 2007.