

Tesi doctoral presentada per En/Na

Yolanda CÁMARA NAVARRO

amb el títol

**"Estudio funcional de la proteína desacopladora
mitocondrial UCP3 en relación con la apoptosis y
las especies reactivas de oxígeno"**

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

BIOLOGIA

Barcelona, 25 de juliol de 2005.

Facultat de Biologia
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular



UNIVERSITAT DE BARCELONA



DISCUSIÓN GLOBAL

Desde su clonación en 1997, muchos son los grupos de investigación que han tratado de determinar cuál es la actividad bioquímica y función fisiológica de UCP3, sin llegar hasta la fecha, a establecer un consenso claro en cuanto a ambos aspectos. El presente proyecto de tesis doctoral, se ha centrado en caracterizar la posible relación de UCP3 con el fenómeno de muerte celular programada y la producción de especies reactivas de oxígeno.

Nuestros primeros estudios, se basaron en la utilización de un sistema de expresión inducible TetOn, en que células 293-HEK fueron transfectadas de forma estable para la expresión inducible de la forma humana de UCP3. Este sistema nos permitía expresar elevados niveles de la proteína en un entorno libre de su expresión endógena, como es el que proporciona dicha línea celular proveniente de riñón. Aunque comprobamos que UCP3 se localizaba subcelularmente en mitocondria y que la línea utilizada ofrecía un sistema homólogo para la expresión de la forma humana de la proteína, quisimos determinar en primer lugar, la funcionalidad de la proteína *in vitro*. Previamente, se había observado en otros modelos celulares, que la expresión de UCP3 estaba asociada a un descenso en el potencial de membrana mitocondrial (García-Martínez et al., 2001). Realizando un estudio con células permeabilizadas, determinamos en nuestro sistema de expresión, que UCP3 inducía un aumento en el consumo de oxígeno en estado 4 en presencia de palmitato, aceleración en el consumo que era parcialmente inhibible por GDP. La inhibición por GDP también se manifestó en la capacidad del nucleótido de purina para repolarizar la membrana tras inducir una disminución del $\Delta\Psi_m$ con palmitato. Así, describimos que UCP3 promovía un **desacoplamiento inducido por ácidos grasos y sensible a GDP**, de acuerdo con el comportamiento bioquímico descrito para UCP1, y demostrando la funcionalidad de la proteína UCP3 expresada *in vitro*. A pesar de que el comportamiento bioquímico que describimos para UCP3, está de acuerdo con las observaciones de otros autores (Echtay et al., 2002b; Jaburek et al., 1999) existen datos contradictorios al respecto de la acción de ácidos grasos o GDP, que podría depender del tipo celular o las condiciones experimentales. De hecho, la expresión ectópica de elevados niveles de UCP3 en hígado, que en condiciones basales permite la expresión de la proteína en un entorno libre de UCPs, no nos permitió detectar ninguna actividad desacoplante de dichas características.

En paralelo a la realización de estos estudios, surgieron varios datos en la literatura que cuestionaban la utilización de sistemas de sobreexpresión para el estudio de la actividad de estas proteínas. En estos casos, se demostraba la posibilidad de causar un desacoplamiento artefactual, como consecuencia indirecta de la expresión de gran cantidad de proteína en la membrana mitocondrial interna (Cadenas et al., 2002; Guerini et al., 2002). Este artefacto podía suponer una afectación general de la función mitocondrial (colapso del potencial de membrana mitocondrial, déficit de ATP, etc.) alterando de forma significativa, entre otros, a los estudios bioenergéticos y apoptóticos que eran de nuestro interés. Sin embargo, en nuestro caso no observamos una alteración de la tasa de respiración en células HEK-293 enteras al inducir la expresión de UCP3, ni en condiciones basales, ni tampoco en estado 4. Además, el trabajo con células permeabilizadas nos permitió determinar como hemos visto, que el desacoplamiento inducido en presencia de ácidos grasos era regulable por GDP, luego podíamos descartar en nuestro sistema la posibilidad de provocar un aumento incontrolado de la conductancia en presencia de UCP3. Por otro lado, la inyección *in vivo* del vector adenovírico para la expresión de UCP3, no supuso en mitocondrias aisladas de hígado, una alteración de la tasa de consumo de oxígeno en estado 4, ni del índice de control respiratorio, sugiriendo la ausencia de un desacoplamiento inespecífico.

La expresión de UCP3 en nuestro sistema no inducía apoptosis *per se*, sin embargo, **sensibilizaba a las células 293-HEK a estímulos pro-apoptóticos dependientes de mitocondria** como la staurosporina. Pudimos observar como la sensibilización se manifestaba en parámetros claramente dependientes de la regulación que ejerce la mitocondria sobre la apoptosis, como la liberación de citocromo c o la activación de caspasa-9. Este hecho favorecía la hipótesis de que la presencia de UCP3 pudiera estar mediando la sensibilización de forma directa, ya que es esperable que de tener una acción sobre la regulación del proceso apoptótico, ésta tenga lugar a través de la mitocondria dónde se localiza la proteína.

Una de las formas en que UCP3 podría estar favoreciendo la apoptosis es a través de su actividad desacoplante. Durante el proceso apoptótico, de hecho, se ha descrito una disminución en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$). Sin embargo, la relación de dicha despolarización con la regulación del proceso, parece ser compleja, ya que no está claro si juega un papel en la generación del fenómeno, o si se trata de una consecuencia del mismo (Ly et al., 2003). Así, los desacoplantes químicos pueden sensibilizar a la célula frente a estímulos pro-apoptóticos (Hao et al., 2004; Linsinger et al., 1999; Vier et al., 2004), inducir la muerte celular (Armstrong et al., 2001; Dispersyn et al., 1999) o

incluso inhibirla (Stoetzer et al., 2002). La actividad desacoplante de la proteína puede suponer también una alteración del estatus bioenergético de la célula. Un descenso abrupto en los niveles de ATP, como el causado por un fuerte desacoplamiento, puede desencadenar la muerte celular (Mills et al., 2002; Sun and Zemel, 2004). Sin embargo, en nuestro modelo, la expresión de UCP3 no comporta una afectación de los niveles de ATP. De hecho, datos previos, sugieren que la presencia de UCP3 promueve un desacoplamiento suave, que facilita la oxidación de ácidos grasos e incluso conlleva un incremento en los niveles de ATP (Garcia-Martinez et al., 2001).

La sensibilidad del MPTP a un conocido inductor de su apertura, como es el calcio se veía también incrementada en las células HEK-293 en presencia de UCP3. Este hecho sugiere una relación entre la actividad de UCP3 y la regulación de la apertura del poro. Esta interacción podría ser a través de un efecto sobre el $\Delta\Psi$, ya que agentes desacoplantes pueden inducir la apertura del poro de transición en la permeabilidad o MPTP (Eriksson, 1991; Harris et al., 1979; Igbavboa and Pfeiffer, 1991; Jung et al., 1997; Jurkowitz et al., 1983; Jurkowitz and Brierley, 1982) o a través de la interacción directa de UCP3 con proteínas que forman parte del MPTP. En el mismo sentido, en ensayos de *swelling* realizados sobre mitocondrias aisladas del hígado de ratones transducidos *in vivo* con un adenovirus para la expresión de UCP3, se observó una mayor sensibilidad del MPTP a su apertura en respuesta a agentes inductores como el calcio y el atractilato.

Otro miembro de la familia de transportadores mitocondriales, como la proteína ANT, forma parte del MPTP. ANT tiene una función relevante en la fisiología mitocondrial como transportador de ATP/ADP, pero su estructura proteica le permite adoptar una conformación en la que actúa como canal permeable al calcio, ante determinados estímulos (Brustovetsky and Klingenberg, 1994). Se cree que esta actividad de ANT como canal es fundamental en la transición de permeabilidad de la membrana mitocondrial. Un transportador presenta una gran especificidad de sustrato, ya que su unión proporciona la energía necesaria para que se produzca el cambio conformacional que permite catalizar el transporte. Los canales en cambio, permanecen abiertos por períodos limitados en los que permiten el paso de gran cantidad de sustrato y de forma poco específica. Se ha descrito un comportamiento similar para UCP1, que se sabe puede comportarse como un canal de Cl^- en determinadas condiciones experimentales (Arechaga et al., 2001; Huang and Klingenberg, 1996). La proteína ANT comparte otras características con la familia de UCPs, como la capacidad de catalizar el transporte de protones activado por ácidos grasos (Brustovetsky and Klingenberg, 1994; Wojtczak et al., 1998). No es por tanto extraño pensar que UCP3 pudiera estar participando también

en el fenómeno de transición de la permeabilidad. Además, recientemente se ha descrito que se puede dar la transición en la permeabilidad de la membrana, en organismos carentes de ANT, lo que sugiere la existencia de otras proteínas capaces de substituir a dicha proteína en esta función (Kokoszka et al., 2004).

Como hemos mencionado previamente, los miembros de la familia Bcl-2 actúan como reguladores del proceso de apoptosis a nivel mitocondrial. Entre los miembros anti-apoptóticos de la familia, se encuentra Bcl-2, y entre los pro-apoptóticos Bax. Bax ejerce su papel promotor de la apoptosis translocándose desde su ubicación habitual en citosol, a la membrana mitocondrial externa, dónde Bcl-2 puede contrarrestar su acción promotora de muerte celular. En nuestros estudios observamos que en presencia de UCP3, dicha relación se encontraba aumentada en mitocondria. Una relación Bax/Bcl-2 aumentada en mitocondria, puede considerarse como un factor sensibilizador a la muerte celular inducida por staurosporina.

UCP3 podría también interactuar con otras proteínas que están relacionadas con la regulación del proceso de apoptosis. Hasta el momento la única interacción directa descrita es la de UCP3 con un miembro de la familia de proteínas 14.3.3. (Pierrat et al., 2000). Esta familia de proteínas está constituida por numeroso miembros que participan en diversos y relevantes procesos celulares que van desde el control del ciclo celular, a la transducción de señal y la regulación de la apoptosis. Pueden actuar como factores anti-apoptóticos secuestrando proteínas que promueven la muerte celular, como Bad o Bax (Nomura et al., 2003; Subramanian et al., 2001). Curiosamente, el miembro capaz de interactuar con Bax, la proteína 14.3.3θ, es el mismo que interactúa con UCP3. Así, UCP3 podría estar desplazando a Bax de su unión con la proteína 14.3.3θ, lo que explicaría su mayor presencia en las mitocondrias de las células en las que inducimos la expresión de la proteína desacopladora.

Estudios que han aparecido durante la realización de esta tesis, indican que la proteína UCP2 puede inducir o reprimir la muerte celular en función del tipo celular (Mattiasson et al., 2003; Mills et al., 2002; Sun and Zemel, 2004; Teshima et al., 2003). De hecho, recientemente se ha relacionado a la propia proteína UCP3 con la protección neuronal frente a estímulos pro-apoptóticos como la hiperglicemia (Leininger et al., 2004; Vincent et al., 2004a). Sin embargo, el principal lugar de expresión de UCP3 *in vivo* es el músculo esquelético, y es por tanto en este tejido donde creímos indispensable determinar el sentido biológico de la relación que UCP3 puede tener con la muerte

celular. Por eso, en una segunda parte de la presente tesis doctoral, el estudio se ha trasladado al modelo de células musculares en cultivo.

El músculo es un tejido particular en cuanto al desarrollo de la apoptosis, ya que está constituido por células multinucleares y con un contenido mitocondrial muy variable, que además adquieren un fenotipo de resistencia a la apoptosis como parte del programa de diferenciación miogénica. Existen muy pocos datos en la literatura acerca de la regulación de vías apoptóticas en el músculo esquelético, aunque este proceso parece jugar un importante papel en procesos fisiológicos y patofisiológicos en el músculo adulto, como el desarrollo, el envejecimiento, y en el origen de diversas distrofias (Dirks and Leeuwenburgh, 2002; Sandri and Carraro, 1999).

La expresión de UCP3 está asociada a señales de estrés metabólico como un acúmulo de ácidos grasos libres (Brun et al., 1999b; Gong et al., 1997; Weigle et al., 1998), TNF α (Busquets et al., 1998; Masaki et al., 1999a), procesos de caquexia (Bing et al., 2000) o sepsis (Sun et al., 2003) que pueden desencadenar procesos apoptóticos.

Como hemos visto en la *Introducción* a este trabajo, datos recientes sugieren que las proteínas desacopladoras UCP2 y UCP3 estarían participando en el control de la producción de ROS a través de su capacidad para disminuir el potencial de membrana mitocondrial. De hecho, los casos en los que se ha descrito un papel protector frente a la muerte celular por parte de UCP2, se han relacionado con su capacidad para limitar la generación de ROS (Diano et al., 2003; Mattiasson et al., 2003). La producción de ROS es un conocido modulador de la respuesta apoptótica en diferentes modelos, aunque la relación entre ambos procesos es como hemos visto, muy compleja. Los ROS juegan además un importante papel en la fisiología muscular, participando en la contracción. Los datos disponibles a cerca de las características del proceso apoptótico en el entorno del músculo esquelético diferenciado, son sin embargo, escasos. Por ello, una primera parte del estudio realizado en líneas musculares, se centró en caracterizar la respuesta muscular a la apoptosis, y su posible relación con la producción de ROS.

Como hemos mencionado previamente, la célula muscular adquiere resistencia a la apoptosis como parte del programa normal de miogénesis, así que el comportamiento celular en términos de apoptosis y estrés oxidativo era previsiblemente diferente según el estadio de diferenciación.

En una primera aproximación con la línea celular L6, observamos que **la producción de ROS sufría modificaciones a lo largo del proceso de diferenciación miogénica**. El nivel de ROS desciende al inicio de la diferenciación para recuperarse hacia el final de la miogénesis. El descenso inicial en el nivel de ROS coincide con un momento en que la población celular se ve disminuida, ya que se produce una selección de las células que van a proseguir la diferenciación a través de un mecanismo de apoptosis (Granel, 2003). Durante el proceso de diferenciación, los miotubos recuperan los niveles de ROS que presentaban los mioblastos L6, hecho que puede relacionarse con un descenso en la capacidad antioxidante asociada al proceso de miogénesis y que se manifiesta en un descenso en la expresión de genes codificantes para enzimas antioxidantes (concretamente, las superóxido dismutasas 1 y 2, y la glutatión peroxidasa 1), así como en un descenso en los niveles de GSH. De hecho, los ROS son necesarios para el desarrollo normal de funciones fisiológicas como la contracción muscular, con lo que puede ser necesario mantener cierto nivel de ROS basal en las células diferenciadas.

Igualmente, **los niveles de NF- κ B activo, descienden abruptamente al iniciarse la diferenciación**, como se había observado en la línea C2C12 (Franco et al., 1999). Este factor es responsable de la activación transcripcional de genes mayoritariamente implicados en la proliferación y supervivencia celular (como por ejemplo el de la superóxido dismutasa 2, del que efectivamente, observamos un descenso) (Karin and Lin, 2002; Wong et al., 1989). Algunos autores consideran necesaria una disminución en la actividad NF- κ B, para permitir el proceso de diferenciación miogénica (Lehtinen et al., 1996), ya sea para permitir la selección clonal (Guttridge et al., 1999) o mediante procesos independientes de la apoptosis (Dee et al., 2003). Sin embargo, otros autores consideran relevante la actividad de este factor en la cascada de activación miogénica (Kaliman et al., 1999). Por otro lado, la presencia de NF- κ B en el núcleo no se recupera durante la miogénesis, así que es insensible al aumento de ROS que tiene lugar durante el proceso. Por tanto, la actividad basal del factor en células diferenciadas, no es dependiente de los niveles de ROS.

En la siguiente aproximación confirmamos que existía un comportamiento diferencial de las células respecto a un estímulo pro-apoptótico, según el estadio de diferenciación en que se encuentren. Tal y como se ha descrito previamente, los miotubos desarrollan una resistencia a la apoptosis (Sandri and Carraro, 1999). Así, en nuestro caso, **los miotubos eran más resistentes a la activación de caspasas en respuesta a un estímulo pro-apoptótico como la staurosporina**, que como hemos visto, es dependiente de vías de regulación mitocondriales. Esta resistencia, se

manifestaba tanto a nivel de una caspasa efectora (como la caspasa-3), como al de una más relacionada con la activación de vías apoptóticas dependientes de mitocondria (como la caspasa-9), luego pudimos concluir que estas vías, eran también importantes en la regulación de la apoptosis de células musculares.

En numerosos modelos, se ha observado que los ROS pueden mediar la respuesta apoptótica a diversos estímulos (de Bernardo et al., 2004; Fiordaliso et al., 2004; McCarthy et al., 2004; Sanvicens et al., 2004; Zhao et al., 2002). En nuestro caso, comprobamos que la staurosporina, inducía un aumento en la producción de ROS, aunque con la técnica utilizada resulta imposible determinar el origen de los mismos (mitocondria, fuentes citosólicas, etc.). Curiosamente, la diferente sensibilidad a la staurosporina entre células que se hallan en distinto estadio miogénico, se daba también a nivel de la producción de ROS. Así, **los mioblastos mostraban una mayor sensibilidad que los miotubos a la inducción de ROS en respuesta al tratamiento con staurosporina**. Este hecho sugería que los ROS podrían estar mediando el efecto de la staurosporina sobre la muerte celular en las células musculares.

Por otro lado, hay que considerar que los niveles de ROS siempre son resultado de un balance entre la generación de nuevas especies reactivas y la capacidad antioxidante de la célula. Por tanto, no podemos descartar la posibilidad de que el aumento en los niveles de ROS observado tras el tratamiento con staurosporina, se deba a un descenso en la capacidad antioxidante inducido por la staurosporina, y no a una mayor generación *de novo* de especies reactivas.

Otros parámetros que pueden reflejar el grado de estrés oxidativo, como el descenso en GSH o la activación de NF- κ B, muestran un perfil de respuesta a staurosporina similar al observado para la activación de caspasas y los niveles de ROS. Es decir, las células no-diferenciadas muestran una mayor sensibilidad a los cambios inducidos por la staurosporina. Este hecho, refuerza la hipótesis de que los ROS estén mediando la muerte celular en respuesta a este agente pro-apoptótico.

Sin embargo, el pre-tratamiento con antioxidantes demostró que **la activación de la cascada apoptótica en respuesta a la staurosporina ocurría de forma independiente a la generación de ROS** cualquiera que sea el estado de diferenciación de las células. En el mismo sentido, una depleción de GSH, que puede ser suficiente para causar la muerte celular (Higuchi, 2004), tampoco tiene ningún efecto sobre la apoptosis en respuesta a staurosporina, ni en mioblastos ni en miotubos.

Aunque habitualmente se ha considerado a los ROS como mediadores de la muerte celular en respuesta a estímulos pro-apoptóticos, estas especies reactivas pueden jugar un papel importante como mensajeros secundarios (siempre que no excedan la capacidad antioxidante de la célula), activando vías de señalización que son importantes para la supervivencia celular (Hancock et al., 2001). Un ejemplo es su capacidad para activar vías dependientes de factores de transcripción como NF- κ B (Soares et al., 1998) en diversos tipos celulares, incluyendo el músculo esquelético (Zhou et al., 2001). No obstante, y también mediante el tratamiento con antioxidantes, pudimos comprobar que **la activación de NF- κ B en respuesta a staurosporina ocurría de forma independiente a la producción de ROS** tanto en mioblastos como en miotubos de L6. El comportamiento de NF- κ B respecto al estrés oxidativo, parece depender del tipo celular y el estímulo. De hecho, datos recientes demuestran que la activación de NF- κ B no responde necesariamente a un aumento en la producción de ROS (Hayakawa et al., 2003; Li and Karin, 1999). Por otro lado, la staurosporina es un antibiótico inhibidor de la PKC con capacidad de inducir la apoptosis, activando vías que preferencialmente, dependen de regulación mitocondrial (Arnoult et al., 2002; Charlot et al., 2004; Tafani et al., 2001). Es por tanto, un compuesto que tiene efectos sobre numerosos procesos celulares. No es de extrañar entonces, que sea capaz de desencadenar respuestas en las células que conlleven la activación del factor NF- κ B, quizás en un "intento de la célula" para compensar el estímulo pro-apoptótico de la staurosporina.

Los ROS generados en respuesta a la staurosporina no están condicionando la muerte celular, y podrían ser productos secundarios de alguna de las reacciones que tienen lugar en el transcurso del proceso de apoptosis. Es posible también que los ROS estén interactuando con vías que repercuten indirectamente en la activación de NF- κ B. Curiosamente, al reprimir la formación de ROS en respuesta a staurosporina mediante el uso de antioxidantes, no observamos un descenso en la activación de NF- κ B sino incluso un aumento en la actividad de este factor. Los ROS pueden interactuar con vías distintas a la activación de NF- κ B (p.ej. MAPK, AP-1...). Alguna de estas vías podría tener una finalidad complementaria a la de NF- κ B. Así, al reprimir la generación de ROS en respuesta a staurosporina, podríamos estar aumentando la necesidad de la célula de activar la vía NF- κ B. En cualquier caso, de estar vehiculando un "intento de supervivencia celular", éste nunca es eficiente, ya que no logra revertir la activación de la apoptosis.

Por sí mismos, los ROS son capaces de inducir la apoptosis en muchos modelos celulares (Raha and Robinson, 2001; Thirunavukkarasu et al., 2004). Pudimos observar que el peróxido de hidrógeno era capaz de activar la caspasa-3, tanto en mioblastos como en miotubos, aunque nuevamente los mioblastos eran más sensibles en su respuesta. De hecho, en el transcurso de esta tesis, otros grupos experimentales han descrito una mayor sensibilidad al estrés oxidativo en mioblastos (Catani et al., 2004).

Por otro lado, en nuestro caso, en mioblastos, el peróxido de hidrógeno tiene un efecto aditivo sobre la activación de la caspasa-3 en respuesta a staurosporina, mientras que no afecta a la respuesta de miotubos. Este efecto aditivo sugiere que staurosporina y peróxido de hidrógeno promueven la activación de la caspasa-3 a través de mecanismos independientes. Esto unido al hecho de que la represión de ROS con antioxidantes no tenga ningún efecto sobre la apoptosis, nos permite concluir que los ROS no juegan un papel protector en la inducción de la apoptosis en respuesta a staurosporina. No obstante, no podemos descartar que su generación, permita la activación de vías de señalización que intenten contrarrestar el estímulo pro-apoptótico. De hecho, verificamos que en este modelo celular, como ya había sido descrito previamente (Catani et al., 2004), el peróxido de hidrógeno promueve la activación de NF- κ B. Observamos como de nuevo, la activación tiene lugar de forma más notoria en mioblastos, dónde quizás la cascada de activación de NF- κ B sería más necesaria, ya que es dónde el peróxido de hidrógeno es capaz de desencadenar la activación de caspasa-3.

Una vez caracterizada la respuesta a staurosporina en el entorno natural de expresión de UCP3, pasamos a determinar si la proteína tenía un efecto en la interrelación ROS-apoptosis del músculo esquelético. Como hemos visto, una de las funciones propuestas para UCP3 es la de limitar la producción de ROS gracias a su actividad desacoplante, favoreciendo la recircularización de quinonas en la cadena respiratoria. Se cree que a partir de esta capacidad para disminuir ROS, UCP3 podría estar influenciando a otros procesos como la apoptosis. Sin embargo, las evidencias de que UCP3 tenga esta capacidad *in vivo*, son hoy por hoy indirectas (Vidal-Puig et al., 2000).

UCP3 se expresa preferencialmente en el músculo diferenciado pero su expresión en líneas celulares en cultivo está muy disminuida respecto a los niveles que alcanza la proteína en el músculo *in vivo* (García-Martínez et al., 2001; Solanes et al., 2000). Por ello, utilizamos un vector adenovírico para transducir la expresión de UCP3 en células musculares. La proteína provoca un descenso en el $\Delta\Psi$ de acuerdo con su actividad

desacoplante. Sin embargo, la expresión de UCP3 en células L6 no provoca alteraciones, ni en los niveles de ROS (ver más adelante), ni en la expresión de genes relacionados con los mecanismos antioxidantes, ni con el estrés celular, tanto en células L6 como en C2C12. Así, parece que la expresión de UCP3 no está teniendo consecuencias significativas sobre el metabolismo de los ROS. Igualmente, en el hígado de ratones transducidos con un adenovirus para la expresión de UCP3, tampoco observamos alteraciones generalizadas en la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo (aunque la inducción de genes como la p53 y c-fos, indican la existencia de cierto nivel de estrés celular).

En la línea celular de las L6, **no observamos ninguna protección frente a la muerte celular inducida por staurosporina, por el hecho de expresar UCP3, incluso se produce una débil sensibilización**, al igual que lo observado previamente para las 293-HEK. Este efecto es contrario al observado en células neuronales, donde la presencia de UCP3 protege de la muerte celular inducida por hiperglicemia (Vincent et al., 2004a). La protección de UCP3 frente a la muerte celular en estas células, ha sido relacionada con una disminución en la producción de ROS. Sin embargo, en nuestro modelo, **la expresión de UCP3 no estaba asociada a ninguna alteración en la producción de ROS ni a nivel basal, ni en respuesta a staurosporina**. De todos modos, y dado a que la muerte celular en las células musculares, parece ser independiente de la producción de ROS en respuesta a staurosporina, tampoco esperaríamos que el efecto de UCP3 sobre la apoptosis viniera determinado por su posible efecto sobre la producción de ROS. De hecho, la leve sensibilización frente a la apoptosis que observamos en presencia de UCP3, vendrá determinada por mecanismos independientes de la formación de ROS, como podrían ser la disminución del $\Delta\Psi$, que se sabe puede tener un efecto sobre la apertura del MPTP (ver anteriormente).

En músculo esquelético la apoptosis está asociada a diversos procesos fisiológicos y patológicos. Luego, es posible que UCP3 juegue un papel en la regulación de la muerte celular programada en músculo. De hecho, recientemente se ha descrito una sobreexpresión de UCP3 como una de las primeras alteraciones en el desarrollo de la esclerosis lateral amiotrófica (Dupuis et al., 2003). Posiblemente, la relación de UCP3 con la apoptosis dependa del tipo celular o estímulo inductor, como también sucede para UCP2 (Dupuis et al., 2003; Mattiasson et al., 2003; Mills et al., 2002; Sun and Zemel, 2004; Teshima et al., 2003).

Los ácidos grasos de cadena larga, como el palmitato, son otro estímulo que puede causar la muerte celular (Kong and Rabkin, 2002; Listenberger and Schaffer, 2002; Penzo et al., 2002; Shimabukuro et al., 1998; Unger, 2002; Unger and Orci, 2002) pudiendo implicar vías reguladas por mitocondria (de Pablo et al., 1999; Sparagna et al., 2000). Dada la estrecha relación existente entre los niveles de ácidos grasos, y la expresión (Cabrero et al., 2000; Hwang and Lane, 1999; Nagase et al., 1999; Son et al., 2001) y actividad de las UCPs (Jaburek et al., 1999; Nicholls and Locke, 1984), resultaba interesante evaluar el efecto que la presencia de UCP3 pudiera tener sobre la acción de los ácidos grasos en cuanto a ROS y apoptosis.

Se sabe que el **palmitato**, puede inducir apoptosis por mecanismos dependientes (Yamagishi et al., 2002) e independientes (Hickson-Bick et al., 2002) de la generación de ROS. En nuestro modelo no observamos inducción de apoptosis tras el tratamiento con ácidos grasos (oleato o palmitato) en las células musculares diferenciadas, aunque sí un **aumento en la generación de ROS**. Así pues, al igual que ocurría en respuesta a la staurosporina, las células musculares parecen constituir un entorno en que la formación de ROS y apoptosis son fenómenos independientes.

El tratamiento con ácidos grasos activa la producción de ROS en cardiomiocitos (Hickson-Bick et al., 2002) y células β -pancreáticas (Carlsson et al., 1999) aunque también pueden reducirla en células endoteliales (Duval et al., 2002a). La generación de ROS en respuesta a ácidos grasos puede ser consecuencia del aumento de disponibilidad de sustrato para la cadena respiratoria tras la β -oxidación, lo que eleva el $\Delta\Psi$, favoreciendo la reducción incompleta del oxígeno. Sin embargo, en nuestro caso, el tratamiento con etomoxir que inhibe la entrada de ácidos grasos oxidables a la mitocondria, induce un aumento en la producción de ROS en respuesta al palmitato. Así, **el aumento de ROS derivado del tratamiento con palmitato no parece ser consecuencia de su metabolismo en mitocondria**. De hecho, los ácidos grasos pueden inducir la producción de ROS a través de mecanismos como la síntesis de ceramida o la activación de vías independientes de mitocondria, como la actividad NADPH-oxidasa (Inoguchi et al., 2000).

La capacidad pro-apoptótica de los ácidos grasos depende de su estructura química. Mientras que es conocida la capacidad del palmitato para desencadenar procesos apoptóticos, ácidos grasos insaturados como el oleato, pueden estimular la proliferación y reducir la apoptosis (Hardy et al., 2000; Listenberger et al., 2001). En nuestro caso, aunque no se daba apoptosis en ningún caso, si observamos como **el palmitato inducía**

una mayor formación de ROS que el oleato, así como una mayor activación de NF- κ B, como también ha sido descrito recientemente por otros autores (Hickson-Bick et al., 2002; Jove et al., 2005). Los ácidos grasos actúan como ligandos de los receptores nucleares PPAR, y éstos activan la expresión de muchos genes implicados en la oxidación de ácidos grasos (Gulick et al., 1994). Se sabe que el oleato tiene mayor afinidad por PPAR α y PPAR δ (Kliwer et al., 1997) con lo que podemos suponer que se metabolizará más fácilmente que el palmitato, reduciendo la probabilidad de formar ROS (por ejemplo mediante la generación de ceramidas).

Como hemos mencionado previamente, se cree que UCP3 podría tener un papel en la limitación de la generación de ROS gracias a su capacidad desacoplante. Los ácidos grasos son conocidos inductores de la actividad de UCP3 y recientemente se ha mostrado que el superóxido (Echtay et al., 2002a; Talbot et al., 2004) y derivados de la lipoperoxidación, pueden activar a esta proteína (Echtay et al., 2003). Sin embargo, la transducción de miotubos con el adenovirus **UCP3, no sólo no disminuía los ROS formados tras el tratamiento con palmitato, sino que incluso los incrementaba, como también lo hacía la inducción de NF- κ B.**

Debido a una mayor disponibilidad de sondas para el análisis de expresión génica en ratón, ampliamos el estudio a la línea celular muscular C2C12. La presencia de UCP3 no tenía como hemos visto, consecuencias significativas sobre la expresión de genes relacionados con estrés oxidativo en las células musculares, pero si tiene sin embargo, consecuencias sobre parámetros que podrían estar relacionados con la oxidación de ácidos grasos. En la línea muscular de ratón C2C12, observamos en presencia de UCP3, una **inducción de la expresión de la carnitina palmitoil-CoA transferasa-1 (CPT-1)**, un enzima necesario para la translocación y oxidación de los ácidos grasos en el interior de la mitocondria. De hecho, la presencia de UCP3 favorece la oxidación de ácidos grasos frente a la de glucosa en células musculares (Bezair et al., 2005; Garcia-Martinez et al., 2001). UCP3 podría promover la oxidación de ácidos grasos disminuyendo el $\Delta\Psi$, y aumentando así la demanda de sustratos oxidativos para la cadena respiratoria. El aumento en la expresión de la CPT-1, podría ser reflejo de esta mayor demanda de sustratos oxidativos. El aumento en la oxidación de ácidos grasos podría ser también la explicación al hecho de que la expresión endógena de UCP2 se vea disminuida con la transducción adenoviral de UCP3. La expresión tanto de UCP2 como de UCP3, está activada por los ácidos grasos actuando como ligandos de receptores nucleares tipo PPAR. Un aumento en la β -oxidación consecuencia de la expresión de UCP3, provocaría

una disminución en los ácidos grasos del medio, y por tanto, una disminución de la señalización dependiente de PPAR. Sin embargo, otro de los genes que se sabe están regulados transcripcionalmente por ácidos grasos, actuando como ligandos de PPAR, es el de la propia CPT-1 (Mascaro et al., 1998), cuyo mRNA aumenta paradójicamente, en presencia de UCP3.

Aunque como hemos mencionado la producción de ROS asociada al tratamiento con ácidos grasos, no parece tener su origen en mitocondria, no podemos descartar que este sea el origen de la sobre-producción de ROS que detectamos con UCP3. Una posible explicación sería que una inducción de la oxidación de ácidos grasos mediada por UCP3, supondría un aumento en el $\Delta\Psi$, que como hemos mencionado previamente favorece la producción de ROS (Echtay et al., 2002a; Talbot et al., 2004). Aunque en cualquier caso, el aumento en el $\Delta\Psi$, estará condicionado por la demanda energética celular. Otra posibilidad se basa en la acción de las ceramidas sobre el flujo a través de la cadena respiratoria. Las ceramidas se producen ante un acúmulo de ácidos grasos en el exterior de la mitocondria y pueden inhibir la actividad del complejo III de la cadena respiratoria (Di Paola et al., 2000; Gudz et al., 1997). Este hecho, podría explicar la mayor producción de ROS en respuesta al palmitato, en presencia de UCP3, ya que la adición conjunta de un desacoplante y un inhibidor de la cadena respiratoria, es una situación dónde la producción de ROS es muy elevada (Lyamzaev et al., 2004).

Mientras que la función fisiológica de UCP3 sigue siendo fruto de controversia, en el caso de UCP2 parece claro que la proteína desempeña una función en la limitación de la producción de ROS (Arsenijevic et al., 2000; Negre-Salvayre et al., 1997). De hecho, en células L6 comprobamos que durante la miogénesis, la expresión de UCP2 (a nivel de mRNA¹) desciende en paralelo a la disminución de la expresión de enzimas antioxidantes y al aumento de la expresión de UCP3, sugiriendo que UCP2 está implicada en la regulación de la producción de ROS. El hecho de que la transducción de UCP3 en las células musculares, conlleve una disminución en la expresión endógena de UCP2, al menos a nivel de su mRNA, podría explicar entonces, la sobre-inducción de ROS en respuesta a palmitato que observamos en presencia de UCP3.

Los datos existentes en la bibliografía son a menudo contradictorios, y posiblemente nos hallemos ante una proteína que tiene un papel diferencial en función de

¹ Es necesario considerar que los niveles de mRNA de UCPs no correlacionan necesariamente con la expresión a nivel de proteína (Pecqueur et al., 2001; Sivitz et al., 1999).

cada entorno celular o estímulo. En nuestro caso, hemos observado que UCP3 no protege de la apoptosis, y en todo caso la favorece, ante un estímulo dependiente de mitocondria. Podríamos hipotetizar que UCP3 presentase un comportamiento dual según la intensidad del estímulo. En una situación en la que se activase la expresión y actividad de UCP3 por la presencia de ácidos grasos, u otros activadores naturales de la proteína, ésta podría actuar como un desacoplante fisiológico, acelerando la velocidad de la cadena respiratoria y favoreciendo la oxidación de ácidos, controlando así la sobreproducción de ROS. A partir de cierto umbral, o ante un estímulo pro-apoptótico, la proteína podría, a través de su capacidad desacoplante o según nuestros datos, más posiblemente a través de la interacción con otros elementos reguladores del proceso, favorecer la apoptosis en una región sarcoplasmática concreta, evitando que toda la fibra muscular se vea dañada por una reacción inflamatoria.