



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EFFECTO DEL PEROXIDO DE HIDROGENO EN LA ADHESION  
DE FIBROBLASTOS L929 A VITRONECTINA.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

**ADRIANA MEJIA HERNANDEZ**



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

MEXICO, D. F.

2005

m341804



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Raúl Aguilar Caballero
Vocal	Profa. Luz del Carmen Castellanos Román
Secretario	Prof. Marco Antonio Velasco Velázquez
1er. Suplente	Profa. Herminia De Jesús Loza Tavera
2º. Suplente	Profa. Criselda Mendoza Milla

Sitio donde se desarrollo el tema: Laboratorio de Farmacología Molecular,  
Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM.

El presente trabajo fue financiado parcialmente por el proyecto PAPIIT  
IN230202 (DGAPA- UNAM). Adicionalmente, Adriana Mejía Hernández contó  
con una beca obtenida de dicho proyecto.

Asesor de tema:

Q.F.B. Marco Antonio Velasco Velázquez

Sustentante:

Adriana Mejía Hernández

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la  
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el  
contenido de mi trabajo recepcional.  
NOMBRE: Adriana Mejía Hernández  
FECHA: \_\_\_\_\_  
FIRMA: \_\_\_\_\_

*D*edico esta tesis a toda mi familia, en especial a mi mamá María, a mi hermano Edgar, a mi papá Enrique y a mi amigo INRI.

*A*gradezco a todas y todos los que se cruzaron en este interesante recorrido universitario y que, por lo tanto, son parte de mi.

*Muchas gracias*

*Adriana*

# Efecto del peróxido de hidrógeno en la adhesión de fibroblastos L929 a vitronectina.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
I. ANTECEDENTES.....	2
<b>1. Especies Reactivas de oxígeno.....</b>	<b>2</b>
1.1 Generación de ERO.....	2
1.1.1 Peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	5
1.1.2 Radical hidroxilo (OH <sup>•</sup> ).....	5
1.1.3 Anión superóxido (O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> ).....	6
1.2 Efecto de las ERO en la célula.....	6
1.2.1 Estrés oxidativo.....	7
1.2.2 Defensa antioxidante.....	8
1.3 Efecto de las ERO en la transducción de señales.....	9
1.3.1 Mecanismos de acción de las ERO sobre la transducción de señales..	11
<b>2. Adhesión celular.....</b>	<b>18</b>
2.1 Integrinas.....	19
2.1.1 Vías de señalización dependientes de integrinas.....	20
2.2 Efecto de las ERO sobre la adhesión mediada por integrinas.....	22
2.3 Participación de paxilina en la señalización dependiente de integrinas.....	24
2.3.1 Efecto de las ERO sobre paxilina.....	26
<b>3. El citoesqueleto de actina.....</b>	<b>28</b>
3.1 Efecto de las ERO sobre el citoesqueleto de actina.....	28
<b>4. Participación de MAPK p38 en el rearreglo del citoesqueleto de actina y la adhesión.....</b>	<b>30</b>
II. HIPÓTESIS.....	32
III. OBJETIVOS.....	33
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	34
V. RESULTADOS.....	38
VI. DISCUSIÓN.....	45
VII. CONCLUSIONES.....	50
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	51

## I. RESUMEN.

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) han sido identificadas recientemente como mediadores importantes en la regulación de la actividad de diferentes proteínas involucradas en procesos de señalización indicando que pueden participar en el control de la apoptosis, la adhesión, la proliferación o la migración celular. La adhesión celular es un proceso fundamental que regula la organogénesis y la diferenciación en organismos eucariontes. Su función es mantener la arquitectura tisular, al mismo tiempo que transmite señales. Se ha descrito que el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) modifica la adhesión de diferentes estirpes celulares. Los mecanismos involucrados no se conocen claramente, por lo que en el presente proyecto se analizó el efecto del tratamiento *in vitro* con  $H_2O_2$  en la adhesión a vitronectina, el rearrreglo del citoesqueleto de actina, la distribución de paxilina y fosforilación en residuos de tirosina de paxilina de fibroblastos L929 con el propósito de analizar el mecanismo por el cual el  $H_2O_2$  regula la adhesión.

Los resultados indican que: 1) el  $H_2O_2$  200  $\mu$ M disminuye la adhesión (80%) de fibroblastos L929 a vitronectina; 2) la adición simultánea del antioxidante NAC 5 mM previene el efecto inducido por  $H_2O_2$ ; 3) los efectos de  $H_2O_2$  y NAC en la adhesión involucran modificaciones en el rearrreglo del citoesqueleto de actina y en la redistribución de paxilina; 4) en este modelo, MAPK p38 participa en la desorganización del citoesqueleto de actina producido por  $H_2O_2$ , pero no en la regulación del proceso de adhesión y 5) los tratamientos con  $H_2O_2$  y  $H_2O_2$ /NAC no modifican la activación de paxilina mediada por fosforilación en residuos de tirosina.

El esclarecimiento del mecanismo por el cual el  $H_2O_2$  y otras ERO regulan la adhesión mediada por integrinas podría justificar el uso de antioxidantes como tratamientos adyuvantes para el tratamiento de patologías relacionadas con las ERO como el cáncer, la aterosclerosis, el síndrome de Alzheimer y el proceso neurodegenerativo.

## II. ANTECEDENTES

### 1. Especies Reactivas de Oxígeno.

El oxígeno molecular ( $O_2$ ) es indispensable para la supervivencia de los organismos aerobios. Durante el metabolismo aerobio se llevan a cabo reacciones de óxido-reducción que convierten la energía proveniente del transporte mitocondrial de electrones en enlaces fosfato de alta energía presentes en moléculas como el ATP. El complejo mitocondrial citocromo C oxidasa cataliza la reducción del  $O_2$  a  $H_2O$ . La reducción parcial del oxígeno durante estas reacciones genera metabolitos altamente reactivos; como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ). Estos metabolitos parcialmente reducidos reciben el nombre de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Thannickal, 2000).

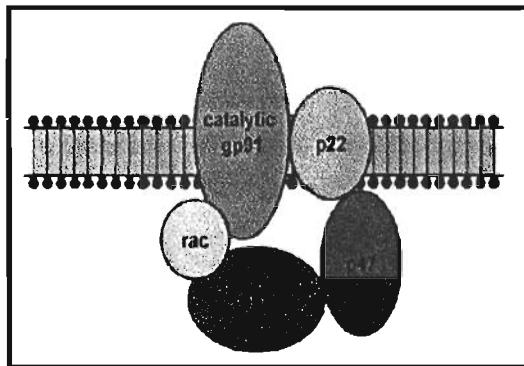
#### 1.1 Generación de ERO.

Las ERO pueden ser producidas por fuentes endógenas y exógenas (Tabla 1). Las fuentes endógenas incluyen: el metabolismo mitocondrial (fosforilación oxidativa), el metabolismo de P450, peroxisomas y células activadas que regulan la respuesta inflamatoria.

**Tabla 1. Generación de ERO**

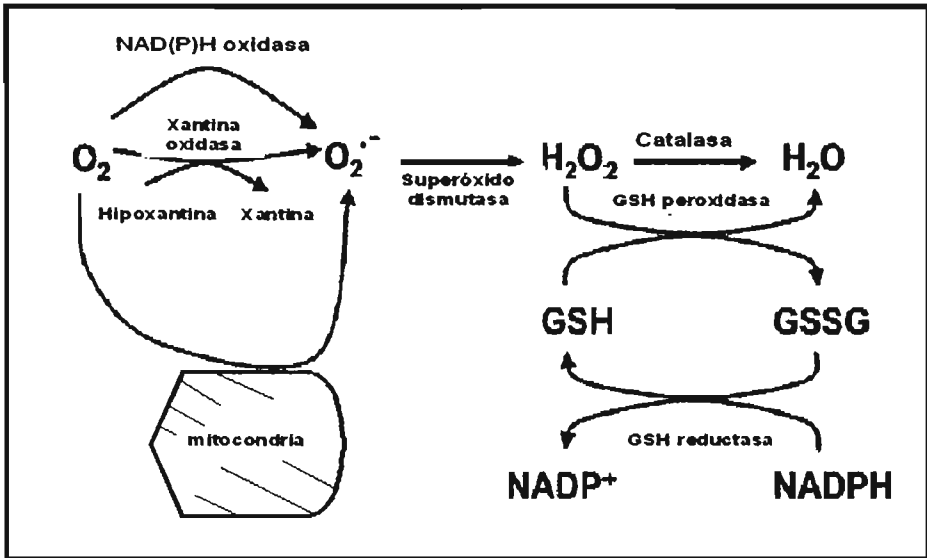
OXIDANTES CELULARES	FUENTE	ESPECIES OXIDANTES
Endógenos	Mitocondria Citocromo P450 Células inflamatorias Peroxisomas	$O_2^{\cdot-}$ , $H_2O_2$ , $^{\cdot}OH$ $O_2^{\cdot-}$ , $H_2O_2$ $O_2^{\cdot-}$ , $H_2O_2$ $H_2O_2$
Exógenos	Metales (reacción de Fenton) Radiación	$^{\cdot}OH$ $^{\cdot}OH$

Durante el metabolismo mitocondrial, alrededor del 4 % del consumo total de oxígeno se utiliza en la generación de ERO. Las oxidoreductasas asociadas a membranas son otra fuente importante de generación de ERO. Las más estudiadas son la familia P450 y b5, que oxidan ácidos grasos insaturados o xenobióticos y reducen el  $O_2$  formando  $H_2O_2$  y/o  $O_2^{\cdot-}$ . Otro sistema enzimático muy activo en la producción de ERO es el complejo asociado a la membrana plasmática, NADPH oxidasa. Este complejo produce  $O_2^{\cdot-}$  mediante la reducción de oxígeno utilizando NADPH como donador de electrones (Esquema 1). La xantina oxidasa, aldehído oxidasa, flavoproteín deshidrogenasa y triptofano dioxigenasa, son otros ejemplos de enzimas que pueden generar ERO durante su ciclo catalítico (Freeman, 1982) (Esquema 2).



**Esquema 1. Estructura del complejo NADPH oxidasa.** El complejo está formado por varias subunidades: p22 y la subunidad catalítica gp91 (localizadas en vesículas membranales) y también por p47, p67 y la GTPasa Rac (localizadas en el citoplasma). Modificado de Dröge.





**Esquema 2. Vías de producción y eliminación de ERO.**

El metabolismo mitocondrial o enzimas como la xantina oxidasa y el complejo NAD(P)H oxidasa generan anión superóxido, el cual es convertido a peróxido de hidrógeno por acción de la superóxido dismutasa. La reducción del peróxido de hidrógeno por la catalasa o la GSH peroxidasa genera agua como producto final. El glutatión usado por la GSH peroxidasa es regenerado por la acción de la GSH reductasa que utiliza NADPH como donador de electrones. Modificado de Dröge.

Los peroxisomas son otra fuente importante de la producción total de  $H_2O_2$  (Boveris, 1972). Contienen enzimas que generan  $H_2O_2$ , como la glicolato oxidasa, urato oxidasa, L- $\alpha$ -hidroxiácido oxidasa y acil-CoA oxidasa. La catalasa peroxisomal utiliza el  $H_2O_2$  producido por estas oxidasas, para oxidar otros sustratos mediante reacciones de peroxidación que son importantes en los procesos de destoxificación del hígado y riñón (Tolbert, 1981).

Los neutrófilos, eosinófilos y macrófagos son otra fuente endógena de ERO. Cuando estas células se activan, se incrementan los niveles de anión superóxido, peróxido de hidrógeno y óxido nítrico.

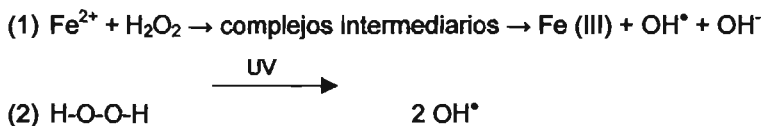
Respecto a las fuentes exógenas, se sabe que carcinógenos no genotóxicos inducen la generación de ERO en diferentes estirpes celulares (Rice-Evans, 1993). Compuestos clorados, radiación, iones metálicos, ésteres de forbol y algunos compuestos con actividad sobre peroxisomas, son algunos ejemplos de agentes que han mostrado inducir la producción de ERO y daño *in vitro* e *in vivo* (Klaunig, 1997). Por ejemplo, el reactivo 2-butoxietanol induce la producción de ERO y la generación de cáncer en hígado de ratón (Seisky, 2002).

### 1.1.1 Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) puede formarse espontáneamente o por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Es una molécula mucho más estable en comparación con el OH<sup>•</sup> y el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y, dadas sus propiedades generales (tamaño pequeño, alta reactividad y capacidad de difundir), puede atravesar la membrana mitocondrial y funcionar como segundo mensajero (Chance, 1979; Pavlović, 2002). En presencia de metales de transición puede generar radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton. Se ha reportado que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es capaz inactivar a las enzimas gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y fructosa bifosfato de cloroplasto mediante la oxidación de tioles -SH en sitios activos (Brodie, 1987).

### 1.1.2 Radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>).

El radical hidroxilo puede ser generado por reacciones del tipo Fenton (1) o por la fisión homolítica de puentes O-O inducida por radiación UV (2):



El radical hidroxilo es considerada una de las especies oxidantes más dañinas. Debido a su vida media corta y alta reactividad, el OH<sup>•</sup> actúa en los sitios cercanos donde se produce. El daño oxidativo que puede generar está determinado por la ubicación de los metales de transición en la célula. Puede interactuar con ácidos nucleicos, lípidos y proteínas (Betteridge, 2000).

### 1.1.3 Anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>).

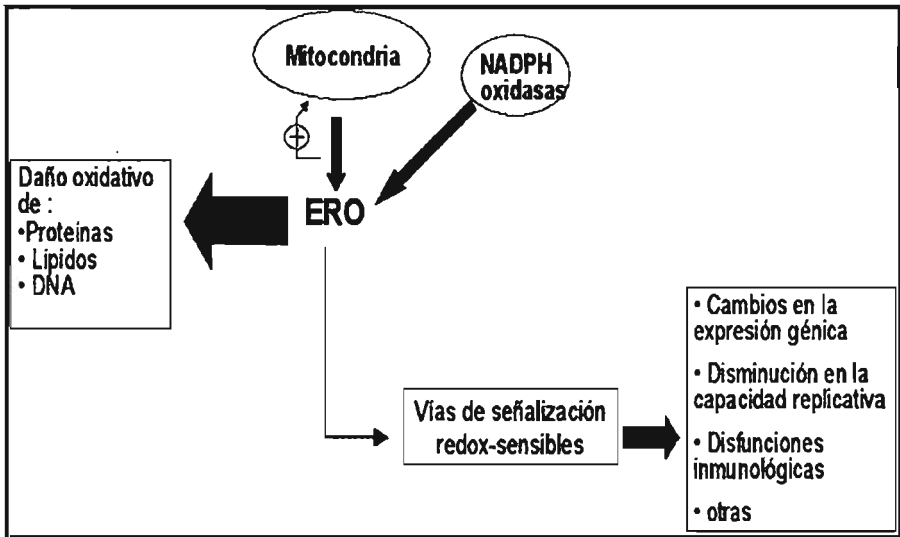
El anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) se forma en prácticamente todas las células aerobias y su principal fuente son los neutrófilos. En solución acuosa el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> puede generar peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) mediante una reacción de dismutación (3).



En la mayoría de los sistemas biológicos la generación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> usualmente resulta en la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En comparación con OH<sup>•</sup>, el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> es menos reactivo y la reacción con ácidos nucleicos, lípidos o aminoácidos es muy lenta. El daño generado por O<sub>2</sub><sup>•-</sup> se debe a las posibles reacciones con otros radicales para formar moléculas más reactivas y dañinas.

## 1.2 Efecto de las ERO en la célula.

El efecto de las ERO sobre la célula depende del sitio donde son originadas, su concentración y tiempo de eliminación. En bajas concentraciones las ERO regulan procesos de señalización celular, por lo que su producción es finamente regulada y las moléculas blanco sumamente específicas (Finkel, 2003). Por otro lado, cuando hay un incremento en la producción de ERO y el sistema antioxidante no es capaz de balancearlo, la célula entra a un estado denominado estrés oxidativo en el cual el DNA, las proteínas y los lípidos son dañados (Esquema 3).



**Esquema 3. Generación y efecto de las ERO en la célula.**

La concentración de ERO determina su efecto sobre la célula. Altas concentraciones de ERO producen daño a DNA, lípidos y proteínas. En bajas concentraciones las ERO modifican vías de señalización que regulan diversos procesos celulares.

**1.2.1 Estrés oxidativo.**

El término estrés oxidativo indica una situación de desequilibrio entre la producción de ERO y las defensas antioxidantes, en favor de las ERO (Sies, 1985). El estrés oxidativo puede ser resultado de:

1. Disminución de antioxidantes enzimáticos.
2. Depleción de antioxidantes no enzimáticos y otros constituyentes esenciales provenientes de la dieta.
3. Incremento en la producción de ERO por una exposición elevada a O<sub>2</sub>.
4. Presencia de toxinas que al ser metabolizadas generan ERO.
5. Incremento en la activación de células mediadoras de la respuesta inflamatoria que producen ERO.

El estrés oxidativo puede inducir adaptación, daño o muerte celular. En condiciones de estrés oxidativo moderado, la célula activa procesos de adaptación con la finalidad de restaurar el balance oxidante/ antioxidante. La adaptación involucra cambios en la expresión génica o modificaciones en la sensibilidad de los blancos comúnmente vulnerables al daño. Por ejemplo, hepatocitos expuestos a  $H_2O_2$  presentan una disminución en la transcripción de ARNm que codifica para enzimas de la familia P450 (Barker, 1994).

Si la respuesta adaptativa no es eficiente la célula entra a un estado de daño reversible en el que DNA, proteínas y lípidos son dañados. Las ERO interaccionan directamente con el DNA generando mutaciones o indirectamente activando endonucleasas dependientes de  $Ca^{2+}$ . Las ERO actúan sobre muchas proteínas incrementando su susceptibilidad a proteasas de tal forma que se modifica su estructura y función. Las membranas celulares son dañadas por las ERO mediante la peroxidación de lípidos, generando productos electrofílicos reactivos como epóxidos y aldehídos.

Cuando el estrés oxidativo es severo y el daño se vuelve irreversible, la célula muere. La muerte puede ser resultado de múltiples mecanismos; por ejemplo, durante la reparación del DNA dañado hay una activación excesiva de la poli (ADP-ribosa) polimerasa y como consecuencia se depleta el ATP intracelular conduciendo a la muerte celular.

### 1.2.2 Defensa antioxidante.

En condiciones fisiológicas normales, la célula es capaz de balancear la producción de ERO con antioxidantes (Tabla 2). Los antioxidantes son sustancias que en concentraciones menores comparadas con el sustrato oxidable, detienen o previenen significativamente la oxidación de dicho sustrato (Halliwell, 1989). La defensa antioxidante es de dos tipos: enzimática y no enzimática (Tabla 2).

**Tabla 2. ANTIOXIDANTES CELULARES**

Enzimáticos	No enzimáticos
Superóxido dismutasa Catalasa Glutación peroxidasa Glutación transferasa Peroxidasas	Glutación Vitamina E Vitamina C Ácido úrico Ubiquinonas Coenzima Q β-caroteno

Los antioxidantes enzimáticos incluyen a la superóxido dismutasa (SOD), glutación peroxidasa y catalasa entre otras. La glutación peroxidasa y la SOD se localizan en el citosol y en la mitocondria. La glutación peroxidasa elimina el peróxido de hidrógeno y la SOD reduce el anión superóxido a peróxido de hidrógeno y agua. La catalasa elimina altas concentraciones de peróxido de hidrógeno y se localiza en los peroxisomas (Betteridge, 2000). Los antioxidantes no enzimáticos son la vitamina E, la vitamina C, el β-caroteno, el glutación y la coenzima Q entre otros, actúan reaccionando directamente con las especies oxidantes (Clarkson, 2000).

### 1.3 Efecto de las ERO en la transducción de señales.

La transducción de señales implica el movimiento de estímulos externos al interior de la célula. Durante la transmisión de las señales químicas, diversas proteínas sufren modificaciones post-traduccionales necesarias para una eficiente señalización. Recientemente las ERO han sido identificadas como reguladoras de la actividad de diferentes proteínas involucradas en la transducción de señales indicando que pueden participar en el control de varios procesos celulares como la adhesión, proliferación, migración o apoptosis.

Por ejemplo, se sabe que fibroblastos, células endoteliales y células de músculo vascular liso producen ERO en bajas concentraciones para regular la transducción de señales (Finkel, 2003). En otras estirpes celulares, el estímulo generado por citocinas o factores de crecimiento produce un incremento en la concentración de ERO. La inhibición de la producción intracelular de ERO, utilizando agentes químicos o enzimáticos, inhibe la vía de transducción de señales dependiente del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Schreck, 1991).

Se ha demostrado la participación de las ERO en la vía del factor de crecimiento nervioso (NGF) y en la del factor de crecimiento epidermal (EGF), en células neuronales (Suzukawa, 2000) y en células de carcinoma epidermoide (Bae, 1997) respectivamente. La estimulación inducida por estos factores provoca un incremento en la producción de ERO mediante la participación de la proteína Rac1. Como consecuencia de la activación de Rac1 se induce la fosforilación de muchas proteínas y de los receptores involucrados; estos efectos se inhiben mediante la adición de catalasa.

La activación de los receptores para EGF o PDGF- $\beta$  por angiotensina II está mediada por ERO y se inhiben por antioxidantes como N- acetil cisteína (NAC). En el caso particular del receptor para EGF el efecto de la angiotensina II involucra la activación de la cinasa p60<sup>c-src</sup> por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wang, 2000). El receptor para insulina se autofosforila después de la unión del ligando. El tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM genera el mismo efecto aún en ausencia de insulina. En este sistema se ha identificado que el efecto inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> involucra modificaciones en los residuos de cisteína del sitio activo del receptor (Schmid, 1999). La proteína cinasa B (PKB/Akt) puede ser activada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y posteriormente interaccionar con Hsp27; una proteína de choque térmico que participa en la regulación del rearrreglo del citoesqueleto de actina (Konishi, 1997).

De manera similar, se ha identificado que la proteína cinasa C (PKC) puede ser regulada indirectamente por ERO. La presencia de oxidantes estimula a la fosfolipasa C (PLC) que se encarga de regular la producción de diacilgliceroles (DAG); los cuales regulan directamente la actividad de la PKC. Sin embargo, no se excluye la posibilidad de que las ERO actúen directamente sobre grupos –SH presentes en la enzima y modifiquen su actividad (Avdonin, 2000).

### 1.3.1 Mecanismos de acción de las ERO sobre la transducción de señales.

Los mecanismos por los cuales las ERO regulan la transducción de señales no son claros. Se ha propuesto que las ERO modifican directamente la actividad de enzimas o que actúan sobre factores de transcripción que regulan la expresión de moléculas transductoras.

Los factores de transcripción AP-1, AP-2, p21ras y NF-  $\kappa$ B son susceptibles de regulación por ERO. Estos factores tienen un papel crucial en el control de la proliferación celular, la diferenciación y la morfogénesis (Pavlović, 2002). AP-1 controla la expresión de genes que regulan la síntesis de colagenasa, del factor de crecimiento de trombocitos (TGF-1b) y de algunas citocinas. Se ha reportado que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y algunas citocinas participan en las vías dependientes de JNK y MAPK p38 induciendo la activación de AP-1 (Chang, 2001). Cuando JNK se activa, transloca al núcleo y fosforila a c-Jun y ATF2 potenciando la actividad transcripcional (Gupta, 1995). Se ha reportado que los cambios en el grado de fosforilación en residuos de tirosina, serina o treonina están involucrados en los efectos de las ERO sobre la activación de AP-1. Numerosos reportes indican la estrecha relación entre la activación de AP-1 por oxidantes y el proceso canceroso.



NF- $\kappa$ B activa genes que codifican para la síntesis de varias citocinas (IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ ), receptores para citocinas, moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina) y factores de crecimiento (Collins, 2001). Alteraciones en la regulación de este factor se relacionan con patologías como la aterosclerosis, asma, diabetes y cáncer entre otras. El incremento intracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estimula la activación de NF- $\kappa$ B mediante la participación de MAPK cinasas. Esta activación puede ser bloqueada por la adición de antioxidantes como L-cisteína, N-acetil cisteína (NAC), tioles, polifenoles o vitamina E (Nomura, 2000). Schreck y colaboradores observaron que la activación de NF- $\kappa$ B sólo se lleva a cabo después de la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o butilperóxido, pero no con los radicales superóxido o hidroxilo, indicando una activación selectiva de NF- $\kappa$ B mediada por peróxidos (Schreck, 1991).

Se han propuesto algunos posibles mecanismos por los cuales las ERO regulan la actividad de NF- $\kappa$ B (Pavlović, 2002):

- 1) Oxidación de sitios activos de cinasas que activan a I $\kappa$ B (inhibidor de NF- $\kappa$ B), provocando la disociación del complejo NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B y la posterior translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo.
- 2) Modulación redox de la actividad de I $\kappa$ B.
- 3) Modulación del transporte de NF- $\kappa$ B del citoplasma hacia el núcleo.

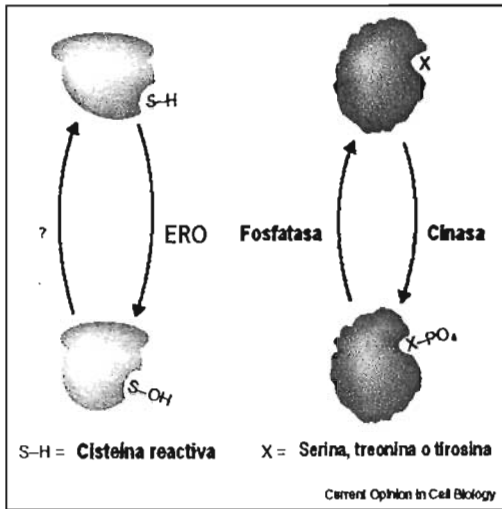
La regulación de la transducción de señales involucra entre otros mecanismos, el control del grado de fosforilación de proteínas mediante la acción de fosfatasas y cinasas. El efecto de las ERO sobre la actividad de estas enzimas explica parcialmente el mecanismo de acción sobre la transducción de señales. Se ha encontrado una relación directa entre el incremento en los niveles de especies oxidantes y el incremento en la fosforilación en residuos de tirosina de diversas proteínas. Este fenómeno puede ser el resultado de una mayor actividad de tirosina cinasas o de una disminución de la actividad de tirosina fosfatasas (PTP).

Se ha observado que el  $H_2O_2$  induce la fosforilación de residuos de tirosina en numerosas proteínas que son puntos de control de la transducción de señales. Por ejemplo, en linfocitos expuestos a  $H_2O_2$  se induce la activación de la cinasa p56<sup>lck</sup> mediante autofosforilación en el residuo Tyr-394. Lck pertenece a la familia Src y tiene un papel importante en la activación de linfocitos T (Pavlović, 2002). También se han estudiado los casos del receptor a factor de crecimiento epidermal (EGFR), del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) y de la tirosina cinasa Scr, donde el  $H_2O_2$  incrementa la fosforilación y las actividades catalíticas (Matsubara, 1986; González-Rubio, 1996).

Proteínas con actividad de tirosina fosfatasas (PTP) contienen en sus sitios activos residuos de cisteína susceptibles de ser oxidados por  $H_2O_2$ . La oxidación de estos residuos induce cambios conformacionales que provocan una alteración en la función de la proteína (Esquema 5). En presencia de  $H_2O_2$  las PTP se inactivan y el resultado es un incremento en el grado de fosforilación de otras proteínas. Fosfatasas como PTEN y la enzima reguladora del ciclo celular Cdc25C han mostrado ser susceptibles de regulación redox (Lee, 2002; Savitsky, 2002). La oxidación de cisteínas en el dominio activo de la proteína tioredoxina induce la disociación de ésta del complejo tioredoxina-ASK1, permitiendo la liberación y activación de la cinasa ASK1. Una vez activa ASK-1 funciona como un vínculo que promueve la activación de la proteína cinasa activada por mitógenos MAPK p38 (Liu, 2000).

De manera similar la actividad de la fosfatasa LMW-PTP se inhibe en presencia de ERO provocando la fosforilación permanente de FAK y el incremento de la adhesión (Chiarugi, 2003). La fosforilación de FAK promueve la formación de fibras de actina necesarias para un eficiente adhesión (Euikyung, 2002).

**Esquema 5. Regulación redox de cisteínas reactivas.**

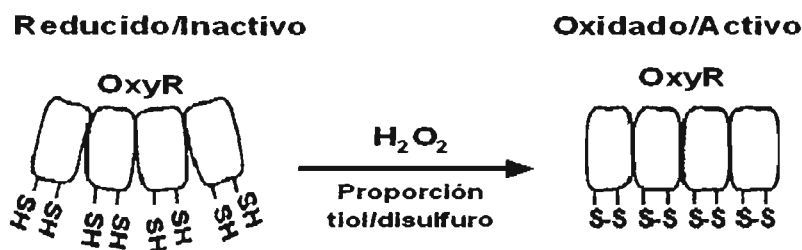


Las ERO y en particular el  $H_2O_2$  modifican directamente los residuos con cisteínas activas de diversas proteínas. La exposición a oxidantes puede convertir los residuos de cisteína a derivados (S-OH) que modifican la función de la proteína. Estas alteraciones pueden ocurrir también en proteínas con actividad de cinasa o fosfatasa, cuya función es regular la fosforilación reversible en residuos de serina, treonina o tirosina de diversas proteínas que participan en la transducción de señales.

Además de la oxidación de cisteínas reactivas, se han propuesto otros mecanismos que tratan de explicar como las ERO regulan la actividad de diversas proteínas :

1. Formación de puentes disulfuro intramoleculares.
2. Dimerización dependiente de puentes disulfuro intramoleculares.
3. Formación de ditirosinas.
4. Oxidación de proteínas por reacción de Fenton.

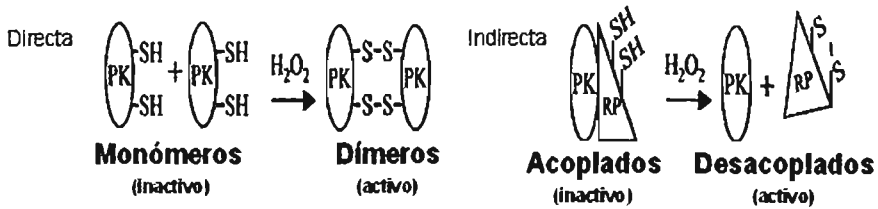
*Formación de puentes disulfuro intramoleculares.* La oxidación de residuos -SH genera puentes disulfuro S-S y la actividad de la proteína se modifica por cambios conformacionales. La proteína bacteriana que responde ante el estrés oxidativo (OxyR) se activa después de la formación de puentes disulfuro intramoleculares (Christman 1985; Storz 1990) (Esquema 6). Por otro lado, se ha identificado la participación de sistemas reductores de puentes disulfuro como el Factor-1 redox (Ref-1) en el núcleo. Las cisteínas de factores de transcripción son susceptibles de ser modificadas por Ref-1 y como consecuencia se promueve la unión con el DNA (Rainwater, 1995; Hirota, 1999; Lando, 2000).



**Esquema 6. Activación de OxyR por  $H_2O_2$ .**

La proteína OxyR se activa por la formación de puentes disulfuro intramoleculares. Este proceso es mediado por  $H_2O_2$  o por cambios en el estado redox tiol/disulfuro. Modificado de Dröge.

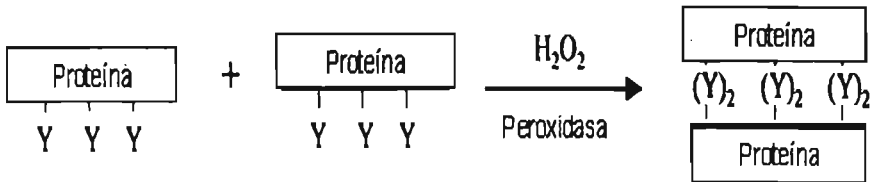
*Dimerización dependiente de puentes disulfuro intermoleculares.* El  $H_2O_2$  induce la formación de puentes disulfuro mediante la oxidación de residuos -SH. La proteína cinasa (PK) se activa en presencia de  $H_2O_2$  a partir de la formación de dímeros dependientes de puentes disulfuro. Esta cinasa también puede encontrarse formando un complejo inactivo con la proteína regulatoria (RP). El  $H_2O_2$  induce la disociación de este complejo y la activación de sus componentes (Gotoh, 1998).



**Esquema 7. Dimerización de puentes disulfuro intermoleculares.**

La activación de la proteína cinasa (PK) puede ser directa o indirecta. La activación directa involucra la formación de dímeros por puentes disulfuro intramoleculares mediada por  $H_2O_2$ . La activación indirecta explica como el complejo inactivo PK/RP es activado por acción del  $H_2O_2$  que oxida residuos -SH presentes en RP y provoca la disociación del complejo. Modificado de Thannickal.

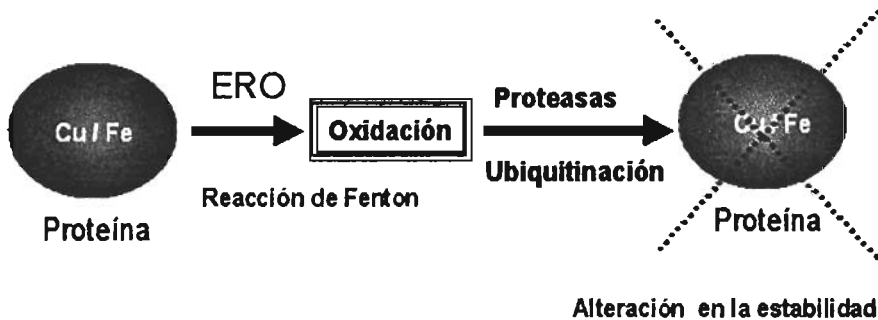
*Formación de ditirosinas.* El  $H_2O_2$  o la peroxidasa pueden provocar la formación de uniones entre tirosinas de diferentes proteínas, formando estructuras cuaternarias que pueden o no tener actividad catalítica (Esquema 8).



**Esquema 8. Mecanismo de formación de ditirosinas.**

La presencia de  $H_2O_2$  o peroxidasa induce la formación de ditirosinas; aquellas proteínas que contienen tirosinas pueden formar nuevas estructuras secundarias con actividad catalítica o sin ella. Modificado de Thannickal.

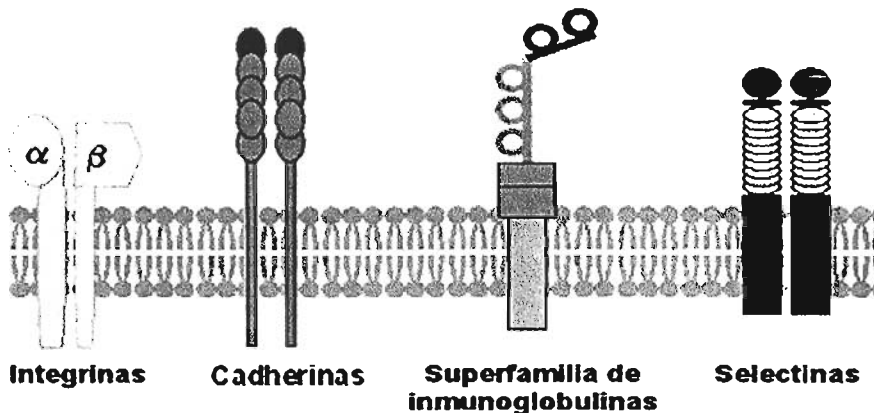
*Oxidación de proteínas por reacción de Fenton.* La presencia de metales de transición en la estructura de la proteína provoca que sea blanco de ERO y que se lleve a cabo una oxidación mediante la reacción de Fenton. La proteína oxidada sufre un proceso de ubiquitinación que la hace susceptible de la acción de proteasas. Se ha sugerido que éste es el mecanismo por el cual las ERO modifican la estabilidad de las proteínas (Iwai, 1998) (Esquema 9).



**Esquema 9. Efecto de ERO sobre la estabilidad de proteínas. Participación de metales de transición y de la reacción de Fenton. Modificado de Thannickal.**

## 2. Adhesión celular.

La adhesión celular es un proceso fundamental que regula la organogénesis y la diferenciación en organismos eucariontes. Su función es mantener la arquitectura tisular, al mismo tiempo que transmite señales. En tejido normal las células se adhieren tanto una a otra, como a un retículo de proteínas fibrilares insolubles conocido como matriz extracelular (MEC). Las interacciones celulares con la MEC son mediadas por moléculas de adhesión de diferentes familias, moléculas transductoras y proteínas estructurales. Se han identificado cuatro familias principales de moléculas de adhesión: cadherinas, selectinas, integrinas y la superfamilia de inmunoglobulinas (Esquema 10).



**Esquema 10. Familias principales de moléculas de adhesión.**

Las integrinas son receptores de superficie glicoproteicos que reconocen moléculas de matriz extracelular como vitronectina, fibronectina, laminina o colágenas y que intervienen en la adhesión y migración celular. Las cadherinas son glicoproteínas que regulan la adhesión célula-célula de manera dependiente de calcio y son capaces de interactuar con el citoesqueleto de actina mediante proteínas de la familia de las cateninas. La superfamilia de las inmunoglobulinas son glicoproteínas que participan en las interacciones célula-célula y se caracterizan por contener en su porción extracelular múltiples dominios parecidos a los de las inmunoglobulinas. Las selectinas están presentes en células del endotelio vascular y células sanguíneas, son dependientes de calcio y tienen un papel importante en la adhesión de leucocitos al endotelio.

## 2.1 Integrinas

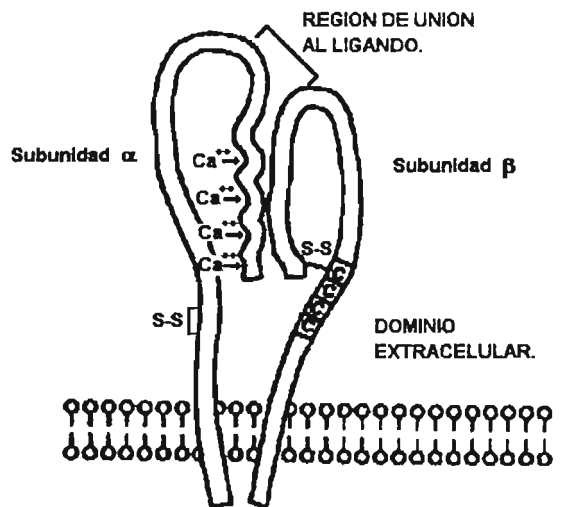
Las integrinas son una familia de glicoproteínas que funcionan como receptores a moléculas de la MEC. Están formadas por dos subunidades:  $\alpha$  (120-180 kDa) y  $\beta$  (90-110 kDa) y la especificidad de ligando se logra por las combinaciones entre estas subunidades. Actualmente se han identificado 24 tipos de subunidades  $\alpha$  y 9 de  $\beta$  (Danen, 2001). Ambas subunidades contienen puentes disulfuro internos que estabilizan la conformación de las cadenas peptídicas (Esquema 11). En la Tabla 3 se muestran algunos ejemplos de integrinas y sus respectivos ligandos.

Esquema 11. Representación esquemática de una integrina

La subunidad  $\alpha$  contiene regiones que contribuyen a la unión de cationes divalentes que estabilizan tanto la unión heterodimérica como la unión del ligando.

La subunidad  $\beta$  contiene un segmento de cuatro dobles en una zona rica en cisteínas, que forma puentes disulfuro internos.

La región de unión a ligando reconoce la secuencia arginina-glicina-aspartato (RGD) contenida en moléculas de matriz extracelular.





**Tabla 3. LIGANDOS DE LAS SUBFAMILIAS DE INTEGRINAS.**

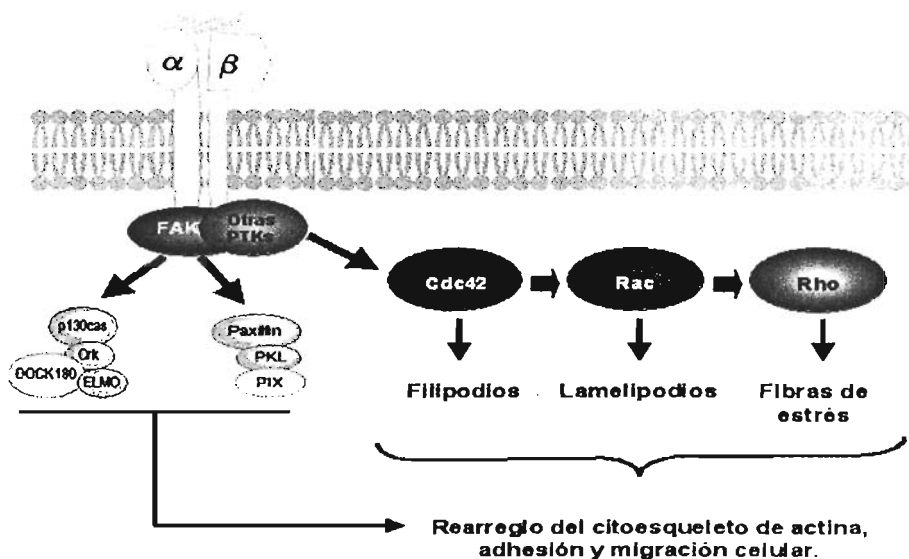
RECEPTOR.	LIGANDO	RECEPTOR	LIGANDO
Integrinas $\beta 1$		Integrinas $\beta 3$	
$\alpha 1\beta 1$	Colágena Tipo I y IV, laminina.	$\alpha 1\text{Ib}\beta 3$	Fibrinógeno, fibronectina, vitronectina.
$\alpha 7\beta 1$	Fibronectina, VCAM-1.	$\alpha v\beta 3$	Fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, laminina, trombospodina.
Integrinas $\beta 2$		Integrinas $\beta 7$	
$\alpha 1\beta 2$	ICAM -1, -2, -3. C3bi, fibrinógeno,	$\alpha 4\beta 7$	Fibronectina que contiene la región IIICS, VCAM-1, MAdCAM.
$\alpha m\beta 2$	ICAM-1, factor de coagulación X.	$\alpha E\beta 7$	Cadherina E.
$\alpha x\beta 2$	Fibrinógeno, C3bi?		

### 2.1.1 Vías de señalización dependientes de integrinas.

Las integrinas reconocen en su ligando una secuencia peptídica específica (i.e. Arg-Gly-Asp) (Ruoslathi, 1996) y como consecuencia, se agrupan en complejos especializados conocidos como *sitios de adhesión focal*. Los complejos formados funcionan como conexión entre la matriz extracelular y el citoesqueleto de actina, y generan señales que regulan la migración y la proliferación celular. La unión del ligando a su receptor induce un cambio conformacional en los dominios citoplasmáticos de la integrina, permitiendo que la subunidad  $\beta$  interactúe con otros componentes del sitio de adhesión focal (Burrige, 1996). En estas estructuras se concentran, además de integrinas, proteínas del citoesqueleto ( $\alpha$ -actinina, vinculina, talina, tensina y paxilina) y proteínas cinasas como la cinasa de adhesión focal (FAK) (LaFlamme, 1996; Clark, 1995; Burrige, 1996).

Después del estímulo mediado por las integrinas, FAK se activa y se autofosforila en el residuo Tyr 397 generando un sitio de enlace de alta afinidad para la proteína tirosina cinasa c-Src, de la cual FAK es sustrato (Schaller, 1995). Los residuos de tirosina fosforilados sirven para la unión de moléculas que inician cascadas de señalización. La unión de la proteína adaptadora Grb2 conecta el estímulo inicial con la vía de Ras, Raf, y finalmente culmina en la activación de la cinasa activada por mitógenos MAPK/ERK (Schlaepfer, 1994). Adicionalmente se ha determinado que la disminución en la expresión de FAK resulta en una inhibición de la adhesión a moléculas de matriz extracelular.

La activación de integrinas enciende vías de señalización que regulan el rearreglo del citoesqueleto de actina. Una de estas vías involucra la participación de tres GTPasas de bajo peso molecular relacionadas con la familia de Ras: Rho, Rac y Cdc42. De manera general Cdc42 regula la formación de filipodios, Rac regula la formación de lamelipodios y Rho controla la formación de fibras de estrés. Los lamelipodios y filipodios son estructuras altamente móviles que frecuentemente se unen y desprenden del sustrato para producir movimiento, retracción o pliegues en la membrana. Las fibras de estrés consisten en largas redes de filamentos que atraviesan la célula, se encuentran unidas indirectamente a la matriz extracelular por medio de integrinas y los complejos de adhesión focal. Estas estructuras participan activamente durante la adhesión y migración celular (Condeelis, 2001; Lodish, 2000) (Esquema 13).



### Esquema 13. Vía de transducción de señales para Cdc42, Rac y Rho.

La unión del ligando a la integrina estimula la activación de FAK y otras cinasas las cuales actúan sobre proteínas adaptadoras como paxilina o bien sobre GTPasas como Cdc42. Cuando Cdc42 se activa se enciende una cascada de señales que involucra la participación de Rac y Rho. Estas GTPasas regulan directamente la formación de filipodios, lamelipodios y fibras de estrés, indispensables en el rearreglo del citoesqueleto de actina, la adhesión y la migración celular.

## 2.2 Efecto de las ERO sobre la adhesión mediada por integrinas.

La función de las ERO en la adhesión mediada por integrinas aún no se ha aclarado por completo. En células del sistema inmune las ERO estimulan la adhesión. El tratamiento con  $H_2O_2$  incrementa la adhesión de eosinófilos a células endoteliales de cordón umbilical humanas, alcanzando su efecto máximo con 1mM. La adición de catalasa revierte el efecto y al parecer las integrinas que contienen la subunidad  $\beta_2$  participan activamente.

Recíprocamente, la unión de integrinas  $\beta 2$  a su ligando, promueve la activación transitoria de la NADPH oxidasa y, como consecuencia, la formación de superóxido/ peróxido. Esto sugiere que la producción de ERO podría formar parte de un mecanismo de retroalimentación positiva autócrina. Aunque las vías de señalización involucradas no se han descrito totalmente, se sabe que se requiere de la actividad de cinasas Src y MAPK p38 y de la integridad del citoesqueleto de actina (Nagata, 2000).

En otras estirpes celulares, el efecto de  $H_2O_2$  en la adhesión celular es contrario al reportado para células del sistema inmune. Células PC-12 (células neuronales) tratadas con  $H_2O_2$  presentan una inhibición específica dependiente de la dosis en la adhesión a colágena (Zhang, 1994). De manera similar, las células TM (malla trabecular) disminuyen su adhesión a fibronectina, laminina o colágena I y IV después del tratamiento con  $H_2O_2$  1mM durante 10 minutos. Adicionalmente, se observó el acortamiento de las fibras de estrés de actina y modificaciones en la distribución de paxilina y de FAK en el sitio de adhesión focal (Zhou, 1999). Células ECV304 disminuyen su adhesión a colágena después de 10 minutos de tratamiento con terbutil-hidroxiperoxido (t-BHP). En la línea celular de hibridoma epitelial EAhy926 la adhesión se incrementa en un 15% y 30% después del tratamiento con t-BHP 125 y 250  $\mu M$  respectivamente. El tratamiento con el antioxidante  $\alpha$ -D-Tocoferol previene el efecto de t-BHP sobre la adhesión en células ECV304 y lo enfatiza en un 40 % en células EAhy926 (Lamari, 2001).

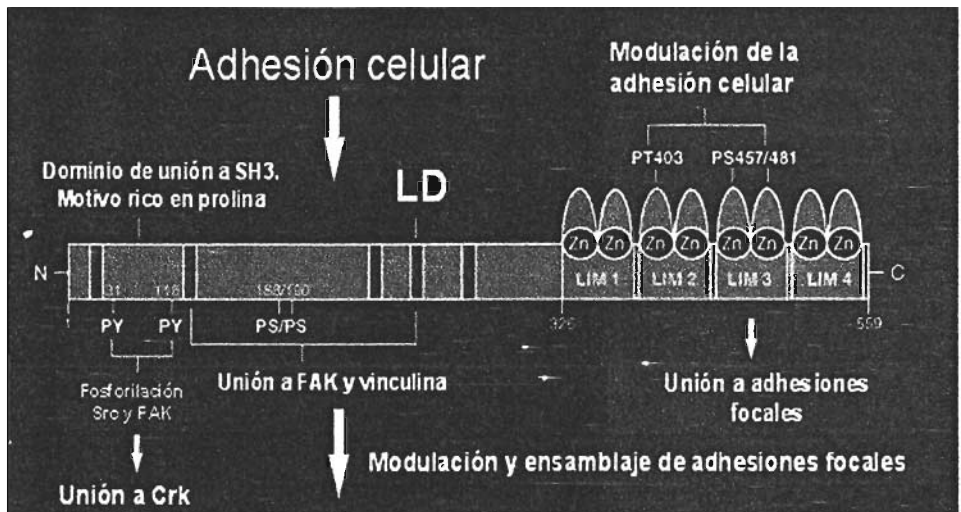
En fibroblastos, la exposición a dosis subletales de  $H_2O_2$  produce un decremento en la adhesión a plástico. Estos cambios en la adhesión correlacionan con la desorganización del citoesqueleto de actina (Mocali, 1995). Los mecanismos involucrados en los cambios en la adhesión pueden involucrar cambios metabólicos (Mocali, 1995; Zhang, 1994), además de la redistribución de moléculas asociadas al citoesqueleto de actina, como talina, vinculina y paxilina (Zhou, 1999) que son componentes fundamentales de los sitios de adhesión focal.

## 2.3 Participación de paxilina en la señalización dependiente de integrinas.

Como se mencionó anteriormente, la estimulación de integrinas induce la formación de complejos llamados sitios de adhesión focal. Paxilina es una proteína adaptadora que forma parte de estos complejos y que tiene la capacidad de conectar estímulos extracelulares que regulan la organización del citoesqueleto de actina y la adhesión.

*Estructura.* Paxilina es una proteína citoplasmática de 68 kDa purificada a partir de músculo liso (Turner, 1990). Esta presente en humano, ratón, rana, pez cebra, levaduras y otros organismos. En eucariotes superiores se han identificado 3 isoformas de paxilina:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La paxilina  $\alpha$  es la isoforma más comúnmente expresada debido a que las isoformas  $\beta$  y  $\gamma$  presentan procesos de restricción. En humanos se expresan las 3 isoformas y en ratón se ha identificado que sólo las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  están presentes. Estructuralmente se ha dividido en dos fragmentos: el extremo amino que presenta dominios LD ubicado, y el carboxilo terminal que presenta dominios LIM. El extremo amino presenta sitios ricos en leucina que se repiten 5 veces y que sirven como puntos de unión a proteínas como vinculina, FAK o PYK2. Además, se han identificado en el fragmento amino terminal dominios ricos en prolina, que pueden interactuar con los dominios SH3 de miembros de las familias Src y Crk. Por otro lado, los dominios LIM, presentes en el extremo carboxilo, están constituidos por 4 motivos dedos de zinc que regulan la interacción con otras proteínas. La participación de los dominios LIM de paxilina en la regulación de las adhesiones focales y el rearreglo del citoesqueleto ya ha sido descrita; en particular, el dominio LIM3 controla la localización de paxilina en los sitios de adhesión focal. Por otro lado se ha identificado que la fosforilación en serina/treonina de LIM2/3 regula la localización de paxilina y la adhesión a fibronectina (Brown, 1996; Brown 1998) (Esquema 14).

**Función.** La principal función de paxilina es la integración y transmisión eficiente de señales provenientes de integrinas que regulan el rearreglo del citoesqueleto de actina, la adhesión y la migración celular. Por ejemplo, la migración y la supervivencia en células F9 (carcinoma de ratón) se realiza a través de la interacción de paxilina/FAK, y la estimulación de la vía ERK (Subuaste, 2004).



**Esquema 14. Estructura de paxilina.**

Paxilina es una proteína adaptadora que presenta dos tipos de dominios: LD y LIM, estos le permiten interactuar con otras proteínas como Crk o con los sitios de adhesión focal. La eficiente interacción de paxilina con otras proteínas permite la integración y transmisión de señales que regulan procesos de adhesión y migración celular. Modificado de Turner.

**Regulación de la actividad.** Paxilina es una fosfoproteína que puede ser fosforilada en residuos de tirosina, serina o treonina. La actividad y funcionalidad de paxilina se ha relacionado con su estado de fosforilación. Se ha demostrado que la adhesión dependiente de integrinas induce la fosforilación en tirosina de paxilina mediante la acción de FAK o Src. Se han identificado otros estímulos que inducen la fosforilación en tirosina de paxilina como son la activación de receptores para el factor de crecimiento epidermal (EGF), hormona del crecimiento, acetilcolina, epinefrina, angiotensina II, trombina, vasopresina, endotelina, entre otros.

Como consecuencia de la fosforilación en tirosina se generan sitios de unión para el dominio SH2 de otras proteínas adaptadoras. La asociación con Crk es la más caracterizada e involucra la interacción con los residuos Y31 y Y118. Crk puede interactuar con C3G (intercambiador de nucleótidos de guanina) y servir de vínculo con la vía de Ras/MAPK. En células NMuMG la fosforilación de paxilina en los residuos Y31 y Y118 es necesaria para una eficiente extensión de la membrana durante la adhesión y migración (Tsubouchi, 2002). Utilizando anticuerpos se han logrado identificar otros sitios de fosforilación funcionales que pueden ser sustratos para Src: Y40, Y88 y Y181.

Además de la fosforilación en tirosina, cambios en la fosforilación en serina/treonina de paxilina han sido reportados. Después de la activación de integrinas se fosforilan los residuos de serina 188/190 (Bellis, 1997); de manera similar T396/401 (en LIM2) y S455/479 (en LIM3) son fosforilados después de la adhesión o de la estimulación con angiotensina II (Brown, 1999). La cinasa activada por mitógeno JNK fosforila directamente a la isoforma  $\beta$  en T178 (Huang, 2004) y la cinasa MAPK p38 actúa sobre S85 para regular la migración celular (Huang, 2003).

### 2.3.1 Efecto de las ERO sobre paxilina.

Actualmente no se sabe si las ERO pueden regular directamente la actividad de paxilina. Células BPAECs tratadas con  $H_2O_2$  1 mM durante 10 minutos presentan un incremento en la fosforilación en tirosina de paxilina y de FAK, dicho incremento está relacionado con la inhibición de fostatasas más que por la activación de cinasas (Vepa, 1999). En células MCF-7 se demostró que la ausencia de glucosa en el medio provoca un incremento de  $H_2O_2$  intracelular que induce fragmentación del DNA y alteración de la membrana celular.

Ya que los cambios en la membrana están directamente relacionados con moléculas de adhesión y la organización del citoesqueleto de actina; se estudió particularmente la participación de paxilina y las modificaciones en el grado de fosforilación/desfosforilación de ésta. Se encontró que el  $H_2O_2$  inhibió la actividad de PTP y como consecuencia se incrementó la fosforilación de paxilina; además de que se indujo su redistribución y la formación de fibras de estrés. En este mismo sistema, el tratamiento con N-acetil cisteína (NAC) previno de los efectos inducidos por  $H_2O_2$  (Song, 2000).

En otro modelo se identificó que el estrés inducido por  $H_2O_2$  o insulina activa a la cinasa Src que fosforila a caveolina-1 en el residuo Y14. El regulador negativo de esta cinasa es Csk, el cual contiene un dominio SH2 que le permite interaccionar con paxilina. Por lo que en este trabajo se determinó que la fosforilación de caveolina-1 inducida por  $H_2O_2$  o insulina está regulada por el complejo Csk-paxilina (Cao, 2004).



### 3. El citoesqueleto de actina.

El citoesqueleto es un sistema citoplásmico de proteínas fibrilares. Tiene por función estabilizar la estructura de la célula, organizar el citoplasma con todos sus organelos y dirigir el movimiento. El citoesqueleto es responsable de que algunas células pueden emitir pseudópodos en el proceso de fagocitosis; contribuye a que las células musculares se contraigan y a que los organelos se muevan de manera coordinada en el interior del citoplasma. Los polímeros proteicos que componen el citoesqueleto son microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos de actina. Estas tres categorías de filamentos pueden ser diferenciadas por su diámetro, composición química y su función. Los tres polímeros proteicos están interconectados mediante proteínas accesorias y forman una red que se extiende desde el núcleo hasta la superficie celular (Carlier, 1991; Lodish, 2000; Ville, 1996).

El citoesqueleto de actina es el más abundante dentro de la célula y es esencial para la motilidad, el crecimiento, la división celular, la señalización, el desarrollo y el mantenimiento de la forma celular. Los microfilamentos son el componente más importante de la maquinaria contráctil, por lo tanto, están involucrados en prácticamente todos los movimientos celulares incluyendo desplazamiento, corrientes citoplasmáticas, contracción y citocinesis. También contribuye a regular la adhesión, la organización de proteínas y el movimiento de receptores en la superficie celular (Lodish, 2000; Pawlak, 2001).

#### 3.1 Efecto de las ERO sobre el citoesqueleto de actina.

El citoesqueleto de actina es susceptible de ser modificado por ERO. Numerosos reportes indican que la presencia de estrés oxidativo provoca alteraciones en la membrana celular y en el rearrreglo del citoesqueleto. Aunque los mecanismos involucrados no se han aclarado totalmente, ya ha sido posible identificar la participación de la vía dependiente de MAPK p38 y de moduladores de la polimerización de actina.

El efecto de las ERO sobre el rearrreglo del citoesqueleto de actina depende de la estirpe celular. Por ejemplo, los microfilamentos de actina de células endoteliales son extremadamente resistentes a oxidantes como el  $H_2O_2$  y la menadiona. Se ha reportado que estas células, al ser tratadas con  $H_2O_2$ , incrementan la formación de adhesiones focales, la reorganización del citoesqueleto de actina y la activación de MAPK p38, MAPK2/3 y Hsp27 con la finalidad de llevar a cabo eficientemente procesos como la migración celular durante la angiogénesis y la respuesta ante el estrés. En contraste, otras células como los fibroblastos sufren la total disrupción del citoesqueleto de actina al ser expuestos a  $H_2O_2$  (Hout, 1997). En células Caco-2 (cáncer de colon) el  $H_2O_2$  y el HOCl provocan la disrupción del citoesqueleto de actina, la oxidación de actina y disminuyen la fracción de F-actina estable e incrementan la fracción de G-actina (monómero) (Banan, 2001).

Se ha propuesto que uno de los mecanismos que regula la respuesta del citoesqueleto de actina ante el estrés involucra la participación de las proteínas de choque térmico Hsp25/27. Estas proteínas se encuentran altamente conservadas, se expresan en muchos tejidos y su función es modular la polimerización de actina *in vitro* e *in vivo* (Benndorf, 1994). En presencia de estrés, Hsp25/27 es fosforilada en residuos de serina/treonina por acción de cinasas como MAPK p38, y forman agregados que se unen a la actina previniendo así la despolimerización (Guay, 1997). Se ha observado que la sobreexpresión de Hsp25 en células NIH-3T3 estabiliza los microfilamentos de actina después del tratamiento con citocalacina D e incrementa la concentración de F-actina en células de ovario de hámster chino (Lavoie, 1993). Otros resultados indican que la isoforma Hsp27 no fosforilada actúa como un inhibidor de la polimerización de actina y puede tener efectos sobre otros procesos celulares (Schneider, 1998). Al parecer la fosforilación de Hsp25/27, es necesaria para una modulación eficiente del citoesqueleto de actina ante el estrés oxidativo (Esquema 15). Sin embargo, en fibroblastos L929 la fosforilación no parece ser indispensable en el efecto protector de Hsp25, contra la disrupción del citoesqueleto de actina inducida por  $H_2O_2$  (Préville, 1998).

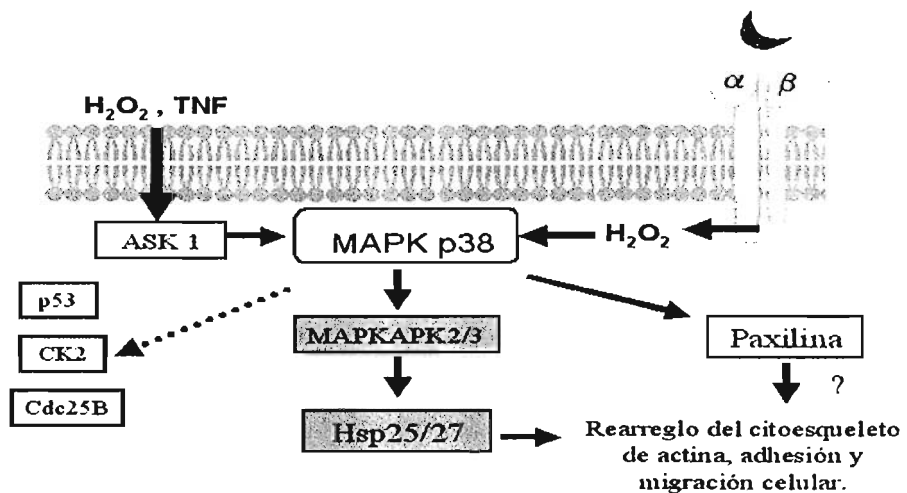
#### 4. Participación de MAPK p38 en el rearrreglo del citoesqueleto de actina y la adhesión.

La familia MAPK (proteína cinasa activada por mitógeno) participa en la regulación de la proliferación, migración, diferenciación, inflamación y en la respuesta ante el estrés. Esta familia se ha dividido en 3 grupos: Erk/MAPK, p38 y JNK. La subfamilia MAPK p38 está formada por 4 isoformas: p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  y p38 $\delta$ . MAPK p38 es activada por diferentes estímulos como factores de crecimiento, citocinas y quimioatrayentes como VEGF, TNF o LPS (Huang, 2004). Se ha reportado que la presencia de ERO también activa a MAPK p38, por lo que esta cinasa juega un papel muy importante en la respuesta ante el estrés oxidativo (Shi, 2002). Existen muchos estudios que indican la participación de MAPK p38 en la adhesión a moléculas de matriz extracelular, así como en el rearrreglo del citoesqueleto de actina inducido por oxidantes.

La reorganización de F-actina inducida por estrés oxidativo está regulada por la vía MAPK p38/MAPKAPK-2/Hsp. Recientemente Huang y colaboradores demostraron que durante la extensión de células PC-12, se lleva a cabo la fosforilación de paxilina en el residuo Ser83 por MAPK p38 (Huang, 2004). La vía dependiente de MAPK p38 participa en la regulación de las adhesiones focales, pero aún no se sabe si la fosforilación de paxilina por esta cinasa es indispensable para la adhesión y migración celular (Esquema 15).

En lo que respecta al papel de MAPK p38 sobre la adhesión, se ha reportado que en células SW620 (cáncer de colon) la inhibición de esta cinasa por SB-203580 incrementa la adhesión a colágena tipo I (Walsh, 2003). En otra estirpe celular, células MDCK, se ha demostrado que el desprendimiento de la matriz extracelular estimula a MAPK p38, pero la inhibición de la cinasa con SB-203580 no protege de la apoptosis dependiente de adhesión (anoikis) (Khawaja, 1997).

La adhesión dependiente de integrinas de PMN a fibronectina y la adhesión dependiente del estallido oxidativo en respuesta al estímulo por LPS involucra la fosforilación de MAPK p38, pero el efecto sobre la adhesión se inhibe mediante el tratamiento con SB-203580. En estos modelos, los resultados indican que la activación de MAPK p38 y la vía dependiente de ella es esencial para una eficiente adhesión (Cuenda, 1995; Beyaert, 1996). En condriocitos humanos se determinó que el estímulo por fragmentos de fibronectina o anticuerpos contra integrinas  $\alpha 2\beta 1$  y  $\alpha 5\beta 1$  incrementó la fosforilación de ERK1/2, c-Jun y MAPK p38 (Forsyth, 2002).



**Esquema 15. Activación de MAPK p38 por  $H_2O_2$ .**

MAPK p38 puede ser activada por la cinasa ASK1 o directamente por el  $H_2O_2$  generado por la activación de integrinas. Una vez activada MAPK p38 puede actuar sobre varios sustratos como p53, MAPKAPK2/3 o paxilina. La fosforilación de MAPKAPK2/3 provoca su activación y la subsecuente fosforilación de Hsp25/27. Como resultado de la activación de MAPK p38 se modifica el rearrreglo del citoesqueleto de actina, la adhesión y migración celular.

## **II. HIPÓTESIS.**

El tratamiento con  $H_2O_2$  modificará la adhesión de fibroblastos L929 a vitronectina. El efecto estará relacionado con modificaciones en el rearrreglo del citoesqueleto de actina y en la redistribución de paxilina.

### **III. OBJETIVOS.**

#### **Objetivo general.**

Analizar el efecto del tratamiento *in vitro* con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la adhesión, el rearreglo del citoesqueleto de actina y la distribución de paxilina de fibroblastos L929 en presencia de vitronectina.

#### **Objetivos particulares.**

1. Analizar el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la adhesión de fibroblastos L929 a vitronectina.
2. Evaluar la actividad de diferentes antioxidantes o inhibidores enzimáticos sobre el efecto inducido por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
3. Analizar el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre el rearreglo del citoesqueleto de actina de fibroblastos L929 en presencia de vitronectina.
4. Analizar el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la distribución de paxilina de fibroblastos L929 en presencia de vitronectina.
5. Aclarar parcialmente el mecanismo por el cual el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> regula la adhesión dependiente de integrinas.

#### IV. MATERIAL Y MÉTODOS.

##### *Material biológico.*

Los fibroblastos L929 (ATCC) se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino y una mezcla de antibióticos (penicilina 5 mg/mL, estreptomycin 10 mg/mL y neomicina 10 mg/mL; Gibco) en cajas de cultivo de 80 cm<sup>2</sup> de área (Nunc). Se incubaron en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y temperatura constante de 37 °C (incubadora Nuair). Las células se cosecharon con Tripsina/EDTA (0.05%/0.5 mM; Gibco) y se contaron en un hematocitómetro donde se evaluó paralelamente la viabilidad por exclusión de azul tripán. Para los ensayos se utilizaron cultivos con viabilidad mayor o igual al 95%.

##### *Ensayos de adhesión.*

Los ensayos de adhesión se realizaron de acuerdo al protocolo reportado por M.J. Humphries (Humphries, 2000). Vitronectina humana (2 µg/ mL) se sembró en algunos pozos de una microplaca de 96 pozos (Nunc) y se incubó durante 4 horas a 37 °C. Posteriormente estos pozos se bloquearon durante una hora con albúmina desnaturalizada (10 mg/mL). Como control de la adhesión inespecífica, se bloquearon pozos sin vitronectina.

- 1) *Cinética de adhesión.* Para determinar el tiempo de tratamiento, se colocaron  $4.0 \times 10^4$  células por pozo, la placa se mantuvo en incubación y se realizaron lavados cada 5 minutos durante un periodo de 45 minutos. Cada intervalo de tiempo se realizó por triplicado. Las células adheridas se cuantificaron mediante una tinción con cristal violeta, que se basa en la afinidad del colorante por las proteínas celulares. La tinción consiste en fijar las células durante 30 minutos a temperatura ambiente con una solución 1.1 % de glutaraldehído en amortiguador salino de fosfatos (PBS), después se añade una solución 0.2% de cristal violeta durante 30 minutos y al término del tiempo se realizan lavados extensivos para eliminar el exceso de colorante.

Finalmente el colorante se solubiliza en 10% de ácido acético y se cuantifica mediante un lector de microplacas (Biotek EL311) a una longitud de onda de 595 nm; siendo la absorbencia una medida proporcional de las células adheridas en el pozo.

- 2) *Efecto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, antioxidantes o SB-203580 en la adhesión.* Determinado el tiempo de tratamiento y en las condiciones descritas, se colocaron 4.0X10<sup>4</sup> células por pozo y simultáneamente se adicionó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6-200 μM). Cada tratamiento se realizó por triplicado, usándose como control células sólo con medio. La placa se incubó durante 15 minutos a 37 °C. Cuando se evaluó el efecto de antioxidantes, éstos se adicionaron simultáneamente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cuando se evaluó el efecto del inhibidor SB-203580, las células se incubaron con éste 30 min previos al ensayo de adhesión. Al término de la incubación se realizaron varios lavados para retirar las células no adheridas. Las células adheridas se cuantificaron mediante una tinción con cristal violeta, descrita anteriormente. El análisis estadístico se realizó comparando las células tratadas contra su respectivo control utilizando la prueba de Dunnet con un límite de significancia de P < 0.05.

#### *Tinción con faloidina fluorescente.*

Para analizar el efecto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, antioxidantes o el inhibidor SB-203580 en la morfología y el rearreglo del citoesqueleto de actina, células L929 sembradas sobre vitronectina se trataron en portaobjetos con pozos desmontables (Nunc). Después del tratamiento las células se fijaron durante 30 minutos a 37 °C con formaldehído al 4% en amortiguador salino de fosfatos (PBS). Posteriormente se permeabilizaron 5 minutos con Tritón X-100 (0.1 %) y se expusieron 1 hora a una solución con faloidina-Alexa 488 (Molecular Probes, 5 U/mL), protegidos de la luz y a una temperatura de 37 °C. Concluida la incubación, las preparaciones se lavaron extensivamente y se montaron usando glicerol para su análisis y fotodocumentación con microscopio de fluorescencia ( Nikon Eclipse 600).



### *Inmunolocalización de paxilina.*

Para evaluar el efecto de los tratamientos en la redistribución de paxilina, células L929 sembradas sobre vitronectina se trataron en portaobjetos con pozos desmontables (Nunc). Después del tratamiento las células se fijaron durante 30 minutos a 37 °C con formaldehído al 4% en amortiguador salino de fosfatos (PBS) y posteriormente se permeabilizaron 5 minutos con Tritón X-100 (0.1 %). Se bloquearon durante 1 hora a 37 °C con una solución de albúmina al 3% en PBS. Finalizado el bloqueo, las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C con el anticuerpo policlonal anti-paxilina hecho en conejo (Santa Cruz Biotechnology, 1:200). Después de lavar las preparaciones con PBS, éstas fueron incubadas en las mismas condiciones con el anticuerpo secundario anti-conejo hecho en cabra (IgG/ Alexa 546, Santa Cruz Biotechnology, 4 µg/mL). Concluida la incubación, las preparaciones se lavaron extensivamente y montaron usando glicerol para su análisis y fotodocumentación con microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 600).

### *Inmunoprecipitación y Western Blot.*

Células L929 tratadas se lisaron con 1 mL de amortiguador de lisis frío (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1%, NP-40, 1 mM DTT, 5 % glicerol, 5 mM de EDTA, 1 mM de fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF), 1 mM o-vanadato, 1 µg/ mL de pepstatina A, leupeptina y aprotinina y 10 mM fluoruro de sodio). Se incubaron en hielo 5 minutos y posteriormente se centrifugaron durante 12 minutos a 13 000 rpm. Para la inmunoprecipitación, los lisados anteriores se incubaron durante 3 horas a 4 °C y agitación constante con el anticuerpo anti-paxilina (policlonal, Santa Cruz Biotechnology) que previamente había sido unido a perlas de proteína A - agarosa. Al término de la incubación se realizaron 3 lavados con amortiguador salino de lavado (amortiguador de lisis 1:10, inhibidores de proteasas y fosfatasa 1X) y se prepararon para ser separados por electroforesis vertical en gel de acrilamida al 12 % en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Después de la separación se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa en cámara húmeda.

La membrana se bloqueó 1 hora con leche (5%) en agitación constante y después se lavó 3 veces con TBS-Tween 20 (0.1%). Posteriormente, fue incubada 1 hora a temperatura ambiente y agitación constante con los anticuerpos primarios: anti-paxilina (policlonal, Santa Cruz Biotechnology) o anti-fosfotirosina (clona PY20, Santa Cruz Biotechnology) en TBS-Tween 20 (0.1%). Después de lavar las membranas, éstas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (anti-ratón para PY20 o anti-conejo para paxilina, 1:10 000) por una hora más. Para la detección de la señal por quimioluminiscencia, las membranas se trataron con el kit Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se documentaron los resultados por exposición de la membrana a placas de autoradiografía (Kodak).

## V. RESULTADOS.

*Cinética de adhesión.* El tiempo utilizado para evaluar el efecto de  $H_2O_2$ , antioxidantes o el inhibidor SB-203580 fue de 15 minutos. Como se muestra en la Figura 1, con este tiempo podemos observar modificaciones en la adhesión en ambos sentidos: incrementos y decrementos. A partir de 25 minutos el sistema se satura y casi todas las células se han adherido.

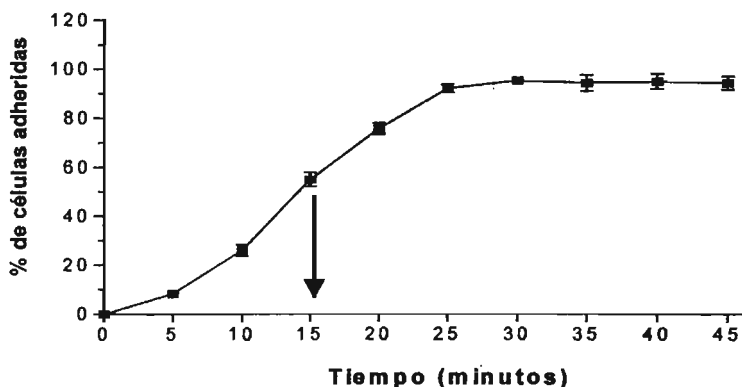
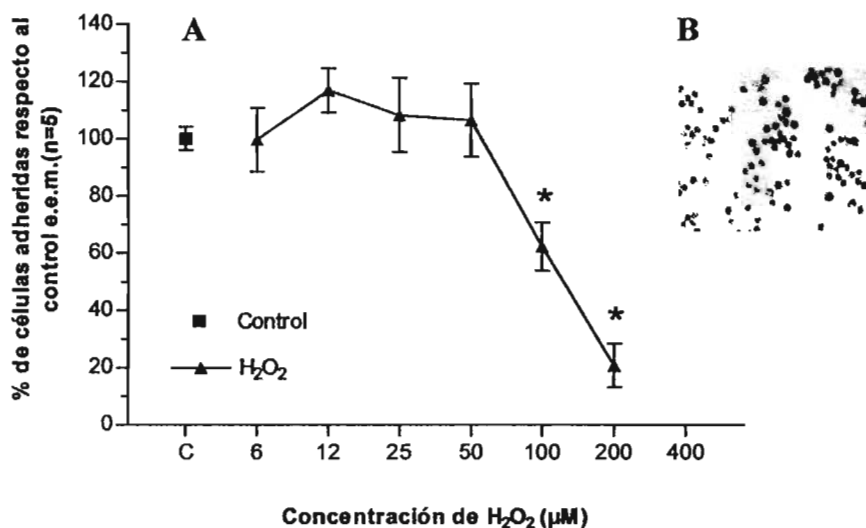


Figura 1. Cinética de adhesión de fibroblastos L929 a vitronectina.

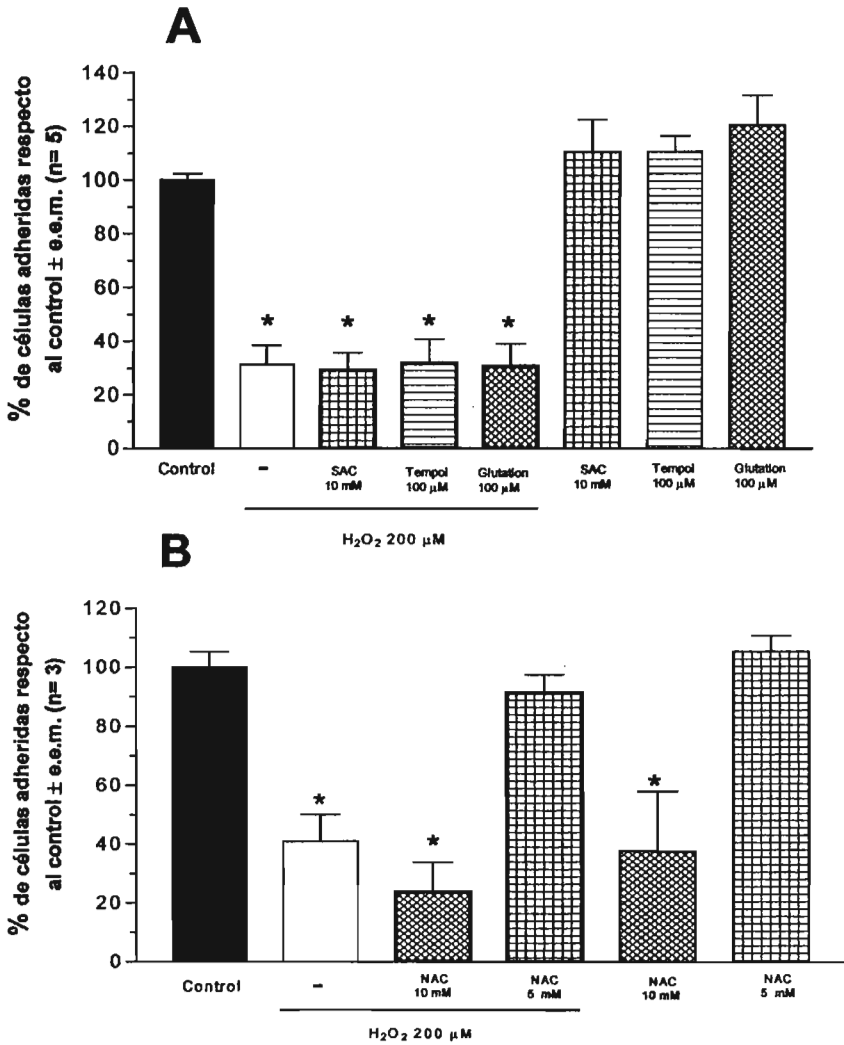
*Efecto del  $H_2O_2$  en la adhesión a vitronectina.* El  $H_2O_2$  disminuyó la adhesión de los fibroblastos L929 a vitronectina; el efecto máximo se observó con  $200 \mu M$  de  $H_2O_2$  siendo aproximadamente de un 20% respecto al control (Figura 2A), en el rango de concentraciones evaluadas. Este efecto no está relacionado con la muerte celular, ya que las células que no se adhieren son capaces de reducir MTT después del tratamiento con  $200 \mu M$  de  $H_2O_2$ . El ensayo de MTT se basa en la capacidad de las células vivas de reducir el MTT soluble en agua a formazán de MTT insoluble en agua, mediante la acción succinil-deshidrogenasa mitocondrial (Figura 2B).



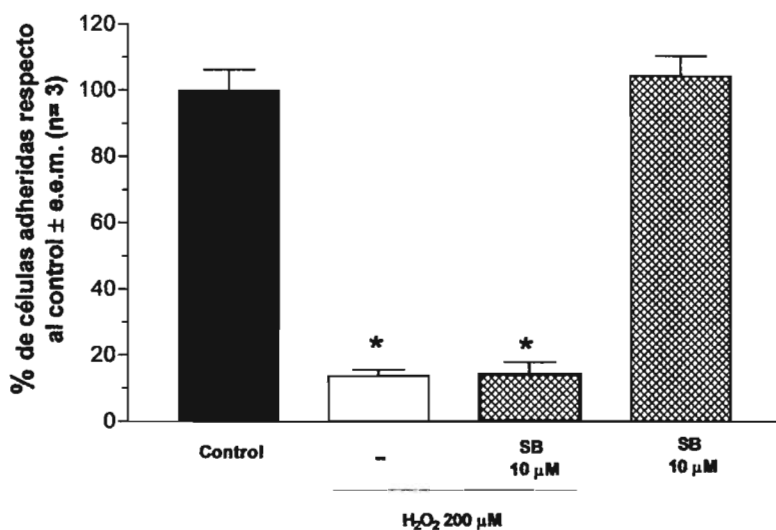
**Figura 2.** (A) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuye la adhesión de fibroblastos L929 a vitronectina. La gráfica representa los promedios ± e.e.m. de 5 experimentos independientes; los asteriscos (\*) indican diferencias significativas respecto al control ( $P < 0.05$ , Dunnett). (B) La disminución en la adhesión no involucra la muerte, ya que las células que no se adhieren son capaces de reducir MTT después del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 μM.

*Efecto de antioxidantes en la disminución de la adhesión inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.* El tratamiento simultáneo con los antioxidantes S- alil cisteína (SAC) 10 mM, tempol 100 μM o glutatión 100 μM no modificó el efecto producido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 3A). Por otro lado, N- acetil cisteína (NAC) 5 mM previno totalmente el efecto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 3B).

*Efecto de SB-203580 en la disminución de la adhesión inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.* El tratamiento con el inhibidor SB-203580 10 μM no modificó el efecto producido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 4).

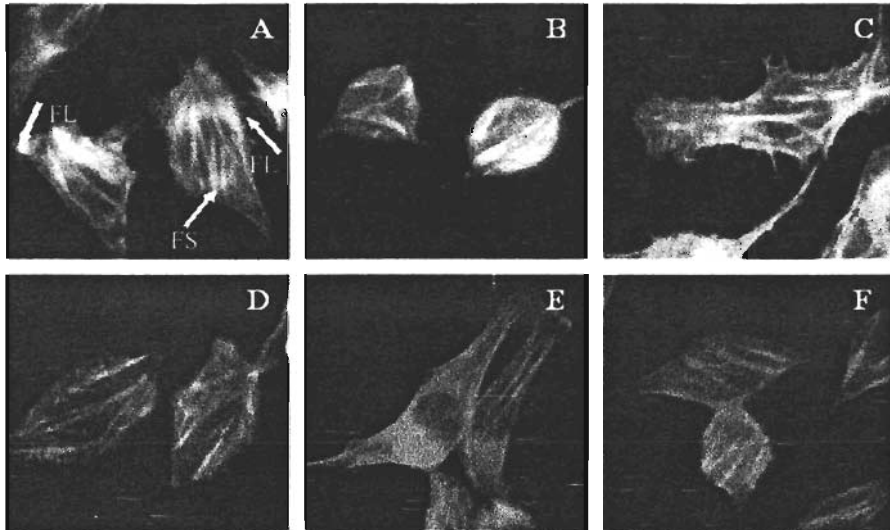


**Figura 3.** Efecto de antioxidantes en la disminución de la adhesión inducida por  $H_2O_2$ . (A) SAC 10 mM, tempol 100  $\mu M$  o glutatión 100  $\mu M$  no modifican el efecto de  $H_2O_2$  200  $\mu M$ , sin afectar la adhesión basal. La gráfica representa los promedios  $\pm$  e.e.m. de 5 experimentos independientes. (B) NAC 5 mM previene totalmente el efecto de  $H_2O_2$  200  $\mu M$  y no modifica la adhesión basal. Una concentración más alta de NAC (10 mM) modifica la adhesión basal y tiene un efecto aditivo al de  $H_2O_2$ . La gráfica representa los promedios  $\pm$  e.e.m. de 3 experimentos independientes. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas respecto al control ( $P < 0.05$ , Dunnet).



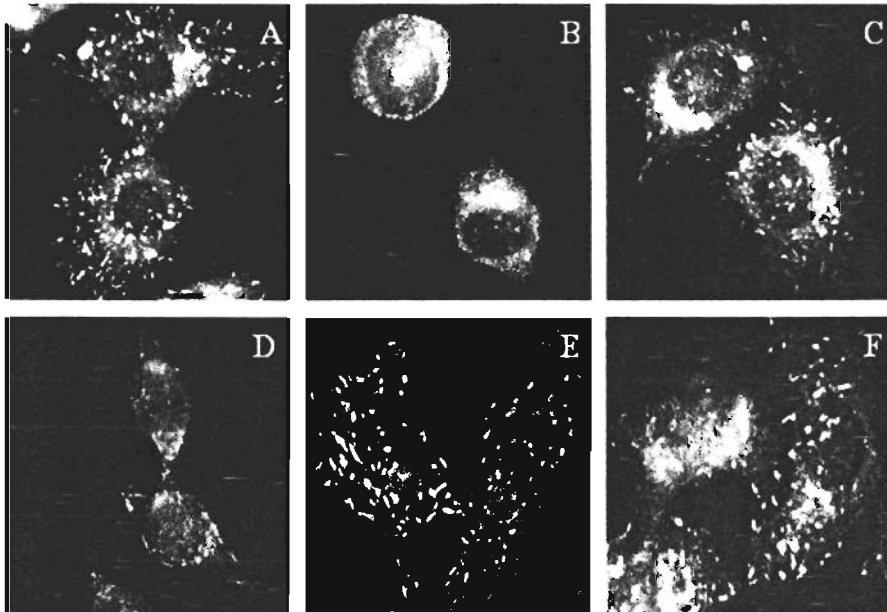
**Figura 4.** Efecto del inhibidor SB-203580 en la disminución de la adhesión inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. SB-203580 10 μM no previene el efecto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 μM y no modifica la adhesión basal. La gráfica representa los promedios ± e.e.m. de 3 experimentos independientes. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas respecto al control (P < 0.05, Dunnett).

*Tinción con faloidina- fluorescente.* Mediante la tinción de células L929 con faloidina conjugada con un fluorocromo determinamos que el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 μM modifica la morfología de las células y el rearrreglo del citoesqueleto de actina. En las células control se observan filopodios y la presencia de fibras de estrés a lo largo de toda la célula que tiene forma poligonal (Figura 5A). Estas características se modifican cuando se adiciona H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 μM durante 15 minutos; la célula pierde su forma poligonal y adquiere una forma esférica, los filopodios y las fibras de estrés desaparecen (Figura 5B). Cuando se adiciona simultáneamente NAC 5 mM se previene totalmente el efecto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 μM (Figura 5C). Una prevención parcial se observa con el tratamiento con SB-203580 10μM, pues hay presencia únicamente de fibras de estrés (Figura 5D). NAC 5 mM (Figura 5E) o SB-203580 10μM (Figura 5F) inducen la desaparición de filopodios, pero no modifican fibras de estrés.



**Figura 5.** Efecto de  $H_2O_2$  en la morfología y el rearreglo del citoesqueleto de actina de fibroblastos L929. Se muestran micrografías representativas de células teñidas con faloidina-fluorescente control (A),  $H_2O_2$  200  $\mu M$  (B),  $H_2O_2$  200  $\mu M$  + NAC 5 mM (C),  $H_2O_2$  200  $\mu M$  + SB-203580 10  $\mu M$  (D), NAC 5 mM (E) o SB-203580 10  $\mu M$  (F). (A) Las células control tienen una forma poligonal y la presencia de fibras de estrés (FS) y filipodios (FL), indicadas con flechas. (B)  $H_2O_2$  desorganiza el citoesqueleto de actina en células L929, se aprecia cambios en la morfología y la ausencia de fibras de estrés y filipodios. (C) El tratamiento simultáneo con NAC 5 mM previene totalmente el efecto inducido por  $H_2O_2$  200  $\mu M$ . (D) SB-203580 10  $\mu M$  previene parcialmente el efecto inducido por  $H_2O_2$  200  $\mu M$  (D). (E) NAC 5 mM o (F) SB-203580 10  $\mu M$  inducen la desaparición de filipodios, pero no modifican fibras de estrés.

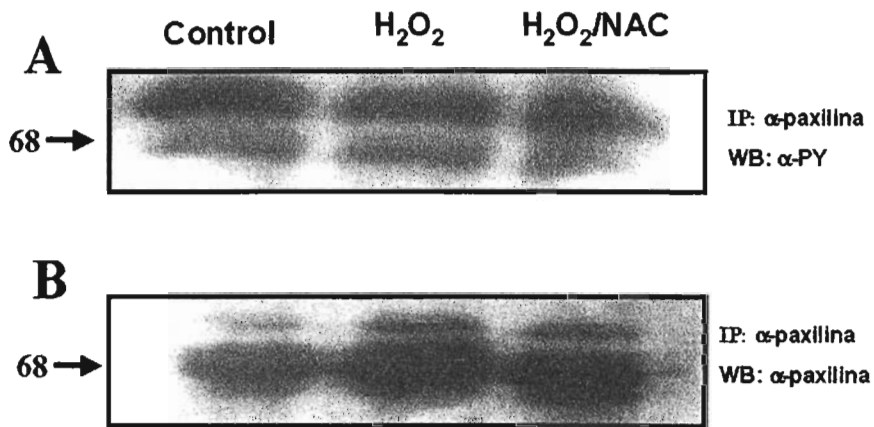
**Inmunofluorescencia.** Para evaluar la participación de paxilina en los efectos producidos por  $H_2O_2$ , NAC o SB-203580 realizamos inmunolocalizaciones para identificar modificaciones en su redistribución.  $H_2O_2$  200  $\mu M$  modificó la redistribución de paxilina, además se observó nuevamente el cambio en la morfología de la célula previamente identificado con la tinción con faloidina-fluorescente (Figura 6B). Cuando se adiciona simultáneamente NAC 5 mM se previene totalmente el efecto de  $H_2O_2$  200  $\mu M$  (Figura 6C), no así con SB-203580 10  $\mu M$  (Figura 6D). NAC 5 mM (Figura 6E) o SB-203580 10  $\mu M$  (Figura 6F) no modifican la redistribución de paxilina ya que presentan un patrón de distribución similar a las células control (Figura 6A).



**Figura 6.** Efecto de  $H_2O_2$  en la redistribución de paxilina de fibroblastos L929. Se muestran micrografías representativas de células control (A),  $H_2O_2$  200  $\mu M$  (B),  $H_2O_2$  200  $\mu M$  + NAC 5 mM (C),  $H_2O_2$  200  $\mu M$  + SB-203580 10  $\mu M$  (D), NAC 5 mM (E) o SB-203580 10  $\mu M$  (F). (A) Las células control presentan una forma poligonal y en toda la célula se puede observar un patrón de distribución de paxilina definido. (B)  $H_2O_2$  modifica la redistribución de paxilina y la morfología celular. (C) El tratamiento simultáneo con NAC 5 mM previene totalmente el efecto inducido por  $H_2O_2$  200  $\mu M$ . (D) El inhibidor SB-203580 10  $\mu M$  no modifica el efecto de  $H_2O_2$ . El tratamiento con NAC 5 mM (E) o SB-203580 10  $\mu M$  (F) no induce cambios en la redistribución de paxilina con respecto al control.

*Immunoprecipitación y Western Blot.* Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la activación de paxilina de fibroblastos L929, se realizó una inmunoprecipitación a partir de lisados totales de células sin tratamiento, con  $H_2O_2$  200  $\mu M$  o con  $H_2O_2$  200  $\mu M$  + NAC 5 mM. En la Figura 7A se observa que los tratamientos no modifican la activación de paxilina, ya que la fosforilación en residuos de tirosina es la misma en todos los carriles. Para comprobar que el efecto no se debe a diferencias en la cantidad de proteína, sobre la misma membrana se realizó la detección de paxilina (Figura 7B).





**Figura 7.** Efecto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/NAC sobre la activación de paxilina de fibroblastos L929. (A) El tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/NAC no modifica el grado de fosforilación en tirosina de paxilina con respecto al control. (B) La cantidad de paxilina no se modifica por los tratamientos.

## VI . Discusión.

Los experimentos que realizamos describen el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fibroblastos L929 sobre varios parámetros: adhesión a vitronectina, rearreglo del citoesqueleto de actina, redistribución de paxilina y fosforilación en residuos de tirosina de paxilina.

Los resultados que obtuvimos en los ensayos de adhesión son consistentes con lo reportado por Zhang en células PC-12 donde se demostró que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuye la adhesión a colágena. En este modelo la disminución de la adhesión se correlaciona con la depleción intracelular de ATP, y no con el incremento de Ca<sup>2+</sup> intracelular o la disminución en la expresión de la integrina  $\alpha 1\beta 1$  que reconoce a colágena (Zhang, 1994).

Aunque el mecanismo por el cual H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> regula la adhesión dependiente de integrinas no se ha aclarado, se sabe que puede modular directamente la actividad de integrinas y/o las vías de transducción dependientes de éstas. Ya se ha reportado que los tioles superficiales presentes en estos receptores pueden ser oxidados por ERO y como consecuencia se modifica su actividad (Laragione, 2003). La densidad de integrinas en la superficie de células BSC-1 puede ser modificada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM, al promoverse la redistribución de subunidades  $\alpha 3$  almacenadas en el citoplasma hacia la membrana (Gailit, 1993).

Para una eficiente adhesión a moléculas de matriz extracelular se requiere, además de la activación de integrinas, la integridad del citoesqueleto de actina. La disminución en la adhesión a vitronectina y los cambios morfológicos en células L929 correlacionan con la desorganización del citoesqueleto de actina. Nuestros resultados son semejantes a lo reportado por Mocali en fibroblastos expuestos a dosis subletales de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> donde se produce un decremento en la adhesión a plástico y estos cambios en la adhesión también correlacionan con la desorganización del citoesqueleto de actina (Mocali, 1995).

La disrupción de componentes del citoesqueleto interfiere directamente con el proceso de señalización que regula la adhesión y la estabilización de la adhesión. Los filamentos de actina están involucrados en varios niveles de la regulación de interacciones adhesivas; por ejemplo ya se ha demostrado que la completa disrupción de estos componentes suprime el agrupamiento de integrinas, el desarrollo de adhesiones focales y la señalización dependiente de la adhesión (Defilippi, 1999). El efecto de oxidantes sobre la organización del citoesqueleto ya ha sido descrito en varias líneas celulares y se ha determinado que algunas son más susceptibles que otras respecto al daño generado. En fibroblastos (Hout, 1997) y en células Caco-2 (Banan, 2001) el  $H_2O_2$  provoca la disrupción del citoesqueleto de actina, pero en células endoteliales el tratamiento con  $H_2O_2$  incrementa la formación de adhesiones focales, la reorganización del citoesqueleto de actina y la activación de MAPK p38, MAPK2/3 y Hsp27.

La adecuada organización del citoesqueleto de actina es indispensable durante la formación de los sitios de adhesión focal. Los sitios de adhesión focal son puntos clave de la señalización dependiente de integrinas y de la regulación de la adhesión. Es probable que el efecto del  $H_2O_2$  sobre la adhesión esté relacionado con modificaciones en las proteínas del citoesqueleto, en las proteínas adaptadoras y moléculas transductoras, lo que provoca un inadecuado reclutamiento y ensamblaje de estos complejos moleculares. En este contexto, ya ha sido reportado el efecto del  $H_2O_2$  sobre la redistribución y activación de paxilina. Esta proteína adaptadora es reclutada a los sitios de adhesión focal donde participa en la conexión de estímulos extracelulares que regulan la organización del citoesqueleto de actina y la adhesión.

En fibroblastos L929 el tratamiento con  $H_2O_2$  no permite la localización y distribución de paxilina en los sitios de adhesión focal. Este efecto se puede relacionar con la disminución en la adhesión, ya que la actividad de paxilina y su adecuada localización en los sitios de adhesión focal son indispensables para una eficiente adhesión, así como en la regulación la polimerización de actina y la migración celular. La actividad de paxilina está relacionada con su estado de fosforilación, dicha fosforilación puede llevarse a cabo en residuos de tirosina, serina o treonina. Se ha descrito la relación entre la activación de integrinas y la fosforilación en tirosina de paxilina mediante la acción de FAK o Src, que promueve la generación de sitios de unión para el dominio SH2 de otras proteínas adaptadoras.

Existe el antecedente de que en células endoteliales el tratamiento con  $H_2O_2$  1 mM durante 30 minutos incrementa el grado de fosforilación en tirosinas de paxilina y de FAK (Vepa, 1999). En nuestro modelo el tratamiento con  $H_2O_2$  no modifica el grado de fosforilación en tirosinas de paxilina, lo cual puede deberse a: 1) la fosforilación en tirosina no es relevante en el efecto del  $H_2O_2$ , y tal vez sea la fosforilación en serina/treonina la que participe activamente; 2) las condiciones experimentales en las que observamos el efecto sobre la adhesión a vitronectina no son las adecuadas para detectar diferencias en el grado de fosforilación en tirosina de paxilina, ya que en otros modelos se evalúan concentraciones más altas y tiempos de exposición más prolongados y 3) competencia de otra proteína homóloga para ser fosforilada. Respecto a este último punto, es de considerar la posible participación de una proteína homóloga a paxilina: Hic-5 (hydrogen peroxide-inducible clone 5). Esta proteína es un miembro de la familia LIM y estructuralmente está muy relacionada con paxilina. En fibroblastos se localiza en los sitios de adhesión focal, funciona como molécula adaptadora y regula la organización del citoesqueleto de actina (Turner, 2000). Hic-5 puede inhibir la fosforilación en tirosina de paxilina al competir por el sitio de unión de cinasas como FAK o PYK2. Estudios recientes indican que Hic-5 transloca de los sitios de adhesión focal al núcleo bajo condiciones de estrés oxidativo y promueve la inducción de c-fos.

Muchos estudios han demostrado la participación de la vía dependiente de MAPK p38 en la regulación de la adhesión, la organización del citoesqueleto de actina y en la respuesta ante el estrés oxidativo. Nuestros resultados indican que MAPK p38 participa en el rearrreglo del citoesqueleto de actina inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero no en la regulación del proceso de adhesión. El mecanismo por el cual MAPK p38 ejerce su efecto protector ya se ha descrito e involucra a proteínas moduladoras de la polimerización de actina: Hsp25/27 (proteínas de choque térmico). En presencia de estrés oxidativo MAPK p38 es fosforilada y activada y actúa sobre su sustrato MAPKAP2/3, posteriormente Hsp25/27 son fosforiladas por MAPKAP2/3 y forman agregados que se unen a la actina previniendo así la despolimerización (Guay, 1997).

Ya se reportó la participación de MAPK p38 y Hsp25 en el rearrreglo del citoesqueleto de actina de fibroblastos L929 expuestos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En ese estudio se concluyó que la fosforilación de Hsp25 por MAPK p38 no es indispensable en el efecto protector, ya que dicho efecto se debe a la regulación del estado redox intracelular por Hsp25. En presencia de estrés oxidativo Hsp25/27 regulan la producción de glutatión reducido (GSH) intracelular, de tal manera que el nivel de oxidantes disminuye y no se produce daño en el citoesqueleto (Prévile, 1998). En nuestros ensayos identificamos que la inhibición de MAPK p38 con SB-203580 previene parcialmente del efecto producido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y considerando los antecedentes, es posible que a pesar de estar bloqueada esta cinasa y no se fosforile Hsp25, el efecto parcial se deba a un incremento en los niveles intracelulares de GSH y a la subsecuente disminución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

El efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la adhesión a vitronectina, el rearrreglo del citoesqueleto de actina y la redistribución de paxilina se previno mediante la adición del antioxidante N- acetil cisteína (NAC). Este compuesto es un tiol que reacciona con ERO, es precursor de L-cisteína, incrementa los niveles de GSH y sirve como agente reductor. El NAC puede regular vías de transducción de señales ya que inhibe a JNK, MAPK p38, AP-1 y NF-κB.

Además puede prevenir la apoptosis y promover la supervivencia mediante la activación de la vía ERK1/2. La actividad de muchas proteínas puede ser modificada por la acción reductora del NAC (Zafarullah, 2003). Por ejemplo, el tratamiento con NAC modifica la actividad de la GTPasa Rac1, productora de superóxido, bloqueando la reorganización del citoesqueleto de actina en células endoteliales (Moldovan, 1999). Además es un agente terapéutico usado en inflamación, fibrosis, invasión y disfunción endotelial. La evidencia indica que los mecanismos antioxidantes del NAC son muchos y es muy probable que actúen en forma cooperativa y/o en cascada.

Existe evidencia de la participación de las ERO en la generación de patologías como el cáncer, la arteroesclerosis, el síndrome de Alzheimer y el proceso neurodegenerativo, entre otras. Estas patologías son consecuencia de modificaciones en diferentes procesos biológicos, como la adhesión, la migración, la proliferación y la muerte celular. El esclarecimiento del mecanismo por el cual las ERO modulan estos procesos celulares puede justificar el uso de antioxidantes como tratamientos adyuvantes para el tratamiento de estas patologías.

## VII . Conclusiones.

- En el modelo que se montó, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración de 200 μM disminuye la adhesión (80%) de fibroblastos L929 a vitronectina.
- La adición simultánea del antioxidante NAC 5 mM previene el efecto sobre la adhesión inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> .
- Los efectos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y NAC en la adhesión involucran modificaciones en el rearreglo del citoesqueleto de actina y en la redistribución de paxilina.
- En este modelo, MAPK p38 participa en la desorganización del citoesqueleto de actina producido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero no en la regulación del proceso de adhesión.
- Los tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/NAC no modifican la activación de paxilina mediada por fosforilación en residuos de tirosina.

## VIII . Bibliografia.

- ❖ Avdonin P. **2000**. Receptor-dependent regulation of  $(Ca^{2+})_i$  and phospholipase C in vascular endothelial cells. *J. Recept Signal Transduct Res.* **20**:235-254.
- ❖ Bae Y., Kang S., Seo M., Baines I., Tekle E., Chock P., Rhee S. **1997**. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* **272**: 217-221.
- ❖ Barber D.A., Harris S.R. **1994**. Oxygen free radicals and antioxidants: a review. *Am. Pharm.* **34**:26-35.
- ❖ Barker C. W. et al. **1994**. Down-regulation of P450 1A1 and P450 1A2 mRNA expression in isolated hepatocytes by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **269**:3985.
- ❖ Bellis S., Perrotta J., Curtis M., Turner C. **1997**. Adhesion of fibroblasts to fibronectin stimulates both serine and tyrosine phosphorylation of paxillin. *Biochem J.* **325**: 375–381.
- ❖ Benndorf R., Hayess k., Ryazantsev S., Wieske M., Behlke J., Lustfch G. **1994**. Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity. *J. Biol. Chem.* **269**:20780-20784.
- ❖ Betteridge D.J. **2000**. What is oxidative stress?. *Metabolism.* **49**:3-8.
- ❖ Beyaert R., Cuenda A., Van den Berghe W., Plaisance S., Lee C., Haegeman G., Cohen T., Fiers W. **1996**. The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis in response to tumour necrosis factor. *EMBO J.* **15**:1914.
- ❖ Boveris A., Oshino N., Chance B. **1972**. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J.* **128**: 617-630.
- ❖ Brodie A., Reed D. **1987**. Reversible oxidation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase thiols in human lung carcinoma cells by  $H_2O_2$ . *Biochem. Biophys. Commun.* **148**. 128-133.
- ❖ Brown M. C., Turner C. E. **2002**. Roles for the tubulin- and PTP-PEST-binding paxillin LIM domains in cell adhesion and motility. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* **34**: 855 - 863.



- ❖ Brown M., Perrotta J., Turner C. **1996**. Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *J. Cell Biol.* **135**:1109-1123.
- ❖ Brown M., Perrotta J., Turner C. **1998**. Serine and threonine phosphorylation of the paxillin LIM domains regulates paxillin focal adhesion localization and cell adhesion to fibronectin. *Mol. Biol. Cell.* **9**:1803-1816.
- ❖ Brown M., Turner C. **1999**. Characterization of paxillin LIM domain-associated serine threonine kinases: activation by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J. Cell Biochem.* **76**: 99-108.
- ❖ Brown M., Turner C. **2004**. Paxillin: Adapting to Change. *Physiol Rev.* **84**: 1315–1339.
- ❖ Burridge K., Chrzanowska W. **1996**. Focal adhesion, contractility and signaling. *Ann Rev. Cell Dev. Biol.* **12**: 463-519.
- ❖ Cao H., Sanguinetti A., Mastick C. **2004**. Oxidative stress activates both Src-kinases and their negative regulator Csk and induces phosphorylation of two targeting proteins for Csk: caveolin-1 and paxillin. *Experimental Cell Research.* **294**:159-171.
- ❖ Carlier F. **1991**. Actin: protein structure and filament dynamics. *The Journal of Biological Chemistry.* **266**:1-4.
- ❖ Chance B., Sies H., Boveris A. **1979**. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* **59**:527-605.
- ❖ Chang L., Karin M. **2001**. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* **410**: 37-40.
- ❖ Christman M., Morgan R., Jacobson F., Ames B. **1985**. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell.* **41**:753-762.
- ❖ Clarkson P. M., Thompson H. S. **2000**. Antioxidants : what role do they in physical activity and health? *Am. J. Clin. Nutr.* **72**:637-646.
- ❖ Colavitti R., Pani G., Bedogni B., Anzevino R., Borrello S., Waltenberger J., Galeotti T. **2001**. Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/KDR. *J. Biol. Chem.* **277**:3101-3108

- ❖ Collins T., Cybulsky M. **2001**. NF- $\kappa$ B: pivotal mediator innocent bystander in atherogenesis? *J. Clin. Invest.* **107**:255-264.
- ❖ Condeelis J. **2001**. How is actin polymerization in vivo?. *Trends in Cell Biology.* **11**: 288-293.
- ❖ Cuenda A., Rouse J., Doza N., Meier R., Cohen T., Gallagher F., Young R., Lee C. **1995**. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stress and interleukin-1. *FEBS Lett.* **364**:229.
- ❖ Dalle-Donne I., Rossi R., Milzani A., Di Simplicio P., Colombo R. **2001**. The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. *Free Radical Biology and Medicine.* **31**: 1624 -1632.
- ❖ Danen H., Yamada M. **2001**. Fibronectin, integrins and growth control. *Journal of Cellular Physiology.* **189**:1-13.
- ❖ Dröge W. **2002**. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* **82**: 47-95.
- ❖ Euikyung K., Jung H., Hyeon S., Sung H., Pann G. **2002**. Thimerosal stimulates focal adhesion kinase and cytoskeletal changes by redox modulation. *Biochem. Biophys.* **1593**:9-15.
- ❖ Finkel T. **2003**. Oxidant signals and oxidative stress. *Current Opinion in Cell Biology.* **15**: 247-254.
- ❖ Forsyth C., Pulai J., Loeser R. **2002**. Fibronectin fragments and blocking antibodies to  $\alpha 2\beta 1$  and  $\alpha 5\beta 1$  integrins stimulate mitogen-activated protein kinase signaling and increase collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) production by human articular chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism.* **46**: 2368-2376.
- ❖ Freeman B., Crapo J. **1982**. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* **47**: 412-426.
- ❖ Gille J., Joenje H. **1989**. Chromosomal instability and progressive loss of chromosomes in HeLa cells during adaptation to hyperoxic growth conditions. *Mutant. Res.* **219**:225.
- ❖ Giri D., Aggarwal B. **1998**. Constitutive activation of NF- $\kappa$ B causes resistance to apoptosis in human cutaneous T cell lymphoma HuT-78 cells. Autocrine role of tumor necrosis factor and reactive intermediates. *J. Biol. Chem.* **273**: 14008-14014.

- ❖ González-Rubio M., Voit S., Rodríguez-Puyol D., Weber M., Marx M. **1996**. Oxidative stress induces tyrosine phosphorylation in PDGF- $\alpha$  and - $\beta$  receptors and pp60<sup>c-src</sup> in mesangial cells. *Kidney Int* . **50**:164-173.
- ❖ Gotoh Y., Cooper J. **1998**. Reactive oxygen species and dimerization-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in tumor necrosis factor-alpha signal transduction. *J. Biol. Chem.* **273**: 17477-17482.
- ❖ Guay J., Lambert H., Gingras-Breton G., Lavoie J., Huot J., Landry J. **1997**. Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J. Cell Sci.* **110**:357-368.
- ❖ Gupta S., Cambell D., Derijard B., Davis R. **1995**. Transcription factor ATF2 regulation by JNK signal transduction pathway. *Science.* **267**:389-393.
- ❖ Halliwell B., Gutteridge JMC. **1989**. *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford University Press.
- ❖ Hirota K., Murata M., Sachi Y., Nakamura H., Takeuchi J., Mori K. Yodoi J. **1999**. Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* **274**: 27891-37897.
- ❖ Huang C., Borchers C., Schaller M., Jacobson K. **2004**. Phosphorylation of paxillin by p38MAPK is involved in the neurite extension of PC-12 cells. *The Journal of Cell Biology.* **164**:593-602.
- ❖ Huang C., Rajfur Z., Borchers C., Schaller M., Jacobson K. **2003**. JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration. *Nature.* **424**: 219-223.
- ❖ Humphries MJ. **2000**. Cell adhesion assays. *Meth. Mol. Biol.* **139**:279-285.
- ❖ Huot J., Houle F., Spitz D., Landry J. **1997**. HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res.* **56**:273-279.
- ❖ Iwai K., Drake S., Wehr N., Weissman A. LaVaute T., Minato N., Klausner R., Levine R., Rouault T. **1998**. Iron-dependent oxidation, ubiquitination, and degradation of iron regulatory protein-2: implications for degradation of oxidized proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**: 4924-4928.

- ❖ Khwaja A., Downward J. **1997**. Lack of correlation between activation of Jun-NH2-terminal kinase and induction of apoptosis after detachment of epithelial cells. *J. Cell Biol.* **139**:1017-1023.
- ❖ Klaunig J. E., Xu Y., Bachowski S., Jiang J. **1997**. Free-radical oxygen-induced changes in chemical carcinogenesis. *Free Radical Toxicology.* 375-400.
- ❖ Klaunig J., Kamendulis L. **2004**. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **44**:239-67.
- ❖ Konishi H., Matsuzaki H., Tanaka M., Takemura Y., Kuroda S. **1997**. Activation of protein kinase B (Akt/RAC-protein kinase) by cellular stress and this association with heat shock protein Hsp27. *FEBS Lett.* **410**:493-498.
- ❖ La Flamme S., Auer K. **1996**. Integrin signaling. *Sem Cancer Biol.* **7**: 111-118.
- ❖ Laferriere J., Houle F., Taher MM., Valerie K., Hout J. **2001**. Transendothelial migration of colon carcinoma cells requires expression of E-selectin by endothelial cells and activation of stress-activated protein kinase-2 (SAPKp38) in the tumor cells. *J. Biol. Chem.* **276**:33762-33772.
- ❖ Lamari F., Bernard M., Braut-Boucher F., Derappe C., Pichon j., Foglietti M., Aubery M. **2001**. Opposite effects of oxidative stress on endothelial cells lines (ECV304 and Eahy929). Interactions with extracellular matrix. *Biological Reactive Intermediates VI*. Edited by Dansette et al Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- ❖ Lando D., Pongratz I., Poellinger L., Whitelaw M. **2000**. A redox mechanism controls differential DNA binding activities of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  and the HIF-like factor. *J. Biol. Chem.* **275**: 4618-4627.
- ❖ Larsson R., Ceruti P. **1989**. Translocation and enhancement of phosphotransferase activity of protein kinase C following exposure in mouse epidermal cells to oxidants. *Cancer Res.* **49**: 5627-5632.
- ❖ Lee S., Yang K., Kwon J., Lee C., Jeong W., Rhee S. **2002**. Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* **277**:20336- 20342.
- ❖ Liu H., Nishitoh H. Ichijo H. Kyriakis J. **2000**. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor-2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 2198-2208.

- ❖ Lodish H., Darnell J., et al. **2000**. *Molecular Biology*, 4th. Edition. Scientific American Books. USA. 1033-1174.
- ❖ Mahadev K., Wu X., Zilbering A., Zhu L., Lawrence J., Goldstein B. **2001**. Hydrogen peroxide generated during cellular insulin stimulation is integral to activation of the distal insulin signaling cascade in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **276**:48662-48669.
- ❖ Matsubara T., Ziff M. **1986**. Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *J. Immunol.* **137**: 3295-3298.
- ❖ Mocali A., Caldini R., Chevanne M., Paoletti F. **1995**. Induction, effects and quantification of sublethal oxidative stress by hydrogen peroxide on cultured human fibroblasts. *Experimental Cell Research.* **216**:388-395.
- ❖ Moldovan L., Irani K., moldovan N., Finkel T. **1999**. The actin cytoskeleton reorganization induced by Rac1 requires the production of superoxide. *Anioxid. Redox Signal.* **1**:29-43.
- ❖ Nagata M., Yamamoto H., Shibasaki S., Sakamoto Y., Matsuo H. **2000**. Hydrogen peroxide augments eosinophil adhesion via  $\beta 2$  integrin. *Immunology.* **10**:412-418.
- ❖ Nathan C. **1992**. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**:3051-3064.
- ❖ Nomura M., Ma W., Chen N., Bode A., Dong Z. **2000**. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced NF- $\kappa$ B activation by tea polyphenols, epigallocatechin gallate, and theaflavins. *Carcinogenesis.* **21**:1885-1890.
- ❖ Pavlović D., Dorđević V., Kocić G. **2002**. A "cross-talk" between oxidative stress and redox cell signaling. *Facta Universitatis.* **9**:131-137.
- ❖ Pawlak G., Helfman M. **2001**. Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Current Opinion in Genetics and Development.* **11**:41-47.
- ❖ Prévile X., Gaestel M., Arrigo AP. **1998**. Phosphorylation is not essential for protection of L929 cells by Hsp25 against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated disruption actin cytoskeleton, a protection which appears related to the redox change mediated by Hsp25. *Cell Stress and Chaperones.* **3**:177-187.
- ❖ Rainwater R., Parks D., Anderson M., Tegtmeyer P., Mann K. **1995**. Role of cysteine residues in regulation of p53 function. *Mol. Cell. Biol.* **15**:3892-3903.

- ❖ Rice-Evans C., Burdon R. **1993**. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Progress in Lipid Research*. **32**:71-110.
- ❖ Ruoslahti E., Giancotti F. **1989**. Integrins and tumor cell dissemination. *Cancer Cells*. **1**:119-126.
- ❖ Saitho M., Nishitoh H., Fujii M., Takeda K., Tobiume K., Sawada Y., Kawabata M., Miyazono K., Ichijo H. **1998**. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK1)-1. *EMBO J*. **17**: 2596-2606.
- ❖ Savitsky P., Finkel T. **2002**. Redox regulation of Cdc25C. *J. Biol. Chem*. **277**:20535-20540.
- ❖ Schaller M., Hildebrand J., Shannon J., Fox J., Vines r., Parsons J. **1995**. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125<sup>FAK</sup>, directs SH-dependent binding pp60<sup>FAK</sup>. *Mol. Cell Biology*. **14**:1680-1688.
- ❖ Schlaepfer D., Hanks S., Hunter T., Van der Geer P. **1994**. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by Grb2binding to focal adhesion kinase. *Nature*. **372**:786-791.
- ❖ Schmid E., Hotz-Wagenblatt A., Hack V., Dröge W. **1999**. Phosphorylation of the insulin receptor kinase by phosphocreatine in combination with hydrogen peroxide. The structural basis of redox priming. *FASEB J*. **13**:1491-1500.
- ❖ Schreck R., Rieber P., Baeuerle P. **1991**. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- $\kappa$ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J*. **10**:2247-2258.
- ❖ Schulze-Oshoff K., Ferrari D., Los M., Wesselborg S., Meter M. **1998**. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem*. **254**:439-459.
- ❖ Seger R., Krebs E. **1995**. The MAPK signaling cascade. *FASEB J*. **9**:726-735.
- ❖ Seisky A. M., Kamendulis L. M., Klaunig J. E. **2002**. Hepatic effects of 2-butoxiethanol in rodents. *Toxicol. Sci*. **70**:252-260.
- ❖ Shi Y., Gaestel M. **2002**. In the cellular garden of forking paths: how p38 MAPKs signal for Downstream assistance. *Biol. Chem*. **383**: 1519-1536.
- ❖ Sies H. **1985**. Oxidative stress: introductory remarks. *Oxidative Stress*, ed. H. Sies. Academic Inc. ( incertos 1 y 2).

- ❖ Song S. H., Lee K. H., Kang M. S., Lee Y. J. **2000**. Role of paxillin in metabolic oxidative stress-induced cytoskeletal reorganization: involvement of SAPK signal transduction pathway and PTP-PEST gene expression. *Free Radical Biology and Medicine*. **29**: 61 - 70.
- ❖ Storz G., Tartaglia L., Ames B. **1990**. Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science*. **248**: 189-194.
- ❖ Subuaste C., Pertz O., Adamson E., Turner C., Junger S., Hanh K. **2004**. Vinculin modulation of paxillin-FAK interactions regulates ERK to control survival and motility. *The Journal of Cell Biology*. **165**: 371-381.
- ❖ Suzukawa K., Miura K., Mitsushita J., Resau J., Hirose K., Cristal R., Kamata K. **2000**. Nerve growth factor-induced neuronal differentiation requires generation of Rac1-regulated reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* **275**:13175-13178.
- ❖ Thannickal J., Fanburg B. **2000**. Reactive oxygen species in cell signaling. Invited Review, *American Journal of Physiology*. **279**: L1005-L1028.
- ❖ Tolbert N., Essner E. **1981**. Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes. *J. Cell Biol.* **91**: 271-283.
- ❖ Tsubouchi A., Sakakura J., Yagi R., Mazaki Y., Schaefer E., Yano H., Sabe H. **2002**. Localized suppression of RhoA activity by Tyr31/ 118-phosphorylated paxillin in cell adhesion and migration. *J. Cell Biol.* **159**: 673-683.
- ❖ Turner C., Glenney R., Burridge B. **1990**. Paxillin; a new vinculin-binding protein present en focal adhesions. *J. Cell Biol.* **111**:1059-1068.
- ❖ Vepa S., Scribner W., Parinandi N., English D., García J., Natarajan V. **1999**. Hydrogen peroxide stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase in vascular endothelial cells. *Am J Physiol.* **277**: L150-L158.
- ❖ Vिलее C. **1996**. *Biología de Vилее*. 3ª ed. Editorial Interamericana McGraw Hill, pag. 683-702.
- ❖ Walsh M., Thamilselvan V., Grotelueschen R., Farhana L., Basson M. **2003**. Absence of adhesion triggers differential FAK and SAPKp38 signals in SW620 human colon cancer cells that may inhibit adhesiveness and lead to cell death. *Cell Physiol Biochem.* **13**:135-146.

- ❖ Wang D., Tu X., Cohen R., Brecher P. **2000**. Distinct effects of N-acetylcysteine and nitric oxide on angiotensin II-induced epidermal growth factor receptor phosphorylation and intracellular Ca<sup>2+</sup> levels. *J. Biol. Chem.* **275**:12223-12230.
- ❖ Wang E., Wong A. Cortopassi G. **1997**. The rate of mitochondrial mutagenesis is faster in mice than in humans. *Mutat. Res.* **377**:157-166.
- ❖ Zafarullah M., Li W., Sylvester J., Ahmad M. **2003**. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**: 6-20.
- ❖ Zhang Z., Turner C., Drzewiecki J., Hinshaw B., Hyslop A. **1994**. *Brain Research.* **662**: 189-197.
- ❖ Zhou L. Yohoung U., Yue B. **1999**. Oxidative stress affects cytoskeletal structure and cell-matrix interactions in cells from an ocular tissue: the trabecular meshwork. *Journal of Cellular Physiology.* **180**:182-189.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA