

Universitat de Barcelona

Facultat de Medicina

**Papel del colesterol mitocondrial
en la resistencia del carcinoma
hepatocelular a la quimioterapia.**

Joan Montero Boronat

Papel del colesterol mitocondrial en la resistencia del carcinoma hepatocelular a la quimioterapia.

Memoria presentada por Joan Montero Boronat para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Anna Colell Riera y del Dr. José Carlos Fernández-Checa Torres en el Departamento de Muerte y Proliferación Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Tesis adscrita al Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina, Universitat de Barcelona.

Tutor: Dr. Carles Enrich Bastús

Dr. José Carlos Fernández-Checa Torres

Dra. Anna Colell Riera

Joan Montero Boronat



Where the world ceases to be the scene of our personal hopes and wishes; where we face it as free beings, admiring, asking and observing, there we enter the realm of Art and Science.

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

No es este el relato de hazañas impresionantes. Es un trozo de dos vidas tomadas en un momento en que cursaron juntas un determinado trecho, con identidad de aspiraciones y conjunción de ensueños.

Ernesto Guevara

Este va a ser sin duda el capítulo más difícil de escribir, pues creo que hay mucha gente a la que debo agradecer el haber formado parte de esta parte del camino de mi vida.

En primer lugar, querría agradecer a mi director Carlos Fernández-Checa el haber confiado en mí para realizar este ambicioso proyecto y darme su apoyo en todo momento. A mi directora de tesis, Anna Colell, quiero darle muy especialmente las gracias por su paciencia, por su motivación y ayuda en los momentos difíciles, y por enseñarme día a día lo que significa ser un buen científico. También quiero agradecer a Carmen García-Ruiz su apoyo y comprensión durante estos años, y a Albert Morales y Montse Marí sus buenos consejos y su buena disposición para echar una mano durante todo este tiempo. Al aprendiz de australiano Lluís (la tieta) quiero agradecerle el ayudarme a dar los primeros pasos en el laboratorio, pero sobre todo las fiestas, coñas y viajes que hemos hecho juntos (Yellowstone, el Half Dome...ei, busca'm algo!). A Laura, por los momentos de complicidad y apoyo entre libras, y por recorrer conmigo desde el principio el duro camino de la tesis. A Raquel por iniciarme en el apasionante mundo del cultivo celular y por alegrar cada mañana con su sonrisa. A la futura mamá Susana gracias por sacarme de tantos apuros; y por formar con Anna Moles el dueto más divertido de la Fundació, eso sí, siempre dispuestas a echar un cable (y unas risas). A Alberto por los comentarios picantes y por redescubrir el significado de tantas palabras del diccionario. A Helen, darle mucho ánimo con los ratones. A las recién llegada Núria, con la que comparto un buen puñado de amigos, darle ánimo, porque al final vale la pena. A Núria Matías quiero agradecerle el apoyo durante estos últimos meses y desearle toda la suerte del mundo en la tesis (ja veuràs que... és conya!). A Claudia (*are you talking to me?*) gracias por los consejos, el buen humor y por intentar enseñarme alemán (*ich möchte ein bier trinken*, ¿a que no está mal?). A Inma, nuestra miniyo, por traer aire fresco y una bonita sonrisa al IIBB. Finalmente, quiero agradecer de corazón a quienes sin duda han compartido más buenos y no tan buenos momentos

conmigo en el laboratorio, Fran y Anna. Gracias Fran por los buenos momentos vividos (Tossa, USA, Salamanca...), por ayudarme a ser un poco más ordenado (un poquito sólo) y por el apoyo en los momentos más difíciles de la tesis. Annona, el desastret es fa gran. Gràcies per la paciència, la confiança, el recolzament i per tot el que hem viscut plegats (abogadoooo...).

Pero esta tesis no es más que un punto y seguido de algo que empezó hace ya algunos años en la facultad de química: cafés, largas charlas en el pasillo, cervecitas, y alguna que otra tarde empollando. Cómo no agradecer a Dani, que siempre consigue arrancarme una risa, incluso en los momentos más duros; a la Mónica, quanta complicitat, i quants i quants cafés, oi?; a Cristóbal quieras o no siempre serás mi muerde, y un buen amigo; al bueno de Roberto, torero para los amigos; a Meri Peña, que por fin sentó la cabeza, ¡con lo que tú has sido!; a la Deborah, que sense dubte és la menorquina més riallera del món; a la Sara, la cochi que més m'ha ensenyat sobre mí mateix (quina sort que tens Huggy!); a la Marta, la meva consellera particular, felicitats a tu i al Santi; al gran Baldoman, que hubiera sido de mí sin tus apuntes...¿de verdad fueron 19?; a Alberto, el compi más loco y cojonudo del mundo; a Jordi Folch, la primera persona que vaig conèixer a la facultat; a Ramon, la persona más constante que conozco... (Jordi González, no te busques que vienes después) No em puc oblidar del que a més de company de carrera va ser el millor company de pis, en Marc; Epi, gràcies per animar-me als moments més durs i per tots els consells... això ja està fet! Y también al resto de químicos Òscar, Jandro, Yolanda, Montse Cañadillas, Javi, Anna Icart, Dani Ramil, Núria, Jordis (los cracks), Gerard, Ruben, Sendoa, Carmen, Irene, Ester Torr, Isa, Eulàlia, Toni, Farris (el senyor de les festes), Juan...y seguro que me dejo gente. Gracias a todos.

Tampoco querría olvidarme de donde hice mis primeros pinitos como científico, esa séptima planta de la facultad con el rellano más concurrido que he visto. En primer lugar, gracias a Carolina por tener la paciencia de enseñarme y guiarme; y al grupo de Receptores por acogerme como a uno más y dejarme probar lo que es un laboratorio bioquímico. Quiero dar las gracias también al laboratorio de Enzimo, donde di mis primeros pasos en el mundo de la proteómica y donde tan buenos momentos pasé con Josep Maria (churri para nosotros), Òscar (chiquitín), Víctor (el padre Antona amante del Razz y la Franziskaner), Montse Serra, Jordi Querol, Bristócal... nunca tan pocos

metros cuadrados dieron para tanto. Gracias Oscar Besumbes por enseñarme tanto de ciencia (esas clases de genética molecular con un café y “català a l’atac” como ejemplo) y de la vida en general; sin duda serás un excelente profesor. Y gracias también a las demás personitas de la séptima: María José (aún nos quedan muchas cervecitas que compartir), Ester Angulo, Maribel (aún no me creo que ya seas madre!), Pedro (gauche, droite), Isa, Joan Boren, Pau, Sara, Antonio, Ceci (la extremeña con más arte), Cris (eeeeiiii tio!), Laia Canela, Iñaki, Jordi el Heavy (el millor baixista i una de les millors persones que conec), Albert el Punko, Lorenzo (almeriense de nacimiento, fiestero de vocación), Víctor, Mario Marotta... y tanta tanta gente. No et creguis que m’oblido de tu Meri. Sense dubte has estat, ets i seràs una peça clau de la meva vida. Gràcies per recolzar-me, per aconsellar-me, per entendre’m i per donar-me sempre el millor de tu mateixa sense demanar res a canvi.

També vull donar les gràcies als meus companys de bioquímica: Laura, la que tenia més empenta de la classe; Jorgito, ¿cuántas veces habremos arreglado el mundo ya? suerte con la farmacia; Pedrín, aunque me caigan collejas en el comedor también quiero que estés aquí; Eli, encara no entenc com t’ho feies, ets una crack; Ari-Jali, la lleidatana amb el cor més gran; Ingrid, ¿recordes tots els dubtes que teníem? ja saps que ets el meu referent, segur que seràs una madrassa!; Meri gran, ¿recordes que la primera presentació que vam fer?; Núria, t’ho creguis o no ets el meu exemple de solidaritat, sacrifici i bondat; Meri peque, sempre seràs la meva germana petita adoptada, el que no tinc tan clar és qui fa de germà gran, eskarrrik asko!; Luís, maño de nacimiento, filósofo de vocación; Víctor, el donostiarra que más se mueve y que mejor cocina, sigo creyendo que tu sitio es Barcelona, así te tendré más cerca; Júlia, mira que venir també al clínic...aiissss!; Irene Forn, espero que segueixis amb la dansa i que ens continuem veient de sopar en sopar; i a la resta de bioquímics Davids, Marc Liesa (alguna cosa em diu que seguim camins molt semblants), Elisabet, Irene Casalprim (segur que triomfaràs), Ekaitz (aunque no estudiáramos juntos ya eres de la familia), Joasha... Sempre ens quedarà Turquia, barraques, sopars (pallassos!) i calçotades.

Vull agrair també a totes aquelles persones que han estat amb mi aquests quatre anys i mig, dia a dia, aguantant-me en els bons i en els mals moments.

A la gent de la Fundació, Ifigènia, Sandra, Xavi (el pitbull del Papiol, espero que ens veiem aviat), Jordi Sintes (pel bon humor, les conyes...com era aquell sorollet?), Irene

(cuida'm al fiero i ànims), Míriam (per aguantar-me les bromes), Txell (pels bons consells), Ises del FACS (pel bon humor); a la gent de Malària: Elisa, Laura i Alfredo. A la gent de Bio Cel·lular: Marta, Ignasi, Albert, Ana, Laia, Mireia, Paqui, Neus, María... per aguantar les meves incursions lúdico-laborals, i pels caps de setmana de juega y jarana. A la gent de l'IDIBAPS (i annexes): Melina (mi ejemplo de autoestima), Ramón Bataller, Elena, Pau, Anita, Pedrín, Javi, Anna Planagumà (primera incombustible), Raquel, Sònia... gràcies a tots.

A los del IIBB (¡que no me pase nada!), por las fiestas, cafés, risas en la cantina, calçotades, excursiones, juegas varias y sobre todo por el buen rollo siempre. Gracias a los de la sexta: Judith (felicitats mamá!), Noe (eres un encanto), Llorenç (el fiestero de Castalla), Zoila (que sigue de excursión por California...), Mercè (el millor somriure de la Segarra), Susana, Iolanda (veína del barri), Lucila, Xavi, Laia, Jordi (para los demás top-ten, para mí, el rastas amoroso), Rubén (mi santo particular; “tío, cuidado con los charlies” y gracias por todo), Mercedes (argentina cariñosa y mi piropera particular), Sebastià, Sara (Paleta! ¿por qué siempre te metes conmigo? jajaja), Aina (al pot petit...), Fran (el gallego más salao), Mireia (un trosset de pa), Marcelo, Víctor (juerguista nato y mejor persona), Sílvia (me puedes decir cómo va el nanodrop?), Eli (¡cuanta coña en la cantina!), Ro (¡esta vez el cubata lo pago yo!), Pablo (compañero de lectura), Julián, Emili, Amanda, Raúl (que trabaja cuerpo y mente las mismas horas al día), María Jaramillo (ánimo con el chino), Montse Roig (gràcies per ajudar-me sempre), Rous (una de las primeras personas que conocí en el IIBB), Ester Verdaguer, Ester Pozas, Leo, Santi, Tomás, Anna (teletubbie), Abraham (comment ça va?), Isa, María (aunque nos abandonaras para irte a tierras sureñas), Jari (suerte que tenemos una como esteee, eres un sol), Laura (risueña como ella sola y con un enorme corazón), Pablo (gracias por tu ayuda estos últimos meses)... gracias a todos, y perdón si me dejo a alguien, el alzheimer no perdona. Gracias a los de la séptima: Montse (truska!), Nacho (no dejes nunca de meterte conmigo), Gemma, Patri (la heviata iibbera), Ana, Dani, Edu (tío, l'antivirus no em funciona!), Marieta (la valenciana més simpàtica), Javi, Rosa (mi rosita que es todo corazón), Araní, Bebel (prima! la de cosas buenas que hemos compartido), Susana (de sangre cubana), Mari (miniminyó), Ismail (shukram!), Amine (siempre rodeados de veneno!), Marta Massip (mamá,mamá!), Neus (mamá y adicta al chocolate), Marta, Lluís, Alba, Emma, Sabrina (ens veem al despatxet), Michaela (mi buena companyera de poyata y despachito), Albert (tiiiuuu, si no fos per tu...ets un sol!

quan anem a l'anti amb la Marisol?), Ángeles, Eugenia... gracias a todos. Y como no a Teresa, Loli y Salima, por traer buen humor de buena mañana

Vull agrair molt especialment als incombustibles tants i tants bons moments junts : dinars, sopars, sortides, festes... senzillament sou genials. Vull donar les gràcies a la Marta (siempre somos...) per les bones converses davant d'una (i quasi sempre més d'una) cervesa, per ensenyar-me a estimar la Costa Brava i la seva gent, i per tantes tantes nits sense dormir. Al Marc per ensenyar-me a estimar una mica més la muntanya i la Segarra (especialment la bacanal), i per aportar-me serenitat en els moments en que més m'ha fet falta. A l'Isa ("bones aquetes tsopes"), per fer-me riure i donar-me carinyo i confiança en mi mateix. A l'Elisabet per escoltar-me, recolzar-me i per saber-me dibuixar sempre un somriure als llavis encara "que no em pegui". A l'Ignasi per les seves fideuàs de diumenge, per ensenyar-me la bellesa del Delta i per no dir mai que no a un bon got de vi ("o a lo que se tercié!"). A Félix (alias big sucker) por intentar enseñarme alemán (forget it!) y por tantos buenos momentos dentro y fuera del Clínic; serás un padrazo. A la Gemma, la olotina més trempada, per acceptar a aquest salvatge tantes vegades al pis i per ajudar-me a acabar la Matagalls-Montserrat. I per descomptat als afortunats: Jordi, Bea, Carles i Uli.

A mis compañeros de futbol: Raulinyu ("esquerra-dreta, oblida-te'n oblida-te'n"), Víctor (capitán Sparrow), David (el papá gigante), Xavi petit (gran persona i millor estòmac), Lluís (gordito), Fran (anda que cambiar-nos por la Play...), Ismail (el león de Túnez), Uri (Van Nistelrooy), Marc (de tu millor no parlo...), Philipp (la classe alemana), Miquelet (mi ídolo en san fermines), Jordi Sintes (el artillero), Jordi González (el flanco enemigo), Pablito (el Homer peruano), Xavi (Pitbull del Papiol)... gracias por compartir tantas risas, bravas, cervezas y "revoltosos" los jueves.

También quiero agradecer muy especialmente su apoyo y comprensión a: a Jordi González, quien siempre me ha apoyado, escuchado y con quien he compartido una infinidad de buenos momentos; a Pedro y Beatriz que siempre han estado a mi lado dándome buenos consejos; a Fátima, a quien siempre he sentido cerca pese a la distancia manteniendo viva una bonita amistad; a Sílvia que compartió parte de este duro camino conmigo; a la Dra. Lúcia Robert por echarme un cable en los momentos finales de esta tesis; a la Marta, merci pels ànims; a Uri, Albert, Joan y Max por

apoyarme durante el doctorado; al Sergi Vendrell per ajudar-me en la recta final; a Carol por las conversaciones filosófico-emotivas; a mis ex-compañeras de piso Cynthia y sobre todo Faby, la mexicana con el corazón más grande que conozco; a Marcos, Sònia, Ferran, Roger, David Gasol, Iván, Joani, Dani, David Acevedo, Santi y la resta de la gent del pati amb els que he crescut; al Riki, per ser sempre allà per escoltar-me, recolzar-me i ser un bon amic; A la Tulin, que sempre ha estat al meu costat des de petits i a qui estimo com a una germana; a los fondoneros Ali, Habi, Iván, Alfonso, Silvia, Juarez, Fabi, Loli, María la coja, Fernando, Almu, Gemas, Jose, Cecilio y familia, la família Carmona, Ruben... por buenos momentos compartidos en tierras del sur; a Maite, por aguantar las interminables horas de autismo con el Toshi y por hacerme reír cuando más lo he necesitado; y a Olguiña, que siempre ha sabido aconsejarme, hacerme sonreír y ser la mejor de las amigas en todo momento.

A mi familia, en el sentido más amplio. A mis tíos y primos que me han dado siempre su cariño y su apoyo, siendo un referente para superarme día a día. Y a mi abuela que es un ejemplo de fuerza de voluntad, entereza y sacrificio.

Y por supuesto, gracias a ti Lola, por ser el lucero que me ha iluminado el camino en la última y más difícil etapa de la tesis. Tu apoyo, cariño y comprensión incluso en los peores momentos me han hecho mirar hacia adelante y no derrumbarme. Eres alguien excepcional; mi ejemplo de bondad, generosidad, madurez, amor sin reservas, alegría y entrega. Gracias por hacer que quiera ser mejor persona cada día.

Y finalmente, a mis padres y a mi hermana. Porque sin ellos yo no sería quien soy, y nada de esto tendría sentido. Gracias por vuestro amor y apoyo incondicional en todo momento, por darme un motivo para levantarme cada mañana, y sobre todo por enseñarme a amar y a pensar.

Gracias a todos.

Per aspera ad astra

Séneca

A mis padres y
a mi hermana.

A₂C 2-(2-metoxietoxi)etil-8-(cis-2-*n*-octilciclopropil) octano

ACAT acil-CoA-colesterol acil transferasa

Acetil-CoA Acetil-coenzima A

ACR *acceptor control ratio*, razón de control del aceptor

ADN ácido desoxirribonucleico

ADNm ácido desoxirribonucleico mitocondrial

ADP adenosina difosfato

AFP α-fetoproteína

AIF *apoptosis induction factor*, factor inductor de apoptosis

ANT transportador de nucleótidos de adenosina

ARN ácido ribonucleico

ARNi ácido ribonucleico de interferencia

ARNm ácido ribonucleico mensajero

ATP adenosina trifosfato

BH dominios homólogos de Bcl-2

BSA albúmina sérica bovina

CARD dominio de reclutamiento de caspasas

CHC carcinoma hepatocelular

CoA coenzima A

CoQ coenzima Q

CRM cadena respiratoria mitocondrial

CsA ciclosporina A

Cyp-D ciclofilina D

DCF 2'7'-Diclorofluoresceína

DED *death-effector domain*, dominio efector de muerte

DISC *death-inducing signalling complex*, complejo señalizador de inducción de muerte

DPH 1,6-difenilo 1-3-5 hexatrieno

FADD *Fas associated death domain*, dominio de muerte asociado a Fas.

FADH₂ dinucleótido de flavina-adenina reducido

FasL ligando del receptor Fas

FD70 dextrano de 70 kD marcado con fluorocromo.

GCL ligasa glutamato-cisteína

GS glutatión sintasa

GSH glutatión

mGSH glutatión mitocondrial

GSSG glutatión oxidado

HDL *heavy density lipoprotein*, lipoproteína de alta densidad

HFPA ácido α -hidroxifarnesilfosfónico, inhibidor de la farnesil transferasa

HMGCoA reductasa hidroximetilglutaril CoA-reductasa

HPLC *high performance liquid chromatography*, cromatografía líquida de alta resolución

HSL lipasa sensible a hormona

IAP proteínas inhibidoras de caspasas

IDL *intermediate density lipoprotein*, lipoproteína de densidad intermedia

IGF factor de crecimiento de tipo insulina

IL interleuquina

LDL lipoproteína de baja densidad

LDLR receptor de LDL

MCD Me- β -ciclodextrina

MME membrana mitocondrial externa

MMI membrana mitocondrial interna

MP Membrana plasmática

NADH dinucleótido de nicotinamida adenina reducido.

PBR receptor de benzodiazepinas periférico

PBS tampón fosfato salino

PC fosfatidilcolina

PCR reacción en cadena de la polimerasa

PE fosfatidiletanolamina

Pi anión fosfato

PI3 fosfatidilinositol-3-fosfato

PL fosfolípido

PMT permeabilidad mitocondrial transitoria

Prot proteína

RAIDD *receptor associated interleukine death domain*, dominio de muerte asociado al receptor de interleuquinas

RE retículo endoplasmático

ROS *reactive oxygen species*, especies reactivas de oxígeno

RT-PCR transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa

SCAP *SREBP cleavage-activating protein*, proteína que escinde y activa a SREBP.

SDH succinil deshidrogenasa

SDS-PAGE electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio

SRE *sterol regulatory element*, elemento regulador de esteroides.

SREBP *sterol regulatory element binding protein*, proteínas de unión a los elementos reguladores de esteroides

StAR *steroidogenic acute regulatory protein*, proteína aguda reguladora de la estereoidogénesis

START *StAR-related lipid transfer*, dominio de transferencia lipídica relacionado con StAR

TBS tampón salino con Tris

TNF *tumor necrosis factor*, factor de necrosis tumoral

TNFR *tumor necrosis factor receptor*, receptor del factor de necrosis tumoral

TRADD *TNF receptor associated death domain*, dominio de muerte asociado al receptor de TNF

TRAF *TNF receptor associated factor*, factor asociado al receptor de TNF

TUNEL marcaje de uridinas terminales por la uridina deoxinucleotidil transferasa.

UPR *unfolded protein response*

UV ultravioleta

VDAC *voltage dependent anion carrier*, canal aniónico dependiente de voltaje

VHB virus de la hepatitis B

VHC virus de la hepatitis C

VLDL *very low density lipoprotein*, lipoproteína de muy baja densidad

ÍNDICE

• INTRODUCCIÓN	p.5
1 Colesterol	p.5
1.1 Estructura y propiedades químicas	p.5
1.2 Localización y funciones	p.5
1.3 Regulación, síntesis y transporte	p.7
1.3.1 Vía exógena	p.8
1.3.2 Vía endógena	p.10
1.3.3 Regulación transcripcional de los niveles de colesterol	p.12
1.3.4 Transporte intracelular de colesterol	p.13
2 Mitocondria	p.15
2.1 Historia evolutiva	p.15
2.2 Estructura y composición	p.16
2.3 Transporte mitocondrial	p.17
2.4 Cadena respiratoria y fosforilación oxidativa	p.18
2.5 Defensa antioxidante mitocondrial. El glutatión	p.20
3 Muerte celular: necrosis o apoptosis	p.24
3.1 Necrosis	p.24
3.2 Apoptosis.	p.24
3.3 Permeabilización mitocondrial	p.27
3.3.1 Permeabilización por proteínas de la familia Bcl-2	p.28
3.3.2 Permeabilidad mitocondrial transitoria	p.29
3.4 Liberación de proteínas	p.32
4 Cáncer.	p.35
4.1 Carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma	p.36
4.2 Adaptación tumoral: papel del colesterol	p.38
4.2.1 Metabolismo	p.38
4.2.2 Apoptosis	p.40
4.3 Quimioterapia	p.42
4.3.1 Terapias inductoras de PMT y muerte celular	p.43

4.3.2	Uso de estatinas	p.45
•	OBJETIVOS	p.47
•	MATERIALES Y MÉTODOS	p.49
1	Cultivo celular.	p.49
1.1	Líneas celulares.	p.49
1.2	Aislamiento y cultivo de hepatocitos de rata.	p.49
2	Aislamiento mitocondrial.	p.50
2.1	Hígado de rata.	p.50
2.2	Biopsias hepáticas humanas.	p.51
2.2.1	Biopsias hepáticas sanas.	p.51
2.2.2	Muestras de hepatocarcinoma humano	p.52
2.3	Líneas celulares hepáticas	p.52
2.4	Determinación de pureza e integridad mitocondriales	p.53
3	Respiración mitocondrial	p.53
4	Microscopía electrónica	p.53
5	Determinación de colesterol	p.54
6	Microscopía láser confocal	p.54
7	Manipulación del colesterol mitocondrial	p.55
8	Fluidificación de las membranas mitocondriales	p.55
9	Determinación del parámetro de ordenamiento de membrana	p.56
10	Cuantificación de fosfolípidos	p.56
11	Inmunodetección por <i>western blot</i>	p.56
12	Monitorización de la permeabilidad mitocondrial transitoria	p.57
13	Especies reactivas de oxígeno	p.58
14	Determinación de la actividad caspasa-3	p.58
15	Medidas de GSH	p.59

16	Transporte de GSH	p.59
17	Extracción y análisis de ARN	p.59
17.1	Extracción.	p.59
17.2	RT-PCR.	p.60
17.3	RT-PCR cuantitativa a tiempo real	p.60
17.4	Silenciamiento de StAR por ARNi	p.61
18	Preparación de liposomas y ensayos fluorimétricos	p.62
19	Modelo de carcinoma hepatocelular en ratones atímicos	p.63
20	Ensayo TUNEL,vascularización y progresión tumoral	p.64
•	RESULTADOS	p.65
1	Aislamiento mitocondrial y determinación de colesterol	p.65
2	Efecto del colesterol sobre la funcionalidad mitocondrial	p.71
3	Respuesta mitocondrial frente a estímulos apoptóticos	p.75
3.1	Atractilósido	p.77
3.2	Radicales libres	p.81
3.3	Calcio	p.84
3.4	Permeabilización por la proteína Bax	p.85
4	Papel modulador del colesterol en la respuesta celular a la apoptosis	p.93
4.1	Resistencia frente a estímulos apoptóticos de acción mitocondrial	p.93
4.2	Sensibilización por la disminución del colesterol celular	p.94
4.2.1	Inhibición del enzima HMG-CoA reductasa: lovastatina	p.94
4.2.2	Inhibición del enzima escualeno sintasa: YM-53601	p.100
4.3	Sensibilización por la disminución del colesterol mitocondrial	p.104
5	Efecto del colesterol en el tratamiento quimioterapéutico	p.108
•	DISCUSIÓN	p.113
1	Papel del colesterol en la permeabilización mitocondrial	p.113

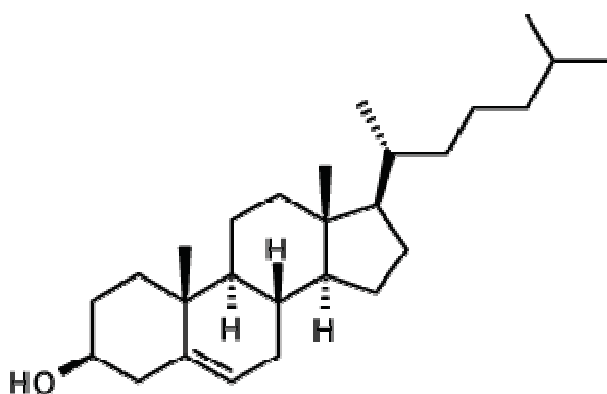
2	Papel del colesterol en la resistencia del CHC a la quimioterapia	p.116
•	CONCLUSIONES	p.121
•	BIBLIOGRAFÍA	p.123
•	ANEXO	p.141

Introducción

1 Colesterol

1.1 Estructura y propiedades químicas

El colesterol es una molécula orgánica cuya estructura química le permite desempeñar funciones vitales para la célula. Presenta una cabeza polar constituida por un grupo hidroxilo, y una cola, o porción apolar, formada por el carbociclo ciclopentanoperhidrofenantreno y sustituyentes alifáticos (**Esquema 1**). Es una molécula pequeña y anfipática, con una baja solubilidad en agua (10^{-8} M) y, al igual que otros lípidos, una buena solubilidad en disolventes orgánicos como cloroformo (CHCl_3) o etanol (EtOH). Además, es plana, lo que le permite intercalarse en las bicapas lipídicas de las membranas biológicas modulando su movilidad y su fluidez (Maxfield and Tabas, 2005).



Esquema 1. Estructura de la molécula de colesterol

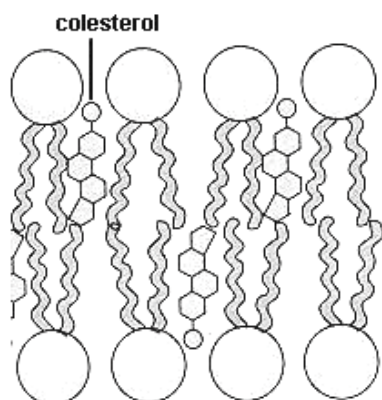
1.2 Localización y funciones

El colesterol es un lípido que se encuentra ampliamente distribuido en los tejidos y en el plasma sanguíneo de los vertebrados, siendo los órganos que presentan un mayor contenido el hígado, médula espinal, páncreas y cerebro. Su importancia biológica reside en que:

- ✓ Es un componente estructural de las membranas biológicas.
- ✓ Es precursor de la vitamina D, que regula la homeostasis del calcio.
- ✓ Es precursor de las hormonas sexuales: progesterona, estrógenos y testosterona.
- ✓ Es precursor de las hormonas corticoesteroides: cortisol y aldosterona
- ✓ Es precursor de las sales biliares, esenciales para la absorción de grasas en el intestino.

Como constituyente de las membranas celulares el colesterol se encuentra heterogéneamente distribuido (Ikonen, 2008). En condiciones normales, esta presente en la membrana plasmática (MP) de las células eucariotas en una proporción molar 1:1 con relación a los fosfolípidos; y representa entre el 35 y el 45% de sus moléculas lipídicas. (Maxfield and Wustner, 2002). El colesterol es también abundante en compartimentos endosomales de reciclaje y en el complejo de Golgi, especialmente en la red trans-Golgi. Por el contrario, tanto el retículo endoplasmático como las mitocondrias presentan un contenido pobre en colesterol.

El colesterol, al ser una molécula pequeña, es capaz de ocupar los huecos entre las cadenas de fosfolípidos, estableciendo enlaces de tipo van der Waals, y disponiendo su grupo hidroxilo hacia el exterior de la membrana para interactuar con el medio acuoso (**Esquema 2**) (Ikonen, 2008). La presencia de colesterol en la membrana presenta un doble efecto. Por un lado, aumenta la rigidez de la membrana, ya que los anillos de su estructura molecular interactúan con las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos, inmovilizándolas parcialmente. Además incrementa el orden de la bicapa, dejando zonas más rígidas y otras zonas más flexibles, previniendo la condensación y cristalización de las cadenas de los fosfolípidos, e inhibiendo posibles transiciones de fase. En cualquier caso, es evidente que esta molécula regula propiedades de membrana que son claves para que pueda realizar su función en la célula.



Esquema 2. Distribución del colesterol en la membrana. Interacción con los fosfolípidos.

Actualmente, se postula que los lípidos en la membrana se pueden encontrar en dos formas: como un mosaico fluido en el que las proteínas y demás componentes estarían flotando en la bicapa lipídica (Singer and Nicolson, 1972); o de una forma más estructurada, constituyendo las llamadas balsas lipídicas (*lipid rafts*) de unos 70 nm de diámetro. Estas balsas son muy ricas en esfingolípidos y en colesterol, y ayudan a organizar las proteínas para que puedan interaccionar funcionalmente (Simons and Ehehalt, 2002).

Además de la membrana plasmática, el colesterol está presente en otros compartimentos subcelulares (aunque en menor proporción) como el retículo endoplasmático, en el aparato de Golgi, en los lisosomas y en la mitocondria. A pesar de que ésta última es muy pobre en colesterol (0.5-3% respecto a la membrana plasmática), estudios recientes, realizados en mitocondria aislada, muestran como variaciones en los niveles de colesterol son capaces de modular la respuesta mitocondrial frente a estímulos apoptóticos (Colell et al., 2003).

1.3 Regulación, síntesis y transporte

Existen dos grandes fuentes de colesterol:

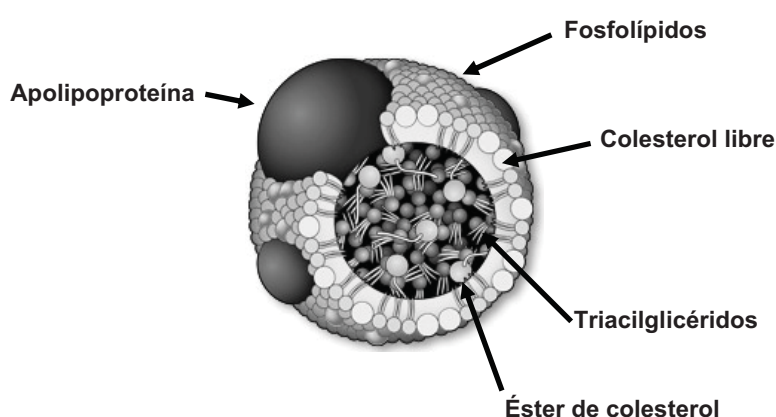
- ✓ **Exógena:** por absorción del colesterol preexistente en los alimentos de origen animal.
- ✓ **Endógena:** mediante síntesis *de novo* a partir de su precursor el acetil-coenzimaA.

1.3.1 Vía exógena

El colesterol presente en los alimentos es incorporado tras el proceso de la digestión. Una vez las células epiteliales del tubo digestivo han absorbido los compuestos lipídicos, éstos son transportados por el organismo mediante las lipoproteínas (Kruit et al., 2006); complejos macromoleculares esféricos formados por un núcleo que contiene lípidos apolares (colesterol esterificado y triglicéridos) y una capa externa polar formada por fosfolípidos, colesterol libre y proteínas (**Esquema 3**). Las proteínas que contienen (llamadas apolipoproteínas) sirven para aglutinar y estabilizar las partículas de grasa en un entorno acuoso como el de la sangre o la linfa, recubriéndolas y dejando expuesta su parte polar. Actúan a modo de detergente y son indicadoras del tipo de lipoproteína, pues los receptores de cada célula pueden identificarlas y controlar su metabolismo.

Las lipoproteínas se clasifican en diferentes grupos según su densidad.

- Quilomicrones
- Lipoproteínas de muy baja densidad (**VLDL**, *Very Low Density Lipoprotein*)
- Lipoproteínas de densidad intermedia (**IDL**)
- Lipoproteínas de baja densidad (**LDL**)
- Lipoproteínas de alta densidad (**HDL**)



Esquema 3. Estructura de una lipoproteína

Las grasas (triacilglicéridos, ácidos grasos libres y colesterol) que incorporamos de la dieta son transportadas en primera instancia por los quilomicrones, que son sintetizados

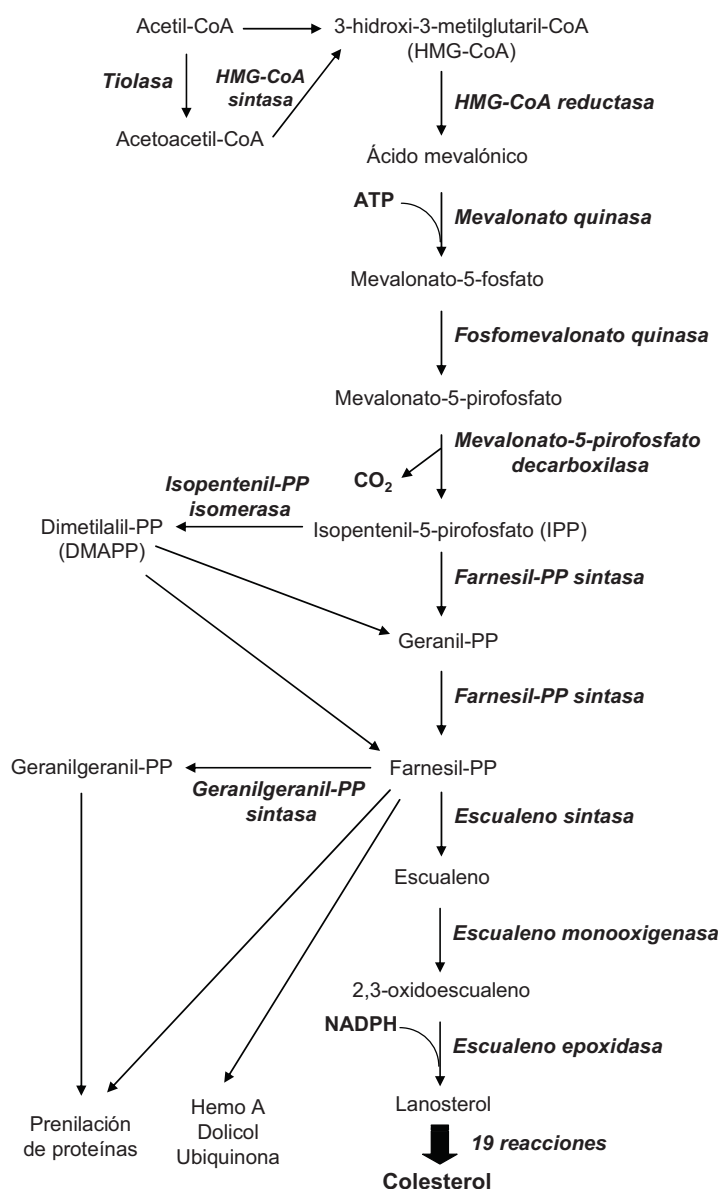
en las células epiteliales del intestino (Dietschy et al., 1993). Son grandes partículas esféricas que transportan su carga lipídica a través de la linfa hacia los tejidos. Al pasar por los capilares, las lipoproteinlipasas (LPL) degradan parte de los triacilglicéridos, provocando un enriquecimiento progresivo del porcentaje de colesterol en los quilomicrones remanentes, que acaban por ser captados y degradados por el hígado. Este órgano, a su vez, es el responsable de secretar las VLDL para distribuir triacilglicéridos y ésteres de colesterol por todo el organismo. A medida que las LPL presentes en los tejidos van hidrolizando los triacilglicéridos de las VLDL, éstas se hacen más pequeñas y más densas, y se enriquecen en colesterol hasta convertirse en LDL. Un exceso de LDL en plasma se asocia con la aterosclerosis, resultado de la presencia y crecimiento en el interior de las arterias de placas de ateroma constituidas esencialmente por un núcleo de éster de colesterol, que a su vez pueden derivar en graves situaciones patológicas como el infarto de miocardio y la apoplejía. Por otra parte, el hígado también sintetiza las HDL como lipoproteínas vacías que, tras circular a través del torrente sanguíneo, recogen el exceso de colesterol desde los distintos tejidos para que una vez en el hígado pueda ser metabolizado; es el llamado transporte reverso. Las LDL se unen a los receptores de membrana, a través de los cuales se internalizan en la célula. En el interior celular son transportados por endosomas, desde donde el colesterol puede ir a los diferentes compartimentos intracelulares, incluyendo la membrana plasmática y el retículo endoplasmático. El receptor se puede degradar vía proteosoma o devolverse de nuevo a la membrana.

El hígado juega un papel clave en el metabolismo lipídico del organismo, y en especial en la regulación de los niveles de colesterol. Además es en este órgano donde tiene lugar la síntesis de las sales biliares que emulsionan (de manera similar a como lo hace un detergente) las grasas para facilitar su metabolización y absorción en la pared intestinal. Éstas derivan del colesterol y se acumulan en la vesícula biliar, hasta que llega el alimento al duodeno; entonces son liberadas al intestino para que ejerzan su función sobre las gotas de grasa. Si bien gran parte de estas sales se reabsorbe (Grundy, 1983), un porcentaje importante es excretado, siendo ésta la principal vía de eliminación de colesterol del organismo.

1.3.2 Vía endógena

El colesterol endógeno es sintetizado mayoritariamente en el retículo endoplasmático (RE), a través de la vía del mevalonato (**Esquema 4**). El enzima limitante, principal punto de control de la vía, es la HMG-CoA reductasa (Endo, 1992), que cataliza la conversión de HMG-CoA a mevalonato. La síntesis de colesterol incluye los siguientes pasos (García-Ruiz et al, in press):

1. Transformación de acetil-CoA a mevalonato.
2. Transformación de mevalonato a escualeno mediante reacciones sucesivas de transferencia de grupos prenilo.
3. El escualeno se transforma en lanosterol.
4. El lanosterol se convierte en colesterol después de otras 19 reacciones sucesivas, catalizadas enzimáticamente, y que requieren la presencia de oxígeno.



Esquema 4. Vía del mevalonato.

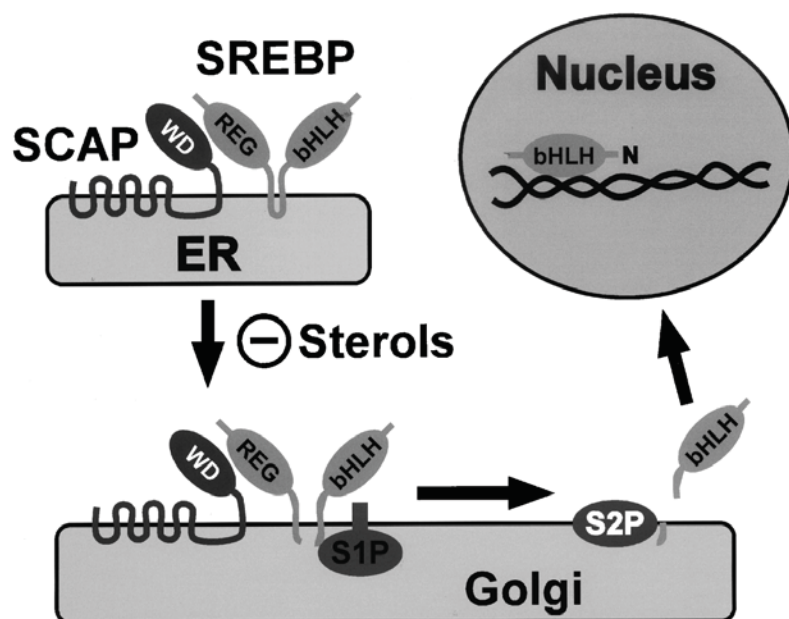
La vía del mevalonato, a su vez, se ramifica para producir otros importantes productos biológicos como los dolicoles, ubiquinona, y los isoprenoides, farnesil-pirofosfato (PP) y geranilgeranil-PP (McTaggart, 2006). Los isoprenoides juegan un importante papel en las modificaciones postraduccionales de proteínas reguladoras, como la proteína G, laminina nuclear, y las proteínas pequeñas de unión a GTP. Por uniones covalentes a estas proteínas los isoprenoides crean sitios lipídicos que influyen en la unión a la membrana y en el tráfico intracelular de proteínas asociadas a membrana. Los mayores sustratos de la prenilación son Rho y Ras, que son proteínas pequeñas de unión a GTP que cambian de la forma inactiva, unida a GDP, al estado activo, unido a GTP. En las células endoteliales, la translocación de Ras del citoplasma a la membrana plasmática es dependiente de la farnesilación, mientras que la translocación de Rho es dependiente de

la geranilación. Las proteínas Ras ayudan a la proliferación y diferenciación celular y cada miembro de la familia Rho tiene una función específica involucrada en movilidad, secreción y proliferación celular (McTaggart, 2006).

1.3.3. Regulación transcripcional de los niveles de colesterol

El RE, además de ser el orgánulo donde tiene lugar su síntesis *de novo* a partir de acetil-CoA y posterior esterificación, es el compartimento encargado de mantener la homeostasis celular del colesterol.

La síntesis *de novo* está regulada por el colesterol presente en el RE de las células. Los factores de transcripción **SREBPs** (*Sterol Regulatory Element Binding Proteins*), son los encargados de llevar a cabo este control. SREBP-2 principalmente activa genes involucrados la síntesis de colesterol, mientras que SREBP-1a y SREBP-1c controlan sobre todo en la síntesis de ácidos grasos. Estas proteínas transmembrana se encuentran transcripcionalmente inactivas en el RE. En presencia de una concentración determinada de colesterol en la membrana del RE, las SREBPs están asociadas con la proteína reguladora **SCAP** (*SREBP-cleavage activating protein*) (**Esquema 5**). Cuando disminuye la concentración de colesterol en el RE, se disocia el complejo SREBP-SCAP, permitiendo que SREBP migre al aparato de Golgi, donde es escindida secuencialmente por las proteasas S1P y S2P (*site 1 and 2 proteases*) (Goldstein et al., 2006). Como resultado de este procesamiento se forma el factor de transcripción bHLH que migra al núcleo celular, para unirse a los SRE (*Sterol Regulatory Elements*) de genes diana del metabolismo del colesterol y de los ácidos grasos, y controlar su expresión. Entre los genes regulados por estas proteínas destacan los del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) y de la hidroximetilglutaril CoA-reductasa (HMG-CoA-reductasa), el enzima limitante en la vía biosintética del colesterol.



Esquema 5. Esquema del sistema regulador SCAP-SREBP.

Extraído de: Horton, J.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 109, 1125-1131.

Además del sistema de regulación mencionado, se han descrito algunos más; así, cuando la célula detecta niveles altos de colesterol se acelera la degradación de la HMG-CoA reductasa por su unión con la proteína Insig (Sever et al., 2003). Por otro lado, si se acumulan los esteroides en el RE, y se une colesterol al dominio sensible a esteroides que presenta la proteína SCAP, ésta sufre un cambio conformacional que hace que se ancle a la misma proteína Insig (ubicada en el RE), impidiendo la salida de SCAP-SREBP2 hacia el Golgi, evitando con ello la activación del factor de transcripción (Goldstein et al., 2006).

1.3.4 Transporte intracelular de colesterol

El colesterol es un lípido que por su insolubilidad en agua requiere de mecanismos específicos para su transporte tanto fuera (lipoproteínas) como dentro de la célula.

El movimiento de colesterol a través del citoplasma, a su vez, puede seguir dos grandes estrategias. Por un lado, puede que este lípido una vez incorporado en las membranas vesiculares (lisosomas, endosomas, peroxisomas...) pueda fundirse con otras membranas y pasar de un compartimento intracelular a otro (Maxfield and Wustner, 2002). Por ejemplo, cuando es sintetizado *de novo*, es transportado desde el RE a las caveolas (dominios ricos en caveolina) de la membrana plasmática mediante este sistema. Este transporte es muy dinámico, pues se ha determinado que se renueva todo

el colesterol de la membrana cada 40 min (Lange et al., 1993), y es dependiente de ATP, ya que requiere un citoesqueleto intacto para permitir el transporte de las vesículas. Sin embargo, cuando se bloquea este transporte vesicular el tráfico intracelular de colesterol se mantiene, lo que demuestra la existencia de otro mecanismo igual de efectivo para realizar la misma función (Soccio and Breslow, 2004).

Este segundo mecanismo de transporte lo llevan a cabo proteínas con dominios hidrofóbicos capaces de unir y solubilizar el colesterol. Análisis de la transcripción de genes controlados por las SREBPs, permitieron identificar las proteínas StARD4, 5 y 6, relacionadas estructuralmente con StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*), y que se agrupan en la gran familia START (*StAR-related lipid transfer*). Esta familia de proteínas presentan una gran similitud tanto en secuencia génica como en estructura tridimensional, y carecen de secuencia localizadora (péptido señal) que las dirija a ningún compartimento subcelular, con lo que estarían confinadas principalmente al citoplasma. Así pues, se cree que las proteínas de la familia START unirían lípidos insolubles, permitiendo su transporte a través del acuoso citosol (Miller, 2007). Más concretamente, se cree que StARD4 sería la principal responsable de entregar el colesterol, procedente del RE y de otros compartimentos subcelulares, a la membrana mitocondrial externa; mientras que StAR (StARD1), por sí misma, sería la responsable de transportarlo desde la membrana mitocondrial externa (más rica en colesterol) a la interna (Miller and Strauss, 1999). Este transporte es especialmente importante en aquellas células que secretan hormonas esteroideas o, como en el caso de los hepatocitos del hígado, sales biliares, puesto que es la membrana mitocondrial interna, contiene toda una serie de citocromos (como el P450) claves para poder sintetizar estos compuestos a partir del colesterol.

El colesterol por sí solo es tóxico para la célula, por eso cuando se acumula, debe almacenarse esterificado en forma de microvesículas lipídicas (Maxfield and Tabas, 2005). La esterificación la lleva a cabo el enzima ACAT (acil-CoA-colesterol acil transferasa), que cataliza la transferencia de un ácido graso del CoA al grupo hidroxilo del colesterol, convirtiéndolo en una sustancia más hidrofóbica. El orgánulo que realiza esta esterificación es nuevamente el RE. Cuando se necesita recuperar, se activa la colesterol esterasa (lipasa sensible a hormona, HSL), que hidroliza los ésteres de colesterol.

2 Mitocondria

Las mitocondrias son orgánulos esenciales para el mantenimiento de la viabilidad celular, pues en ellas tiene lugar la producción de energía en forma de ATP (Mitchell, 1961, 1979). Además, realizan otras funciones importantes, como la termogénesis (producción de calor mediante el desacoplamiento del gradiente electroquímico en la membrana mitocondrial interna del tejido adiposo marrón), la homeostasis del calcio (matriz mitocondrial), o la síntesis del grupo hemo (en hepatocitos y células precursoras de eritrocitos), así como, la síntesis de aminoácidos, nucleótidos, fosfolípidos, pirimidinas y otros metabolitos.

Por un lado, es responsable de la fosforilación oxidativa que confiere a la célula un mayor rendimiento energético (proporcionando alrededor del 90% de su requerimiento en forma de ATP), permitiendo los complejos procesos celulares (Rich, 2003). Esta mayor disponibilidad energética ha permitido que las células ganasen eficiencia y complejidad, y, en último término, ha posibilitado la evolución de los organismos superiores. Pero por otro lado, en estos últimos años se ha puesto de manifiesto su implicación en el envejecimiento y la muerte celular, como reservorio de distintas proteínas proapoptóticas. Además, se ha relacionado su disfunción con distintas enfermedades como cáncer o enfermedades neurodegenerativas (e.g. Alzheimer).

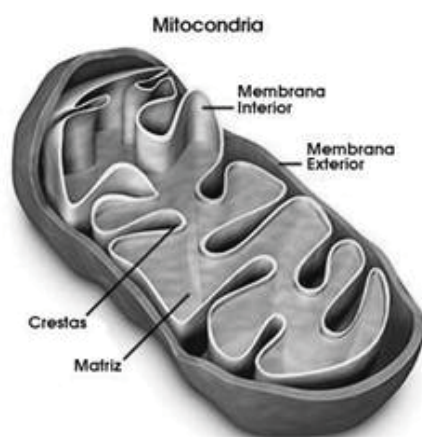
2.1 *Historia evolutiva*

Lynn Margulis recuperó una antigua hipótesis, reformulándola como teoría endosimbiótica (Margulis, 1971). Según esta versión actualizada, hace unos 1.500 millones de años, una célula procariota capaz de obtener energía de los nutrientes orgánicos empleando el oxígeno molecular como oxidante, se fusionó en un momento de la evolución con otra célula procariota o eucariota primitiva al ser fagocitada sin ser inmediatamente digerida; un fenómeno que se observa con cierta frecuencia. De esta manera se produjo una simbiosis permanente entre ambos tipos de seres: la procariota fagocitada proporcionaba energía, especialmente en forma de ATP y la célula huésped ofrecía un medio estable y rico en nutrientes. Este mutuo beneficio hizo que la célula procariota llegara a convertirse en una parte de ella: la mitocondria. Las bacterias y las mitocondrias tienen mucho en común: tamaño, estructura, componentes de membrana y

la forma en que producen energía. Además, la mitocondria posee material genético propio (ADNmt), de doble cadena circular, muy similar al de las bacterias primitivas. Este ADNmt codifica sólo una pequeña fracción de las proteínas presentes en este orgánulo, el resto dependen del genoma celular. La relación de dependencia entre célula y mitocondria sigue siendo un misterio en muchos aspectos, como la coordinación en el crecimiento mitocondrial, su replicación y el tráfico de proteínas. La mitocondria necesita a la célula para sobrevivir, y viceversa. Paradójicamente, este orgánulo puede inducir la muerte celular con un objetivo más elevado: el beneficio del organismo.

2.2 Estructura y composición

Las mitocondrias son orgánulos dinámicos de un diámetro aproximado entre 0.5 y 1 μm que se hallan asociados a microtúbulos, lo que determina su distribución en el citoplasma. Están compuestas por dos membranas, externa e interna. Aunque ocasionalmente pueden estar unidas en los llamados sitios de contacto, estas dos membranas altamente especializadas delimitan dos compartimentos esenciales: la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana (**Esquema 6**).



Esquema 6. La mitocondria y sus componentes.

La **membrana mitocondrial externa (MME)** es bastante permeable, y permite el paso de moléculas pequeñas (de peso molecular inferior a 5000 D) e iones. Presenta una composición lipídica muy parecida a la membrana citoplasmática y al RE, formada principalmente por fosfolípidos de ácidos grasos insaturados (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol). Aproximadamente un 60% de su composición

corresponde a proteínas, entre las cuales se encuentran porinas, la Acil-CoA-sintetasa, la NADH-citocromo-b₅-reductasa, monoamino oxidasa y el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC).

La **membrana mitocondrial interna (MMI)** es altamente impermeable, a diferencia de la externa, formando una barrera entre el citosol y la matriz mitocondrial. Presenta pliegues, llamados crestas mitocondriales, que le confieren una mayor superficie que la MME y que contienen la mayoría de los sistemas enzimáticos anclados en la membrana (la cadena de transporte de electrones, la ATP-sintetasa y proteínas transportadoras). Su composición es también diferente, presentando un mayor contenido proteico (80%), y claras diferencias lipídicas; no contiene apenas colesterol y los fosfolípidos se distribuyen en 45-50% fosfatidilcolinas, 25-35% fosfatidiletanolaminas y 10-20% cardiolipinas (Cunningham et al., 1982). Este último corresponde a un difosfatidilglicerol con cuatro cadenas de ácidos grasos con un alto contenido en ácido linoleico (18:2), que no se encuentra en ninguna otra membrana celular de mamíferos; y es responsable de la impermeabilidad de la MMI a los iones.

La **matriz mitocondrial** contiene la maquinaria implicada en la síntesis de proteínas (ADN, ARN y ribosomas) y es donde tienen lugar las reacciones del ciclo de Krebs y la β -oxidación.

El **espacio intermembrana**, confinado entre la MME y la MMI, se muestra como un interesante microentorno del cual se sabe poco, pero que contiene algunas de las proteínas cruciales para entender la fisiología celular, el catabolismo mitocondrial y la muerte celular. Dentro de este compartimento se han encontrado distintas proteínas proapoptóticas (citocromo c, Smac/DIABLO, AIF...), la creatina quinasa, la adenilato quinasa (que transforma el AMP en ADP) (Green, 2006; Martinou and Green, 2001)...

2.3 Transporte mitocondrial

Dada la relativa permeabilidad de la MME, y la casi completa impermeabilidad de la MMI, que sólo permite la difusión de pequeñas moléculas neutras (O₂, H₂O, CO₂, NH₃, acetato, etanol...), el transporte, ya sea activo o pasivo, se realiza a través de la MMI mediante canales o transportadores específicos. Actualmente están bien caracterizados al menos doce transportadores de metabolitos. La mayoría de éstos corresponden a transportadores de aniones: ADP/ATP, Pi, oxoglutarato, aspartato/glutamato, piruvato,

citrato, dicarboxilatos... Pero también se conocen algunos de cationes o zwitteriones: acilcarnitina/carnitina, ornitina, glutamina... Además se postula la existencia de algunos más para permitir la importación de nucleótidos, cofactores y compuestos no sintetizados en la mitocondria (Palmieri, 1994).

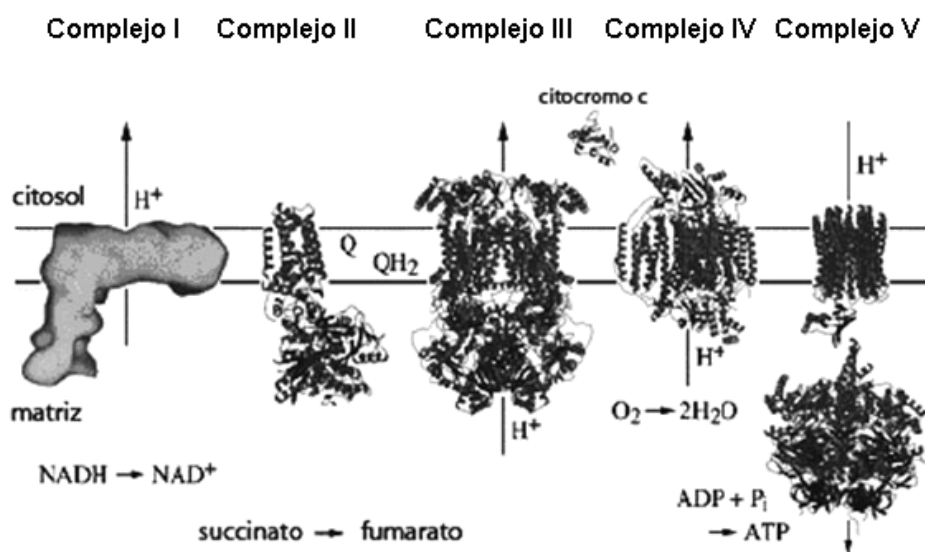
Los transportadores relacionados con la fosforilación oxidativa (de ADP/ATP y de Pi) están presentes en todas las mitocondrias. Los encargados de importar equivalentes reducidos o sustratos para la fosforilación oxidativa en la matriz mitocondrial (piruvato, carnitina, oxoglutarato y aspartato/glutamato) también se hallan ampliamente distribuidos. Pero en cambio hay otros transportadores que son específicos para células de un determinado órgano o tejido y su distribución depende de las funciones que desempeñe en cada caso la mitocondria: transportador de dicarboxilatos (gluconeogénesis), transportador de citrato (síntesis de ácidos grasos), y transportadores de ornitina, de glutamato y de glutamina (ciclo de la urea) (Palmieri, 1994).

El transporte a través de la MMI está afectado por el potencial de membrana que se crea por el constante bombeo de protones, que carga positivamente el espacio intermembrana y negativamente la matriz. La mayoría de transportadores realizan un intercambio equimolar de aniones (antiporte) o bien los aniones se transportan junto con protones (simporte), con excepción del transportador de nucleótidos de adenosina (ANT) y del translocador de aspartato/glutamato, que son transportadores electrogénicos, ya que transfieren una carga eléctrica neta.

2.4 Cadena respiratoria y fosforilación oxidativa

En 1925, Keilin descubrió los citocromos que componen la cadena respiratoria y su papel en la respiración intracelular y el consumo de oxígeno (Keilin and Hartree, 1945). Posteriormente, Mitchell describió el acoplamiento entre la oxidación de los complejos respiratorios y la fosforilación del ADP, mediante el aprovechamiento por parte de la ATPasa del gradiente electroquímico creado a partir de la oxidación de los sustratos respiratorios (Mitchell, 1961). Desde entonces la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) y la fosforilación oxidativa fueron ganando importancia, y se fueron describiendo sus componentes hasta llegar al modelo actual (**Esquema 7**) formado por cinco complejos multiproteicos localizados en las crestas mitocondriales, que atraviesan la bicapa lipídica y sobresalen hacia la matriz y el espacio intermembrana. Los

coenzimas difunden a través de la membrana o se hallan débilmente unidos a su superficie.



Esquema 7. Componentes e inhibidores de la cadena de transporte de electrones

El **complejo I** (NADH ubiquinona oxidoreductasa o también llamado NADH deshidrogenasa) es el de mayor tamaño y está formado por al menos 42 polipéptidos (Rich, 2003). Su función es catalizar la transferencia de electrones desde el NADH a la ubiquinona o coenzima Q (CoQ). El **complejo II** (succinato CoQ oxidoreductasa) se compone de 4 péptidos y cataliza la oxidación del succinato a fumarato (en el ciclo de Krebs), transfiriendo los electrones a la ubiquinona en la CRM. Está altamente regulado por el estado redox celular y por el potencial de fosforilación mitocondrial. Está perfectamente acoplado al ciclo de Krebs, permitiendo un aprovechamiento óptimo del poder reductor generado (Robinson et al., 1987). Aproximadamente 10 subunidades constituyen el **complejo III** (citocromo c oxidoreductasa). El citocromo c, localizado en el espacio intermembrana, participa en la transferencia de electrones entre los complejos III y IV. El **complejo IV** (citocromo c), compuesto de 13 subunidades, transfiere 4 electrones desde el citocromo c a una molécula de oxígeno, creándose una molécula de agua.

Esta transferencia de electrones entre los complejos de la cadena respiratoria se aprovecha de forma indirecta para sintetizar el ATP. Al principio de la cadena las moléculas reducidas NADH y FADH_2 transfieren un par de electrones del hidrógeno a

la CRM. Los electrones fluyen (mediante distintas reacciones de óxido-reducción) entre los complejos gracias a un gradiente electroquímico, y al transporte realizado por la ubiquinona y el citocromo c. La transferencia de electrones llevada a cabo entre los complejos I-IV se efectúa a través de subunidades portadoras de grupos prostéticos hierro-sulfuro en los complejos I, II y III, o grupos hemo-hierro en el citocromo c y complejo IV. La energía liberada durante este proceso de transferencia se usa en los complejos I, III y IV para bombear protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembrana. La acumulación de protones en este espacio frente a los electrones de la matriz, crea un potencial eléctrico y un gradiente químico. La membrana interna es prácticamente impermeable a los protones y es necesario que intervenga el **complejo V** (F₀-F₁-ATP sintasa) para que puedan ser transportados de nuevo al interior de la mitocondria. Esta entrada de protones genera energía que es usada para sintetizar ATP a partir de ADP y Pi.

La reducción del O₂ a H₂O en la CRM es incompleta, pues entre un 2 y un 4 % de los electrones se pierden dando lugar a especies reactivas de oxígeno (ROS). Se producen en el complejo I y sobre todo en el complejo III, donde la autooxidación de la semiubiquinona promueve la formación del anión superóxido (O₂⁻), que dismuta originando peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y O₂, espontáneamente o por mediación de la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Turrens and Boveris, 1980). Finalmente, el H₂O₂ es eliminado por la glutatión peroxidasa.

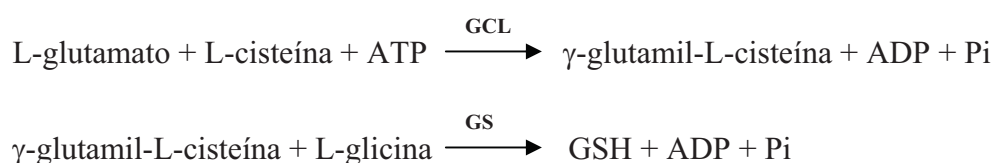
2.5 Defensa antioxidante mitocondrial. El glutatión

En la mitocondria se llevan a cabo distintos procesos, como el de la respiración, que generan de forma continua ROS, poniendo en peligro la viabilidad del propio orgánulo. Es por ello, que existe una defensa antioxidante muy efectiva para protegerla.

El **glutatión** (GSH) es un tripéptido, γ -glutamilcisteinilglicina, constituido por tres aminoácidos: glicina, cisteína y ácido glutámico. Se sintetiza en todas las células de mamífero, pero los órganos principales que regulan su homeostasis son el hígado, los pulmones y el riñón. El hígado tiene características únicas para regular la síntesis del GSH, ya que los hepatocitos son capaces de convertir a la metionina en cisteína a través

de la vía de la transulfuración. Además su biosíntesis está regulada por la tasa de exportación, principalmente hacia el plasma sanguíneo y la bilis.

Dentro de la célula, es sintetizado en el citosol en dos pasos que requieren la hidrólisis de ATP. La primera reacción está catalizada por la γ -glutamilcistein ligasa (GCL), la cual necesita magnesio o manganeso como cofactor para realizar su función, y es el enzima limitante en la síntesis de GSH. Se forma un enlace entre el grupo γ -carboxilo del glutamato y el grupo α -carboxilo de la cisteína, que impide su degradación intracelular. La GCL presenta retroinhibición por producto, impidiendo así una sobreproducción de este compuesto. La segunda reacción está catalizada por la glutatión sintasa (GS), que une la glicina consumiendo nuevamente ATP.



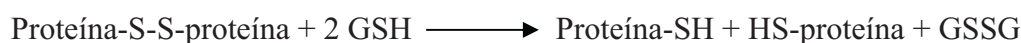
El GSH se distribuye a distintos orgánulos subcelulares, como el RE, el núcleo y la mitocondria. En esta última localización subcelular se encuentra entre un 10-15% de todo el GSH de la célula, mayoritariamente en forma reducida, en proporción 100:1 (GSH:GSSG). Este equilibrio se mantiene gracias al enzima glutatión reductasa, que requiere NADPH para catalizar el paso de GSSG a GSH. Por tanto, el poder reductor de la célula determinará en gran medida este balance.

El glutatión es el antioxidante más abundante en la célula, y usa el grupo tiol de la cisteína como agente reductor. Las principales funciones del GSH son:

- Detoxificar electrófilos inestables, como carbonilos α,β -insaturados y electrófilos de Michael; espontáneamente o mediante la acción del enzima GSH S-transferasa.
- Actuar como coenzima de otros enzimas antioxidantes, como glutarredoxinas y tiorredoxinas.
- Eliminación de cationes metálicos tóxicos.
- Actuar como reserva de cisteína.
- Transporte de cisteína entre distintos tejidos.

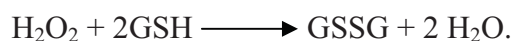
- Mantenimiento del estado reducido de las proteínas (evita la formación de puentes disulfuro que modifiquen su estructura).
- Actuar como cofactor en el metabolismo de prostaglandinas, leucotrienos y distintas hormonas.
- Reducir ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos.
- Reducir puentes disulfuro generados por estrés oxidativo.
- Detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS).

El GSH es esencial para mantener el equilibrio redox intracelular y las proteínas en un estado reducido, asegurando su funcionalidad (Han et al., 2006). La presencia en el medio de ROS o de especies reactivas de nitrógeno (como los peroxinitritos) puede alterar la función de algunas proteínas. Los grupos tiol de las cisteínas pueden oxidarse a cistinas, modificando los puentes disulfuro y finalmente su estructura. Pero mediante el enzima GSH transferasa y el glutati6n reducido, la c6lula consigue revertir su oxidaci6n de la siguiente manera:



Una gran cantidad de energía en forma de poder reductor es gastada de forma contínua para mantener concentraciones elevadas de GSH. El equilibrio tiol-disulfuro dentro de la c6lula regula diversos procesos metab6licos, incluyendo la actividad enzimática, el transporte y la expresi6n de genes.

Por otra parte, el metabolismo aer6bico impone un estr6s oxidativo fisiol6gico. La respiraci6n mitocondrial, la transformaci6n de xenobi6ticos por parte de algunos citocromos (e.g citocromo P450), entre otros, producen radicales libres que pueden generar lipoperoxidaci6n y daño celular. En la mitocondria, la cadena transportadora de electrones genera de forma contínua radicales libres (como anión super6xido, O_2^- , ó per6xido de hidrógeno, H_2O_2) por los electrones que se escapan de ella. La mitocondria dispone de mecanismos de defensa frente a este tipo de compuestos. El O_2^- , es contrarrestado por el enzima super6xido dismutasa (MnSOD), que cataliza su dismutaci6n dando lugar a H_2O_2 y O_2 . Por su parte el H_2O_2 , es reducido por el GSH gracias al enzima glutati6n peroxidasa (GPx) dependiente de selenio, que cataliza la siguiente reacci6n:



Este enzima tiene una gran relevancia a nivel mitocondrial puesto que suple la ausencia de la catalasa, presente en el resto de la célula. Por ello, en este orgánulo, los niveles de glutatión reducido (GSH), deben estar finamente controlados, una disminución de los mismos pueden conducir a la disfunción mitocondrial, pérdida energética, y finalmente muerte celular (Fernandez-Checa and Kaplowitz, 2005). Además, al modular el estado redox, se encuentra involucrado en la regulación de la muerte celular programada producida por la permeabilización de la membrana mitocondrial (Fernandez-Checa, 2003; Fernandez-Checa et al., 1997).

La mitocondria no dispone de la maquinaria enzimática para producir el GSH que necesita, así que debe importarlo desde el citosol mediante un transportador localizado en la membrana mitocondrial interna. En estudios realizados con mitocondrias aisladas de hígado de rata se ha demostrado que es un proceso dependiente de ATP (es un transporte activo) e inhibible por glutamato (Martensson et al., 1990). Su cinética del transporte en mitocondrias de hígado de rata presenta dos componentes, uno de alta y otro de baja afinidad (Coll et al., 2003). Se ha observado que algunos transportadores de la membrana mitocondrial, como el de dicarboxilatos y el de 2-oxoglutarato, son capaces de transportar GSH. Y hay estudios que sugieren que el transportador de 2-oxoglutarato puede ser el responsable del transporte de baja afinidad del GSH en la mitocondria, en un intercambio con 2-oxoglutarato (Fernandez-Checa and Kaplowitz, 2005).

La composición de los fosfolípidos de membrana, así como el contenido en colesterol, regula la fluidez de membrana (van Blitterswijk et al., 1987), afectando al comportamiento de los transportadores que se hallan en ella. Un aumento en los niveles de colesterol en la mitocondria, con la consecuente disminución de la fluidez de membrana, disminuye el transporte de GSH al interior de la mitocondria (Colell et al., 1997). Estudios recientes utilizando líneas celulares HepG2, muestran como el acetaldehído, producto de degradación del etanol, aumenta la síntesis *de novo* de colesterol a través del estrés en el retículo endoplasmático, inhibiendo el transporte de GSH (Lluis et al., 2003). Sin embargo, la fluidificación de las mitocondrias de la línea HepG2 tratada con acetaldehído restaura la capacidad de transporte de GSH hacia el interior de la mitocondria.

3 Muerte celular: necrosis y apoptosis

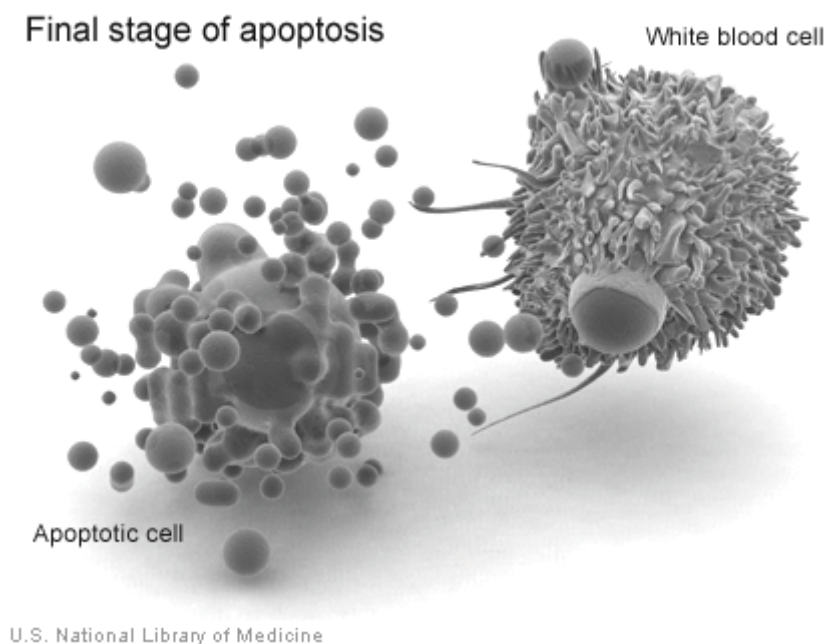
Existen dos formas de muerte celular: necrosis y apoptosis. Las características morfológicas y bioquímicas de ambas permiten establecer claras diferencias entre ellas. Se tiende a pensar que la apoptosis y la necrosis representan los dos extremos de un proceso continuo, ya que ambos tipo de muerte ocurren simultáneamente en tejidos expuestos al mismo estímulo.

3.1 *Necrosis*

La **necrosis** es la forma de muerte celular que resulta de un proceso pasivo, accidental y que es consecuencia de la destrucción progresiva de la estructura con alteración definitiva de su función normal para dar lugar a un daño irreversible. Este daño puede ser desencadenado por factores ambientales como la isquemia, temperaturas extremas, traumatismos mecánicos, hepatotoxicidad, entre otros estímulos. Se produce una reducción de los niveles energéticos, pérdida de ATP y se activan enzimas degradadoras. Finalmente se produce una lisis celular y la liberación de sus componentes al medio extracelular, activando procesos inflamatorios.

3.2 *Apoptosis*

La **apoptosis**, en cambio, es un proceso fisiológico que afecta sólo a determinadas células; aquellas que deben morir por el bien del organismo. En este proceso la membrana celular no se destruye, lo que impide que se libere al espacio extracelular el contenido citosólico y se activen mecanismos inflamatorios. Se produce una granulación del contenido citoplasmático, con conservación de algunos orgánulos hasta el final del proceso. A nivel nuclear la cromatina se condensa y fragmenta. Finalmente, la membrana celular se recoge dando lugar a vacuolas que encapsulan los elementos deteriorados del citoplasma y el núcleo, formando los llamados cuerpos apoptóticos que pueden ser eliminados por los fagocitos en su totalidad (**Esquema 8**).



Esquema 8. Célula apoptótica siendo fagocitada.

La participación de células vecinas en este proceso se manifiesta por su capacidad para enviar señales moleculares a la célula que debe morir; como mecanismo complementario al que desarrolla la célula diana cuando determina molecularmente por sí misma su autodestrucción. El proceso apoptótico presenta una duración variable, dependiendo del tipo de célula, pero es fácilmente identificable mediante el estudio e identificación específico de la degradación de ADN, que se ha logrado con tinciones derivadas de la uridina (TUNEL).

Existen dos vías de señalización que conducen a una muerte celular apoptótica: la vía extrínseca y la vía intrínseca o mitocondrial.

La **vía extrínseca** o de los receptores de muerte, se activa cuando un ligando se une a estos receptores. Dos familias de receptores se han identificado con estas características: Los receptores de muerte de la familia del receptor de TNF (TNFR) que incluyen TNFR1, Fas (CD95), DR3/WSL y los receptores del ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)/Apo-2L (TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5).

Los receptores de muerte poseen un dominio intracelular en el C-terminal del receptor denominado dominio de muerte (*death domain*, DD) (**Esquema 9**). El miembro de los

receptores de muerte más estudiado es el CD95 o Fas. La oligomerización del CD95 tras la unión de su ligando, FasL, es requerida para la transducción de la señal apoptótica. Un complejo de proteínas se asocia con el CD95 activado. Este complejo de señalización inductor de muerte (*death-inducing signalling complex*, DISC) se forma en el segundo de los receptores trimerizados. Primero, el adaptador FADD (*Fas-associated death domain*) se une a través de su dominio de muerte al dominio de muerte del CD95. FADD también presenta el denominado dominio efector de muerte (*death-effector domain*, DED), y, de nuevo por interacciones homólogas, recluta en el DISC la procaspasa-8 (o FLICE) que contiene un DED. Después, la procaspasa-8 es activada proteolíticamente y la caspasa-8 activa (caspasa iniciadora) es liberada del DISC al citoplasma formando un heterotetrámero de dos subunidades pequeñas y dos grandes (Muzio et al., 1996). La caspasa-8 corta proteolíticamente varias proteínas de la célula incluyendo la procaspasa-3 (caspasa ejecutora), que resulta en su activación y en la ejecución de la muerte celular. La inhibición de esta ruta es realizada por proteínas que contienen dos DED y que se unen al complejo CD95-FADD. Esto inhibe el reclutamiento y la activación de la caspasa-8, antiguamente conocida como FLICE, de ahí el nombre de proteínas inhibidoras de FLICE (*FLICE-inhibitory proteins*, FLIP) (Bertin et al., 1997; Hu et al., 1997; Thome et al., 1997).

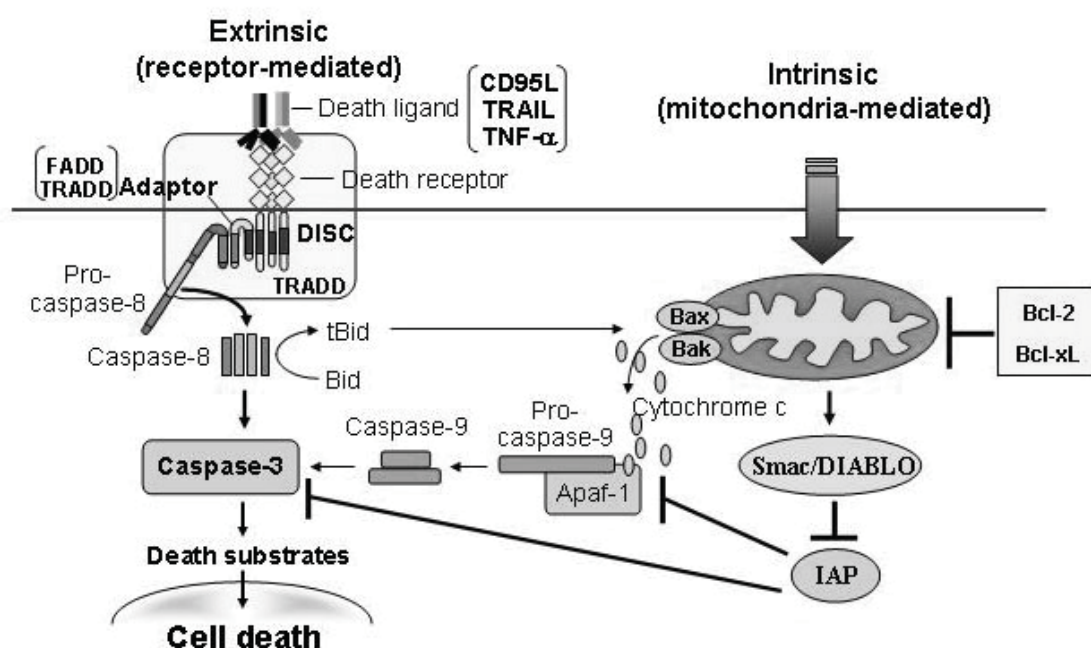
Algo similar sucede con el otro receptor de membrana, TNFR1 (Chen and Goeddel, 2002; Wajant et al., 2003). Su parte intracelular conecta en primer lugar con el adaptador TRADD (*TNF receptor associated death domain*), la unión de FADD a TRADD permitirá el reclutamiento y activación de la caspasa-8. A su vez, el receptor TNFR1, a partir del reclutamiento de TRAF-2 (*TNF receptor associated factor*), puede activar vías de supervivencia como:

1. La activación del factor de transcripción NF- κ B.
2. La activación de la vía de señalización de MAPK.

La **vía intrínseca o mitocondrial** se ejecuta en respuesta a estímulos externos y a daño en el DNA. Las distintas vías de respuesta convergen en la mitocondria, a menudo a través de la activación de miembros proapoptóticos de la familia de Bcl-2 que darán lugar a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la consiguiente liberación de proteínas del espacio intermembrana; entre ellas, el citocromo c (**Esquema 9**) (Newmeyer and Ferguson-Miller, 2003). Esta proteína, una vez en el citosol, se asocia con Apaf-1 y la procaspasa-9 formando el llamado apoptosoma,

complejo que permitirá la activación de la caspasa-9. Una vez que ésta se activa, actúa sobre las caspasas efectoras como la caspasa-3 (Adrain and Martin, 2001).

La vía de los receptores de muerte y la vía mitocondrial convergen a nivel de la activación de la caspasa-3. El solapamiento y la integración de las dos vías se debe a Bid, un miembro proapoptótico de la familia de Bcl-2. La caspasa-8 media la ruptura de Bid incrementando enormemente su actividad proapoptótica que resulta en su translocación a la mitocondria donde promueve la liberación del citocromo c.



Esquema 9. Vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis.

3.3 Permeabilización mitocondrial

La permeabilización de la membrana mitocondrial externa es un proceso que permite la salida de proteínas proapoptóticas (citocromo c, Smac/DIABLO...) del espacio intermembrana al citosol desencadenando la muerte celular. Existen multitud de estudios que demuestran este proceso, pero se desconoce el mecanismo exacto. Actualmente, se barajan dos hipótesis: la formación de canales autónomos por miembros de la familia de proteínas de Bcl-2 (Green, 2006), y la ruptura no-específica

de la MME producida por el hinchamiento de la matriz mitocondrial y la expansión de la MMI (Martinou and Green, 2001).

3.3.1 Permeabilización por proteínas de la familia Bcl-2

Este primer modelo considera a la permeabilización mitocondrial como un proceso intrínseco de la membrana externa y está regulada por proteínas de la familia Bcl-2 (**Esquema 10a**). Estas proteínas contienen al menos una de las cuatro regiones conservadas llamados dominios homólogos de Bcl-2 (BH1-BH4). Se agrupan en tres familias

- ✓ Los miembros antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-xW, Mcl-1 y A1/bfl-1) presentan los cuatro dominios.
- ✓ Los miembros proapoptóticos (Bax, Bak y Bok/Mtd) carecen del dominio BH-4.
- ✓ Los miembros proapoptóticos (Bim/Bod, Bid, Bad, Bmf, Bik/Nbk, Blk, Noxa, Puma/Bbc3 y Hrk/DP5) que sólo presentan el dominio BH3 (*BH3-only*).

La mayoría de ellos presentan un dominio C-terminal que les permite asociarse con membranas. La heterodimerización de las proteínas de la familia Bcl-2 parece ser crucial en la regulación de la permeabilización mitocondrial. Datos estructurales muestran como las proteínas antiapoptóticas presentan un surco hidrofóbico en su superficie que sería el sitio de unión para el dominio BH3 de los miembros proapoptóticos (Petros et al., 2004).

La teoría de permeabilización se basa en modelos tridimensionales de proteínas que revelaron similitudes estructurales entre Bcl-xL y los dominios capaces de formar poros en la membrana de la toxina diftérica y de las colicinas bacterianas (Muchmore et al., 1996). Una estructura muy similar ha sido descrita recientemente para Bax (Suzuki et al., 2000) y posiblemente también se encuentre en Bcl-2 y Bak. Bid también presenta una estructura tridimensional muy similar a Bcl-xL, aunque corresponda sólo a su dominio BH3 (McDonnell et al., 1999). De forma parecida a como lo hacen distintas toxinas bacterianas, distintos miembros de la familia Bcl-2 (incluidos Bcl-xL, Bcl-2, Bax y Bid truncado) forman canales funcionales de iones, siendo voltaje y pH dependientes, además de poco selectivos. La adición de Bax o Bak a Bid truncado (tBid, la forma activa de esta proteína), directamente en mitocondria aislada, permeabiliza la MME sin variar la estructura, potencial de membrana ni el consumo de oxígeno de la misma (von Ahsen et al., 2000). Las proteínas proapoptóticas Bax o Bak sufren un cambio conformacional, de manera que su extremo N-terminal queda expuesto. Bax,

que normalmente se encuentra en el citosol o débilmente unido a la mitocondria, se transloca a este orgánulo, oligomeriza y se inserta en la MME provocando la permeabilización. Estos eventos pueden ser activados por tBID e inhibidos por Bcl-2 y Bcl-xL (Martinou and Green, 2001).

Algunas de las proteínas que salen del espacio intermembrana al citosol durante el proceso de apoptosis tienen un alto peso molecular, con lo que resulta difícil comprender cómo una sola proteína puede provocar la salida de otra como Smac/DIABLO (24 kD), por ejemplo. La respuesta radica en la capacidad de Bax para formar oligómeros. En liposomas, un tetrámero de Bax puede formar un diámetro de poro de 22 Å capaz de liberar citocromo c. La formación de estos poros oligoméricos provocarían la liberación de factores proapoptóticos que llevarían a la muerte celular (Korsmeyer et al., 2000).

3.3.2 Permeabilidad mitocondrial transitoria

El otro modelo para explicar la permeabilidad mitocondrial aboga por la formación de un poro multiproteico que comprende el canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC), el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) y la ciclofilina D, además de otras proteínas, que actúan en los sitios de unión de la MME y la MMI (**Esquema 10b**) (Zamzami and Kroemer, 2001). Experimentos *in vitro* muestran como la permeabilidad mitocondrial transitoria (PMT) ocurre bajo condiciones de estrés oxidativo, altas concentraciones de calcio o isquemia/reperfusión, permitiendo que solutos de bajo peso molecular (hasta 1500 D) puedan atravesar la MMI (Martinou and Green, 2001). La apertura de este canal no específico, permite el equilibrio entre los iones de la matriz y del espacio intermembrana, disipando el gradiente de protones y desacoplando la cadena respiratoria. Además se produce un hinchamiento mitocondrial (dada la hiperosmolaridad de la matriz), el desplegamiento de la MMI (de mayor superficie que la MME a causa de sus crestas); que llevaría en último término a la ruptura de la MME y a la liberación masiva de proteínas solubles y demás factores apoptogénicos al citosol (Green and Evan, 2002) (**Esquema 10b**).

Distintos autores apuntan a que en este proceso se verían nuevamente implicadas proteínas de la familia Bcl-2, interaccionando por ejemplo con ANT o VDAC; regulando la permeabilización mitocondrial (activándola o inhibiéndola) (Zamzami and Kroemer, 2001).

✓ ANT

El translocador de nucleótidos de adenina es un transportador anclado en la MMI que intercambia ADP/ATP, y por tanto es esencial para mantener la carga energética del citosol. Presenta dos estados que le permiten realizar dicho transporte: el estado m, en que la proteína está orientada hacia la matriz mitocondrial, y el estado c, orientada hacia el citosol. Los ligandos que se unen al ANT en el estado m inhiben el PMT (ácido bongkreico), mientras que los que lo hacen en el estado c lo inducen (atractilósido) (Halestrap and Davidson, 1990). Pero ANT por si mismo se muestra incapaz de formar un poro de PMT, ya que requiere de la colaboración de otros componentes. En liposomas reconstituídos se ha observado como ANT interacciona con Bax para formar un canal, y como la adición de Bcl-2 lo previene (Marzo et al., 1998).

✓ VDAC

El canal aniónico dependiente de voltaje, VDAC, es la proteína más abundante de la MME, y permite el paso de solutos de hasta 5kDa de peso molecular hacia los sistemas de transporte específicos de la MMI. La formación de los complejos VDAC/ANT mantienen los puntos de unión entre la membrana mitocondrial interna y externa, y son imprescindibles para un metabolismo energético celular eficaz. Este complejo es capaz de reclutar toda una serie de quinasas (hexoquinasa, glicerol quinasa, creatina quinasa) acoplando el uso del ATP en el citosol, con su transporte desde la matriz mitocondrial.

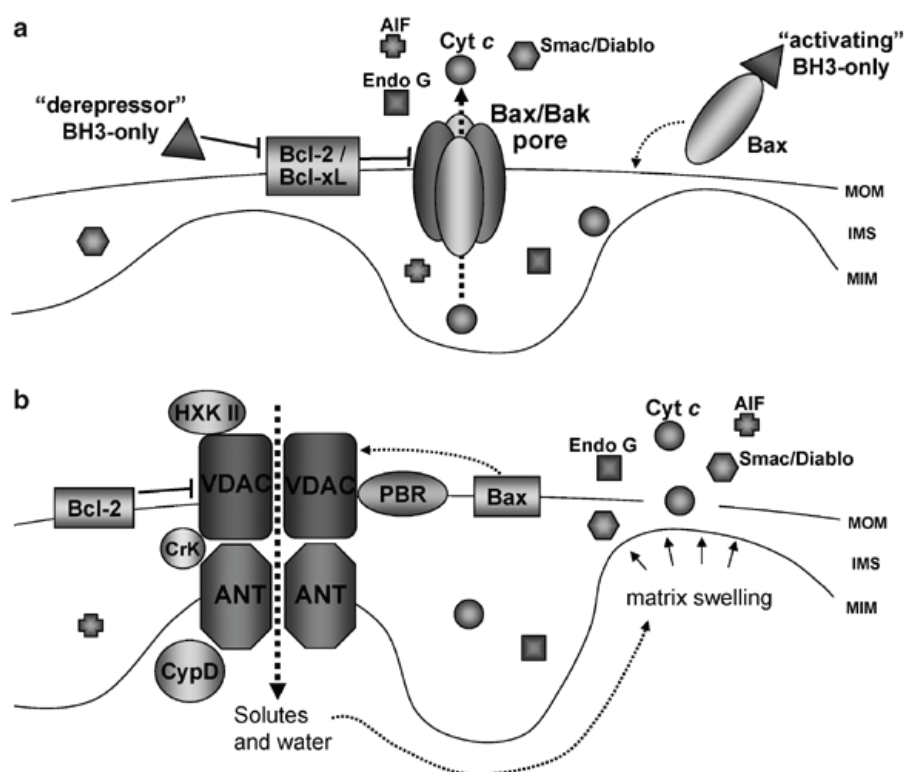
Ensayos de reconstrucción y permeabilización de VDAC en liposomas (Shimizu et al., 1999), muestran la participación de distintos complejos en el desarrollo del poro de PMT, así como su interacción con Bax permitiendo la salida de citocromo c (Shimizu et al., 2000a), mientras que con Bcl-2 se inhibiría el proceso (Shimizu et al., 2000b). Pero estudios recientes con mutantes deficientes en las distintas isoformas de VDAC (VDAC1 y VDAC2) han cuestionado la relevancia de VDAC en la muerte apoptótica (Baines et al., 2007).

✓ **PBR**

El receptor de benzodiazepinas periférico se encuentra en la membrana mitocondrial externa, y se encarga del transporte de colesterol de la membrana externa a la interna, de la regulación de la síntesis de esteroides, y del transporte de porfirinas (Castedo et al., 2002). La sobreexpresión celular de PBR y el uso de sus ligandos farmacológicos demuestran su papel regulador en la apoptosis, aunque se desconoce su mecanismo de acción (Casellas et al., 2002); que podría implicar su interacción directa con VDAC.

✓ **Ciclofilina D**

La ciclofilina D (CyP-D) es una chaperona con actividad peptidil-prolil-cis-trans isomerasa que está localizada en la matriz mitocondrial. La función celular de la CyP-D es controvertida, pero su actividad catalítica la involucra en el plegamiento y cambio conformacional de ciertas proteínas mitocondriales (Matouschek et al., 1995). Mediante estudios de afinidad se descubrió que formaba un complejo multiproteico con VDAC y ANT. La reconstrucción del complejo VDAC-ANT-CyP-D en liposomas reprodujo los efectos observados en mitocondria intacta durante la PMT (Crompton et al., 1998). Se ha observado que la ciclosporina A (CsA) inhibe la apertura del poro al unirse al centro activo de la CyP-D, bloqueando así su interacción con ANT. También se ha observado que células que sobreexpresan la CyP-D son menos sensibles al daño mediado por el estrés oxidativo, manteniendo la funcionalidad mitocondrial (Lin and Lechleiter, 2002), sugiriendo que la CyP-D interacciona con las proteínas del poro evitando que se produzcan modificaciones en sus componentes debido a la acción de los radicales libres (Kim et al., 2003).



Extraído de: Fantin, V.R., and Leder, P. (2006). Mitochondriotoxic compounds for cancer therapy. *Oncogene* 25, 4787-4797.

Esquema 10. Dos modelos de permeabilización mitocondrial.

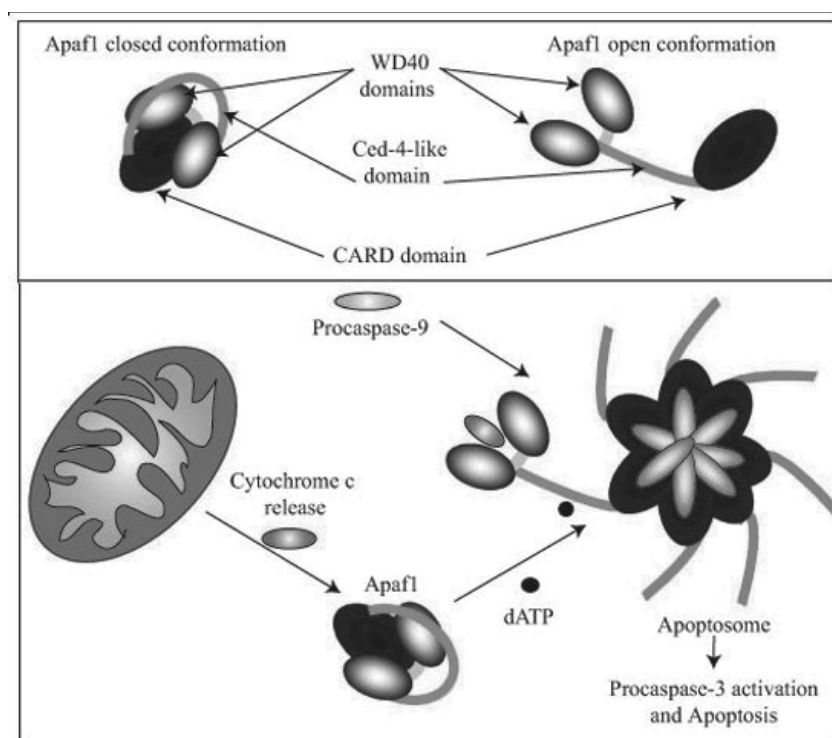
3.4 Liberación de proteínas

Si el proceso de permeabilización mitocondrial es general, la vía glicolítica está comprometida, los niveles de ATP celular disminuyen y esto provoca la muerte necrótica (Malhi et al., 2006). En cambio, si el proceso progresa de manera más lenta donde la glicólisis sea capaz de mantener los niveles de ATP, se produce un colapso del potencial de membrana, hinchamiento mitocondrial, permeabilización o ruptura de la membrana externa y la liberación no regulada de las proteínas solubles del espacio intermembrana mitocondrial, dando lugar a la muerte apoptótica (**Esquema 12**) (Newmeyer and Ferguson-Miller, 2003). Entre estas proteínas encontramos:

- ✓ Citocromo c de 14 kD (Liu et al., 1996).
- ✓ Smac/DIABLO de 24 kD (Green and Evan, 2002).
- ✓ Factor inductor de apoptosis o AIF de 53 kD (Susin et al., 1999b).
- ✓ Omi/HtrA2 de 39 kD (Yang et al., 2003).

- ✓ Caspasas mitocondriales de tamaño aproximado 50 kD (Susin et al., 1999a).

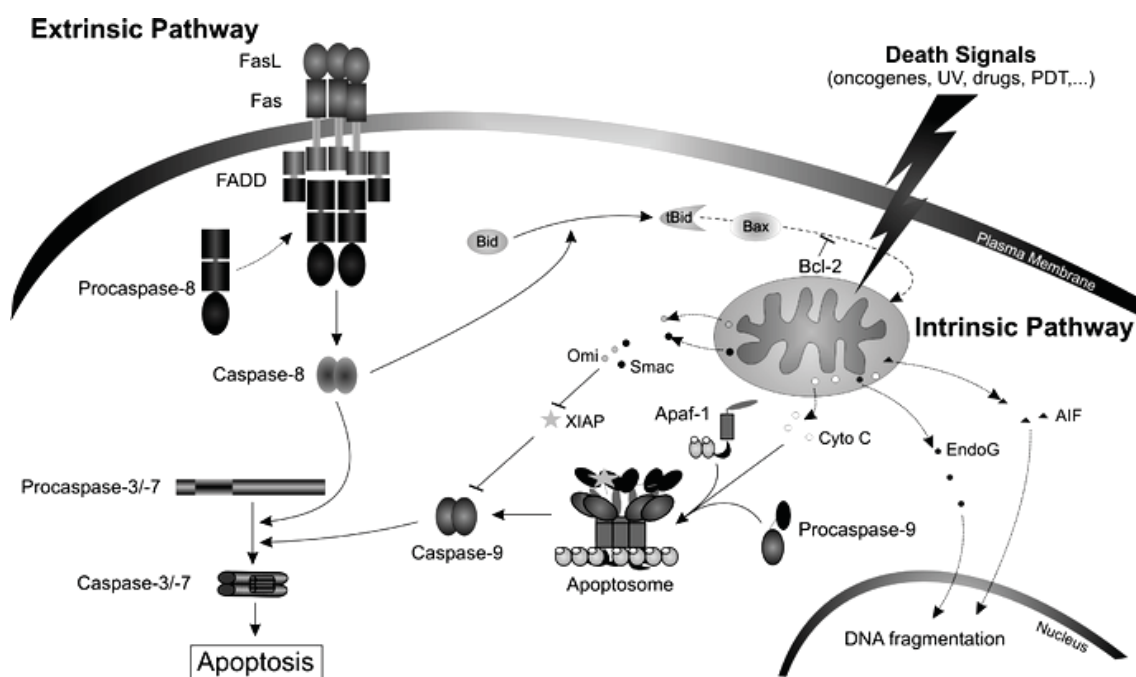
Una vez liberadas estas proteínas al citosol, el **citocromo c** se une a Apaf-1 provocándole un cambio conformacional. Apaf-1 posee los llamados dominios WD40, en el extremo C-terminal, que en condiciones de inactividad secuestran a CARD (dominio de reclutamiento de caspasas) (**Esquema 11**). La unión de citocromo c a Apaf-1, provoca la liberación de este dominio que le permite unirse a la procaspasa 9, y en presencia de dATP/ATP se produce su oligomerización y la formación del complejo apoptosoma (Adrain and Martin, 2001). Tiene lugar entonces el procesamiento y liberación de la caspasa 9, que activa otras caspasas efectoras, como la caspasa 3, 6 y 7 (Rodríguez and Lazebnik, 1999). La actividad proteolítica de estas proteínas es la responsable de la muerte celular. El ATP es esencial para la formación del apoptosoma; en caso de una disminución en sus niveles, la muerte sería necrótica y no apoptótica (Chautan et al., 1999).



Extraído de: Ferraro, E., Corvaro, M., and Cecconi, F. (2003). Physiological and pathological roles of Apaf1 and the apoptosome. *J Cell Mol Med* 7, 21-34.

Esquema 11. Formación del apoptosoma

Las proteínas inhibidoras de caspasas o IAPs evitan la muerte celular al unirse a las caspasas-3 y 7, y la procaspasa 9 (Deveraux and Reed, 1999). A su vez las IAPs están reguladas por Smac/DIABLO y Omi/HtrA2, que interaccionan con su dominio BIR e impiden su acción, facilitando la activación de las caspasas efectoras por parte del apoptosoma (Chai et al., 2000). AIF se transloca al núcleo, estimulando (de forma independiente de ATP y caspasas) la degradación del DNA en fragmentos de aproximadamente 50 kb y la condensación de la cromatina.



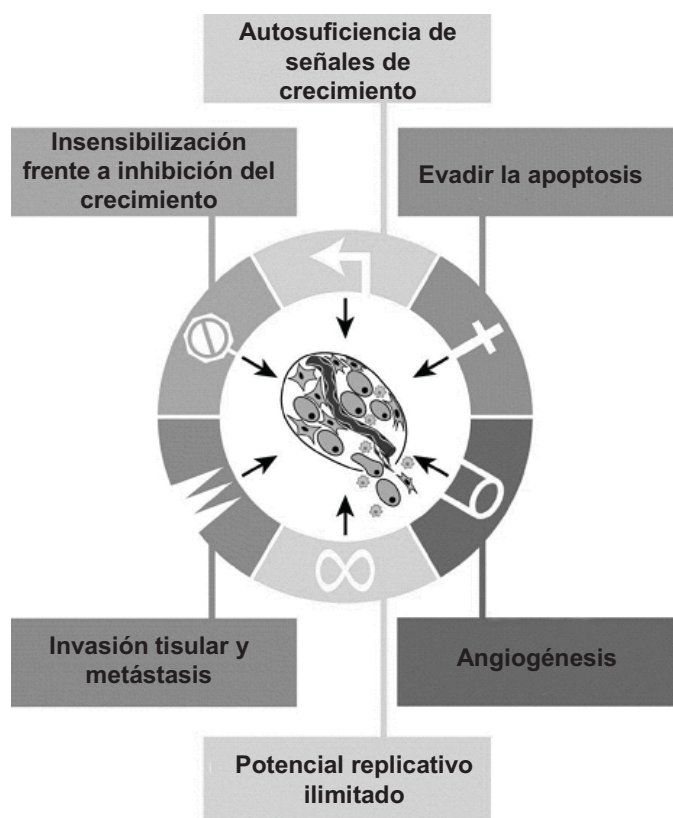
Extraído de: Agostinis, P., Buytaert, E., Breysens, H., and Hendrickx, N. (2004). Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem Photobiol Sci* 3, 721-729.

Esquema 12. Esquema de la apoptosis

4 Cáncer

En medicina, el término cáncer se usa para identificar una entidad clínica de carácter maligno que afecta a un paciente, y cuyas características son la alteración morfológica y funcional seguida de una proliferación descontrolada —no siempre acelerada— de las células de un tejido que invaden, desplazan y destruyen, localmente o a distancia, otros tejidos sanos del organismo (Gupta and Massague, 2006). En otras palabras, cáncer es el término que define a un grupo de enfermedades con un denominador común: la transformación de una célula normal en otra que se comporta de forma peligrosa para el organismo. Hay muchos tipos de cáncer y cada uno tiene sus propias particularidades, aunque existan algunos elementos comunes.

En el proceso de tumorigénesis se tienen que dar seis alteraciones esenciales de la fisiología celular para que colectivamente lleven a la transformación maligna (**Esquema 13**) (Hanahan and Weinberg, 2000): autosuficiencia en cuanto a señales de crecimiento, insensibilidad frente a las señales inhibitoras de crecimiento, evasión de la muerte celular programada (apoptosis), potencial ilimitado de replicación, angiogénesis mantenida e invasión tisular (metástasis). De hecho, las observaciones realizadas tanto en tumores humanos como en modelos animales evidencian que la progresión tumoral sigue patrones parecidos a los descritos por Darwin en su teoría de la evolución (Hanahan and Weinberg, 2000). A través de una sucesión de cambios genéticos, las células van adquiriendo características que favorecen su crecimiento atípico, convirtiéndose progresivamente en células cancerígenas. En este proceso, la evasión de la apoptosis es uno de los puntos claves para el desarrollo de la mayoría, si no todos, los tipos de cáncer (Green and Evan, 2002; Hanahan and Weinberg, 2000).



Extraído de: Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Esquema 13. Principales causas de iniciación y progresión tumoral.

En distintos estudios, se evidencia como las mitocondrias se hallan profundamente alteradas en células transformadas. Se han observado cambios en la fosforilación oxidativa, en su número y distribución, en su metabolismo, en la permeabilización mitocondrial...

4.1 Carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma

El **carcinoma hepatocelular** (CHC) es la tercera causa mundial de mortalidad por cáncer y la tasa de supervivencia es escasa para los pacientes con la enfermedad avanzada. Es uno de los tumores más comunes en muchas partes del mundo, y su incidencia sigue aumentando con la propagación de los virus de la hepatitis B y C, y con el aumento de los casos de cirrosis hepática (Blum, 2005).

Normalmente la enfermedad parte de un historial clínico de inflamación crónica y suele presentar una alta resistencia a la terapia actual (Motola-Kuba et al., 2006; Okuda, 2000). La cirrosis suele preceder al carcinoma, pero no siempre, y generalmente es

secundaria a la infección por virus de hepatitis B (VHB) o C (VHC). En el caso de una infección crónica por VHB, el virus se puede integrar en el ADN de la célula huésped y transactivar oncogenes mediante la proteína Hbx o una proteína derivada de la región preS2/S, originando el cáncer. El VHC se considera en España el factor subyacente más frecuentemente detectado en pacientes con CHC sobre hígados cirróticos, y normalmente está asociado a la coinfección con el VHB y el consumo de alcohol. Hay otros factores que pueden desencadenar CHC como la hemocromatosis, trastornos metabólicos (glucogenosis tipo Y, tirosinemia, porfiria...), la aflatoxina B1, disolventes orgánicos y algunas drogas.

Ocurre en células hepáticas adultas y se caracteriza por una dura protuberancia debajo la caja torácica (debido a la hinchazón del hígado), dolores localizados en la parte superior del abdomen y una coloración amarillenta de la piel. Normalmente se acompañan de un aumento de los niveles en sangre de la alfa-fetoproteína (AFP) y de la fosfatasa alcalina; así como de una rápida deterioración de la función hepática. Puede dar lugar a múltiples fenómenos como eritrocitosis, hipercalcemia, hipoglucemia, hiperlipidemia, porfiria y disfrinogenemia.

El pronóstico no es bueno y los pacientes que se diagnostican con clínica habitualmente mueren en los primeros 6 meses si no se puede administrar ningún tratamiento. Su detección se puede hacer por ecografía, laparoscopia y por tomografía computada helicoidal usando contraste intrarterial, aunque debe hacerse una biopsia para confirmarlo. El principal indicador del riesgo para realizar una resección es la clasificación Child (A, B o C) que depende de: la cantidad de parénquima hepático resecado, el aclaramiento del verde de indocianina y la edad del paciente (Blum, 2005).

El tratamiento curativo es la excisión quirúrgica cuando el paciente no es cirrótico (Child A). Aunque la alcoholización, la criocirugía y la radiofrecuencia pueden ser curativas en tumores pequeños (menores de 3 cm), cuando no se puede hacer la resección. El trasplante es otra alternativa para estos pacientes cuando el tumor es irresecable (Child B o C); si es menor de 5 cm (o si hay tres menores de 3 cm) y no ha habido extensión a otros tejidos. El mejor tratamiento no quirúrgico (paliativo) es la embolización intraarterial con alcohol o el uso de quimioterapéuticos, que consigue reducir el tamaño del tumor y aumentar la supervivencia. La radioterapia no es útil para el CHC y la quimioterapia sistémica es poco efectiva.

El **hepatoblastoma** es un tumor cuya incidencia es mayor en niños por debajo de 4 años de edad, con un predominio en varones, y no se conoce un factor de riesgo asociado. Se presenta habitualmente como hepatomegalia, pero puede tener manifestaciones sistémicas. Se detecta fácilmente porque muestra niveles de alfafetoproteína muy elevados. Suelen ser tumores solitarios que se pueden resear obteniendo una supervivencia a los cinco años superior al 50%.

4.2 Adaptación tumoral: papel del colesterol

Las células tumorales presentan distintas alteraciones en su maquinaria celular (**Esquema 14**). Esas alteraciones pueden ser muy diversas, así como las mutaciones que las provocan. Pero hay un elemento común en todos los tipos de cáncer: una modificación clara del metabolismo energético y en la apoptosis. Y, como se ha explicado en el apartado anterior, esto implica directamente a la mitocondria.

4.2.1 Metabolismo

La mayoría de tumores presentan una mayor tasa de glicólisis. De hecho, un aumento en la glicólisis se relaciona con un mayor grado de desdiferenciación. Se ha observado que sólo un 10 % del piruvato proveniente de esta vía metabólica entra en la mitocondria (Greenhouse and Lehninger, 1977), siendo el resto reducido a lactato (fermentación láctica) aún teniendo niveles normales de oxígeno. Este fenómeno, llamado glicólisis aeróbica, fue descrito por primera vez en 1956 por Otto Warburg. Entonces ya postuló que las células cancerígenas presentaban un metabolismo mitocondrial claramente alterado. A pesar de que este hecho no es la causa fundamental del cáncer, si que le confiere ventajas para su crecimiento. Por ejemplo, permite la adaptación de las células tumorales a condiciones de hipoxia, cuando al irse multiplicando se alejan del vaso sanguíneo. Por otra parte, el fenotipo glicolítico contribuye, por la producción de lactato, a la acidificación del microentorno, facilitando la invasión tumoral (Alirol and Martinou, 2006).

Corroborando estos estudios, algunos grupos han relacionado la malignidad del tumor con una baja actividad de la cadena respiratoria, del ciclo de krebs y de ciertos enzimas mitocondriales (succinato deshidrogenasa, fumarato hidratasa...). El citrato en estas células es preferentemente expulsado desde la mitocondria hacia el citosol, donde es

usado para aumentar la tasa sintética de colesterol. Y, junto con el acetil-CoA y el piruvato acumulados en el citosol, se lleva a cabo la oxidación de la glutamina (principal sustrato de las células tumorales glicolíticas) a través de un anormal ciclo de Krebs (Moreadith and Lehninger, 1984). Otras alteraciones metabólicas se han observado en enzimas como la hexoquinasa (Arora and Pedersen, 1988), unida a la MME, que consigue alimentar de forma continua al tumor mediante la rápida fosforilación de la glucosa, impidiendo que vuelva a salir de la célula. Todo esto lleva a una mayor producción de ATP, empleada principalmente para la división celular.

A pesar de que la mitocondria presenta niveles bajos de colesterol, se ha observado que en las células tumorales está incrementado, y que hay una correlación directa con su grado de malignidad (Baggetto et al., 1992; Campbell et al., 2002; Coleman, 1986; Feo et al., 1973). Los tumores presentan una pérdida en el control (feedback) del enzima responsable de la etapa limitante de la vía de síntesis: la hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa) (Horton et al., 1972; Siperstein, 1995; Tatsuta et al., 1998). Como consecuencia el colesterol se va acumulando en las membranas celulares; y, aunque el propio colesterol inhibe a dicho enzima, esto no impide, sin embargo, su incremento en la mayoría de tumores. Por otra parte, está regulado transcripcionalmente por la SREBP-2, que sufre una maduración proteolítica en el RE, que en los tumores se puede dar en respuesta al estrés en este orgánulo (Soccio and Breslow, 2004). Además, se han observado elevados niveles de mevalonato (producto del HMG-CoA reductasa) en células malignas, y se ha observado como tratamientos con dicho metabolito, promueven un crecimiento tumoral *in vivo* y estimulan la proliferación del cáncer de mama (Duncan et al., 2004). Aunque se conocen vagamente los mecanismos por los cuales las mitocondrias de las células tumorales se cargan de colesterol, se ha descrito la participación de la proteína StAR en el tráfico intermembrana de la línea celular humana HepG2 (Hall et al., 2005).

En condiciones fisiológicas, el colesterol está finamente regulado en las membranas celulares, ya que modula su estructura y funciones. Parece inverosímil, pues, que su acumulación en la mayoría de tumores estudiados sea una característica meramente fortuita. Todos los estudios realizados en esta dirección parecen indicar que estos mayores niveles observados implicarían cambios en las propiedades fisicoquímicas de sus membranas que podrían conferirles ventajas para su supervivencia y capacidades proliferativas. Por ejemplo, las proteínas señalizadoras asociadas a la membrana

plasmática, dependen de la fluidez y organización de ésta para poder realizar su función (Simons and Ehehalt, 2002); y el colesterol impediría su funcionamiento normal. Así pues, se ha observado como Akt, proteína involucrada en vías señalizadoras que promueven crecimiento y supervivencia, está activada en distintos tumores sólidos a causa de un incremento en el número de balsas lipídicas (*lipid rafts*) ricas en colesterol (Li et al., 2006; Zhuang et al., 2005), favoreciendo la activación de la vía.

En el caso concreto de la mitocondria, esta carga anormal de colesterol afecta a la función de sus proteínas integrales de membrana (Colell et al., 1997; Coll et al., 2003; Gimpl et al., 1997; Rogers et al., 1980; Rouslin et al., 1982; Van Blitterswijk et al., 1981) promoviendo la disfunción mitocondrial y la inhibición de la fosforilación oxidativa (Baggetto et al., 1992; Feo et al., 1973; Morton et al., 1976).

4.2.2 Apoptosis

Una de las principales características de las células tumorales es su capacidad para evadir la apoptosis. Estudios con ratones transgénicos, cultivos celulares, o biopsias de pacientes, corroboran esta propiedad en la mayoría de tipos de cáncer.

La maquinaria apoptótica se puede dividir en dos grandes grupos de proteínas: los sensores y los efectores (Alirol and Martinou, 2006). Los sensores son los responsables de controlar que tanto el entorno intracelular como el extracelular presenten condiciones de normalidad. Cuando detectan anormalidad, activan las vías de señalización pertinentes para que la célula muera. Entre estos centinelas se incluyen los receptores de membrana que unen tanto factores de supervivencia como de muerte celular. Por ejemplo, los receptores de señales de supervivencia como IGF-1R, IL-3R, o de muerte, como FAS, TNF-1R... Los sensores intracelulares monitorizan el bienestar de la célula y activa vías de muerte cuando se detectan anormalidades (daño en el ADN, activación de oncogenes, insuficiencia de factores de supervivencia, hipoxia...). Muchas de estas señales que promueven la apoptosis convergen en la mitocondria, que responde liberando citocromo c, y otras factores proapoptóticos. En este proceso, las proteínas de la familia Bcl-2 juegan un papel determinante.

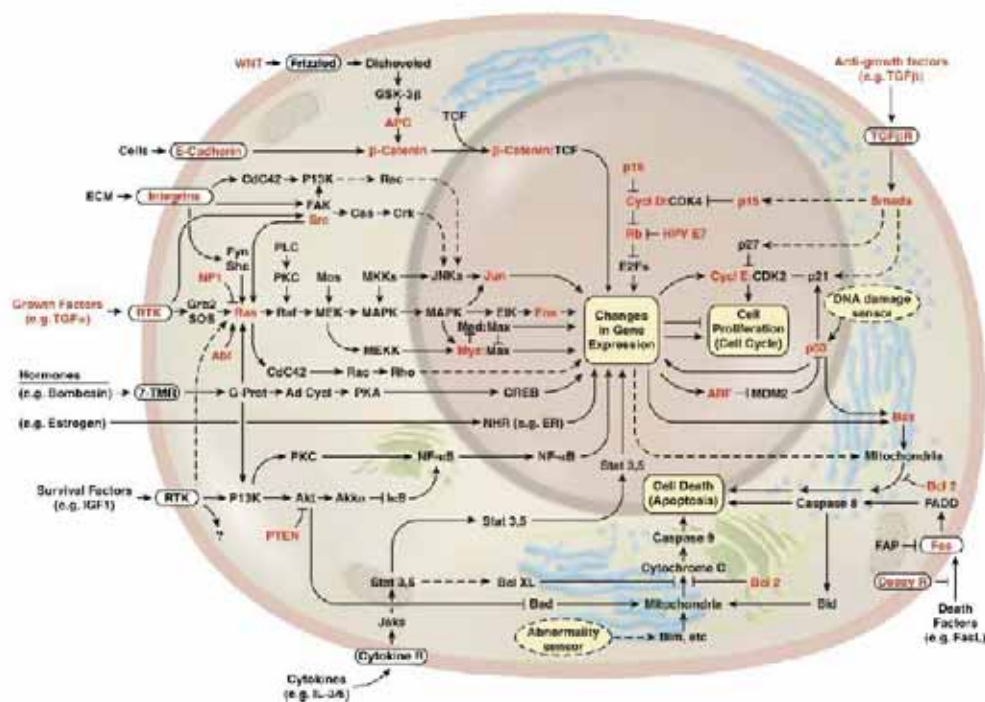
Los efectores incluyen un importante número de proteasas intracelulares llamadas caspasas. Existen caspasas iniciadoras, las caspasas 8 y 9, que son activadas por el receptor de muerte o por la presencia de citocromo c en el citosol, respectivamente. Éstas actúan como gatillo, activando más de una docena de caspasas efectoras que

ejecutan el programa de muerte celular, destruyendo estructuras, orgánulos subcelulares, y finalmente el genoma.

En el caso del cáncer, se han observado múltiples alteraciones en los reguladores apoptóticos pertenecientes a la vía extrínseca, pero sobretodo a la intrínseca (mitocondrial), que confieren ventajas proliferativas y de crecimiento. Se han descrito, por ejemplo, líneas tumorales que carecen de Apaf-1 (Liu et al., 2002; Soengas et al., 2001; Wolf et al., 2001) o de caspasas (Devarajan et al., 2002); o que presentan mayores niveles de proteínas inhibitoras de apoptosis (IAPs) (Ferreira et al., 2001; Krajewska et al., 2003; Tamm et al., 2000), de Bcl-2 (Vaux et al., 1988) o c-myc (McDonnell and Korsmeyer, 1991), entre otras. Se han observado, a su vez, alteraciones en los sensores intracelulares más importantes, como la proteína del retinoblastoma (pRB) y p53, que han sido muy estudiadas mediante modelos de ratones transgénicos, por su implicación en la proliferación de tumores. La proteína p53, por ejemplo, es un sensor de daño en el ADN que activa la expresión de Bax, miembro proapoptótico de la familia Bcl-2, que a su vez actúa permeabilizando a la mitocondria y liberando distintas proteínas efectoras de la apoptosis como citocromo c. Del mismo modo cuando la célula detecta anomalías como hipoxia o hiperexpresión de oncogenes, activa la vía apoptótica a través de p53. No es extraño pues, que más de la mitad de los casos de cáncer en humanos presenten mutaciones en este gen.

Paralelamente, la vía de PI3 quinasa-Akt, que transmite señales antiapoptóticas, también se ha descrito que está involucrada en muchos tumores humanos. El circuito de señalización de supervivencia puede activarse por factores extracelulares como IGF-1/2 o IL-3, por factores intracelulares controlados por la proteína Ras, o por la pérdida del supresor tumoral PTEN (que inhibe a Akt). Más recientemente, también se han observado disfunciones del receptor FAS en un gran número de carcinomas.

Todas estas alteraciones, y muchas otras, permiten que las células tumorales sobrevivan, evadiendo al sistema inmune, e insensibilizándose frente a radiación y quimioterapia (Hanahan and Weinberg, 2000).



Extraído de: Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Esquema 14. Alteraciones observadas en células tumorales.

4.3 Quimioterapia

El objetivo de la quimioterapia es destruir las células tumorales con el fin de lograr reducir la enfermedad, empleando una gran variedad de fármacos, denominados antineoplásicos o quimioterapéuticos. Normalmente, las células que componen los distintos órganos se dividen de manera ordenada con el fin de reemplazar a las células viejas. Esta división está estrictamente regulada por unos mecanismos de control. Sin embargo, los tumores malignos se caracterizan por estar formados por células cuyos mecanismos reguladores de la división están alterados. Durante la división, la célula es más frágil a cualquier modificación que pudiera surgir en su entorno. En líneas generales, los distintos fármacos empleados en quimioterapia, actúan sobre diferentes fases del ciclo celular, alterando la división de las células tumorales e impidiendo su multiplicación. Con el tiempo esto se traduce en una disminución o desaparición del tumor maligno. Algunos de los quimioterapéuticos más usados son:

- ✓ **Agentes alquilantes:** son fármacos que funcionan atacando directamente el DNA y activando p53 (e.g. cisplatino). Estos medicamentos pueden operar en cualquier momento del ciclo celular. Sin embargo, son más eficaces durante la síntesis de ADN. .
- ✓ **Antimetabolitos:** Bloquean el crecimiento celular al interferir con la síntesis de ADN, eliminando la acción de una molécula indispensable para su replicación (e.g. mercaptopurina).
- ✓ **Alcaloides de la vinca:** familia de compuestos que se unen a la tubulina, desestabilizan a los microtúbulos e impiden la división celular (e.g. vinblastina).

Estos fármacos llegan a prácticamente todos los tejidos del organismo y ahí es donde ejercen su acción, tanto sobre las células malignas como las sanas, pues suelen tener una baja especificidad. Algunas poblaciones celulares sanas presentan una alta tasa de proliferación y son por ello las más sensibles a estos tratamientos. Debido a la acción de los fármacos sobre éstas últimas, pueden aparecer efectos secundarios más o menos intensos y generalmente transitorios. Algunos de los más comunes son: caída del cabello, hemorragias, vómitos, anemia, inmunodepresión...

4.3.1 Terapias inductoras de PMT y muerte celular

Como se ha comentado anteriormente, las células tumorales deben evadir la apoptosis para poder progresar. Por ello, actualmente se están probando fármacos que activan procesos apoptóticos en células neoplásicas, mediante la inducción de la permeabilización mitocondrial transitoria (PMT). En general, estas células presentan potenciales de membrana, tanto plasmática como mitocondrial, mayores (Davis et al., 1985). Como consecuencia, compuestos catiónicos lipófilos tienden a acumularse en la matriz mitocondrial. Un ejemplo lo encontramos en la molécula MKT-077, un derivado de la rodacianina, que mata selectivamente células malignas porque inhibe la respiración mitocondrial (Modica-Napolitano et al., 1996), y que ha sido probado en estudios clínicos de fase I. Un paso por delante, la terapia fotodinámica aprovecha este tipo de compuestos (rodamina-1,2,3, porfirinas catiónicas...) para provocar la formación de radicales libres selectivamente en los tumores por irradiación en presencia de oxígeno (Morgan and Oseroff, 2001).

Otras moléculas tóxicas para la mitocondria, como el trióxido de arsénico (ATO), que actúa por producción directa de ROS en este orgánulo, se han usado para tratar algunos tipos de leucemias (Zhang et al., 2001). También se ha probado combinado con otros compuestos como el ácido ascórbico. La lonidamina (Lnd) induce la formación del PMT por acción directa sobre ANT (Belzacq et al., 2001), y se ha mostrado segura y efectiva para el tratamiento de tumores sólidos. El ácido betulínico (un triterpenoide pentacíclico) también actúa induciendo la formación del PMT y se ha comprobado su eficiencia para tratar tumores malignos de cabeza y cuello (Thurnher et al., 2003). Este compuesto, además, coopera con TRAIL promoviendo la apoptosis en diferentes líneas celulares y en cultivos primarios tumorales, sin afectar a fibroblastos humanos normales (Fulda et al., 2004). Existen estudios en los que se utilizan ligandos del PBR, PK11195 y ROS-4864, los cuales regulan la PMT, sensibilizando a las células tumorales a etopósido, doxorubicina y radiación γ (Banker et al., 2002; Decaudin et al., 2002; Hirsch et al., 1998).

En estudios recientes, se ha visto que Bcl-2, entre otras proteínas antiapoptóticas, está sobreexpresadas en muchos tipos de tumores, haciéndolos resistentes a la mayoría de agentes quimioterapéuticos. Esto puede ser debido en parte a un estrés oncogénico constante, que provocaría una expresión constitutiva de Bax, Bak y/o Bim, que deben ser contrarrestados con una sobreexpresión de Bcl-2 (Egle et al., 2004). Este hecho ha promovido un interés creciente para desarrollar moléculas pequeñas y péptidos que mimetizan a proteínas proapoptóticas con el dominio BH3, con el fin de anular a Bcl-2. Uno de los mejores ejemplos es el compuesto no-peptídico HA14-1, que se identificó mediante estudios estructurales tridimensionales (Wang et al., 2000) y que se une al dominio BH3 de Bcl-2, induciendo apoptosis en células tumorales. La antimicina A (aunque se describió como inhibidor del complejo III de la cadena respiratoria) y los inhibidores conocidos como BH3Is, actúan de la misma manera que HA14-1, induciendo apoptosis en células que sobreexpresan tanto Bcl-2 como Bcl-x_L. En esta línea, recientemente se ha descubierto el fármaco ABT-737, con un mecanismo de acción similar al descrito, pero con una mayor afinidad por las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (Oltersdorf et al., 2005). Este compuesto sensibiliza a las células tumorales frente a otros estímulos, pero también es capaz, por sí sólo, de actuar contra linfomas y carcinomas de pulmón.

En cuanto a péptidos BH3-miméticos, se han descrito algunos que antagonizan Bcl-x_L, sensibilizando las células al tratamiento anti-Fas (Holinger et al., 1999); o que tienen

una estructura muy similar a Bid, pero con las modificaciones justas para evitar su degradación intracelular (Walensky et al., 2004). Otras proteínas como Nur77 inducen apoptosis por su unión a otro dominio de Bcl-2 (Lin et al., 2004).

También se han probado oligonucleótidos antisentido para inhibir Bcl-2, y, aunque se ha visto que presentan cierta toxicidad para los pacientes, se muestran muy efectivos con bajas dosis al combinarlos con otros quimioterapéuticos (Chi et al., 2001).

Como se puede constatar, cada vez hay más estudios en que se apunta a la mitocondria, o más bien, a alteraciones mitocondriales, para explicar la resistencia de ciertos tipos de cáncer a la quimioterapia y a otros tratamientos tradicionales, diseñándose terapias antineoplásicas que tiendan a intentar revertir estas alteraciones.

4.3.2 Uso de estatinas

Las estatinas son moléculas que compiten con el mevalonato por el centro activo del enzima HMG-CoA reductasa, inhibiéndolo y disminuyendo, por consiguiente, la síntesis de colesterol. Son fármacos muy seguros, con pocos efectos secundarios, y beneficiosos para la prevención de enfermedades cardiovasculares. Pero además de reducir el colesterol afectan a toda la vía del mevalonato, impidiendo la síntesis de isoprenoides. Estos compuestos suelen ser moléculas orgánicas largas e hidrofóbicas, como los grupos farnesil y geranilgeranil, que se hallan en proteínas como las de la superfamilia de Ras/Rho que están implicadas en proliferación y señalización celular. Esta unión les permite anclarse en las membranas celulares y realizar su actividad biológica. La inhibición de estas modificaciones posttraduccionales mediante estatinas tiene efectos significativos sobre el crecimiento celular *in vitro* y, como sugieren algunos estudios epidemiológicos, pueden contribuir a la prevención de ciertos tipos de cáncer, como el colorrectal y el melanoma. Sin embargo, a pesar de que se han realizado muchos estudios probando distintas estatinas sobre distintos tipos de tumores, su efectividad en pacientes aún está cuestionada.

En particular, hay pocos estudios clínicos con pacientes con carcinoma hepatocelular. El estudio realizado por Kawata y colaboradores comprendía 83 pacientes con CHC avanzado, que, de forma aleatoria, se distribuyeron en dos grupos (Kawata et al., 2001). Unos recibieron placebo y otros una dosis diaria de pravastatina de 40 mg, y todos ellos fueron sometidos a una embolización arterial transcatéter (una terapia estándar para este tipo de pacientes). Observaron como los pacientes tratados con la estatina experimentaban un incremento significativo de su esperanza de vida, que pasó de 9 a 18

meses (Kawata et al., 2001). Otro grupo alemán, sin embargo, realizó un estudio similar con 58 pacientes y, pese a ver un incremento en la supervivencia (de 3.5 a 7.2 meses), estadísticamente no resultó ser significativo (Lersch et al., 2004).

Objetivos

Distintas evidencias en la bibliografía apuntan al colesterol como uno de los componentes lipídicos celulares cuyos niveles están más alterados en la mayoría de células tumorales, y en particular, en el carcinoma hepatocelular (Feo et al., 1973). Asimismo, en el grupo habíamos demostrado previamente como el colesterol, a través de su acción sobre la fluidez de membrana, puede modular la respuesta apoptótica mitocondrial (Colell et al., 2003). Por todo ello, nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Analizar la composición lipídica (niveles de colesterol y fosfolípidos) en mitocondrias de carcinoma hepatocelular y verificar posibles diferencias con sus respectivos controles. Estudiar como los posibles cambios en la composición lipídica, y en particular en los niveles de colesterol, afectan a la fluidez de membrana, al contenido de glutatión y a la funcionalidad mitocondrial.
2. Estudiar si los niveles de colesterol regulan la permeabilización mitocondrial inducida por: estímulos proapoptóticos que inducen PMT (atractilósido, radicales libres, Ca^{2+}) y miembros de la familia de Bcl-2 (tBid, Bax); tanto en mitocondria aislada, modulando el contenido de colesterol, como en liposomas con diferentes concentraciones de colesterol.
3. Evaluar la resistencia de las líneas celulares de carcinoma hepatocelular frente a distintos quimioterapéuticos de acción mitocondrial. Estudiar si la disminución del contenido de colesterol celular, mediante la utilización de distintos inhibidores de la síntesis de colesterol, incrementa la susceptibilidad frente a los agentes quimioterapéuticos.

4. Estudiar el papel del colesterol mitocondrial en la resistencia frente a agentes quimioterapéuticos, mediante la inhibición específica del transporte de colesterol a la mitocondria.

5. Analizar *in vivo* si el tratamiento con drogas que inhiben la síntesis de colesterol combinado con la quimioterapia disminuye el crecimiento tumoral.

Materiales y métodos

1 Cultivo celular

1.1 Líneas celulares

Las líneas celulares de carcinoma hepatocelular, HepG2 (humana), y Reuber H35 (rata), se obtuvieron de la Colección Europea de Cultivos de Células Animales (ECACC, Salisbury, Wilts, UK) y se crecieron a 37°C con un 5% CO₂. Las células se cultivaron a 37°C en atmosfera al 5% de CO₂ en medio Dulbecco modificado de Eagle (DMEM) con alta concentración de glucosa (HepG2) o en medio mínimo esencial Tagle (MEM) (Reuber H35). El medio de cultivo se suplementó con: 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 2 mmol/L de L-glutamina, 1% de aminoácidos no-esenciales, penicilina (100U/mL) y estreptomycin (100µg/mL). En algunos experimentos se usó 10% de suero fetal bovino delipidizado (Slater and Robertson, 1979).

1.2 Aislamiento y cultivo de hepatocitos de rata

Esta técnica se basa en la eliminación del Ca²⁺ intrahepático mediante un agente quelante y posterior perfusión con colagenasa. Se obtiene un alto rendimiento de hepatocitos aislados, con una viabilidad de un 80-95 % y sin apenas contaminación de células no parenquimales.

Para realizar el aislamiento, todas las soluciones se gasearon con 95 % O₂ y 5 % CO₂ y se mantienen a 37 °C.

Solución A (Solución de Hanks modificada): 8.0 g NaCl, 0.4 g KCl, 0.2 g MgSO₄.7H₂O, 0.06 g NaHPO₄.2H₂O, 0.06 g KH₂PO₄, 2.19 g NaHCO₃, ajustando el pH a 7.4. Volumen final: 1 L.

Solución B: Solución A con un 0.12 % de colagenasa IV y 4 mM CaCl₂

Solución C (Solución Krebs-Henseleit): 6.9 g NaCl, 0.36 g KCl, 0.13 g KH₂PO₄, 0.295 g MgSO₄. 7 H₂O, 0.374 g CaCl₂.H₂O, 2 g NaHCO₃, ajustando el pH a 7.4. Volumen final: 1 L.

Las ratas Sprague-Dawley (225-250g) se anestesiaron con pentobarbital sódico al 5% (0.1 ml por cada 100 g de peso corporal) y la cavidad peritoneal se abrió con una incisión en la mitad del vientre. Se inyectó heparina (500 U en 0.1 ml) en la vena cava y se colocó una ligadura (sin atar) alrededor de la vena cava inferior muy cerca del hígado. Se insertó la cánula o catéter en la porta y se aseguró la cánula con la ligadura. La perfusión se inició con flujo de 10-15 ml/min *in situ* con la solución A al mismo tiempo que se cortó la vena cava inferior. Tras aproximadamente 2 minutos de perfusión con la solución de lavado A, se ligó la vena cava inferior, se cortó la vena superior y se procedió a separar el hígado de la cavidad abdominal. Una vez liberado, se sumergió el hígado en solución de digestión B y se perfundió con ésta. Se recircularizó la solución B durante aproximadamente 6 minutos. Pasado este tiempo se sustituyó por la solución C, y con una varilla, se masajeó suavemente el hígado (desde el centro hacia los extremos) hasta conseguir una completa liberación de los hepatocitos. Las células se filtraron a través de una gasa de algodón y se dejaron precipitar durante 2-3 minutos a temperatura ambiente. Para seleccionar las células viables, se lavaron con solución C (Krebs) y se centrifugaron a 700 g durante 20 segundos.

La viabilidad se determinó mediante tinción por exclusión con azul de tripan (Sigma, Cambridge, UK) al 0.2 % en tampón fosfato (PBS) y contaje con cámara de Neubauer.

Cultivo primario de hepatocitos de rata:

Los hepatocitos se sembraron en placas que contenían una base de colágeno (extraído a partir de cola de rata). El medio utilizado fue DMEM/F12 (1:1) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado, 100 U/ml penicilina, y 100 µg/ml de estreptomycin.

Tras cuatro horas en cultivo se lavaron las células con medio para eliminar las células no viables. Se añadió medio nuevo sin suero y se procedió a los correspondientes tratamientos.

2 Aislamiento mitocondrial

2.1 Hígado de rata

Partimos de 5 g de hígado de rata perfundido con solución salina, que desmenuzamos y resuspendimos en 3 volúmenes de tampón de aislamiento (220mM Manitol, 70mM

Sacarosa, 0.1 mM EDTA, 3mM Tris-HCl y 0.1 % de Albúmina sérica bovina sin ácidos grasos, ajustando el pH a 7.4). Disgregamos el tejido mediante cuatro pases a través de un homogenizador de vidrio Potter-Elvehjem acoplado a un motor. Realizamos una primera centrifugación a 700g durante 15 minutos para separar los núcleos y demás restos celulares. El sobrenadante lo centrifugamos a 10.000 g durante 15 min. para obtener el *pellet* mitocondrial por centrifugación diferencial. Lavamos 3 veces con tampón de aislamiento y resuspendimos finalmente en 2 mL de tampón (Schnaitman and Greenawalt, 1968). Puntualmente, se purificaron las mitocondrias por centrifugación rápida a través de gradiente de densidad con Percoll (Reinhart et al., 1982).

2.2 Biopsias hepáticas humanas

2.2.1 Biopsias hepáticas sanas

Se obtuvieron muestras de tejido hepático sano de hepatectomías parciales procedentes de cáncer colorrectal metastático en el hígado.

Para aislar las mitocondrias disgregamos el tejido según se ha descrito en el apartado 2.1 y centrifugamos a través de un gradiente discontinuo de Percoll (Reinhart et al., 1982). El gradiente se preparó a 4°C con cuatro fases de 52%, 42%, 31% y 19% (v/v) de Percoll en medio A (210 mM Manitol, 60 mM Sacarosa, 10 mM KCl, 10 mM Succinato sódico, 1 mM ADP, 0.25 mM Ditiotreitól y 10 mM HEPES/KOH, ajustando el pH a 7.4). El homogeneizado de hígado obtenido (2 mL de medio A por gramo de tejido y por tubo) se repartió sobre los gradientes y se centrifugó inmediatamente a 19.000 rpm (39.600g) durante 1 minuto empleando el rotor SW40Ti en una ultracentrífuga Beckman. Experimentos preliminares establecieron que para este procedimiento la banda óptima para recuperar las mitocondrias se encontraba en la interfase entre 31 y 42% de Percoll . Se recuperó dicha banda y se lavó dos veces con 35 mL de medio A, centrifugando a 10.000 g durante 10 min. El precipitado mitocondrial final se resuspendió en 0.5 mL de medio A.

2.2.2 Muestras de hepatocarcinoma humano

Las muestras de hepatocarcinomas humanos, congeladas en fresco, se obtuvieron de 6 pacientes (varones de entre 53 y 73 años). Las muestras se recogieron de una resección hepática (n=2) o de explantes de hígado cuando se realizaba un trasplante (n=4). En cuatro casos el tumor era multifocal y en dos uninodular. La enfermedad hepática subyacente fue cirrosis alcohólica en 3 casos, cirrosis inducida por el virus de la hepatitis B en dos y cirrosis inducida por el virus de la hepatitis C en uno.

Para aislar mitocondrias se homogeneizaron 0.15 g de tejido en 1 mL de medio A. Disgregamos el tejido por triplicado mediante quince pases a través de un homogenizador de vidrio Potter-Elvehjem acoplado a un motor. Se realizó una primera centrifugación de 5 min a 600 g, y se recuperó el sobrenadante, que volvimos a centrifugar 10 min a 10.300g. El pellet resultante se resuspendió en 200 μ L de medio A y se cargó sobre 2.5 mL de un gradiente continuo de Percoll al 30% en medio A. Se centrifugaron las muestras 35 min a 32.000 rpm (100.000 g) empleando un rotor SW55Ti en una ultracentrífuga Beckman. Tras la centrifugación, se observó una banda en el fondo del tubo, que se recuperó y se lavó dos veces con medio A, centrifugando a 10.000 g durante 10 min. El pellet mitocondrial se resuspendió en 0.2 mL de medio A.

2.3 Líneas celulares hepáticas

El aislamiento mitocondrial a partir de líneas celulares de CHC se realizó, por centrifugación rápida a través de un gradiente de Percoll. Partimos de 5×10^8 células que resuspendimos en 10 mL de tampón de aislamiento frío (320 mM sacarosa, 1 mM EDTA y 10mM Tris-HCl, ajustando el pH a 7.4), disgregamos con homogenizador de vidrio y centrifugamos a 1.330 g durante 5 min. para descartar restos celulares. El sobrenadante se centrifugó a 21.200 g durante 10 min. a 4°C. El *pellet* se resuspendió en 2 mL de tampón de aislamiento y se centrifugó a 4°C a 30.700 g durante 15 min. a través de un gradiente de Percoll de dos fases: 18% y 40%. Se recogió la interfase resultante y se lavó con tampón una primera vez a 16.100 g durante 10 min, y una segunda vez a 7.000 g 10 min (Bai et al., 1999).

2.4 Determinación de la pureza e integridad mitocondriales

Para comprobar tanto el enriquecimiento como el rendimiento del aislamiento mitocondrial de los distintos protocolos descritos, monitorizamos la actividad específica del enzima succinato deshidrogenasa ó SDH (Hatefi and Stiggall, 1978). La contaminación por retículo endoplasmático, membranas plasmáticas, endosomas y lisosomas la evaluamos por inmunodetección específica (*western blot*) con anticuerpos contra las proteínas PERK, Na⁺/K⁺ ATPasa α 1, Rab5A y LAMP-1, respectivamente.

3 Respiración mitocondrial

La determinación de la respiración mitocondrial se realizó mediante la monitorización del consumo de oxígeno con un oxígrafo de Wilson acoplado a un electrodo de Clark, en un cilindro de reacción termorregulado y con agitación magnética.

Se añadió 1 mg de proteína de una suspensión mitocondrial a 1.2 mL de tampón de respiración (pH =7.4):

- ✓ 225 mM Sacarosa
- ✓ 5 mM MgCl₂
- ✓ 10 mM KH₂PO₄
- ✓ 20 mM KCl
- ✓ 10 mM Tris
- ✓ 5 mM HEPES

Se midió el consumo de oxígeno tras la adicción secuencial de: succinato (17 mM), ADP (0.7 mM), oligomicina (13 μ g/mL) y m-CCCP (13 μ M). Calculamos el parámetro ACR (*Acceptor Control Ratio*) definido como el cociente entre la velocidad de consumo de oxígeno al añadir ADP, dividido por la velocidad de consumo de oxígeno sin él. Una correcta funcionalidad mitocondrial correspondería a valores de ACR superiores a 3 (Garcia-Ruiz et al., 1994).

4 Microscopía electrónica

Los precipitados (*pellets*) mitocondriales de la fracción purificada se fijaron en glutaraldehído 3% en 10 mM de tampón de fosfato (pH 7.2). Se post-fijaron en tetraóxido de osmio, se deshidrataron con etanol en pasos secuenciales con óxido de

propileno, y se engastaron en Spurr (Sigma). Finalmente, se hicieron secciones ultrafinas que se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo, y se fotografiaron con un microscopio electrónico JEOL JEM 1010.

5 Determinación de colesterol

El contenido de colesterol en la mitocondria se midió por cromatografía líquida de alta resolución ó HPLC (Duncan et al., 1979). Para determinar el colesterol total, se saponificaron entre 0.5-5 mg de proteína con KOH alcohólico a 60°C durante 30 min. Una vez enfriada la mezcla, se añadieron 10 mL de hexano y 3 mL de H₂O (calidad millipore), y se agitó para asegurar la mezcla y el contacto entre las dos fases. A continuación se recogieron alícuotas de hexano y se secaron bajo corriente de N₂ o mediante una bomba de vacío. Se resuspendió el *pellet* resultante en isopropanol y se analizó por HPLC. Para determinar el colesterol libre, las muestras se trataron de igual manera, pero sin realizar la saponificación.

El análisis con HPLC se realizó con una columna de fase reversa Waters μ Bondpak C18 10- μ m (30cm x 4 mm de diámetro interno), con una fase móvil de 2-propanol/acetonitrilo/agua (60:30:10, v/v) y un flujo constante de 1 mL/min.

6 Microscopía láser confocal

Para obtener las imágenes de microscopía confocal, hepatocitos de hígado de rata, células HepG2 y células Reuber H35 se fijaron durante 10 min con paraformaldehído 3.7% en tampón fosfato 0.1 M. Después las permeabilizamos con saponina 0.1% en un tampón PBS con 0.5% de albúmina sérica bovina durante 5 min. Incubamos las células durante una hora con un anticuerpo primario anti-citocromo c (1:200, Pharmigen), se lavaron repetidas veces con PBS y se incubaron durante 45 min con el anticuerpo secundario. En algunos casos, se añadió filipina (Norman et al., 1972) (50 μ g/mL) durante la incubación con el anticuerpo secundario. Después de algunos lavados con PBS, las células se montaron en Fluoromount-G y se observaron por el microscopio confocal escáner modelo Leica SP2 equipado con lámpara de excitación de UV, láser de argón, y un objetivo 633/1.32 OIL PH3 CS.

7 Manipulación del colesterol mitocondrial

El enriquecimiento en colesterol se realizó incubando las mitocondrias con una solución de albúmina sérica bovina (BSA) saturada en colesterol libre a temperatura ambiente durante 5 min (Martinez et al., 1988). El complejo colesterol-albúmina se preparó disolviendo 50 mg de colesterol en 50 ml de etanol, a la que se le añadió 5 ml de agua desionizada provocando que la solución tomase un aspecto lechoso, debido a la formación de cristales de colesterol. En este punto se añadieron 2 g de BSA, se ajustó el pH a 7.3 y se centrifugó durante 10 minutos a 12.000 g y 4°C. 2 μ l de colesterol-BSA se incubó con un 1mg de proteína mitocondrial durante cinco minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se diluyó 20 veces la solución mitocondrial con un tampón 0.25 M sacarosa, 1mM EDTA pH 7.3, y se precipitaron las mitocondrias que fueron lavadas tres veces para eliminar el exceso de colesterol no incorporado en la membrana mitocondrial. Se llevaron en paralelo controles donde sólo se incubaba con BSA.

La disminución de colesterol en las membranas mitocondriales de ambas líneas celulares se llevó a cabo mediante el tratamiento con una solución de Me- β -ciclodextrina 40mM con agitación suave a temperatura ambiente durante 30 min (Stuven et al., 2003), realizando 3 lavados a continuación.

8 Fluidificación de las membranas mitocondriales

El agente A₂C es un derivado del ácido graso caprílico que se intercala en la bicapa lipídica provocando su fluidificación (Kosower et al., 1977). La suspensión mitocondrial (2 mg/mL) se incubó en un medio 10 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 1 mM EDTA, a pH 7.4 con 2-(2-metoxietoxi)etil-8-(cis-2-*n*-octilciclopropil) octano (A₂C, 125 nmol/mg proteína), partiendo de una solución madre de 12 mg/mL de A₂C. La suspensión se incubó a 37°C durante 30 min y se lavó dos veces, centrifugando a 10.000 g 10 min, para eliminar el exceso de A₂C.

9 Determinación del parámetro de ordenamiento de membrana

La fluidez de las membranas mitocondriales se evaluó por anisotropía de fluorescencia mediante la tinción con 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) (Colell et al., 1997), que se incorpora cerca de la región polar de la bicapa.

La sonda DPH 20 mM en tetrahidrofurano fue diluida 100 veces en el tampón 10 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 1 mM EDTA pH 7.4 y se mantuvo en agitación en la oscuridad hasta que se obtuvo una solución homogénea (1 hora). Un volumen de esta mezcla se adicionó a 3 volúmenes de la suspensión mitocondrial (0.5 mg/ml) y se incubó en ausencia de luz durante 1 hora a 37°C. La polarización de la fluorescencia se midió en un espectrofluorímetro Hitachi con una longitud de onda de excitación de 366 nm y de emisión de 425 nm. Los resultados se expresaron como unidades de anisotropía $r = (I_0/I_{90})/(I_0+2I_{90})$. Donde I_{90} y I_0 son los valores de la intensidad de la luz cuando las lentes polarizadoras están orientadas en perpendicular o paralelo. Los valores de anisotropía de fluorescencia del estado estacionario permitieron determinar el parámetro de ordenamiento de membrana S_{DPH} (Van Blitterswijk et al., 1981).

10 Cuantificación de Fosfolípidos

Homogeneizamos una suspensión mitocondrial (2-5 mg de proteína) en una mezcla de cloroformo:metanol (1:2, v/v) y centrifugamos durante 1 min a 2.000 rpm. Recogimos la fase inferior y la secamos bajo condiciones de vacío. Analizamos los fosfolípidos mediante HPLC con una columna Zorbax Rx-SIL (25 cm x 4.6 mm i.d., 5 mm de tamaño de partícula). La columna se mantuvo a 28 °C con un bloque calefactor y la absorción del eluido se monitorizó a 205 nm con un detector Waters 490 multiwavelength (Millipore) (Guan et al., 2001)

11 Inmunodetección por *western blot*

Los sobrenadantes y los *pellets* mitocondriales se obtuvieron tras una centrifugación a 10.000 g durante 10 min a 4°C. Se separaron 20-60 µg de proteína mediante un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) aplicando un voltaje continuo de 150 V durante aproximadamente 2 h. A continuación, se transfirieron las proteínas a una membrana de

nitrocelulosa (Hibond ECL, Amersham) usando un sistema de transferencia (Bio-Rad), aplicando 50 V durante 1 hora a 4°C. Se bloqueó la membrana 1 hora con leche en polvo diluída en TBS 0.05% Tween 20 (TBST), y luego se incubó con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C. Se hicieron tres lavados de quince minutos con TBST y se incubó con anticuerpos secundarios específicos de cada especie unidos a peroxidasa durante 1 h a temperatura ambiente. Se hicieron nuevamente tres lavados de quince minutos con TBST. Los anticuerpos secundarios unidos se visualizaron, usando el kit revelador ECL (Amersham Biosciences), por quimioluminiscencia con un film de autoradiografía, exponiéndolo el tiempo necesario en cada caso (dependiendo del anticuerpo y de la cantidad de proteína en la muestra). Un vez expuesto, el film se reveló.

Las membranas se incubaron en cada caso con el anticuerpo primario que correspondiera:

- ✓ Anti-citocromo c monoclonal de ratón (clon 7H8.2C12, 1:200, Santa Cruz Biotech.)
- ✓ Anti-Smac/DIABLO policlonal de conejo (1:1000, Calbiochem)
- ✓ Anti-Hsp60 monoclonal ratón (1:200, Santa Cruz Biotech.)
- ✓ Anti- β -actina monoclonal ratón (1:1000, Sigma-Aldrich)
- ✓ Anti-StAR monoclonal ratón (1:1000, Calbiochem)
- ✓ Anti-PERK policlonal conejo (1:200, Santa Cruz Biotech.)
- ✓ Anti-Rab5A policlonal conejo (1:200, Santa Cruz Biotech)
- ✓ Anti-Na⁺,K⁺ ATPasa α 1 monoclonal ratón (1:200, Santa Cruz Biotech.)
- ✓ Anti-LAMP 1 policlonal conejo (1:200, Santa Cruz Biotech)
- ✓ Anti-OGC policlonal de ratón (1:2500, Abnova Corporation)

12 Monitorización de la permeabilidad mitocondrial transitoria

El hinchamiento mitocondrial es una medida que indica la activación del poro mitocondrial transitorio en este orgánulo subcelular para que libere proteínas proapoptóticas al medio desencadenando la apoptosis. En este proceso la matriz mitocondrial (hiperosmótica respecto al citosol) incorpora agua y solutos, se hincha, y finalmente rompe la membrana mitocondrial externa, liberando proteínas como citocromo c y Smac/DIABLO al medio.

Este proceso se puede monitorizar espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 540 nm. Así pues, una vez aisladas las mitocondrias de hígado de rata o de línea celular, las resuspendimos (1mg proteína/mL) en un tampón con 200 mM Sacarosa, 10 mM Tris-MOPS, 5 mM Succinato, 1 mM fosfato potásico, 2 μ M rotenona, 1 μ g/mL oligomicina y 10 μ M EGTA, ajustando el pH a 7.4. Mantuvimos las mitocondrias a 25°C en agitación suave y fuimos midiendo la absorbancia (Colell et al., 1997). Para inducir PMT usamos tanto el ligando de ANT, atractilósido (100 μ M), como CaCl_2 (100 μ M); y se pudo revertir preincubando con ciclosporina A (5 μ M).

13 Especies reactivas de oxígeno

La suspensión mitocondrial se expuso al sistema generador de anión superóxido: xantina (0.1 mM) más el enzima xantina oxidasa (40 mU/mL para H35 y 5 mU/mL para HepG2). La generación de ROS se midió con los marcadores fluorescentes diacetato de clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína (1 μ M, excitación a 505 nm y emisión a 529 nm) o dihidroetidio (5 μ M, excitación a 480 nm y emisión a 620 nm).

14 Determinación de la actividad Caspasa-3

Homogeneizamos células en un tampón con 120 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.5 % Igepal, 2 mM ácido tetracético de etilenglicol-bis-(β -aminoetiléter) y 50 μ M PMSF, durante 15 min a 4 °C con agitación. A continuación, centrifugamos a 12.000 g a 4°C durante 15 min. . 200 μ g de lisado celular se añadieron a 1.25 mL de tampón 100 mM NaCl, 10% sacarosa, 0.1 % CHAPS y 10 mM DTT (pH a 7.4). La activación de caspasa se determinó espectrofluorimétricamente utilizando el sustrato fluorescente Ac-DEVD-AMC (100 μ M, Calbiochem). La liberación de 7-amino-4-trifluorometil coumarin (AMC) fue monitorizada de forma continua, midiendo la emisión a 460 nm con excitación a 380 nm.

15 Medidas de GSH

Se midieron los niveles de glutatión después de una extracción con 10% ácido tricloroacético (Tietze, 1969). El método se basa en la reducción del ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzónico) ó DTNB por el grupo tiol del GSH, dando lugar a un compuesto de color amarillo. A 0.1 ml de muestra, se le añaden 0.1 ml del enzima glutatión reductasa y 2.3 ml de la solución que contiene 0.9 mM EDTA, 0.1 mM DTNB, 0.15 mM NADPH y 50 mM Na₃PO₄. La lectura en el espectrofotómetro se realiza a 37°C y a una longitud de onda 412 nm. Al comparar con los valores de absorbancia de las soluciones estándar de GSH (0-60µM), obtenemos la concentración de GSH en las diferentes muestras.

16 Transporte de GSH

El tampón que se utilizó para el transporte mitocondrial de glutatión fue: 5 mM Hepes, 220 mM manitol, 70 mM sacarosa, 0.1mM EDTA, 0.1% BSA (sin ácidos grasos), 5 mM succinato, 1 mM fosfato de potasio, pH 7.2, con diferentes concentraciones de GSH (1 y 10 mM) y con 1µCi de ³H-GSH en un volumen final de 250µl. El transporte se inicia al añadir las mitocondrias (2 mg/ml) y tras 20 segundos se para al adicionar 1 ml del tampón de transporte frío, seguido de una filtración en vacío para separar el medio de las mitocondrias. Las mitocondrias retenidas en los filtros (Millipore, 0.45µm) se lavaron dos veces con 2.5 ml de tampón de transporte, para eliminar la unión inespecífica de GSH al filtro. Los filtros se dejaron secar y se pusieron en 10 ml de liquido de centelleo, para evaluar la cantidad de GSH marcado transportado al interior de la mitocondria.

17 Extracción y análisis de ARN

17.1 Extracción

El ARN total tanto de las células HepG2 o H35, como de tejidos hepáticos, se extrajeron mediante TRIzol Reagent (Life Technologies Ltd) (Chomczynski and Sacchi, 1987). Aproximadamente 3×10^6 de células se lisaron con 1ml de TRIzol durante 5 minutos para permitir la disociación de los complejos nucleoprotéicos, tras lo que se le

añadió 200 μ l de cloroformo y se agitaron durante 15 segundos para garantizar una buena mezcla de las diferentes soluciones. Después de dejarlos 3 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron a 12.000 g y a 4°C durante 15 minutos. Se recuperó la fase superior y se precipitó el ARN con 0.5 ml de isopropanol durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se centrifugaron los tubos a 12.000g a 4°C durante 10 minutos y se lavó el precipitado obtenido con etanol 70%. Finalmente, se resuspendió el ARN en el volumen correspondiente de H₂O libre de ARNasas.

La concentración y pureza del ARN se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro (DU 640 Spectrophotometer, Beckman, USA). Una solución de ARN que tenga $DO_{260}=1$ contiene aproximadamente 40 μ g de ARN por ml. El cociente entre las absorbancias a 260 y 280 nm nos da una medida de la pureza del ARN, una pureza óptima corresponde a un cociente $DO_{260}/DO_{280}=1.7-2.0$.

17.2 RT-PCR

Para poner a punto las condiciones para la RT-PCR cuantitativa a tiempo real, primero realizamos RT-PCRs probando distintas temperaturas de anidamiento de los cebadores para cada uno de los ARNm que queríamos determinar. Usamos el *kit* comercial de la casa Promega *Access RT-PCR System*TM, siguiendo las especificaciones exactas del fabricante. Los productos de la PCR y los marcadores se resolvieron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 12% con bromuro de etidio (0.5 μ g/ml).

17.3 RT-PCR cuantitativa a tiempo real

La determinación de los niveles de ARNm se realizó mediante la técnica de RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Para ello se usó el kit comercial *iScript*TM One-Step RT-PCR con SYBR® Green (Bio-Rad), siguiendo las especificaciones del fabricante:

- ✓ 50 ng de ARN total
- ✓ 0.3 mM de cebadores (*primers*)
- ✓ 12.5 μ L de mezcla de reacción 2x
- ✓ 0.5 μ L de solución con retrotranscriptasa

La mezcla final (25 μ L) se introdujo en el termociclador y se ejecutó el siguiente programa:

- ✓ 10 min a 50 °C

- ✓ 3 min a 95°C
- ✓ 45 ciclos:
 - 15 s a 95 °C
 - 30 s a 59 °C
 - 25 s a 72 °C

Cada reacción se realizó por triplicado y el *threshold* (C_T) para cada ARNm se comparó con el ARNm control de la proteína ribosomal HPRT, se hizo la media y se convirtió de logarítmico a lineal. Los cebadores usados para ARN de rata o de línea H35 fueron:

- **HPRT** sentido 5'-GAGCCGACCGGTTCTGTCATGTCG-3',
antisentido 5'-GAGCAAGTCTTTCAGTCCTGTCCA-3'
- **StAR D1** sentido 5'-TCAAAGACCAAACCTCACGTGGCTG-3',
antisentido 5'-TAGATGTGGTGGGCAGTCCTT-3'
- **SREBP-2** sentido 5'-TATCATTGAGAAGCGGTACCGG-3',
antisentido 5'-CTGATTTGCCAGCTTCAGCACC-3'
- **HMG-CoA reductasa** sentido 5'-GGAACCGTGGGTGGTGGGAC-3'
antisentido -5'-GCCTTCTTGGTGCATGTTCCC-3'.

Los cebadores usados para ARN humano o de línea HepG2 fueron:

- **HPRT** sentido 5'-GAAAGGGTGTTTATTCCTCATGG -3'
antisentido 5'-CAGTGCTTTGATGTAATCCAGCAG-3'
- **StAR D1** sentido 5'-CTTGGGCATCCTTAGCAAC-3'
antisentido 5'-ATCTTTTCCGATCTTCTGC-3'
- **SREBP-2** sentido 5'-CCCTTCAGTGCAACGGTCATTAC-3'
antisentido 5'-TGCCATTGGCCGTTTGTGTC-3'
- **HMG-CoA reductasa** sentido 5'-GTCATTCCAGCCAAGGTTGT-3'
antisentido -5'-GGGACCACTTGCTTCCATTA-3'.

La región amplificada y la especificidad de la reacción se determinaron mediante electroforesis en gel de agarosa 12% y por análisis de la curva de fusión.

17.4 Silenciamiento de StAR por siRNA

El silenciamiento de proteínas por ARN de interferencia consiste en el uso de ARN de pocos pares de bases (*small interfering RNA* ó ARNi) que hibrida específicamente con el ARN mensajero (ARNm) diana, y el producto de doble cadena resultante es

degradado por ARNasas celulares. El resultado es una disminución neta de las copias del ARNm y, consecuentemente, una disminución en los niveles de expresión de la proteína deseada.

Usamos ARNi comerciales (Santa Cruz Biotechnology Inc.) contra el ARNm de la proteína StAR D1 y control. La transfección celular la realizamos con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. 10^5 células HepG2 o 5×10^4 células Reuber H35, se incubaron con la mezcla de transfección, que contenía 100 pmol de ARNi contra StAR D1 o ARNi control. Tras 48 h de incubación, se procedió a hacer una segunda transfección. Transcurridas 24 h, se procedió a la determinación de los niveles de ARNm por RT-PCR cuantitativa a tiempo real y de la expresión de proteína mediante Western Blot.

18 Preparación de liposomas y ensayos fluorimétricos

Para preparar los liposomas se usaron distintos lípidos de la casa comercial Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL): dioleoilfosfatidilcolina, tetraoleoilcardiolipina y colesterol. Los compuestos monoéter de dodeciloctaelenglicol, metil- β -ciclodextrina (MCD), melitina, α -toxina de *Staphylococcus aureus*, tetanolisina y los dextranos de 70kD marcados con isotiocianato de fluoresceína (FD70), se obtuvieron de la casa comercial Sigma. Las proteínas recombinantes Bax (de origen humano y con un marcaje de 6 histidinas en posición amino-terminal), tBid (proteína Bid de origen murino con un marcaje de 6 histidinas en posición amino-terminal y cortada por la caspasa-8) y Bcl-2 (Bcl-2 de origen humano sin la región carboxi-terminal hidrofóbica) se obtuvieron por expresión en *E. coli* y purificación por cromatografía sobre agarosa unida a Ni^{2+} (Antonsson et al., 2000; Terrones et al., 2004). Bax oligomerizado (oligo-Bax) se obtuvo después de incubar la proteína Bax en un tampón compuesto de 100 mM KCl, 10 mM HEPES, 0.1 mM EDTA a pH 7.0 con octilglucósido (2 % p/v) durante 1 hora a 4°C.

Se prepararon mezclas lipídicas con distintas composiciones y se disolvieron con una mezcla de cloroformo/metanol (2:1). Se eliminaron los disolvente orgánicos por evaporación bajo corriente de argón, seguido de una incubación de dos horas bajo condiciones de vacío. Las películas lipídicas secas resultantes se resuspendieron en tampón KHE suplementado con 100 mg/mL de dextrano de 70 kD unido a una sonda

fluorescente (FD70). Los liposomas (LUVs) se prepararon mediante 10 ciclos de congelación/descongelación, seguidos por 10 ciclos de extrusión a través de membranas policarbonadas de 0.2 μm de diámetro de poro (Nucleopore). El FD70 no encapsulado se eliminó por filtración con gel Sephacryl S-500 HR columns, con tampón de elución KHE.

La liberación de FD70 de los liposomas se monitorizó con un espectrómetro luminiscente Aminco-Bowman SLM-2 (Spectronic Instruments), a temperatura constante de 37°C, con excitación a 490 nm y midiendo la emisión a 530 nm. Se colocó un filtro de corte de 515 nm entre la muestra y monocromador de emisión para evitar interferencias por dispersión. Se cuantificó la liberación con la siguiente ecuación: $(F_T - F_0 / F_{100} - F_0) = 100$, donde F_T es la fluorescencia medida en LUVs tratados a tiempo t , F_0 es la fluorescencia inicial, y F_{100} es el valor de fluorescencia tras la disrupción completa de los liposomas por adición de C_{12}E_8 (concentración final, 0.5 mM). La concentración lipídica fue de 20 μM y el porcentaje calculado corresponde a la mezcla completa de todos los lípidos del sistema. Los LUVs se prepararon con o sin la presencia de colesterol y su susceptibilidad a Bax/tBid o oligo-Bax fue determinada. (Terrones et al., 2004)

19 Modelo de carcinoma hepatocelular en ratones atímicos

El modelo de xenotransplante (*xenograft*) ectópico con ratones atímicos, permite estudiar la progresión y el efecto de los tratamientos sobre el crecimiento tumoral. Estos ratones, al carecer de timo, tienen un deficiente sistema inmunológico que no actúa contra las células cancerosas. Por ello, son el modelo idóneo para realizar estudios *in vivo* y probar terapias antitumorales.

Durante 5-6 semanas mantuvimos ratones atímicos Balb/c (nu/nu) en condiciones libres de patógenos, con acceso ilimitado a comida estándar y agua esterilizada. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos aprobados por el comité ético de IDIBAPS, y bajo supervisión veterinaria. Se inyectaron 2.5×10^6 células HepG2, resuspendidas en 200 μL de PBS estéril, subcutáneamente en ambos flancos de los ratones. Los tumores se midieron periódicamente con un pie de rey, y el volumen se calculó como longitud x amplitud² x 0.5. Tras 2-3 semanas, los ratones se distribuyeron de forma aleatoria en tres grupos experimentales:

- ✓ Grupo A: solvente (control)
- ✓ Grupo B: Atorvastatina (10 mg/kg)
- ✓ Grupo C: YM-53601 (15 mg/kg)

Tras 2 semanas de administración intragástrica, a algunos animales se les inyectó intraperitonealmente doxorubicina (10 mg/kg). Las diferencias en el volumen tumoral se evaluaron en cada grupo durante la siguiente semana, y se expresaron los resultados como porcentaje de cambio en el crecimiento tumoral respecto al volumen medido antes de la quimioterapia o la administración del vehículo.

20 Ensayo TUNEL y progresión tumoral

La técnica TUNEL (*Terminal uridine deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) es un método muy común para detectar la fragmentación del ADN proveniente de la apoptosis. El ensayo se basa en la presencia de cortes en el ADN que pueden ser identificados por la deoxinucleotidil terminal transferasa, un enzima que cataliza la adición de dUTP que pueden monitorizarse con un marcaje específico.

Partimos de tejido hepático incrustado en parafina, e hicimos cortes histológicos de 4 μm de grosor con un microtomo, que después fijamos sobre portas de vidrio. El ensayo TUNEL lo llevamos a cabo mediante incubación con proteinasa K, 2 μg por mL de tampón Tris-HCl, 5 mM EDTA, ajustando pH a 7.4; las secciones se marcaron siguiendo las instrucciones precisas del kit comercial (*In situ Cell Death Detection Kit*, RocheDiagnostics).

Las tinciones inmunohistoquímicas del receptor CD34, un marcador específico de células endoteliales usado para determinar la formación de vasos, se realizaron con un anticuerpo monoclonal de rata anti-CD34 (1:50, Abcam, Cambridge, MA). La inmunoreacción se visualizó con 3,3'-diaminobenzidina (RocheDiagnostics). Las secciones se contratiñeron con hematoxilina (Dako) y se examinaron con un microscopio Zeiss Axioplan equipado con una cámara Nikon DXM1200F.

Los niveles séricos de alfa-fetoproteína fueron determinados por el Centro Diagnóstico Médico (Hospital Clínic, Barcelona).

Resultados

Nota: Parte de los resultados mostrados en este apartado dieron lugar al artículo *Mitochondrial cholesterol contribuyes to chemotherapy resistance in hepatocellular carcinoma* (ver anexo). (Montero et al., 2008)

1 Aislamiento mitocondrial y determinación de colesterol

Estudios previos en tumores sólidos de hepatoma de Morris describían unos niveles más elevados de colesterol mitocondrial que los del hígado huésped (Campbell et al., 2002; Crain et al., 1983; Feo et al., 1973; Feo et al., 1975). El primer paso fue comprobar estas observaciones en dos líneas celulares de carcinoma hepatocelular: HepG2 (de origen humano) y H35 (de rata). Para ello, en primer lugar, debía optimizarse el aislamiento mitocondrial, con el mayor grado de pureza posible y evitando contaminaciones por otros orgánulos subcelulares.

Se obtuvieron imágenes de microscopía electrónica y se analizaron por *western blot*, en el homogeneizado y la fracción mitocondrial, la presencia de las siguientes proteínas:

- ✓ PERK → Retículo endoplasmático
- ✓ Na^+/K^+ -ATPasa $\alpha 1$ → Membrana plasmática
- ✓ Rab 5A → Endosomas
- ✓ Lamp-1 → Lisosomas
- ✓ Citocromo c → Mitocondria

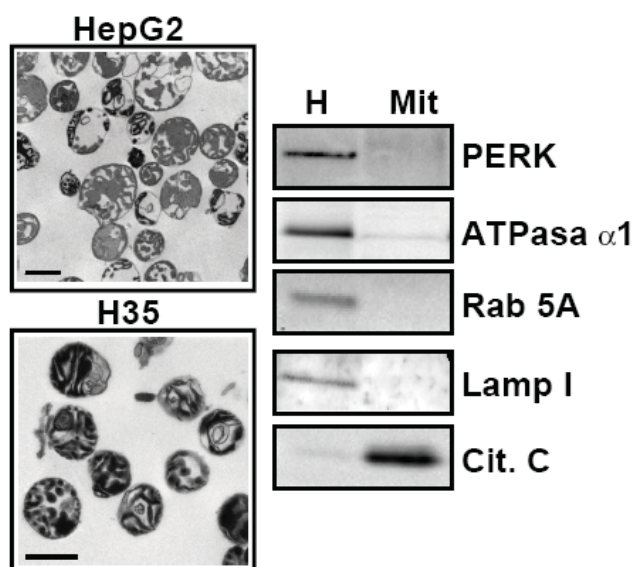


Figura 1 Imágenes de microscopía electrónica de mitocondrias de HepG2 y H35 tras fraccionamiento subcelular (barras de escala = 1 μm). Detección de proteínas específicas de distintos compartimentos subcelulares por *western blot* en homogeneizado (H) y fracción mitocondrial (Mit) de células H35.

Las mitocondrias obtenidas se mostraron libres de contaminaciones provenientes de otros compartimentos subcelulares tales como retículo endoplasmático, membrana plasmática, endosomas y lisosomas (fig. 1).

Para poder comparar con sus respectivos controles, se aislaron mitocondrias tanto de hígado de rata como de biopsias hepáticas humanas. También se tuvo acceso a biopsias de tumores hepáticos humanos y se procedió de la misma manera.

Una vez aisladas las mitocondrias, se determinaron algunos parámetros lipídicos de las mismas, colesterol total (libre y esterificado) y fosfolípidos totales (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y cardiolipina). El análisis se realizó por HPLC.

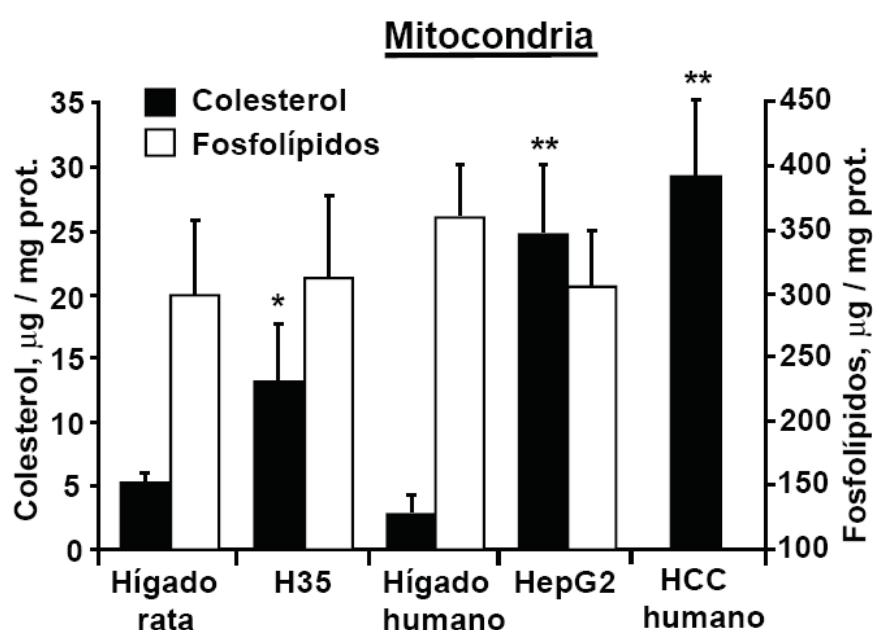


Figura 2. Niveles mitocondriales de colesterol total (barras negras) y fosfolípidos totales (barras blancas) en muestras de hígado de rata, H35, hígado humano, HepG2 y hepatocarcinoma celular humano. Valores expresados como media \pm desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. *,** $p < 0.01$ respecto mitocondrias de hígado de rata o humano.

La concentración de colesterol total (libre y esterificado) presente en las mitocondrias de las líneas celulares H35 y HepG2 era del orden de 3 a 10 veces mayor comparado con sus controles, mitocondrias de hígado de rata y de biopsia de hígado humano sano, respectivamente (fig. 2). Los niveles de fosfolípidos totales, por el contrario, eran similares en todas ellas (fig. 2). Estos datos confirmaban los resultados descritos en hepatomas implantados *in vivo* (Campbell et al., 2002; Crain et al., 1983; Feo et al., 1973; Feo et al., 1975). Curiosamente, el contenido de colesterol detectado en las

mitocondrias de tumores primarios de pacientes con carcinoma hepatocelular era también más elevado que el observado en tejido hepático sano, y similar al que presentaban las células HepG2 (fig. 2).

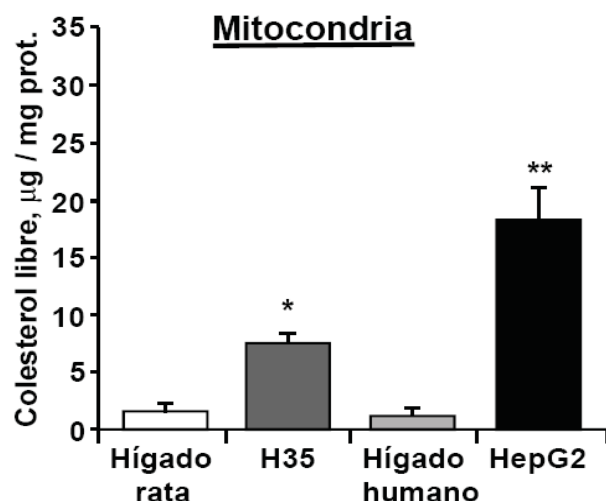


Figura 3. Niveles mitocondriales de colesterol libre analizados por HPLC. Valores expresados como media \pm desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. *,** $p < 0.01$ respecto mitocondrias de hígado de rata o humano.

En paralelo, analizamos los niveles de colesterol libre mitocondrial. Las mitocondrias de las líneas celulares mostaban un mayor contenido en colesterol libre, representando aproximadamente el 70% del colesterol total localizado en este orgánulo (fig. 3).

Para confirmar los resultados obtenidos en mitocondria aislada, se analizaron por microscopía láser confocal células intactas de hepatocitos de rata, HepG2 y H35. Las células se tiñeron con filipina, un antibiótico fluorescente que se une específicamente al grupo 3β -hidroxil del colesterol, y se incubaron con un anticuerpo anti-citocromo c.

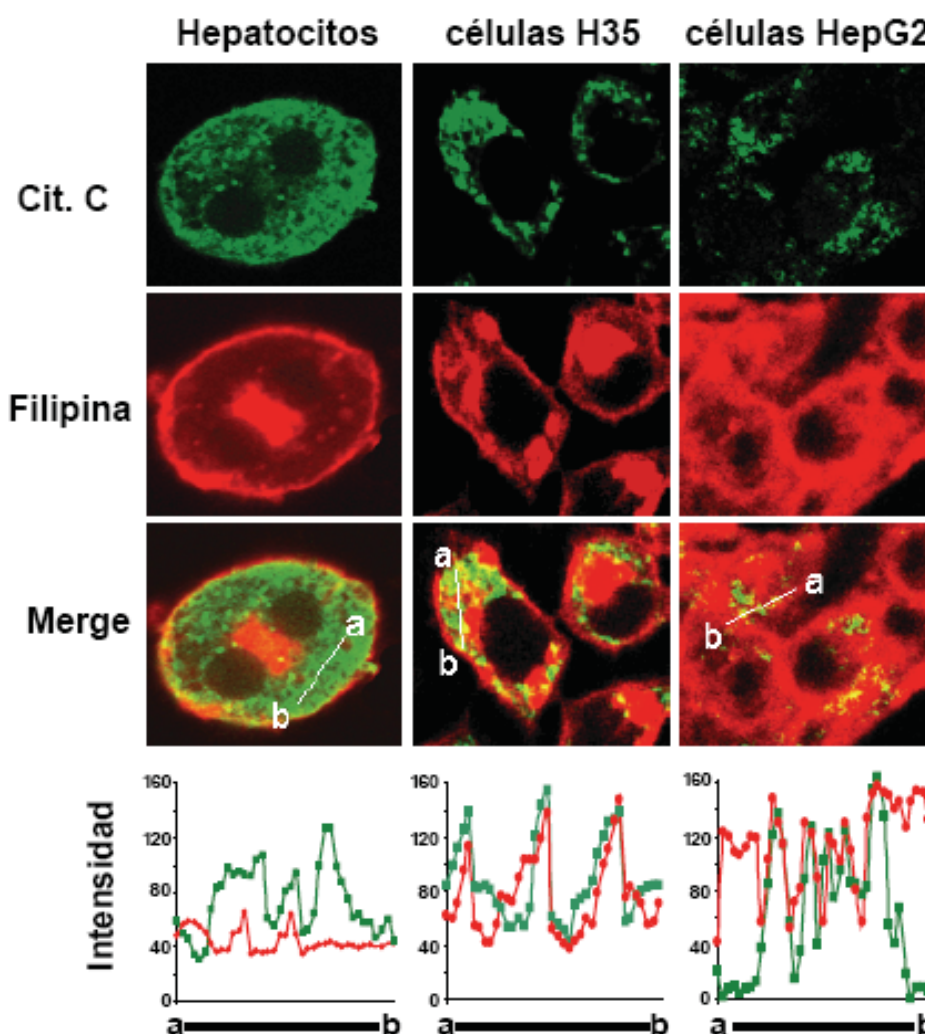


Figura 4. Imágenes de microscopía confocal de hepatocitos de rata, y de células H35 y HepG2. Tinción con filipina (colesterol) y anticuerpo de ratón anti-citocromo c. Los gráficos de abajo representan los perfiles de intensidad de fluorescencia trazados de **a** a **b**.

Ambas líneas celulares, especialmente las HepG2, presentaron una mayor fluorescencia por filipina, más contenido de colesterol, y una mayor colocación con el marcador mitocondrial citocromo c (fig. 4). En paralelo, se monitorizaron los perfiles de intensidad tanto del canal rojo (filipina) como del verde (citocromo c), mostrando una excelente superposición (fig. 4).

El análisis lipídico se completó con la determinación de los niveles de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y cardiolipina (fig.5). No se observaron diferencias en el contenido de fosfatidilcolina, fosfolípido mayoritario en las membranas celulares. Tampoco los niveles de fosfatidiletanolamina mostraban diferencias significativas (fig. 5). Sin embargo, sí se apreció una disminución acusada de la cardiolipina (fig. 5). La

cardiolipina es el único fosfolípido que se sintetiza en la mitocondria (Hostetler et al., 1971), su disminución podría ser reflejo de la disfunción mitocondrial descrita en las células tumorales.

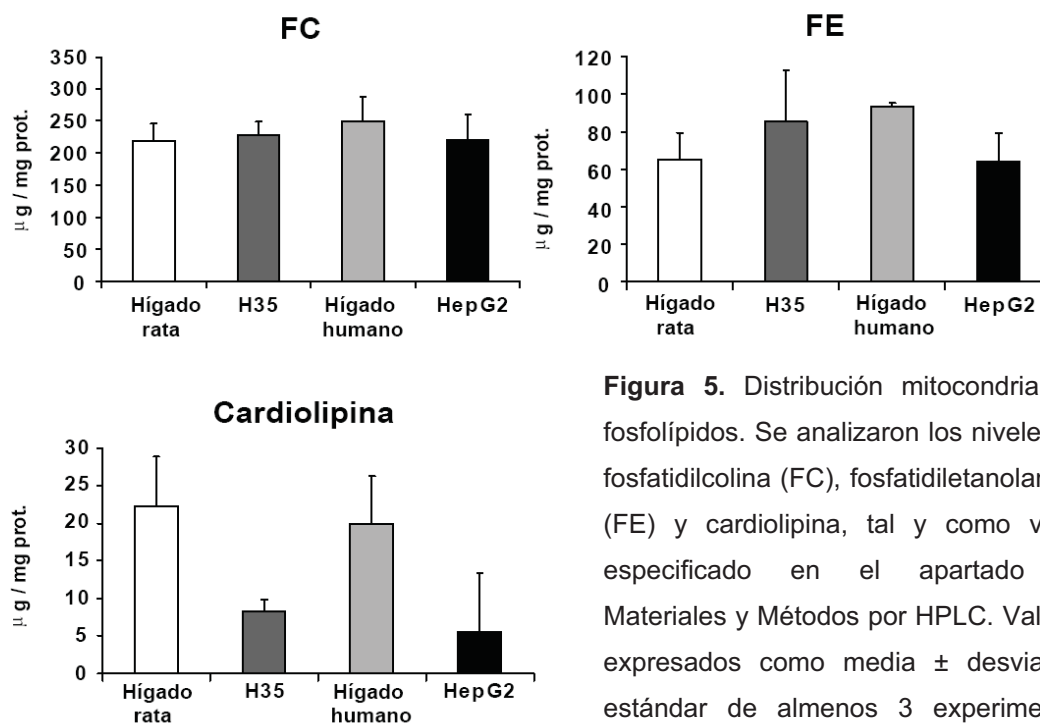


Figura 5. Distribución mitocondrial de fosfolípidos. Se analizaron los niveles de fosfatidilcolina (FC), fosfatidiletanolamina (FE) y cardiolipina, tal y como viene especificado en el apartado de Materiales y Métodos por HPLC. Valores expresados como media \pm desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes.

El paso siguiente fue analizar por PCR a tiempo real, la expresión del ARN mensajero del factor de transcripción SREBP-2, que activa genes involucrados en la síntesis de colesterol, y de la HMG-CoA reductasa, enzima limitante de la vía de síntesis del mismo (fig.6).

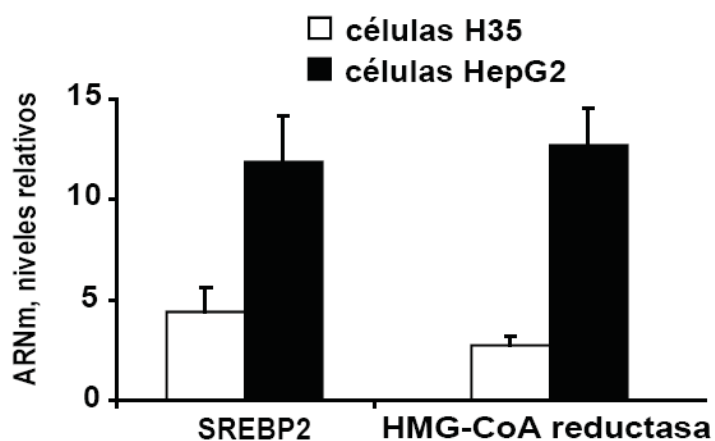


Figura 6. Expresión cuantitativa de ARNm de SREBP2 y HMG-CoA reductasa medida por RT-PCR a tiempo real en células H35 y HepG2 comparando con hígados de rata y humano, respectivamente. Los valores absolutos de ARNm se normalizaron respecto a HPRT y se muestran como expresión relativa.

En ambas líneas celulares, a pesar del elevado contenido de colesterol, los niveles de ARN mensajero, tanto de SREBP-2 como de HMG-CoA reductasa, estaban muy incrementados respecto a sus controles (fig.6), reflejando la ausencia de regulación por feed-back, previamente descrita en células tumorales (Demierre et al., 2005; Duncan et al., 2004; Siperstein, 1995).

2 Efecto del colesterol sobre la funcionalidad mitocondrial y los niveles de glutatión

El colesterol, regula las propiedades físicas de las membranas celulares (Mari et al., 2006; Maxfield and Tabas, 2005; Van Blitterswijk et al., 1981). Además, se ha descrito como una alteración de las propiedades fisico-químicas de las membranas mitocondriales altera la fosforilación oxidativa afectando la funcionalidad mitocondrial (Feo et al., 1975; Fleischer et al., 1962; Woldegiorgis and Shrago, 1985). Por tanto, nos planteamos estudiar el estado funcional de las mitocondrias de las líneas de CHC (fig. 7). Mediante un electrodo de oxígeno de Clark, realizamos medidas de consumo de oxígeno y determinamos el parámetro ACR (*Acceptor Control Ratio*), como índice del grado de funcionalidad mitocondrial.

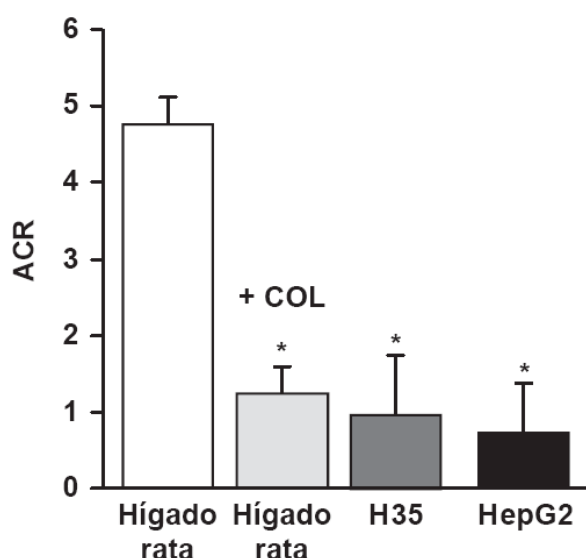


Figura 7. La funcionalidad mitocondrial se determinó por el parámetro ACR (*acceptor control ratio*), calculado como la razón entre el consumo de oxígeno estimulado por la adición de ADP respecto a su ausencia, utilizando un electrodo de oxígeno de Clark. Valores expresados como media \pm desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0.01$ respecto mitocondrias aisladas de hígado de rata. .

Las mitocondrias aisladas de ambas líneas celulares (HepG2 y H35) presentaron una ACR inferior respecto a las mitocondrias de hígado de rata (fig. 7). Paralelamente, el enriquecimiento en colesterol afectó significativamente la funcionalidad de las mitocondrias de hígado de rata (fig. 7).

Una pérdida de la fluidez de membrana inducida por un aumento en los niveles de colesterol puede afectar el correcto funcionamiento de ciertos transportadores presentes en la membrana mitocondrial interna. Así, estudios previos del grupo, han demostrado como el aumento de colesterol mitocondrial disminuye el transporte de glutatión (Colell et al., 1997; Lluís et al., 2003; Mari et al., 2006) y esto se traduce en un descenso acusado del glutatión mitocondrial (mGSH).

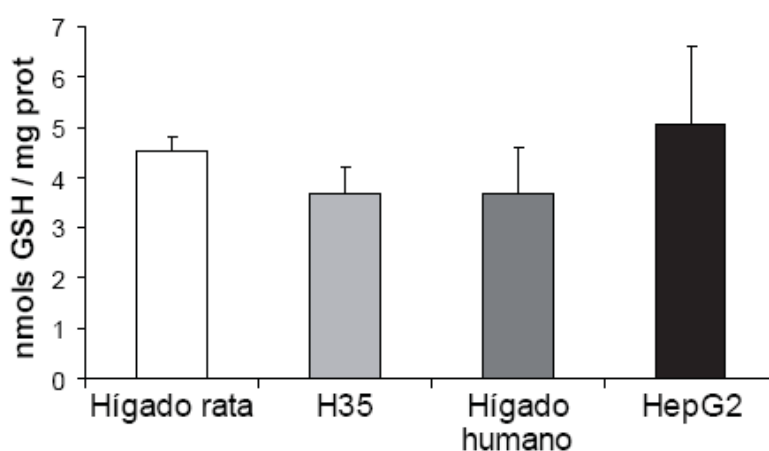


Figura 8. Niveles de glutatión mitocondrial analizados por ensayo enzimático. Valores expresados como media \pm desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes.

Paradójicamente, no se observaron cambios significativos en los niveles de glutatión mitocondrial entre las líneas celulares y sus respectivos controles (fig. 8), pese a tener un alto contenido de colesterol en sus membranas (fig. 2).

Se comprobó el transporte de GSH en mitocondrias aisladas de hígado de rata, y de las líneas celulares H35 y HepG2 (fig. 9).

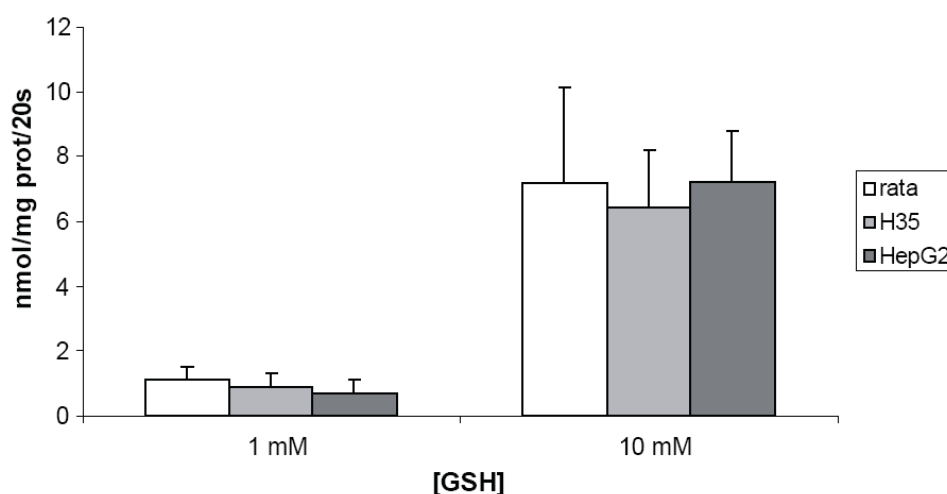


Figura 9. Transporte de glutatión a la mitocondria; expresado como nmol de ^3H -GSH incorporados a la mitocondria tras 20 segundos de incubación y normalizado por proteína. Valores expresados como media \pm desviación estándar de al menos 5 experimentos independientes.

Se analizó la tasa inicial de transporte a 1 y 10 mM y no se observaron diferencias significativas en el transporte mitocondrial de glutatión en las líneas celulares de carcinoma hepatocelular respecto a mitocondrias aisladas de hígado de rata (fig. 9). Puesto que la acumulación de colesterol observada en estas células, no parecía afectar al transporte de glutatión a la mitocondria, pensamos que un posible mecanismo compensatorio podría ser el aumento en el número de transportadores, concretamente el de 2-oxoglutarato (OGC) que se halla en la MMI y que se ha demostrado que contribuye al transporte de GSH a la mitocondria (Coll et al., 2003). Para determinar sus niveles en la mitocondria, se realizó una inmunodetección específica de OGC y Hsp60 (proteína de la matriz mitocondrial que usamos como control de carga) mediante *western blot*.



Figura 10. Análisis por *Western blot* de mitocondrias aisladas de hígado de rata, o de células H35 o HepG2. Se realizó una inmunodetección por *western blot* con un anticuerpo anti-OGC. La proteína mitocondrial Hsp60 se visualizó como control de carga. Se realizaron 3 experimentos independientes obteniendo resultados similares.

Se observó una clara sobreexpresión de este transportador en las mitocondrias aisladas de ambas líneas celulares respecto a las aisladas de hígado de rata, siendo mayor en HepG2 que en H35 (fig. 10).

3 Respuesta mitocondrial frente a estímulos apoptóticos

Para estudiar el papel regulador del colesterol frente a diferentes estímulos apoptóticos, en primer lugar, manipulamos su concentración, enriqueciendo las mitocondrias de hígado de rata y empobreciendo las de las líneas celulares (fig. 11).

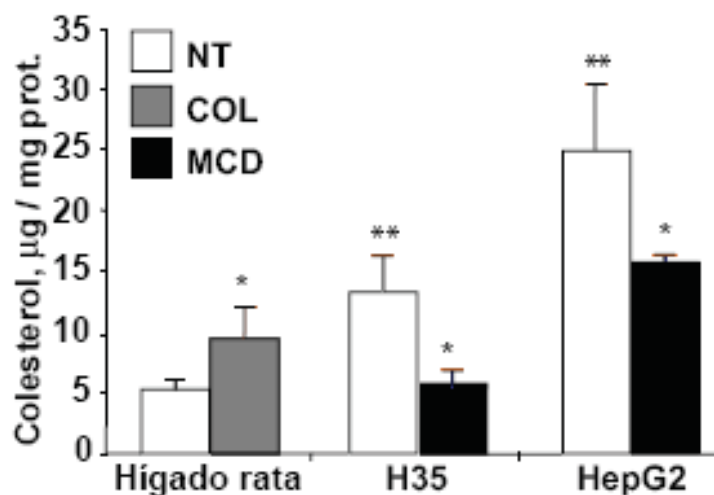


Figura 11. Niveles de colesterol total determinados por HPLC de mitocondria no tratada (NT) o enriquecida en colesterol con una solución de albúmina-colesterol (COL) o tratada con Me- β -ciclodextrina (MCD). Valores expresados como media \pm desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$ respecto mitocondrias no tratadas. ** $p < 0.05$ respecto mitocondrias aisladas de hígado de rata.

Para enriquecer las mitocondrias aisladas de hígado de rata se utilizó una solución de albúmina-colesterol (Colell et al., 2003), consiguiéndose un incremento significativo de su carga de colesterol (fig. 11), cercano a los niveles observados en mitocondrias aisladas de células H35. A pesar de que entre un 60 y un 70 % del colesterol se halla en la membrana externa, de acuerdo con estudios previos (Colell et al., 2003), los niveles de colesterol en los mitoplastos obtenidos a partir de las mitocondrias enriquecidas (COL) eran 2-3 veces mayores que en las mitocondrias controles (no se muestra).

Paralelamente, se utilizó Me- β -ciclodextrina (MCD) (Gimpl et al., 1997), un compuesto que forma complejos con el colesterol de las membranas, para disminuir de forma significativa sus niveles en las mitocondrias aisladas de las líneas celulares H35 y HepG2 (fig. 11).

Seguidamente, se determinó el parámetro de ordenamiento de membrana (S_{DPH}), como indicador del grado de rigidez, obtenido a partir de las medidas de anisotropía de fluorescencia en el estado estacionario de mitocondrias marcadas con DPH (fig. 12).

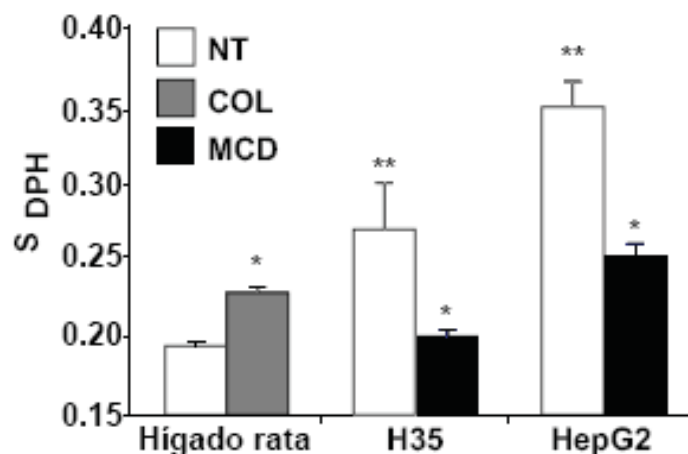


Figura 12. Parámetro de ordenamiento de membrana (S_{DPH}) determinado a partir de la anisotropía de fluorescencia monitorizada a 366 nm (emisión = 440 nm) de mitocondrias marcadas con la sonda DPH, usando filtros plarizados en ambos planos (de emisión y excitación), normalizando por mg de proteína mitocondrial. Valores expresados como media \pm desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$ respecto

Las mitocondrias aisladas de las líneas celulares H35 y HepG2 mostraron un parámetro de ordenamiento de membrana mayor que el observado en mitocondrias aisladas de hígado de rata (fig. 12). Al enriquecer estas últimas en colesterol (fig. 11), se incrementó la S_{DPH} (fig. 12). Por el contrario, al reducir su contenido con Me- β -ciclodextrina en mitocondrias aisladas de células H35 y HepG2 (fig. 11), disminuyó el parámetro de ordenamiento de membrana (fig. 12). Así pues, modulando los niveles de colesterol conseguimos modular el grado de fluidez de las membranas mitocondriales.

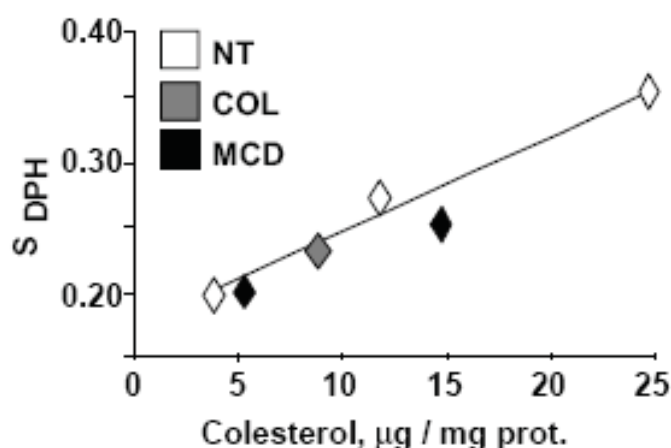


Figura 13. Correlación entre el contenido de colesterol mitocondrial y el parámetro de ordenamiento de membrana (S_{DPH}).

De hecho, el parámetro de ordenamiento de membrana mostraba un elevado grado de correlación con el contenido de colesterol en la mitocondria (fig. 13).

El paso siguiente fue estudiar cómo responden las mitocondrias, en función de su contenido de colesterol, frente a distintos estímulos apoptóticos, ya que esto podría explicar en parte la resistencia de dichas células a la quimioterapia.

3.1 Atractilósido

El primer lugar se examinó la respuesta al atractilósido. El atractilósido es una droga que actúa sobre el translocador de nucleósidos de adenosina (ANT) induciendo la formación del poro mitocondrial transitorio (PMT), el hinchamiento de la matriz y la ruptura de la membrana externa (Colell et al., 2003). Esta ruptura provoca la salida de proteínas proapoptóticas como citocromo c y Smac/DIABLO, que favorecen la formación del apoptosoma, la activación de caspasas y en último término, la muerte por apoptosis. Usamos esta droga con mitocondrias aisladas de hígado de rata, controles (ctrl) o enriquecidas en colesterol (COL), y de la línea Reuber H35, controles (ctrl) o desenriquecidas en colesterol (MCD). Cabe destacar que el nivel de colesterol conseguido tras incubar las mitocondrias de hígado de rata con la solución de albúmina-colesterol y el de las H35 tratadas con MCD fue equivalente.

En primer lugar y como medida del choque osmótico, secundario a la apertura del poro de permeabilidad mitocondrial, se analizó la absorbancia a 540 nm a lo largo del tiempo (fig. 14). En algunos casos preincubamos con ciclosporina A, que actúa sobre la proteína ciclofilina D, inhibiendo la formación del poro.

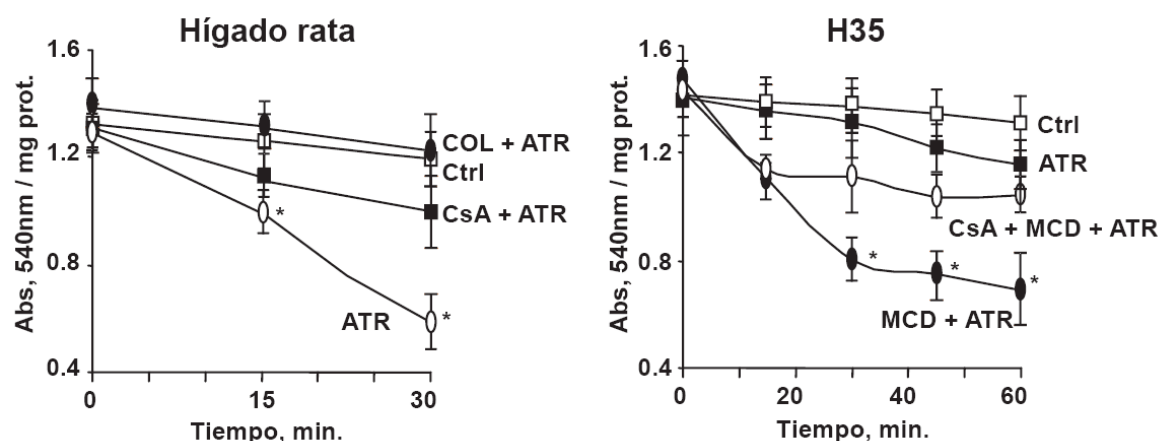


Figura 14. Monitorización de la permeabilidad mitocondrial transitoria de mitocondrias aisladas de hígado de rata y de células H35. Se añadió atractilósido (ATR, 100 μ M) con o sin preincubación con ciclosporina A (CsA, 5 μ M). El hinchamiento mitocondrial se monitorizó midiendo la absorbancia a 540 nm espectrofotométricamente. COL: mitocondrias enriquecidas en colesterol y MCD: mitocondrias tratadas con Me- β -ciclodextrina. Valores expresados como media \pm desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$ respecto a las controles.

El atractilósido provocó un hinchamiento en las mitocondrias aisladas de hígado de rata, o de H35 incubadas con MCD. Por el contrario, las mitocondrias de H35 controles o de hígado de rata enriquecidas en colesterol, se mostraron insensibles al tratamiento (fig. 14). La ciclosporina A consiguió revertir la inducción del PMT provocada por el atractilósido (fig. 14).

En paralelo, se recogieron alícuotas del medio de reacción para analizar la liberación de proteínas proapoptóticas como medida de la permeabilización de la membrana mitocondrial. Se realizó la inmunodetección de las proteínas Smac/DIABLO y Hsp60 tanto del precipitado (*pellet*) como del sobrenadante. Se obtuvieron resultados parecidos con citocromo c (no se muestran).

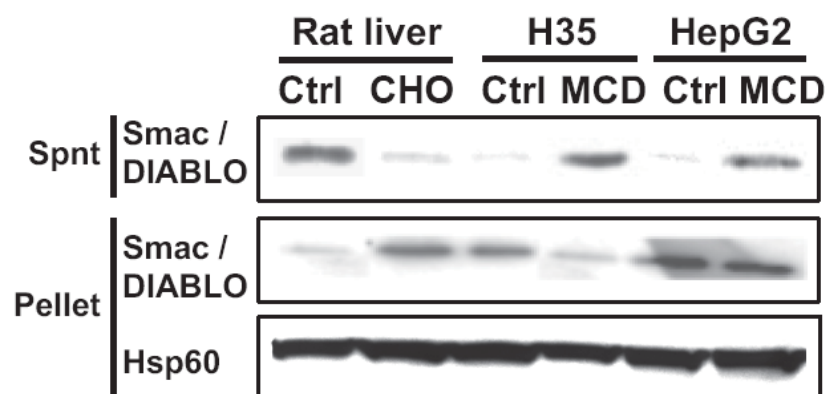


Figura 15. Análisis por *Western blot* de mitocondrias aisladas de hígado de rata, o de células H35 o HepG2; controles (Ctrl), enriquecidas en colesterol (COL) o deplecionadas en colesterol (MCD) tratadas con atractilósido 100 μ M. Tras 45 min de incubación se separaron sobrenadantes (sbnt) y precipitados (*pellet*), y se realizó una inmunodetección por *western blot* con un anticuerpo anti-Smac/DIABLO. La proteína mitocondrial Hsp60 se visualizó como control de carga. Se realizaron 3 experimentos independientes obteniendo resultados similares.

Tanto las mitocondrias aisladas de hígado de rata, como las de las dos líneas celulares disminuidas en colesterol con MCD, liberaron Smac/DIABLO al medio tras incubarlas con atractilósido (fig. 15). Sin embargo, cuando se enriquecieron las de rata con una solución de albúmina-colesterol, esta liberación se vio impedida (fig. 15).

Para estudiar si el efecto inhibitor del colesterol en la permeabilización mitocondrial inducida por Atr era debido a los cambios en la fluidez de membrana, se recurrió a un agente fluidificante, el derivado de ácido graso A₂C.

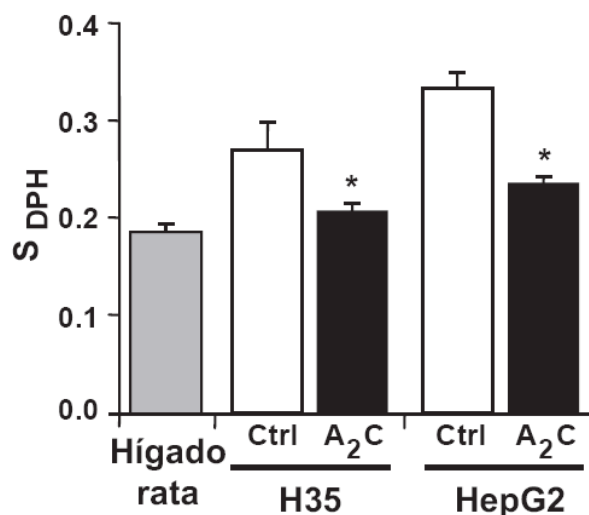


Figura 16. Efecto fluidificante del compuesto A₂C. Se incubaron mitocondrias aisladas de las líneas celulares H35 y HepG2 con el derivado de ácido graso A₂C (125 nmol/mg prot) durante 30 min a 37°C. Después de dos lavados, las mitocondrias se marcaron con la sonda fluorescente DPH y se determinó el parámetro de ordenamiento de membrana (S_{DPH}). Valores expresados como media \pm desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0.01$ respecto al control.

Al incubar las mitocondrias aisladas de ambas líneas celulares con A₂C, la rigidez de la membrana, expresada mediante el parámetro de ordenamiento de membrana S_{DPH} , disminuía significativamente, recuperando los valores controles observados en mitocondrias aisladas de hígado de rata (fig. 16).

Tras la incubación con A₂C, las mitocondrias de H35 y HepG2, se expusieron a atractilósido; y se compararon con las tratadas con MCD. Las mitocondrias preincubadas con A₂C mostraron una sensibilización al atractilósido, similar a la observada mediante el tratamiento con MCD (fig. 17).

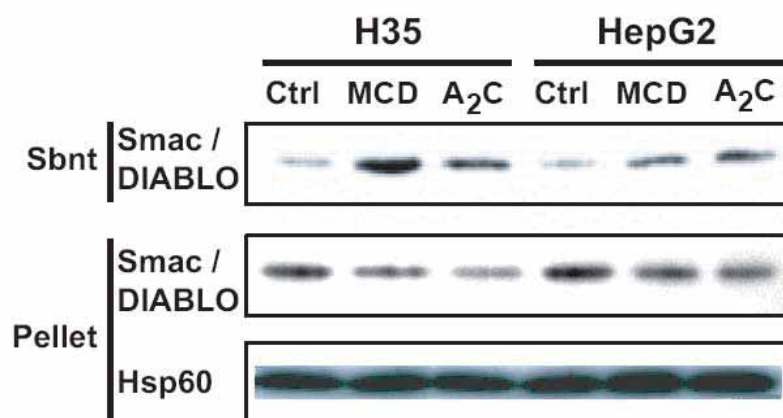


Figura 17. Análisis por *Western blot* de mitocondrias aisladas de células H35 o HepG2; controles (Ctrl), deplecionadas en colesterol (MCD) o incubadas con A₂C, y tratadas con atractilósido 100 μ M. Tras 45 min de incubación se separaron sobrenadantes (sbnt) y precipitados (*pellet*), y se realizó una inmunodetección por *western blot* con un anticuerpo anti-Smac/DIABLO. La proteína mitocondrial Hsp60 se visualizó como control de carga. Se realizaron 3 experimentos independientes obteniendo resultados similares.

3.2 Radicales libres

Se ha descrito que el anión superóxido (O₂⁻) actúa sobre la proteína VDAC promoviendo la liberación de citocromo c (Madesh and Hajnoczky, 2001). En primer lugar, se emplearon mitocondrias aisladas de hígado de rata, y se incubaron con el sistema enzimático xantina más xantina oxidasa (X-XO) para producir anión superóxido *in situ*.

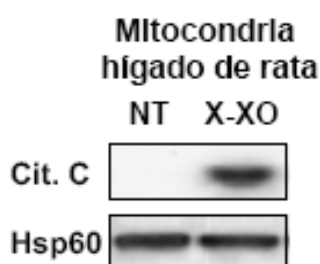


Figura 18. Mitocondrias aisladas de hígado de rata se expusieron al sistema enzimático xantina-xantina oxidasa, X (0.1mM) y XO (40 mU/mL). La liberación de citocromo c se analizó a partir de los sobrenadantes por *western blot*. La proteína mitocondrial Hsp60 se visualizó como control de carga. Se realizaron 3 experimentos independientes obteniendo resultados similares.

El anión superóxido indujo una marcada liberación de citocromo c (fig. 18).

La efectividad del sistema enzimático se comprobó mediante la monitorización de la producción del anión superóxido con la sonda fluorescente dihidroietidio (HE), que es específica para este radical libre. Se realizó con una suspensión de mitocondrias aisladas de células H35, tratadas o no con MCD.

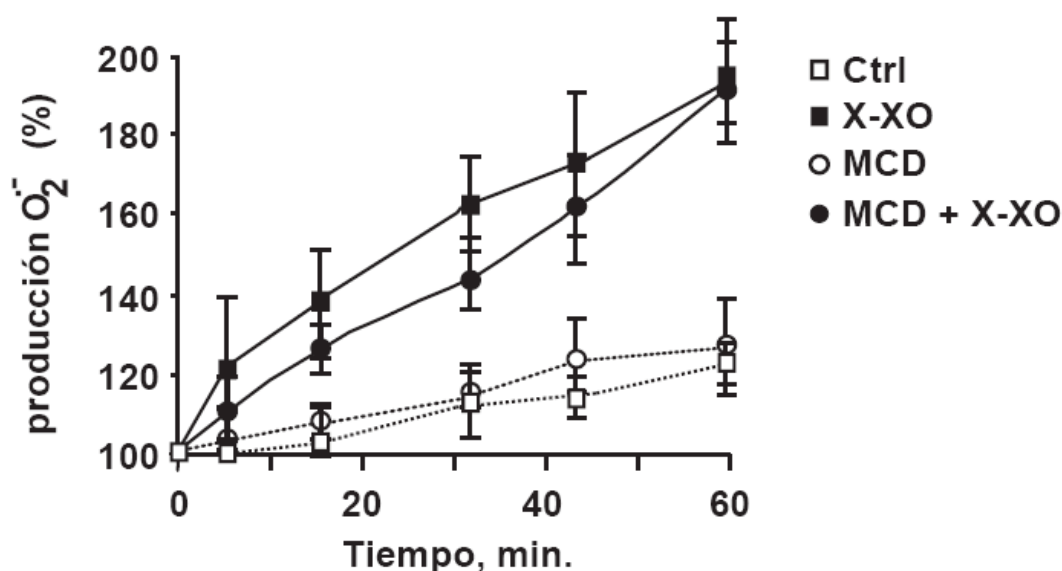


Figura 19. Generación de anión superóxido. Mitocondrias aisladas de células H35, controles (ctrl) o deplecionadas en colesterol con Me- β -ciclodextrina (MCD), se expusieron al sistema enzimático xantina-xantina oxidasa, X (0.1mM) y XO (40 mU/mL) (X+XO). Se examinó la producción de O₂⁻ a lo largo del tiempo con la sonda fluorescente dihidroetidio (5 μ M).

El sistema enzimático X-XO, produjo una liberación gradual y constante de O₂⁻, independientemente de la carga de colesterol mitocondrial (fig. 19). Esta monitorización fue realizada también con suspensiones de mitocondrias aisladas de hígado de rata y de la línea HepG2, obteniendo resultados similares.

A continuación, se analizó el efecto del anión superóxido sobre la liberación de proteínas proapoptóticas. Se incubaron mitocondrias aisladas de la línea celular H35, controles o desenriquecidas en colesterol (MCD), con X-XO, y se recogieron muestras del medio a distintos tiempos. Se analizó la liberación de citocromo c por *western blot*.

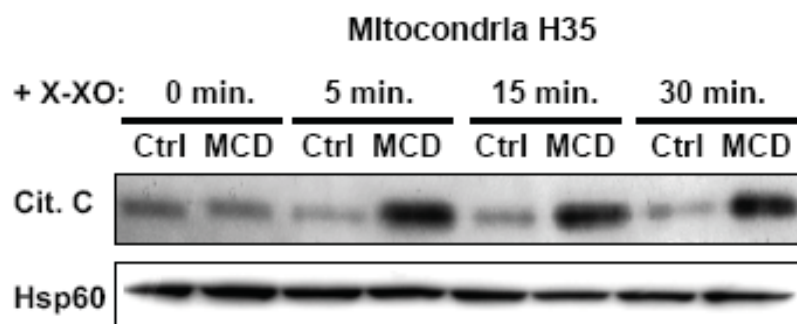


Figura 20. Mitocondrias aisladas de células H35, controles (ctrl) y tratadas con Me- β -ciclodextrina (MCD), se incubaron con el sistema enzimático xantina-xantina oxidasa, X (0.1mM) y XO (40 mU/mL) (X+XO). La liberación de citocromo c se analizó a partir de los sobrenadantes por *western blot* a los tiempos indicados. La proteína mitocondrial Hsp60 se visualizó como control de carga. Se realizaron 3 experimentos independientes obteniendo resultados similares.

Las mitocondrias aisladas de células H35 se mostraron resistentes a la liberación de citocromo c inducida por el sistema enzimático (fig. 20). Sin embargo, al extraer parte de su colesterol con MCD, se reestableció la sensibilidad al anión superóxido.

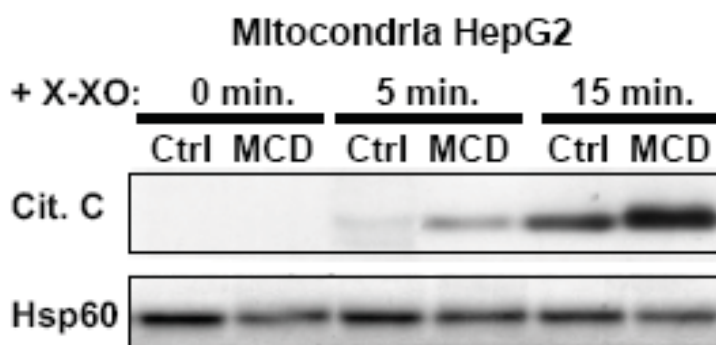


Figura 21. Mitocondrias aisladas de células HepG2, controles (ctrl) y tratadas con Me- β -ciclodextrina (MCD), se incubaron con el sistema enzimático xantina-xantina oxidasa, X (0.1mM) y XO (40 mU/mL) (X+XO). La liberación de citocromo c se analizó a partir de los sobrenadantes por *western blot* a los tiempos indicados. La proteína mitocondrial Hsp60 se visualizó como control de carga. Se realizaron 3 experimentos independientes obteniendo resultados similares.

Se obtuvieron resultados similares con mitocondrias aisladas de la línea celular HepG2 (fig. 21). La liberación de citocromo c al medio se vio muy incrementada al reducir los niveles de colesterol mitocondriales.

3.3 Calcio

El catión calcio (Ca^{2+}) es otro potente inductor del PMT, con el consecuente choque osmótico reflejado en el hinchamiento de la matriz mitocondrial y la liberación de proteínas proapoptóticas desde el espacio intermembrana (Ichas and Mazat, 1998). Como consecuencia de un estrés en el retículo endoplasmático se puede dar un aumento transitorio de los niveles de Ca^{2+} en el citosol, desencadenando la casacaada apoptótica.

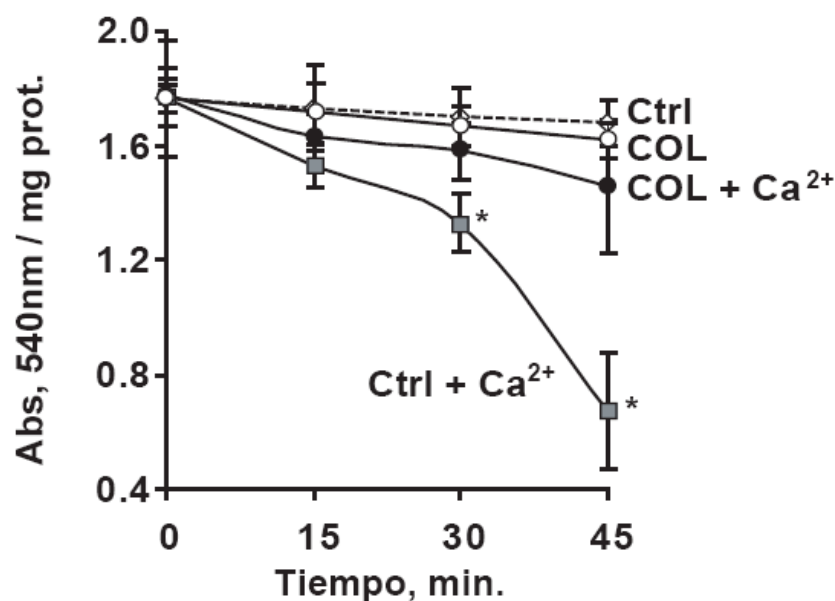


Figura 22. Monitorización de la permeabilidad mitocondrial transitoria de mitocondrias aisladas de hígado de rata, controles (Ctrl) o enriquecidas en colesterol (COL), tras la adición de CaCl_2 (100 μM). El hinchamiento mitocondrial se monitorizó midiendo la absorbancia a 540 nm espectrofotométricamente. Valores expresados como media \pm desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$ respecto a los controles.

Las mitocondrias de hígado de rata enriquecidas en colesterol se mostraron resistentes a la inducción del PMT promovida por el calcio, al contrario que las controles (fig.22). Asimismo, las mitocondrias aisladas de células H35 fueron insensibles a este estímulo, y sólo observamos un descenso en la absorbancia cuando se desenriquecieron en colesterol con MCD (no se muestra). En ambos casos, se analizaron tanto las proteínas liberadas al medio como las correspondientes al precipitado (*pellet*) mitocondrial por *western blot*.

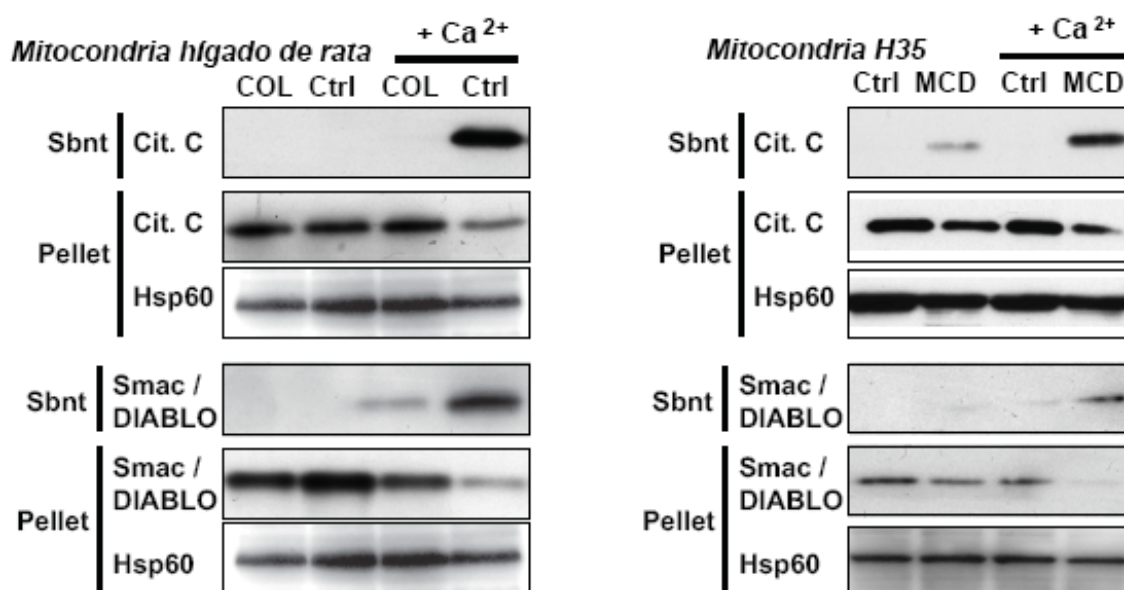


Figura 23. Análisis por *western blot* de mitocondrias aisladas de hígado de rata o de células H35; controles (Ctrl), enriquecidas en colesterol (COL) o deplecionadas en colesterol (MCD), tratadas con CaCl_2 (100 μM). Tras 60 y 30 min respectivamente de incubación se separaron sobrenadantes (sbnt) y precipitados (*pellet*), y se realizó una inmunodetección por *western blot* con anticuerpos anti-Smac/DIABLO y anti-citocromo c. La proteína mitocondrial Hsp60 se visualizó como control de carga. Se realizaron 3-4 experimentos independientes obteniendo resultados similares

El hinchamiento mitocondrial se acompañó de la liberación de citocromo c y Smac/DIABLO al medio. Las mitocondrias de rata controles se mostraron sensibles al calcio, pero al enriquecerlas en colesterol, se volvieron resistentes (fig. 23). Por el contrario, la mitocondrias aisladas de H35, más ricas en colesterol, fueron resistentes a la inducción por Ca^{2+} , pero cuando se desenriquecieron con MCD, se consiguió sensibilizarlas (fig. 23).

3.4 Permeabilización mitocondrial por Bax.

A continuación, nos propusimos estudiar si el contenido de colesterol podía influir sobre la permeabilización mitocondrial llevada a cabo por la proteína Bax. Se analizó la liberación de citocromo c provocada por Bax activada por tBid en mitocondrias aisladas de hígado de rata: controles y enriquecidas en colesterol, tratadas o no con el agente fluidificante A_2C . Se realizó un *western blot*, tanto del sobrenadante como del precipitado (*pellet*), para monitorizar la liberación de citocromo c al medio.

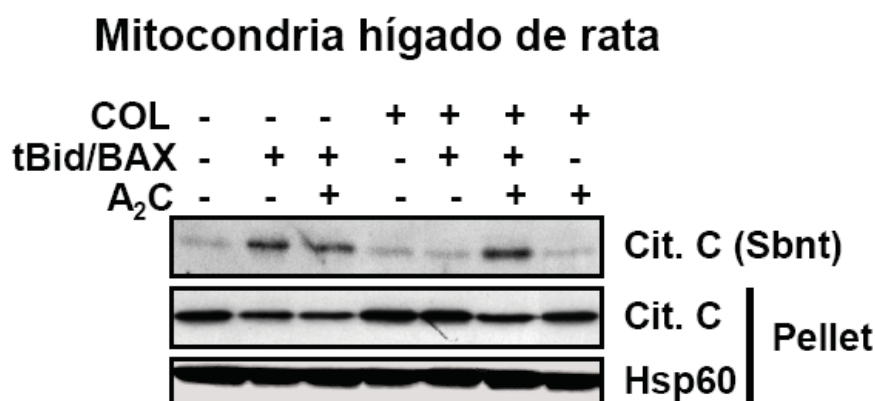


Figura 24. Análisis por *western blot* de mitocondrias aisladas de hígado de; controles (Ctrl) o enriquecidas en colesterol (COL), incubadas o no con A₂C (125 nmol/mg prot), y tratadas durante 45 min con tBid+Bax (20 nM). Se separaron sobrenadantes (sbnt) y precipitados (*pellet*), y se realizó una inmunodetección por *western blot* con anticuerpo anti-citocromo c. La proteína mitocondrial Hsp60 se visualizó como control de carga. Se realizaron 3 experimentos independientes obteniendo resultados similares.

Las mitocondrias aisladas de hígado de rata, tratadas o no con A₂C, cuando se incubaron con las proteínas tBid y Bax, liberaron citocromo c al medio (fig. 24). Sin embargo, cuando se usaron las mismas condiciones con mitocondrias que previamente habían sido enriquecidas con una solución de albúmina-colesterol, no se produjo la liberación con el tratamiento con tBid-Bax. Fue necesario coincubar con A₂C, para recuperar la salida de citocromo c al medio (fig. 24). Se obtuvieron resultados similares al analizar la proteína Smac/DIABLO (no se muestra). Así pues, se estableció una relación de causa-efecto entre el orden de membrana y la liberación de proteínas apoptóticas por Bax.

En paralelo, se analizó el efecto de Bax en la línea celular H35. Con el fin de disminuir los niveles de colesterol mitocondrial, las células se trataron con un inhibidor específico de la HMG-CoA reductasa, la lovastatina. Este fármaco de la familia de las estatinas actúa en el enzima clave de la síntesis, disminuyendo ~40% los niveles de colesterol mitocondrial (fig. 34). Células H35 fueron incubadas durante 24 horas en un medio con o sin lovastatina, y se aisló la fracción mitocondrial. Seguidamente, se trataron con tBid y Bax, y se analizó la liberación de proteínas proapoptóticas al medio.

Mitocondria de H35

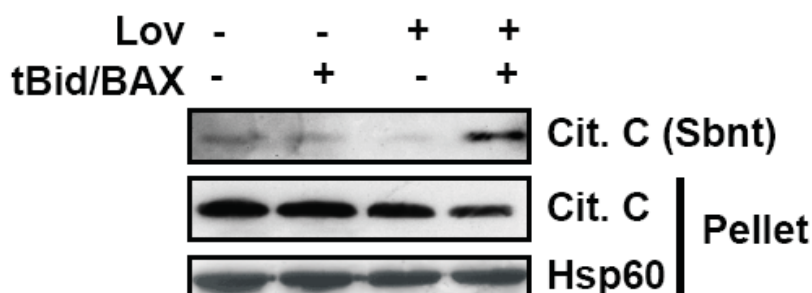


Figura 25. Análisis por *western blot* de células H35 incubadas o no con lovastatina (Lov, 2.5 μ M). Se aislaron las mitocondrias y se expusieron durante 45 min a tBid+Bax (20 nM). Se separaron sobrenadantes (sbnt) y precipitados (*pellet*), y se realizó una inmunodetección por *western blot* con anticuerpo anti-citocromo c. La proteína mitocondrial Hsp60 se visualizó como control de carga. Se realizaron 3 experimentos independientes obteniendo resultados similares.

Las mitocondrias aisladas de la línea celular H35 se mostraron insensibles a la permeabilización por tBid/Bax, y no hubo liberación de citocromo c al medio. Por el contrario, el tratamiento con lovastatina recuperó la actividad permeabilizadora de Bax (fig. 25).

Para corroborar estos resultados y analizar si el colesterol actúa en la inserción de Bax en la bicapa lipídica, se realizaron estudios con liposomas. Se usaron distintas composiciones lipídicas y se analizó como afectaba a la permeabilización por Bax activado por tBid (tBid/Bax). Los liposomas se sintetizaron encapsulando en su interior un dextrano de 70 kD marcado con fluoresceína (FD70), permitiendo su monitorización al liberarse al medio (Terrones et al., 2004).

Primero se sintetizaron liposomas con 2 composiciones distintas:

- COL - con fosfatidilcolina y cardiolipina (90:10, mol/mol).
- COL + con fosfatidilcolina, cardiolipina y colesterol (45:10:45, mol/mol)

Ambos tipos de liposomas se trataron con tBid y Bax, y con tetanolisina, una toxina que depende directamente del colesterol para poder insertarse en la membrana formando un barril α en la bicapa lipídica, y se hizo un seguimiento a lo largo del tiempo (fig. 26).

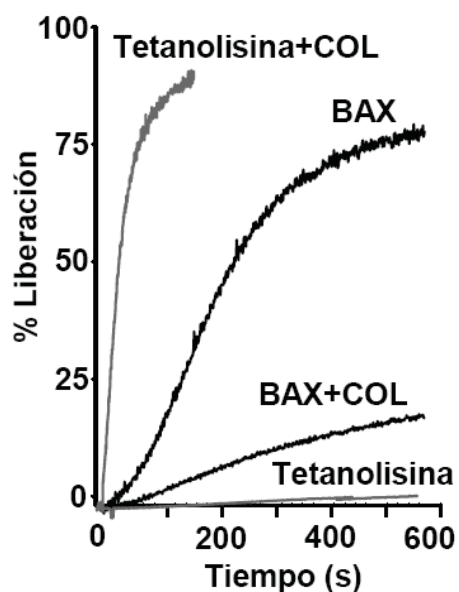


Figura 26. Cinética representativa de la liberación de FD70 desde liposomas compuestos de fosfatidilcolina (PC)/cardiolipina (CL) 90/10 (mol/mol) o PC/CL/colesterol 45/10/45 (mol/mol) (+COL), inducida por BAX + tBID (50 nM) o tetanolisina (10 nM)

La tetanolisina, sólo fue capaz de permeabilizar a aquellos liposomas con colesterol. Por el contrario, la capacidad permeabilizadora de tBid/Bax, se vio claramente comprometida en presencia de colesterol (fig. 26).

A continuación, se comprobó si el tratamiento con MCD era capaz de revertir el enriquecimiento en colesterol, y permitir la permeabilización de la membrana por Bax.

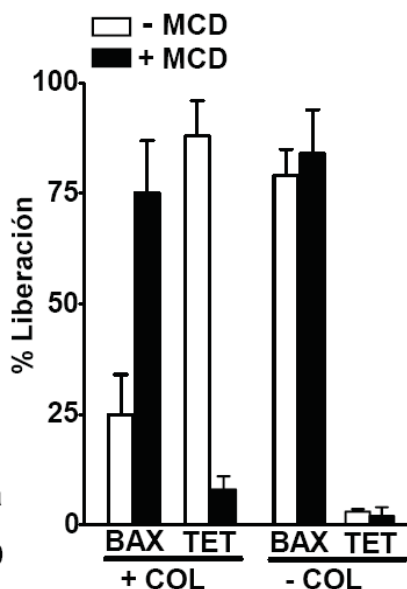


Figura 27. Liberación de FD70 desde liposomas compuestos de fosfatidilcolina (PC)/cardiolipina (CL) 90/10 (mol/mol) (-COL) o PC/CL/colesterol 45/10/45 (mol/mol) (+COL), inducida por BAX + tBID (BAX, 50 nM) o tetanolisina (TET, 10 nM), en presencia o ausencia de Me-β-ciclodextrina 2 mM (MCD). (n = 2)

Los liposomas enriquecidos en colesterol no se permeabilizaron por tBid/Bax, hecho que se reflejó en el menor porcentaje de FD70 liberado al medio. Cuando se preincubó

con MCD, se consiguió revertir este efecto, mostrando que la composición lipídica determina la eficacia de las proteínas de la familia Bcl-2. Obviamente, en los liposomas sin colesterol, la MCD no tuvo ningún efecto.

Nos propusimos entonces realizar estudios similares con liposomas a concentraciones crecientes de colesterol en su composición. Y, además de usar tBid/Bax y tetanolisina, utilizamos:

- Bax oligomerizado artificialmente mediante un detergente (oligo-Bax)
- Melitina, un péptido antimicrobiano capaz de formar poros toroidales asociados con lípidos (Allende et al., 2005)
- Toxina α , una proteína aislada de *S. aureus* capaz de formar canales (Forti and Menestrina, 1989).

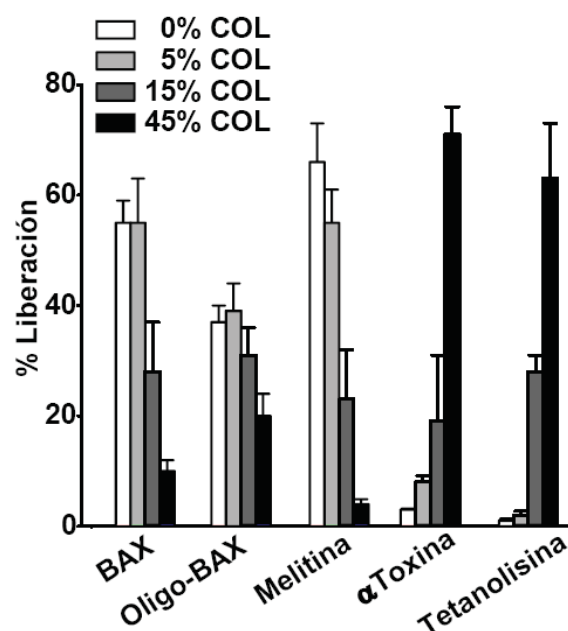


Figura 28. Liberación de FD-70 inducida por BAX+tBID (BAX, 20 nM), BAX oligomerizado (oligo-BAX, 50 nM), melitina (200 nM), α -toxina de *S. aureus* (α -toxina, 20 nM), y tetanolisina (5 nM) en liposomas compuestos por PC/CL 90/10 (mol/mol) en donde PC se sustituyó por cantidades crecientes de colesterol (COL). (n = 3 – 6).

El aumento gradual en colesterol en la composición de los liposomas, provocó una disminución en la capacidad permeabilizante de tBid/Bax, oligo-Bax y melitina (fig. 28). Por el contrario, tanto la α -toxina como la tetanolisina, que dependen del colesterol, incrementaron la permeabilización con su aumento en la composición (fig. 28).

Las proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 antagonizan la salida de factores inductores de muerte desde la mitocondria. Analizamos si el colesterol es capaz de modular la actividad de Bcl-2. Se preincubaron liposomas, con o sin colesterol en su composición, con distintas concentraciones de Bcl-2, exponiéndolos posteriormente al tratamiento con tBid/Bax.

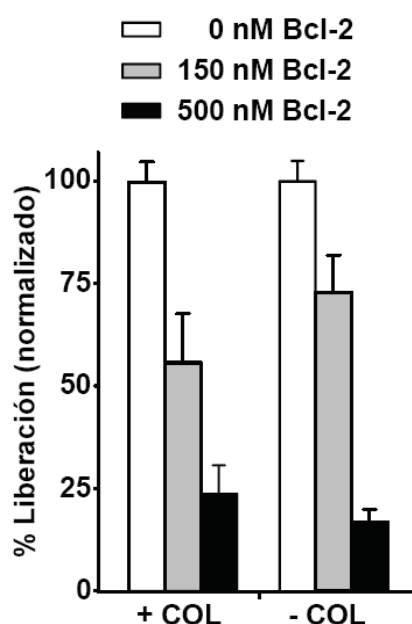


Figura 29. Liberación de FD70 desde liposomas compuestos por fosfatidilcolina (PC)/cardiolipina (CL) 90/10 (mol/mol) (-COL) o PC/CL/colesterol 45/10/45 (mol/mol) (+COL), y expuestos a cantidades crecientes de Bcl-2 5 min antes del tratamiento con BAX+tBID (50 nM). Expresado como porcentaje respecto a la liberación en ausencia de Bcl-2 (n = 2).

Tal como se puede observar, la preincubación con Bcl-2 impidió la permeabilización llevada a cabo por Bax, independientemente del contenido en colesterol (fig. 29).

De forma similar a lo observado con mitocondrias aisladas de hígado de rata enriquecidas en colesterol, la incorporación del agente fluidificante A₂C en la composición de los liposomas, resultó en un aumento significativo de la liberación de dextrano (fig. 30). Es importante constatar, que se produjo a concentraciones relativamente reducidas de A₂C (5 % mol). Lógicamente, la fluidificación en los liposomas sin colesterol, que ya presentaban una buena liberación de FD70, no produjo cambios significativos.

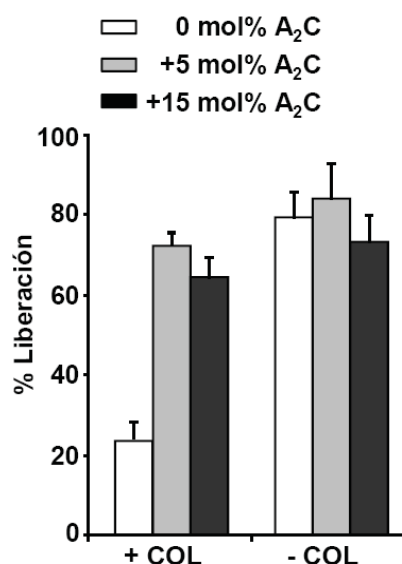


Figura 30. Liberación de FD70 desde liposomas compuestos por fosfatidilcolina (PC)/cardiolipina (CL) 90/10 (mol/mol) (-COL) o PC/CL/colesterol 45/10/45 (mol/mol) (+COL), en donde la fosfatidilcolina se sustituyó por cantidades crecientes de A₂C y se expusieron a BAX+tBID (50 nM). Valores expresados como media \pm desviación estándar de 2-4 experimentos independientes

Finalmente, se examinó si el colesterol era capaz de alterar la capacidad de inserción de Bax en la membrana. Para ello, se usaron monocapas lipídicas con distintas composiciones lipídicas:

- COL - con fosfatidilcolina y cardiolipina (80:20, mol/mol).
- COL + con fosfatidilcolina, cardiolipina y colesterol (40:20:40, mol/mol)

La adición de oligo-Bax a estas monocapas partiendo de distintas presiones iniciales, nos permitió determinar los valores de presión superficiales críticas (π_0), lo que nos indica la penetrabilidad de la proteína en la membrana.

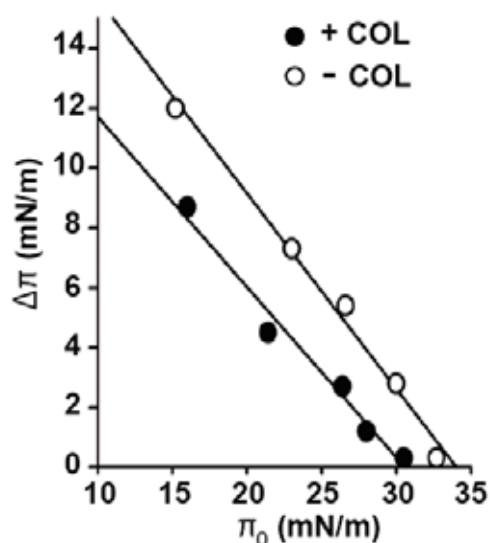


Figura 31. El colesterol reduce la capacidad de Bax oligomerizado para penetrar monocapas lipídicas a distintas presiones de superficie. Están compuestos por fosfatidilcolina (PC)/cardiolipina (CL) 80/20 (mol/mol) (-COL) o PC/CL/colesterol 40/20/40 (mol/mol) (+COL). Las presiones críticas de superficie fueron 34.6 mN/m (-COL) y 30.2 mN/m (+COL). La concentración de Bax oligomerizado fue 400nM.

Se determinaron las presiones de superficie críticas de oligo-Bax en ambos tipos de monocapas, con (30.2 mN/m) y sin colesterol (34.6 mN/m) en su composición (fig. 31). La penetrabilidad fue por tanto menor en monocapas con mayor contenido de colesterol.

Finalmente, podemos decir que estos resultados sugieren que el efecto rigidificador del colesterol sobre la bicapa lipídica modula la capacidad de Bax para permeabilizarla. En parte, esto se debe a la disminución de la capacidad de Bax para insertarse en la matriz lipídica de la membrana.

4 Papel modulador del colesterol en la respuesta celular a la apoptosis

A continuación se examinó el papel del colesterol mitocondrial en la susceptibilidad de las células de carcinoma hepatocelular frente a la quimioterapia de acción mitocondrial.

4.1 Resistencia frente a estímulos proapoptóticos de acción mitocondrial

En primer lugar, analizamos la susceptibilidad celular frente a distintos estímulos proapoptóticos que actúan a nivel mitocondrial como:

- **Trióxido de arsénico (ATO):** droga antineoplásica que induce permeabilidad mitocondrial transitoria (PMT) (Don et al., 2003).
- **Lonidamina (Lnd):** derivado del ácido indazole-3-carboxílico, usado como quimioterapéutico en cáncer de próstata y de mama. Induce PMT (Le Bras et al., 2006).
- **Tapsigargina (Tap):** potente inhibidor de las ATPasas del retículo endoplasmático responsables del transporte de Ca^{2+} . Provoca un aumento de la concentración Ca^{2+} en el citosol, y esto provoca PMT. Se usa habitualmente en el tratamiento del cáncer de próstata (Denmeade and Isaacs, 2005).
- **Doxorubicina (Doxo):** antibiótico antracíclico, que entre otro mecanismos de acción incluye la producción de radicales libres en la mitocondria, y que se usa ampliamente como quimioterapéutico (Kumar et al., 1999).

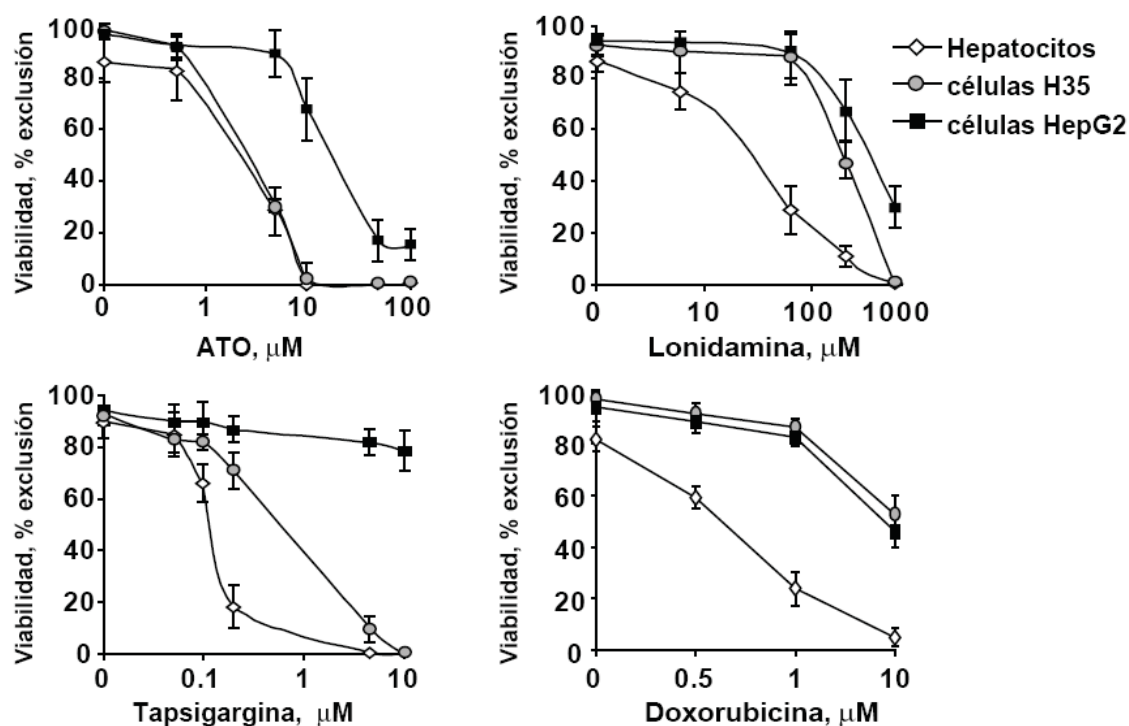


Figura 32. Hepatocitos primarios de rata, y células H35 y HepG2, fueron incubados con dosis crecientes de trióxido de arsénico (ATO), lonidamina, tapsigargina o doxorubicina durante 24 h. La viabilidad celular se determinó por exclusión de azul de tripan. Al menos 100 células de cuatro campos distintos se contaron y se expresaron como porcentaje total.

Ambas líneas celulares mostraron una susceptibilidad reducida frente a concentraciones crecientes de tapsigargina, lonidamina, trióxido de arsénico y doxorubicina, comparado con hepatocitos aislados de hígado de rata (fig. 32).

4.2 Sensibilización por la disminución del colesterol celular

Teniendo en cuenta estos resultados con quimioterapéuticos de acción mitocondrial y tras comprobar que los niveles de colesterol mitocondriales están claramente aumentados en las líneas celulares, nos propusimos ver si dicha resistencia se revertía al disminuir el nivel de colesterol.

4.2.1 **Inhibición del enzima HMG-CoA reductasa: lovastatina**

Diversas estatinas, incluidas la lovastatina y la atorvastatina, se han mostrado efectivas en la reducción de los niveles de colesterol en células HepG2 (Scharnagl et al., 2001). Cabe destacar sin embargo que la inhibición por estatinas actúa al principio de la vía del

mevalonato e impide tanto la formación de colesterol como de los demás compuestos isoprenoides (fig. 33)

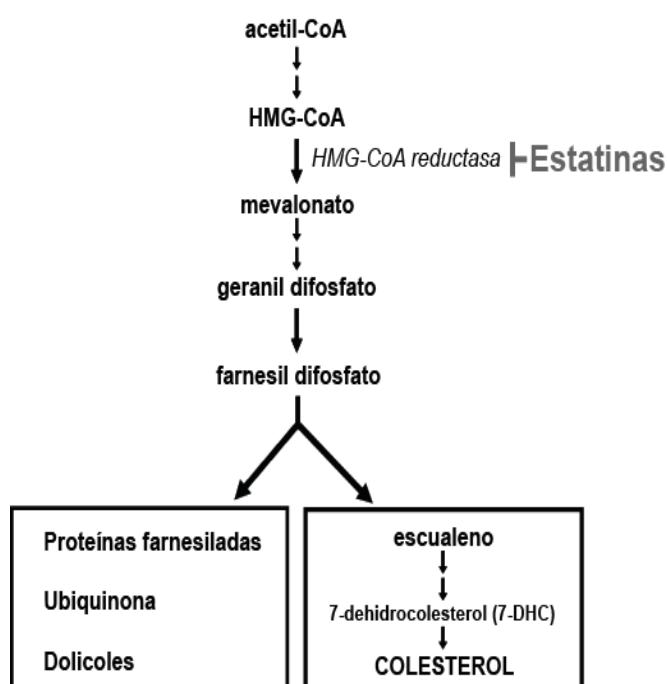


Figura 33. Esquema de la vía de síntesis de colesterol. Acción inhibitoria de las estatinas.

En primer lugar se comprobó la efectividad del tratamiento con lovastatina para reducir los niveles de colesterol mitocondrial en ambas líneas celulares (fig. 34).

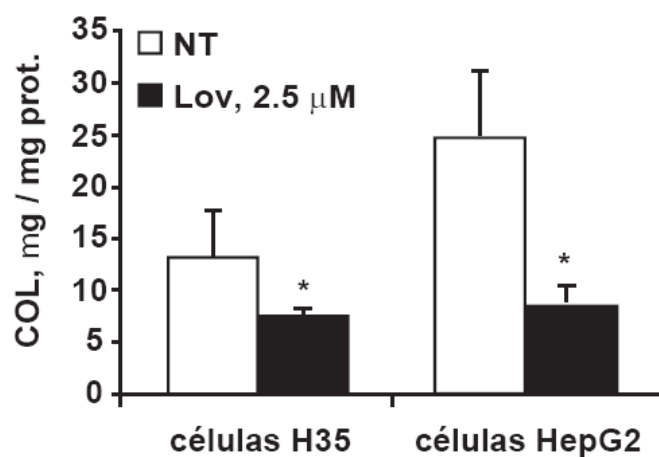


Figura 34. Niveles mitocondriales de colesterol total de células H35 y HepG2 tras 24 h de tratamiento con el inhibidor de la HMG-CoA reductasa, lovastatina (Lov, 2.5 µM). Valores expresados como media \pm desviación estándar de al menos 4 experimentos independientes. * $p < 0.05$ respecto a células no tratadas (NT).

El tratamiento disminuyó significativamente los niveles mitocondriales de colesterol, tanto en H35 como en HepG2 (fig 34). A continuación, se combinó la lovastatina con agentes quimioterapéuticos de acción mitocondrial.

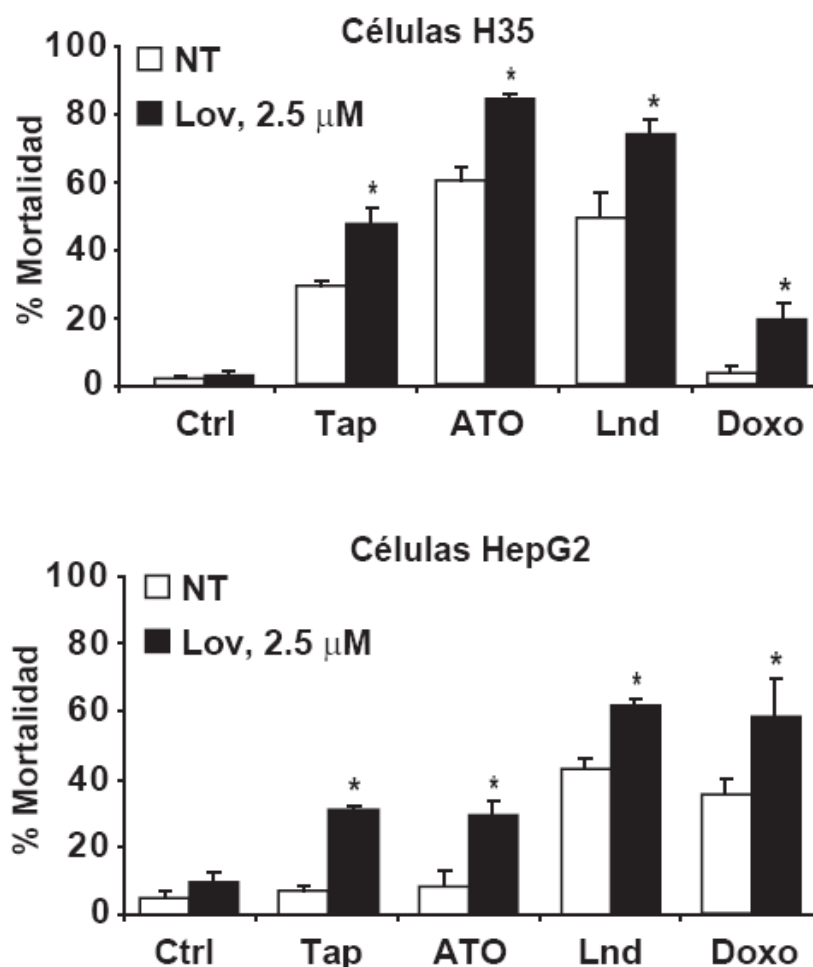


Figura 35. Células H35 o HepG2 no tratadas (NT) o tratadas con lovastatina durante 24 h fueron expuestas a tapsigargina (Tap, 0.2 μ M), lonidamina (Lnd, 0.2 mM), trióxido de arsénico (ATO, 5 μ M) y doxorubicina (Doxo, 1 μ M). La mortalidad celular se determinó por exclusión de azul de tripan. Al menos 100 células de cuatro campos distintos se contaron y se expresaron como porcentaje total. Valores expresados como media \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$ respecto a células no tratadas (NT).

Aunque en distintos grados, el pretratamiento con lovastatina sensibilizó significativamente tanto a las células H35 como a las HepG2, frente a tapsigargina, trióxido de arsénico, lonidamina y doxorubicina (fig. 35). Con el fin de determinar si la muerte celular observada era apoptótica, se realizaron medidas de actividad de caspasa-3 a distintos tiempos y tinción con Hoescht-33258, empleando las mismas condiciones de tratamiento.

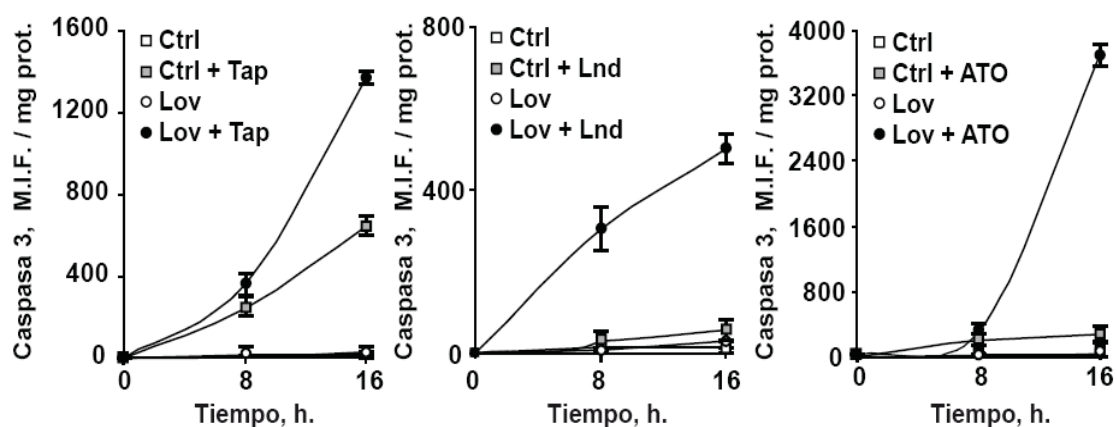


Figura 36. Actividad caspasa-3 de células H35 tratadas con tapsigargina (Tap, 0.2 μ M), lonidamina (Lnd, 0.2 mM) o trióxido de arsénico (ATO 5 μ M) durante 24 h con o sin preincubación con lovastatina (2.5 μ M durante 24 h). La actividad caspasa-3 se determinó a partir de la fluorescencia de los fragmentos AMC. Los resultados se expresan como medias de intensidad de fluorescencia (MIF) \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes.

El tratamiento con lovastatina, más la posterior incubación con las distintas drogas, produjo un aumento significativo en la actividad caspasa-3, (fig. 36).

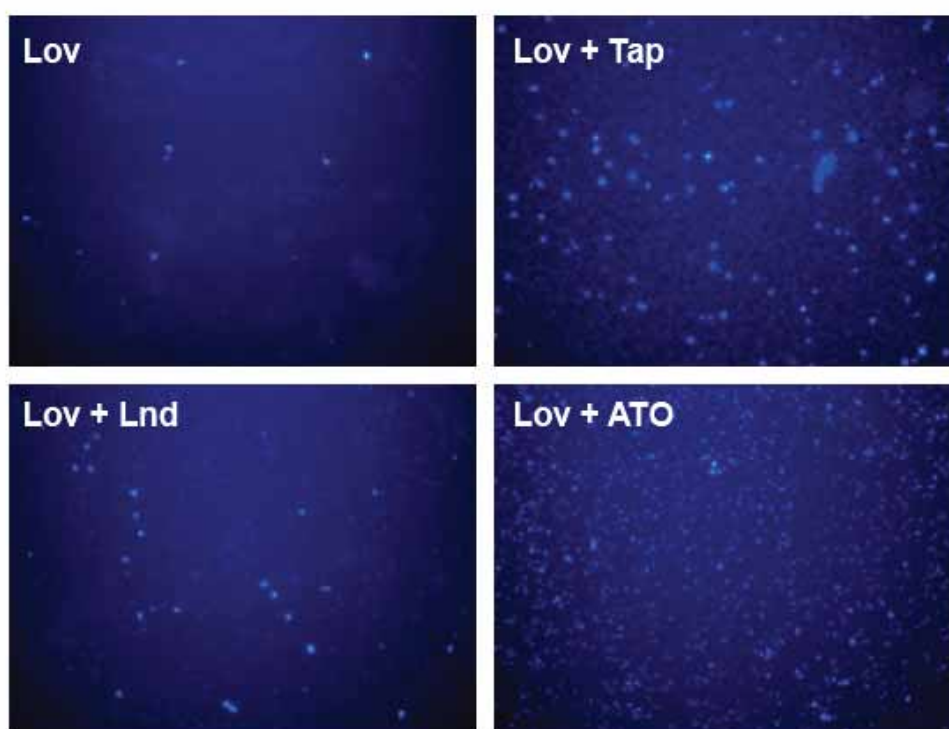


Figura 37. Condensación de la cromatina. Células H35 se trataron con tapsigargina (Tap, 0.2 μ M), lonidamina (Lnd, 0.2 mM) o trióxido de arsénico (ATO 5 μ M) durante 24 h con o sin preincubación con lovastatina (2.5 μ M durante 24 h). Se tiñeron con Hoescht-33258 y se examinó la morfología de la cromatina por microscopía de fluorescencia. Representativo de 3 experimentos independientes que mostraron resultados similares.

La tinción de las células con Hoescht-33258 y posterior análisis mediante microscopía de fluorescencia, mostró cambios morfológicos como condensación y fragmentación nuclear indicando inequívocamente que la muerte celular observada era apoptótica (fig. 37).

En paralelo, empleamos la droga bafilomicina A, un inhibidor selectivo de la ATPasa de protones que produce disfunción lisosomal y promueve una muerte apoptótica independiente de mitocondria (Hishita et al., 2001).

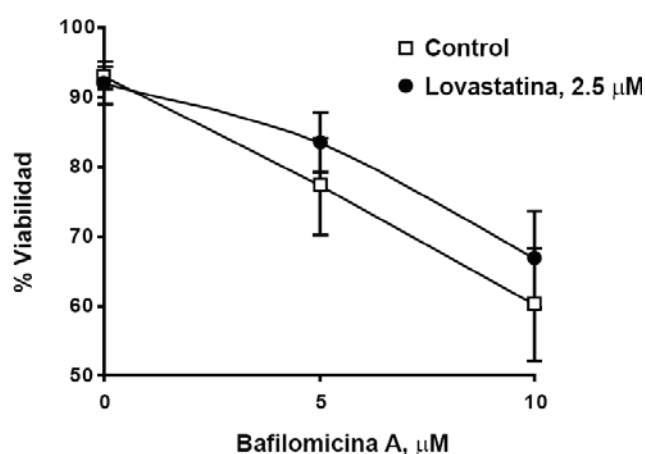


Figura 38. Viabilidad de células H35 expuestas a las dosis indicadas de bafilomicina A (24 h), tratadas o no con lovastatina 2.5 μM . Se determinó por exclusión de azul de tripan. Al menos 100 células de cuatro campos distintos se contaron y se expresaron como porcentaje total. Valores expresados como media \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Las células H35 no mostraron cambios en la susceptibilidad frente a la bafilomicina A al ser pretratadas con lovastatina (fig. 38).

En paralelo, se realizaron tinciones inmunocitoquímicas para analizar la liberación de citocromo c de la mitocondria al citosol.

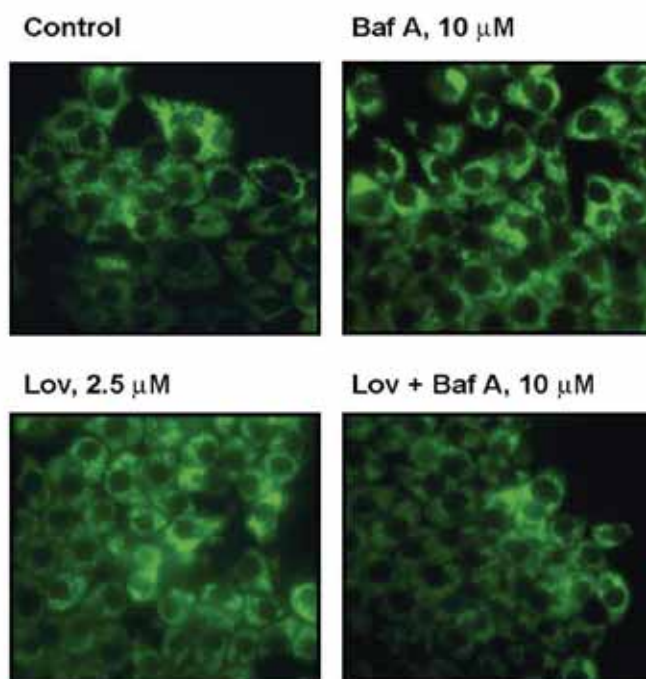


Figura 39. En células H35, tratadas o no 24 h con lovastatina 2.5 μM , se analizó la liberación de citocromo c tras la incubación con bafilomicina A (10 μM , 24h), por microscopía de fluorescencia usando un anticuerpo de ratón anti-citocromo c.

No se observaron diferencias en cuanto a liberación de citocromo c al tratar con bafilomicina A células incubadas con lovastatina respecto a las no-tratadas (fig. 39). Estos resultados sugieren que el efecto sensibilizador de la estatina es específico para drogas que actúan sobre la mitocondria.

La lovastatina inhibe el enzima HMG-CoA reductasa, el enzima limitante de la vía de síntesis de isoprenoides además del colesterol y puede afectar vías de señalización celular importantes para la célula. Por ejemplo, el tratamiento con lovastatina impide la farnesilación de proteínas como las de la familia Rho, involucradas en proliferación y crecimiento celular. Para asegurar que la sensibilización observada se debía al colesterol y no a otro isoprenoide, se usaron los siguientes compuestos:

- **Mevalonato:** producto del enzima HMG-CoA reductasa e intermediario en la vía de síntesis de colesterol, y por tanto por debajo de la inhibición de la lovastatina.
- **HPFA:** ácido α -hidroxifarnesilfosfónico, inhibidor del enzima farnesiltransferasa; responsable de la síntesis de isoprenoides no-esteroideos (ubiquinona, dolicoles...) y permite la farnesilación de proteínas.

Se realizaron distintos experimentos en los que se preincubó células H35 con distintas combinaciones de lovastatina mevalonato y HPFA; para después exponerlas a doxorubicina.

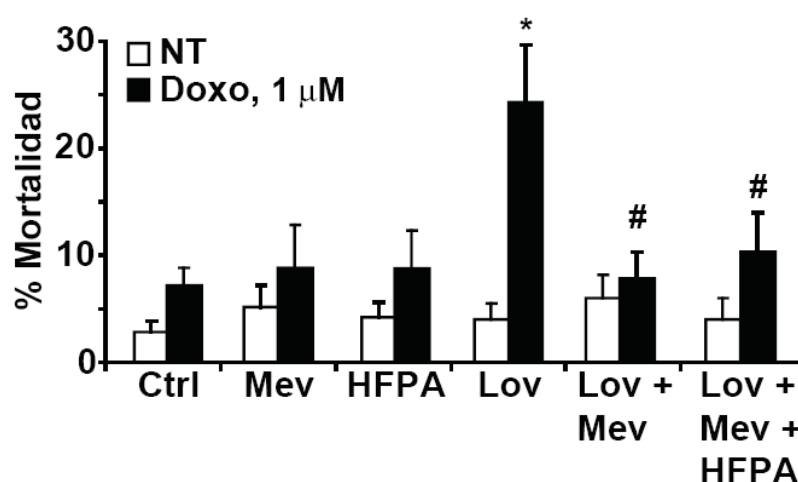


Figura 40. Efecto del mevalonato y el inhibidor de la farnesil transferasa en el incremento de la susceptibilidad a la doxorubicina inducida por la lovastatina en células H35. Células no tratadas (NT) ,o incubadas con lovastatina 2.5 μM durante 24 h con o sin mevalonato (0.5 mM) o ácido α-hidroxfarnesilfosfónico (HPFA, 1 μM) se expusieron a doxorubicina 1 μM durante 24 h. Valores expresados como media ± desviación estándar de 3 experimentos independientes.

El tratamiento con mevalonato o HPFA, por sí solo no tuvo ningún efecto sensibilizador frente a la acción de la doxorubicina, mientras que la lovastatina potenció de manera muy significativa su efecto citotóxico (fig. 40). Al combinar lovastatina y mevalonato, se revirtió el incremento de la mortalidad inducida por doxorubicina. Al tratar de forma conjunta con lovastatina, mevalonato y HPFA, condiciones en las que se mantiene la síntesis de esteroides, también se observó resistencia frente a la acción citotóxica del quimioterapéutico. Estos resultados indican que la sensibilización celular frente a esta droga al tratar con lovastatina, se debe a su acción sobre la síntesis de esteroides y es independiente de la vía no-esteroidea. El conjunto de estos datos sugieren que la acumulación de colesterol, y no de isoprenoides, confiere resistencia a estas líneas celulares frente a los distintos agentes quimioterapéuticos.

4.2.2 Inhibición del enzima escualeno sintasa: YM-53601

Con el fin de confirmar en el papel específico del colesterol en la resistencia de las células de carcinoma hepatocelular frente a los distintos agentes quimioterapéuticos,

empleamos un inhibidor más específico de la síntesis de colesterol: el YM-53601, que actúa, al igual que el ácido zaragóxico, sobre el enzima escualeno sintasa (Ugawa et al., 2000). Este enzima, se encuentra por debajo del HMG-CoA reductasa en la vía de síntesis de isoprenoides, con lo que su inhibición no tiene un efecto tan amplio sobre estos compuestos, y sólo afecta a la síntesis de esteroides (fig. 41).

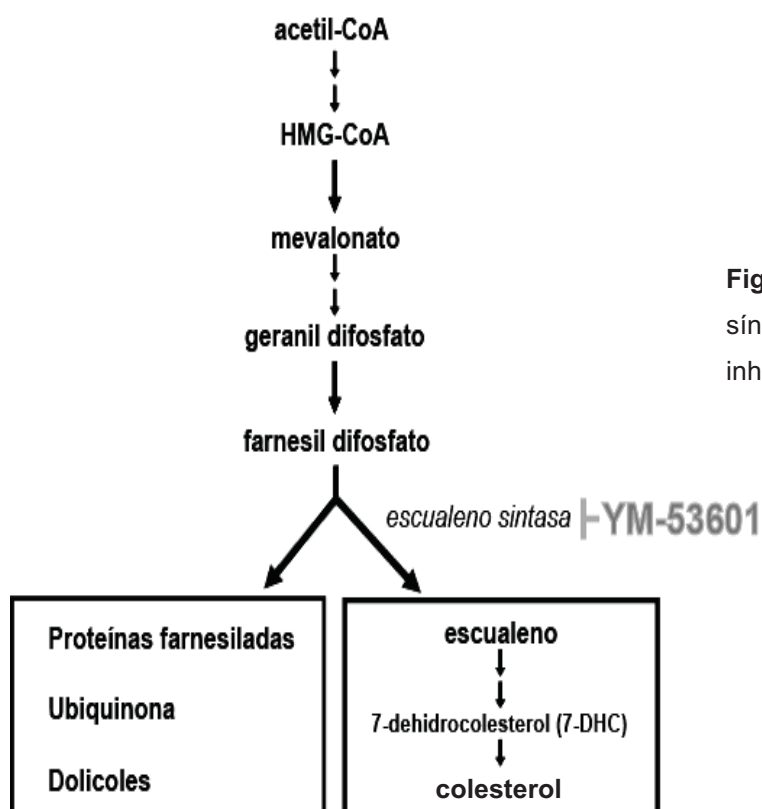


Figura 41. Esquema de la vía de síntesis de colesterol. Acción inhibitoria del YM-53601.

Se trataron las células de carcinoma hepatocelular H35 y HepG2 con YM-53601, a una dosis subtóxica, y se evaluó su acción sobre el contenido de colesterol en la mitocondria. El tratamiento con este inhibidor, disminuyó los niveles mitocondriales de colesterol en ambas líneas celulares, de forma parecida a lo que se había observado al tratar con lovastatina (fig 42).

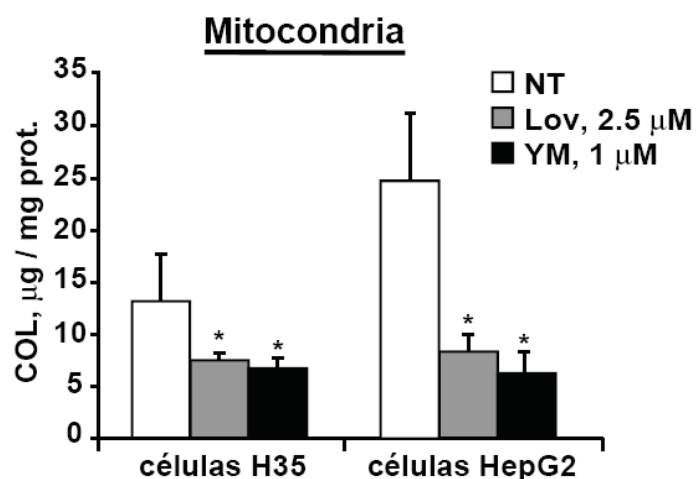


Figura 42. Niveles mitocondriales de colesterol total de células H35 y HepG2 tras 24 h de tratamiento con el inhibidor de la HMG-CoA reductasa, lovastatina (Lov, 2.5 µM), o con el inhibidor de la escualeno sintasa YM-53601 (YM, 1 µM). Valores expresados como media ± desviación estándar de al menos 4 experimentos independientes. * $p < 0.05$ respecto a células no tratadas (NT).

Al igual que con la estatina, combinamos el tratamiento de YM-53601 con los agentes quimioterapéuticos de acción mitocondrial.

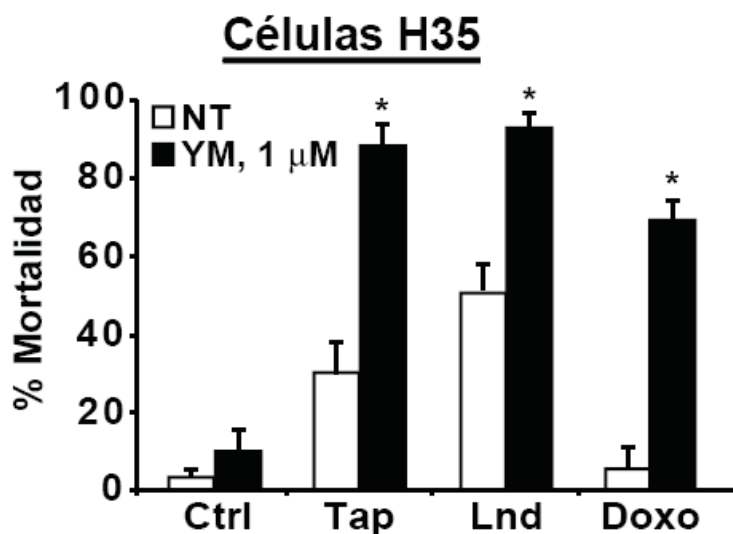


Figura 43. Células H35 no tratadas (NT) o tratadas con YM-53601 1 µM durante 24 h, fueron expuestas a taspigargina (Tap, 0.2 µM), lonidamina (Lnd, 0.2 mM), trióxido de arsénico (ATO, 5 µM) y doxorubicina (Doxo, 1 µM). La mortalidad celular se determinó por exclusión de azul de tripan. Al menos 100 células de cuatro campos distintos se contaron y se expresaron como porcentaje total. Valores expresados como media ± desviación estándar de 3 experimentos independientes. * $p < 0.01$ respecto a células no tratadas (NT).

El tratamiento con YM-53601, sensibilizó a las células frente a los quimioterapéuticos de acción mitocondrial estudiados (fig. 43); de forma similar a lo que se había observado con la lovostatina.

Para comprobar que su efecto sensibilizador se debía únicamente a su acción sobre el colesterol, se combinó la incubación con YM-53601, con dos intermediarios de la ruta biosintética de colesterol: mevalonato (Mev) y 7-dehidrocolesterol (7-DHC). El primero es el producto de la HMG-CoA reductasa y está por encima del escualeno sintasa; y el segundo es un precursor directo del colesterol.

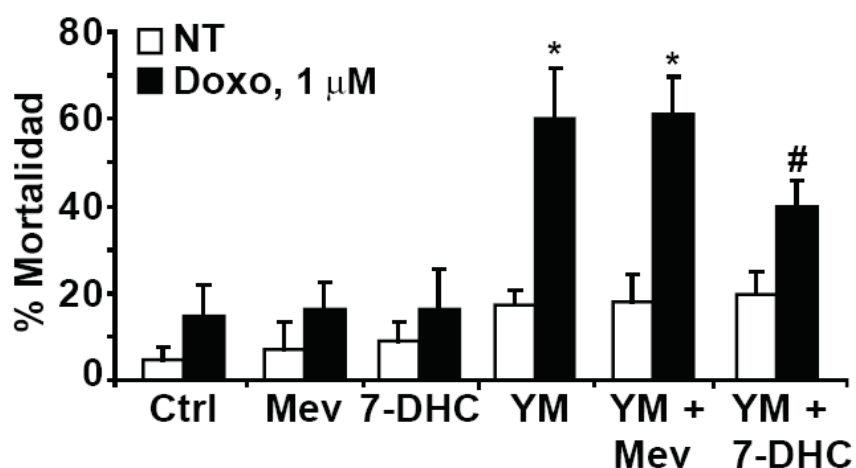


Figura 44. Células H35 incubadas durante 24 h con o sin YM-53601, con mevalonato (0.5 mM) o 7-dehidrocolesterol (7-DHC, 0.5 μg/ml), fueron expuestas 24 h a doxorubicina (Doxo, 1 μM). La mortalidad celular se determinó por exclusión de azul de tripan. Al menos 100 células de cuatro campos distintos se contaron y se expresaron como porcentaje total. Valores expresados como media \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes. * $p < 0.01$ respecto a células no tratadas. # $p < 0.01$ respecto a las tratadas con YM-53601 y expuestas a doxorubicina.

El tratamiento de las células H35 con mevalonato o 7-DHC, por sí solo no tuvo ningún efecto sensibilizador frente a la acción de la doxorubicina; mientras que el tratamiento con YM-53601 potenció de manera muy significativa su efecto citotóxico (fig. 44). Al combinar el inhibidor de la escualeno sintasa y el mevalonato, no hubo reversión de la mortalidad. En cambio al tratar las células con YM-53601 y 7-DHC, se revirtió de forma significativa la acción citotóxica de la doxorubicina (fig. 44).

En conjunto, los datos obtenidos hasta el momento sugerían que el colesterol mitocondrial estaba involucrado en la resistencia del carcinoma hepatocelular frente a

drogas quimioterapéuticas. Y esta resistencia parecía ser independiente de la alteración metabólica de otros isoprenoides.

4.3 Sensibilización por la disminución del colesterol mitocondrial

Para mostrar de manera más específica que el enriquecimiento de colesterol observado en las mitocondrias de las células de carcinoma hepatocelular contribuye a la resistencia frente a la quimioterapia de acción mitocondrial, se investigó el papel de la proteína StAR que se encarga del transporte intramitocondrial de colesterol y regula la síntesis de esteroides en los tejidos especializados (Hall et al., 2005; Soccio and Breslow, 2004). Silenciando esta proteína, se bloquearía específicamente el transporte de colesterol a este orgánulo, validando los resultados obtenidos en mitocondrias aisladas.

En primer lugar, se comprobaron los niveles de expresión de StAR en extractos celulares de las líneas celulares H35 y HepG2, y se compararon con homogenados de hígado de rata y de hígado humano.



Figura 45. *Western blot* representativa que muestra la abundancia de la proteína StAR en extractos celulares de H35 y HepG2, y en homogenados de hígados de rata y humano. La proteína β -actina se visualizó como control de carga. Se realizaron 3 experimentos independientes obteniendo resultados similares.

Se observó una clara sobreexpresión de la proteína en ambas líneas celulares respecto a sus controles, especialmente en el caso de las células HepG2 (fig. 45), que correlacionaban directamente con los niveles de colesterol mitocondriales observados en ambos tipos celulares (fig. 2).

A continuación, se disminuyó selectivamente la expresión de esta proteína mediante el uso de ARN de interferencia (StAR ARNi) especialmente dirigido contra el ARN

mensajero (ARNm) de StAR. Los ARN de interferencia (ARNi) empleados eran comerciales y específicos para cada especie: humano (HepG2) y rata (H35).

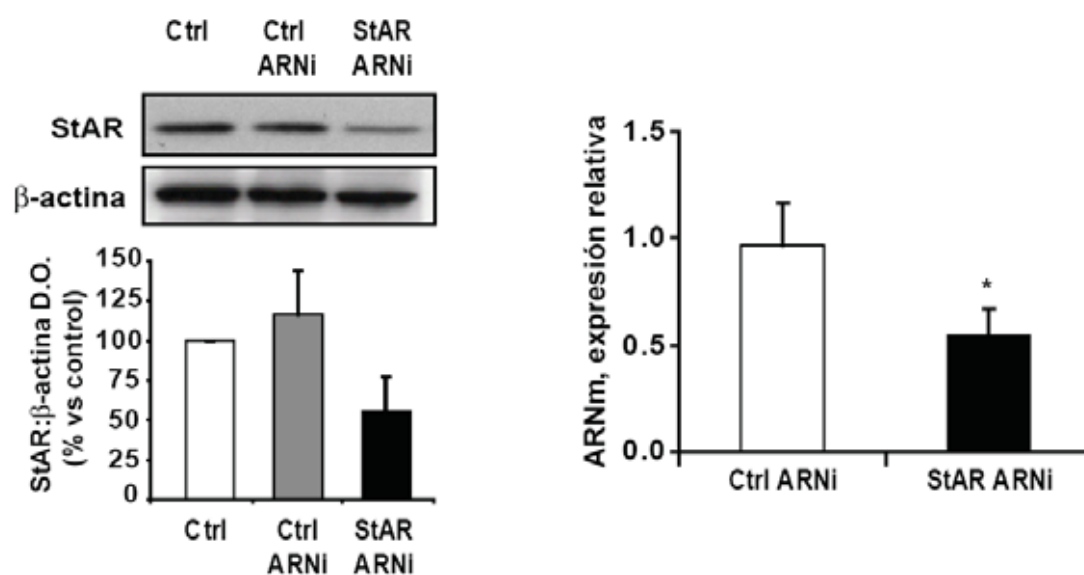


Figura 46. Silenciamiento del ARN mensajero de la proteína StAR. Células HepG2 fueron transfectadas con ARNi StAR o ARNi control (ARNi ctrl) y se cambió el medio. Tras 48 horas los niveles de la proteína StAR se cuantificaron por *western blot* a partir de extractos celulares (izquierda, n=3), y los niveles de ARNm por RT-PCR a tiempo real (derecha, n=3)

Tras 48 h de transfección con ARNi contra StAR se detectó un descenso significativo tanto de la expresión de la proteína como del ARNm, comparado con células transfectadas con ARNi control (fig. 46). Se realizó tanto para HepG2 como para H35 (no se muestran los datos), obteniendo resultados similares.

Para comprobar el efecto del silenciamiento de StAR sobre el colesterol mitocondrial, se trataron ambas líneas celulares con sus respectivos ARNi, se aislaron sus mitocondrias y se determinó su colesterol.

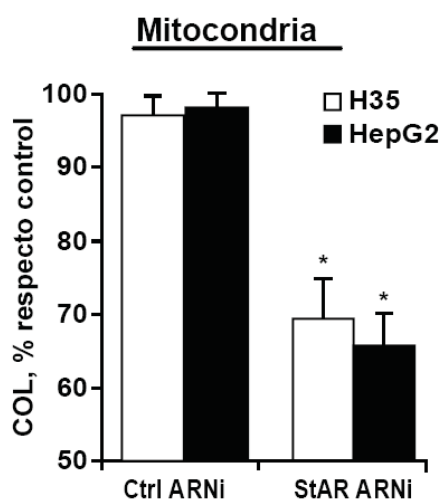


Figura 47. Colesterol mitocondrial (COL) de las células HepG2 y H35, 48 horas después del silenciamiento del ARNm de la proteína StAR. Expresado como porcentaje respecto a células no tratadas. Valores expresados como media \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Se observó un descenso significativo de aproximadamente un 30 % en el colesterol mitocondrial respecto a sus controles, 48 horas después de la transfección (fig. 47). A continuación, se expusieron las células transfectadas a los distintos agentes quimioterapéuticos de acción mitocondrial que se habían usado anteriormente.

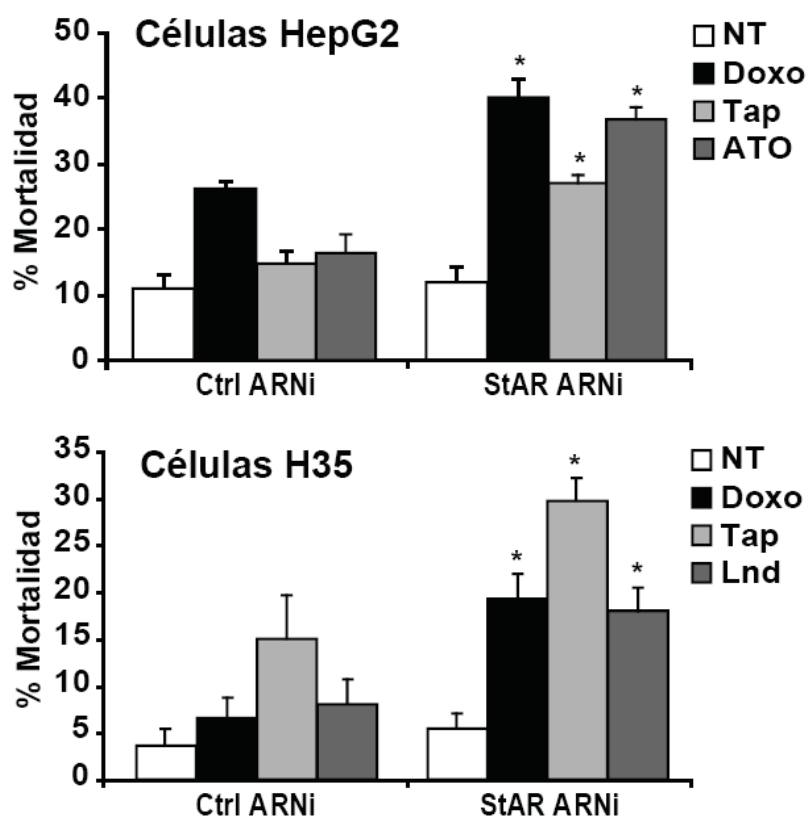


Figura 48. 48 horas después de la transfección con ARNi StAR o control (ctrl), ambas líneas fueron expuestas a doxorubicina (Doxo, 1 μ M), tapsigargina (Tap, 0.2 μ M) y lonidamina (Lnd, 0.2 mM). La mortalidad celular se determinó por exclusión de azul de tripan. Al menos 100 células de cuatro campos distintos se contaron y se expresaron como porcentaje total. Valores expresados como media \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$ respecto a células no tratadas (NT).

La transfección de ambas líneas celulares con StAR ARNi produjo una clara sensibilización frente a doxorubicina, taspigargina y lonidamina (fig. 48). Estos resultados validaron los observados con la inhibición de los enzimas HMG-CoA reductasa y escualeno sintasa y confirmaban que el acúmulo de colesterol en la mitocondria de células de carcinoma hepatocelular impide la acción de agentes quimioterapéuticos.

En conjunto, estos resultados apuntan a la mitocondria, y concretamente a su composición lipídica, como uno de los factores que contribuyen al crecimiento y progresión de estos tumores; y constituyen, por tanto, una potencial diana terapéutica.

5 Efecto del colesterol en el tratamiento quimioterapéutico

En vista de los resultados obtenidos *in vitro*, tanto en mitocondria aislada, como sobre todo a nivel celular, nos propusimos trasladar las investigaciones *in vivo*. Para hacerlo se usó un modelo *in vivo* de xenotransplante ectópico que consistía en inyectar subcutáneamente células tumorales (HepG2) en ambos flancos de un ratón atímico inmunodeprimido. En estas condiciones, tras 2-3 semanas se observó un crecimiento tumoral susceptible de ser tratado con estrategias que bloquean la síntesis de colesterol:

- **Atorvastatina:** inhibidor del enzima HMG-CoA reductasa, de la familia de las estatinas, que se había mostrado efectivo en otros estudios tanto para tratar pacientes humanos como en modelos experimentales (Auerbach et al., 1995; Jones et al., 1998).
- **YM-53601:** inhibidor del enzima escualeno sintasa, que se mostró muy efectivo en estudios *in vivo*. (Ugawa et al., 2000)

En primer lugar, determinamos los niveles de colesterol intratumoral en los ratones tratados con ambas drogas, comparando con ratones controles sin tratar.

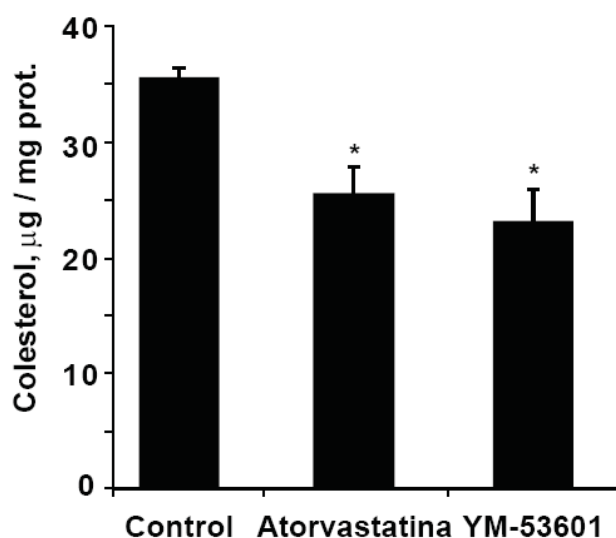


Figura 49. Niveles de colesterol intratumorales de ratones control (tratados con vehículo) o tratados con atorvastatina (10 mg/kg/día) o YM-53601 (15 mg/kg/día). (n = 5)
*p<0.05 respecto control.

El tratamiento con ambas drogas produjo una disminución significativa de los niveles de colesterol intratumoral (fig. 49). Se quiso comprobar que la administración de estas drogas no alteraba la vascularización de los tejidos, y para ello se realizaron cortes

histológicos que se incubaron con un anticuerpo anti-CD34, marcador de células endoteliales (fig. 50).

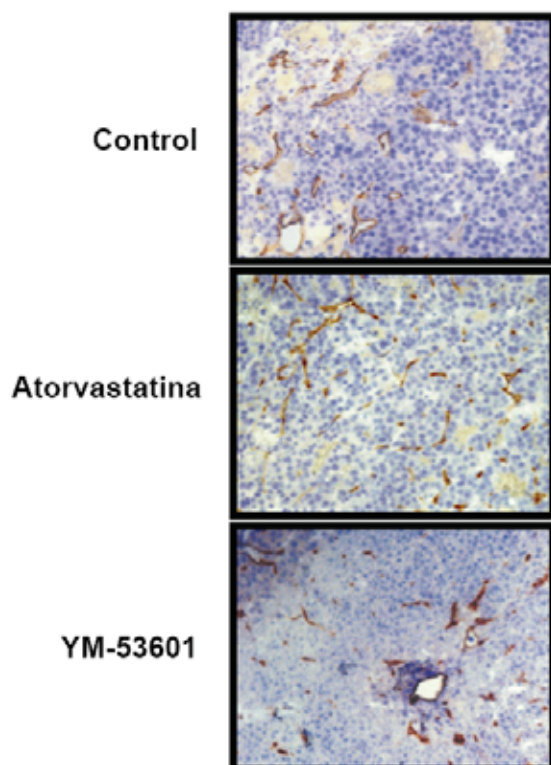


Figura 50. Microvesículas en muestras provenientes de ratones control (tratados con vehículo), o tratados con atorvastatina o YM-53601. Se analizaron por tinción inmunohistoquímica contra el receptor CD34. Imagen representativa de 3 muestras por grupo que mostraron resultados similares.

No se apreciaron diferencias en cuanto a formación de vasos (teñidos de color marrón), demostrando que ninguno de los tratamientos afectaba a la vascularización del tejido tumoral en este modelo.

Realizamos un seguimiento del crecimiento de los tres grupos experimentales, tanto a través de los niveles séricos de alfa-fetoproteína (no se muestra), como del tamaño de los tumores.

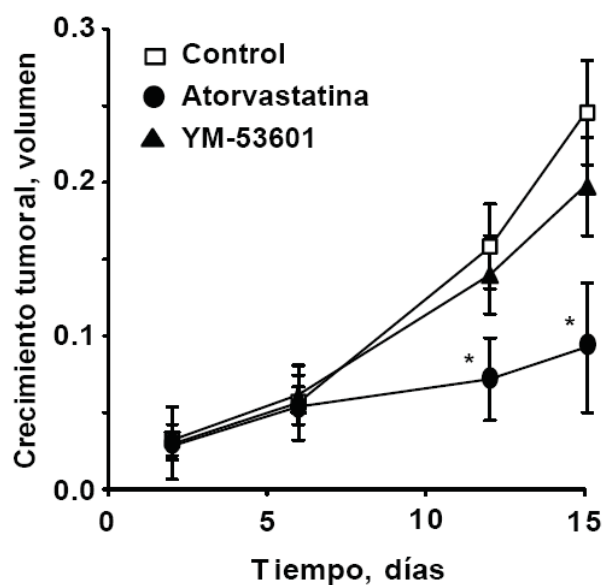


Figura 51. Crecimiento tumoral medido periódicamente a los días indicados de tratamiento.

$$\text{Volumen} = \text{longitud} \times \text{amplitud}^2 \times 0.5$$

El experimento se realizó dos veces con resultados similares. * $p < 0.05$ respecto a los ratones tratados con vehículo.

Los ratones que habían sido tratados con atorvastatina experimentaron un crecimiento significativamente más lento del tumor, mientras que los tratados con YM-53601 presentaban un patrón igual al de los controles (fig. 51). Esto indica que la inhibición de la progresión tumoral por las estatinas podría ser en parte causada por el descenso en la síntesis de isoprenoides, tal y como apuntaban algunos estudios previos (Demierre et al., 2005; Liao and Laufs, 2005).

Tras 2 semanas de tratamiento, a la mitad de los animales se les inyectó intraperitonealmente doxorubicina y se realizó un seguimiento del crecimiento de los tumores (fig. 52).

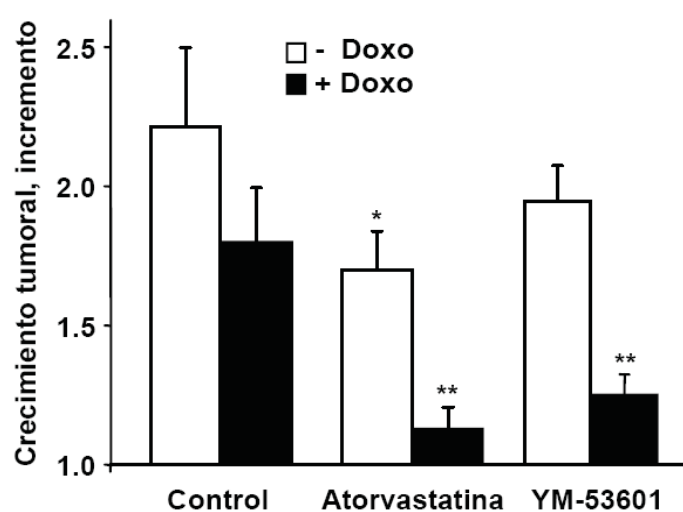


Figura 52. Después de dos semanas de tratamiento, algunos animales recibieron una inyección intraperitoneal de doxorubicina (10 mg/kg). El incremento del crecimiento tumoral fue evaluado en cada grupo experimental (n=5) mediante el cálculo de los cambios de tamaño del tumor después de la administración del agente quimioterapéutico. El experimento se realizó dos veces obteniendo resultados similares. *p<0.05 respecto a ratones controles tratados con doxorubicina.

El tratamiento con doxorubicina no redujo significativamente el crecimiento tumoral en los ratones controles. Sin embargo, prácticamente lo detuvo en aquellos que habían sido tratados previamente con atorvastatina o con YM.53601, demostrando que el colesterol es responsable, al menos parcialmente, de la resistencia de estas células tumorales a la quimioterapia.

Finalmente, se realizaron tinciones TUNEL de cortes histológicos de los tumores tras el tratamiento con doxorubicina para determinar la relevancia de la apoptosis en dicho fenómeno de sensibilización.

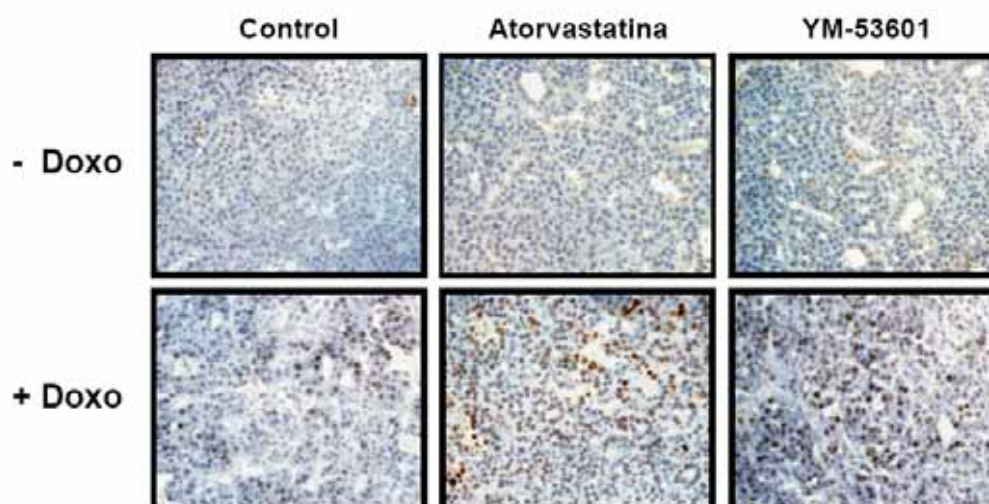


Figura 53. La apoptosis inducida por el agente quimioterapéutico doxorubicina en los tumores de los animales tratados con estatinas (atorvastatina) o con el inhibidor del enzima escualeno sintasa (YM-53601) fue analizada por tinción TUNEL-positiva de cortes histológicos. Imágenes representativas de 3 muestras por grupo mostrando resultados similares.

Se observaron un mayor número de células apoptóticas (tinción marrón), en aquellos ratones tratados de forma conjunta con atorvastatina o YM-53601, y doxorubicina (fig. 53). Además, se mostraron igualmente efectivas ambas drogas, siempre combinadas con el agente quimioterapéutico.

En resumen, estos resultados ponen de manifiesto la importancia del colesterol mitocondrial como modulador de la respuesta del carcinoma hepatocelular frente a la quimioterapia *in vivo*.

Discusión

1. Papel del colesterol en la permeabilización mitocondrial

Se había descrito que los hepatomas heterotópicos de Morris en modelos de xenotransplante (*xenograft*) en ratas Buffalo presentaban un enriquecimiento en los niveles de colesterol de sus mitocondrias, interpretándose como una de las consecuencias de la disfunción mitocondrial característica de las células cancerígenas (Siperstein, 1995). En el presente estudio, hemos investigado el papel de la acumulación de colesterol en las mitocondrias de células de carcinoma hepatocelular (CHC) en respuesta a la quimioterapia *in vitro* e *in vivo*, y los mecanismos implicados.

En primer lugar, confirmamos que líneas celulares de CHC de rata y de humano (H35 y HepG2 respectivamente), presentaban niveles incrementados de colesterol en sus mitocondrias con respecto a las aisladas de hígados de rata y humano sanos, sin que se observaran alteraciones significativas en los niveles de fosfolípidos totales; tal y como se había descrito previamente en mitocondrias de hepatomas sólidos comparado con el hígado huésped (Campbell et al., 2002; Crain et al., 1983; Feo et al., 1973; Feo et al., 1975). Paralelamente, se obtuvieron resultados similares con tumores primarios de pacientes con carcinoma hepatocelular. Cerca del 70 % del colesterol encontrado en las mitocondrias aisladas de células de carcinoma hepatocelular estaba en forma libre, que, en contraste con el esterificado, se sabe que regula la dinámica y el parámetro de ordenamiento de membrana (Colell et al., 2003; Gimpl et al., 1997; Mari et al., 2004; Maxfield and Tabas, 2005; Van Blitterswijk et al., 1981). Además, el incremento del contenido de colesterol en la mitocondria de CHC se correlacionaba con la sobreexpresión de SREBP-2 y HMG-CoA reductasa, validando la falta de regulación del metabolismo de colesterol observado en las células cancerígenas (Demierre et al., 2005; Duncan et al., 2004; Siperstein, 1995) y su utilidad para examinar la susceptibilidad a la quimioterapia.

Con el fin de estudiar el mecanismo por el cual el colesterol mitocondrial media la resistencia a la quimioterapia, nos centramos en primer lugar en las propiedades de membrana de las mitocondrias aisladas de CHC. Observamos como las mitocondrias de

las células HepG2 y H35 presentaban un parámetro de ordenamiento de membrana (S_{DPH}) más elevado, es decir, unas membranas más rígidas. Esta alteración en sus propiedades físico-químicas, se tradujo en un peor funcionamiento de la cadena respiratoria, expresado como alteraciones del parámetro ACR, tal y como había sido descrito previamente (Feo et al., 1975; Fleischer et al., 1962). Sin embargo, este cambio en la fluidez de membrana no afectó significativamente ni los niveles de glutatión mitocondrial ni la cinética de transporte, a pesar de que se había descrito previamente la disminución de ambos por el enriquecimiento mitocondrial de colesterol (Colell et al., 1997; Lluís et al., 2003; Mari et al., 2006). Observamos como la expresión de uno de sus transportadores, el de 2-oxoglutarato (Coll et al., 2003), estaba inducida, sugiriendo la posible activación en células tumorales de mecanismos adaptativos frente a los cambios en las propiedades físico-químicas de las membranas mitocondriales.

El incremento en el parámetro de ordenamiento de membrana mostrado por las mitocondrias de las líneas celulares de CHC H35 y HepG2, podía ser revertido mediante la extracción del colesterol con MCD o la fluidificación con A_2C . Esto se traducía en un incremento en la permeabilización de la membrana mitocondrial y en la salida de citocromo c y Smac/DIABLO en respuesta a atractilósido, anión superóxido, Ca^{2+} y Bax activado por tBid. Una pieza importante para evidenciar la especificidad del colesterol en la regulación de la permeabilización de la membrana mitocondrial fue el enriquecer *in vitro* en colesterol mitocondrias aisladas de hígado de rata. Con ello conseguimos los mismos niveles observados en las células H35 y se reprodujo la resistencia a la liberación de proteínas intermembrana inducida por atractilósido, por Ca^{2+} y por Bax activado. En línea con estas observaciones, liposomas con un alto contenido en colesterol en su composición se mostraron también resistentes a la permeabilización por Bax; recuperando la sensibilidad a Bax tras el tratamiento con MCD o el agente fluidificante A_2C . En paralelo, el contenido en colesterol inhibió de forma dosis-dependiente la permeabilización de las vesículas inducida por melitina, compuesto que se ha descrito forma poros lipídicos toroidales en las membranas dependientes de colesterol (Allende et al., 2005). Asimismo, se ha descrito como la curvatura positiva en la monocapa contribuye a la permeabilización de la membrana mitocondrial por Bax (Terrones et al., 2004), apuntando a la posibilidad que el colesterol estabilice las membranas mitocondriales contra la acción de Bax induciendo curvatura negativa, acumulándose en las regiones de alta curvatura de las membranas (Wang et al., 2007). Observamos como el colesterol disminuyó la capacidad de Bax

para penetrar la membrana, paso crítico en la acción permeabilizadora de Bax. En conjunto estos resultados demuestran como el colesterol, modulando el orden y la curvatura de las membranas mitocondriales, regula la formación o actividad de los poros lipídicos, y con ello, la susceptibilidad a la muerte celular.

En línea con nuestras investigaciones, resultados recientes en liposomas confirmaron que la activación mitocondrial de Bax es inhibida por el colesterol (Lucken-Ardjomande et al., 2008). Además, estos estudios muestran como en mitocondrias aisladas de células HeLa el tratamiento con U18666A, que causa acumulación de colesterol en este orgánulo, retrasa la liberación de Smac/DIABLO y citocromo c, al igual que la oligomerización de Bax, ejerciendo una protección parcial contra la inducción apoptótica por estrés.

2. Papel del colesterol en la resistencia del CHC a la quimioterapia

Nuestros resultados revelan que la resistencia que presentan las células de CHC a la muerte celular inducida por quimioterapia puede revertirse al reducir los niveles de colesterol por inhibición de los enzimas HMG-CoA reductasa o escualeno sintasa. A pesar de que esta estrategia disminuye el colesterol en distintos tipos de membranas, además de las mitocondriales, como por ejemplo la membrana plasmática, en donde se ha visto que los niveles de colesterol modulan la terapia contra el cáncer regulando las vías de supervivencia como la de Akt (Li et al., 2006; Paris et al., 2002; Zhuang et al., 2005); nuestros estudios aportan diferentes evidencias que apoyan el papel específico del colesterol mitocondrial modulando la susceptibilidad de las células de CHC a la quimioterapia.

En primer lugar, demostramos la sensibilización de las células HepG2 y H35 frente a diferentes estímulos que actúan sobre la mitocondria, como la tapsigargina, trióxido de arsénico, lonidamina y doxorubicina, tras la reducción del colesterol celular provocada por la inhibición de los enzimas HMG-CoA reductasa. La lonidamina induce apoptosis por formación del PMT actuando sobre la isoforma del translocador de nucleótidos de adenosina, ANT1 (Don et al., 2003; Le Bras et al., 2006). Se han descrito cuatro isoformas de ANT, codificadas por genes íntimamente relacionados que pertenecen a la familia de transportadores mitocondriales. ANT, a su vez, es uno de los componentes principales del PMT y que media la muerte celular por permeabilización de la membrana mitocondrial (Halestrap and Brennerb, 2003). Estudios recientes en mitocondrias de células murinas carentes de ANT1 y ANT2, cuestionan el papel de ANT en la formación del PMT (Kokoszka et al., 2004). Sin embargo, cabe destacar que las mitocondrias deficientes en ANT1/ANT2 mantienen la capacidad de permeabilización de la membrana mitocondrial por el catión calcio, aunque con dosis mayores, lo cual podría ser debido a la compensación funcional por parte de una nueva isoforma de ANT identificada (Dolce et al., 2005) o por otros transportadores mitocondriales con la capacidad de formar poros en la membrana interna, como el de ornitina/citrulina o el de fosfato (Palmieri, 2004).

La muerte celular provocada por estos quimioterapéuticos era mayoritariamente apoptótica, ya que aumentó la actividad caspasa-3 y la tinción por Hoescht al tratar estas células. La incubación con bafilomicina A, un inhibidor selectivo de la ATPasa de

protones que produce disfunción lisosomal y promueve muerte independiente de mitocondria (Hishita et al., 2001), provocó un descenso de la viabilidad celular independiente del tratamiento con lovastatina, corroborando que esta estatina sensibiliza frente a quimioterapéuticos por su acción sobre el colesterol mitocondrial. Al añadir mevalonato a la incubación con lovastatina, revertimos la muerte celular producida por la doxorubicina, con o sin la presencia del inhibidor del enzima farnesiltransferasa (HPFA) en el medio, demostrando que era la acumulación de esteroides (entre ellos el colesterol) la que confería resistencia a este tipo de células.

Paralelamente, demostramos la sensibilización de las células H35 frente a taspigargina, lonidamina y doxorubicina, tras la reducción del colesterol celular provocada por la inhibición del enzima escualeno sintasa con YM-53601. Observamos como la sensibilización a la doxorubicina, no se revertía con mevalonato, pero si con 7-dehidroxicolesterol (precursor directo del colesterol), descartando así la posible implicación de otro isoprenoide distinto del colesterol en la susceptibilidad de las células frente a las drogas quimioterapéuticas.

Se obtuvieron más evidencias del papel del colesterol mitocondrial en la susceptibilidad a la quimioterapia con el silenciamiento de StAR. StAR es un polipéptido responsable del transporte intramitocondrial de colesterol (Hall et al., 2005; Soccio and Breslow, 2004), que está sobreexpresado en células HepG2 y H35. El silenciamiento de StAR por ARN de interferencia sensibilizó a ambas líneas celulares a la muerte celular inducida por los quimioterapéuticos doxorubicina, taspigargina y trióxido de arsénico. Esta sensibilización podría reflejar la disminución del transporte de colesterol desde la membrana mitocondrial externa a la interna. Sin embargo, nuestros resultados indican que la disminución de StAR por ARNi provocó un descenso de los niveles de colesterol en la mitocondria. Esto implica una menor entrega de colesterol a la mitocondria desde fuentes extramitocondriales, que es llevada a cabo por miembros de la familia StART (*StAR-related lipid transfer*). A pesar de que el mecanismo de la proteína StAR se conoce vagamente, estudios recientes muestran que interacciona con proteínas de la membrana mitocondrial externa como VDAC1 y el transportador de fosfato (Bose et al., 2008). Se cree que StAR actúa en colaboración con miembros de la familia StART a través de su interacción con proteínas de la membrana mitocondrial externa para entregar el colesterol a la mitocondria, aunque este hecho todavía debe ser investigado con mayor profundidad. En conjunto, estos resultados sugieren que el enriquecimiento

de la mitocondria en colesterol juega un papel importante en la resistencia a la quimioterapia de acción mitocondrial.

Mediante un modelo de xenotransplante ectópico de carcinoma hepatocelular en ratones atímicos, observamos como el crecimiento tumoral y la susceptibilidad a la quimioterapia eran modulados por la inhibición de los enzimas HMG-CoA reductasa, con atorvastatina, o escualeno sintasa, con YM-53601. En ambos casos dicho tratamiento provocó un descenso significativo de los niveles de colesterol mitocondriales. La vía de síntesis de isoprenoides da lugar a la generación de farnesil difosfato a partir de mevaloanto, punto a partir del cual se ramifica. Y es la rama del escualeno la que acaba produciendo el colesterol. Por otra parte, se sabe que los isoprenoides regulan la función de algunas proteínas a través de modificaciones postraduccionales, como por ejemplo la familia de pequeñas GTPasas Rho, que coordinan muchos aspectos de la motilidad celular a través de la reorganización del citoesqueleto de actina y de la transcripción génica (Demierre et al., 2005; Liao and Laufs, 2005). La isoprenilación es esencial para la capacidad invasiva mediada por Rho de varios tipos de cáncer, como el melanoma, el pancreático y el de mama. (Collisson et al., 2003). En el modelo *xenograft in vivo*, observamos que la inhibición de la HMG-CoA reductasa, pero no de la escualeno sintasa, frenó la progresión tumoral, sugiriendo que la acción de las estatinas se debía a la disminución ejercida sobre la síntesis de todos los isoprenoides y no sólo del colesterol. Sin embargo, la susceptibilidad de los *xenografts* a la quimioterapia se observó tras el tratamiento tanto con estatinas como con la inhibición de la escualeno sintasa, poniendo de manifiesto la relevancia del colesterol, más que la generación de isoprenoides, en la resistencia de las células de carcinoma hepatocelular. Por consiguiente, nuestros resultados junto con otros estudios recientes sobre distintos tipos de cáncer, como el carcinoma humano de próstata (Brusselmans et al., 2007), ponen de manifiesto la importancia de la modulación del colesterol en la terapia antitumoral.

En resumen, se sabe desde hace mucho tiempo que existe una acumulación de colesterol en las membranas celulares de células cancerígenas, incluida la mitocondria. Pero mostramos por primera vez la relevancia, en carcinoma hepatocelular, de la regulación por parte del colesterol de la dinámica de membrana mitocondrial y la modulación de la respuesta a la quimioterapia de acción mitocondrial *in vitro* e *in vivo*. Además, el efecto potenciador de la inhibición de la escualeno sintasa, sin afectar al metabolismo

isoprenoide, valida la especificidad del colesterol en la resistencia a la quimioterapia, y revitaliza el concepto del efecto potencialmente beneficioso de la disminución de colesterol en la terapia antitumoral.

Conclusiones

A partir de los resultados contenidos en el presente trabajo de investigación se extraen las siguientes conclusiones:

1. La acumulación de colesterol observado en las mitocondrias aisladas tanto de líneas celulares de carcinoma hepatocelular (H35 y HepG2) como de muestras de hepatocarcinoma humano, provoca una mayor rigidez de sus membranas que afecta al funcionamiento de la cadena respiratoria y a la penetrabilidad de la proteína Bax, insensibilizándolas a la permeabilización mitocondrial e impidiendo la liberación de proteínas proapoptóticas al citosol.
2. Al disminuir *in vitro* el contenido de colesterol de mitocondrias aisladas de células H35 y HepG2, éstas se sensibilizaron a estímulos que inducen la formación del poro mitocondrial transitorio (atractilósido, anión superóxido y calcio) y a la permeabilización por Bax activado por tBid.
3. Las líneas celulares de carcinoma hepatocelular estudiadas se sensibilizaron a quimioterapéuticos que actúan en la mitocondria al bloquear farmacológicamente la síntesis endógena de colesterol, tanto a nivel del enzima HMG-CoA reductasa como del escualeno sintasa.
4. Resultados similares respecto a la disminución del colesterol mitocondrial y a la sensibilización a los agentes quimioterapéuticos se observaron tras el silenciamiento de la proteína de transporte mitocondrial de colesterol StAR mediante ARNi de interferencia.
5. El tratamiento con inhibidores de la síntesis de colesterol (atorvastatina y YM-53601) combinado con la droga doxorubicina bloqueó el crecimiento tumoral *in vivo*, induciendo apoptosis sin afectar a la vascularización del tejido.

Bibliografía

- Adrain, C., and Martin, S.J. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* 26, 390-397.
- Alirol, E., and Martinou, J.C. (2006). Mitochondria and cancer: is there a morphological connection? *Oncogene* 25, 4706-4716.
- Allende, D., Simon, S.A., and McIntosh, T.J. (2005). Melittin-induced bilayer leakage depends on lipid material properties: evidence for toroidal pores. *Biophys J* 88, 1828-1837.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R., and Martinou, J.C. (2000). Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* 345 Pt 2, 271-278.
- Arora, K.K., and Pedersen, P.L. (1988). Functional significance of mitochondrial bound hexokinase in tumor cell metabolism. Evidence for preferential phosphorylation of glucose by intramitochondrially generated ATP. *J Biol Chem* 263, 17422-17428.
- Auerbach, B.J., Krause, B.R., Bisgaier, C.L., and Newton, R.S. (1995). Comparative effects of HMG-CoA reductase inhibitors on apo B production in the casein-fed rabbit: atorvastatin versus lovastatin. *Atherosclerosis* 115, 173-180.
- Baggetto, L.G., Clottes, E., and Vial, C. (1992). Low mitochondrial proton leak due to high membrane cholesterol content and cytosolic creatine kinase as two features of the deviant bioenergetics of Ehrlich and AS30-D tumor cells. *Cancer Res* 52, 4935-4941.
- Bai, J., Rodriguez, A.M., Melendez, J.A., and Cederbaum, A.I. (1999). Overexpression of catalase in cytosolic or mitochondrial compartment protects HepG2 cells against oxidative injury. *J Biol Chem* 274, 26217-26224.
- Baines, C.P., Kaiser, R.A., Sheiko, T., Craigen, W.J., and Molkenin, J.D. (2007). Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol* 9, 550-555.
- Banker, D.E., Cooper, J.J., Fennell, D.A., Willman, C.L., Appelbaum, F.R., and Cotter, F.E. (2002). PK11195, a peripheral benzodiazepine receptor ligand,

chemosensitizes acute myeloid leukemia cells to relevant therapeutic agents by more than one mechanism. *Leuk Res* 26, 91-106.

- Belzacq, A.S., El Hamel, C., Vieira, H.L., Cohen, I., Haouzi, D., Metivier, D., Marchetti, P., Brenner, C., and Kroemer, G. (2001). Adenine nucleotide translocator mediates the mitochondrial membrane permeabilization induced by lonidamine, arsenite and CD437. *Oncogene* 20, 7579-7587.
- Bertin, J., Armstrong, R.C., Otilie, S., Martin, D.A., Wang, Y., Banks, S., Wang, G.H., Senkevich, T.G., Alnemri, E.S., Moss, B., *et al.* (1997). Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1172-1176.
- Blum, H.E. (2005). Hepatocellular carcinoma: therapy and prevention. *World J Gastroenterol* 11, 7391-7400.
- Bose, M., Whittal, R.M., Miller, W.L., and Bose, H.S. (2008). Steroidogenic activity of StAR requires contact with mitochondrial VDAC1 and phosphate carrier protein. *J Biol Chem* 283, 8837-8845.
- Brusselmans, K., Timmermans, L., Van de Sande, T., Van Veldhoven, P.P., Guan, G., Shechter, I., Claessens, F., Verhoeven, G., and Swinnen, J.V. (2007). Squalene synthase, a determinant of Raft-associated cholesterol and modulator of cancer cell proliferation. *J Biol Chem* 282, 18777-18785.
- Campbell, A.M., Capuano, A., and Chan, S.H. (2002). A cholesterol-binding and transporting protein from rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1567, 123-132.
- Casellas, P., Galiegue, S., and Basile, A.S. (2002). Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. *Neurochem Int* 40, 475-486.
- Castedo, M., Perfettini, J.L., and Kroemer, G. (2002). Mitochondrial apoptosis and the peripheral benzodiazepine receptor: a novel target for viral and pharmacological manipulation. *J Exp Med* 196, 1121-1125.
- Colell, A., Garcia-Ruiz, C., Lluís, J.M., Coll, O., Mari, M., and Fernandez-Checa, J.C. (2003). Cholesterol impairs the adenine nucleotide translocator-mediated mitochondrial permeability transition through altered membrane fluidity. *J Biol Chem* 278, 33928-33935.
- Colell, A., Garcia-Ruiz, C., Morales, A., Ballesta, A., Ookhtens, M., Rodes, J., Kaplowitz, N., and Fernandez-Checa, J.C. (1997). Transport of reduced glutathione

- in hepatic mitochondria and mitoplasts from ethanol-treated rats: effect of membrane physical properties and S-adenosyl-L-methionine. *Hepatology* 26, 699-708.
- Coleman, P.S. (1986). Membrane cholesterol and tumor bioenergetics. *Ann N Y Acad Sci* 488, 451-467.
 - Coll, O., Colell, A., Garcia-Ruiz, C., Kaplowitz, N., and Fernandez-Checa, J.C. (2003). Sensitivity of the 2-oxoglutarate carrier to alcohol intake contributes to mitochondrial glutathione depletion. *Hepatology* 38, 692-702.
 - Collisson, E.A., Kleer, C., Wu, M., De, A., Gambhir, S.S., Merajver, S.D., and Kolodney, M.S. (2003). Atorvastatin prevents RhoC isoprenylation, invasion, and metastasis in human melanoma cells. *Mol Cancer Ther* 2, 941-948.
 - Crain, R.C., Clark, R.W., and Harvey, B.E. (1983). Role of lipid transfer proteins in the abnormal lipid content of Morris hepatoma mitochondria and microsomes. *Cancer Res* 43, 3197-3202.
 - Crompton, M., Virji, S., and Ward, J.M. (1998). Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem* 258, 729-735.
 - Cunningham, C.C., Filus, S., Bottenus, R.E., and Spach, P.I. (1982). Effect of ethanol consumption on the phospholipid composition of rat liver microsomes and mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 712, 225-233.
 - Chai, J., Du, C., Wu, J.W., Kyin, S., Wang, X., and Shi, Y. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406, 855-862.
 - Chautan, M., Chazal, G., Cecconi, F., Gruss, P., and Golstein, P. (1999). Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr Biol* 9, 967-970.
 - Chen, G., and Goeddel, D.V. (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296, 1634-1635.
 - Chi, K.N., Gleave, M.E., Klasa, R., Murray, N., Bryce, C., Lopes de Menezes, D.E., D'Aloisio, S., and Tolcher, A.W. (2001). A phase I dose-finding study of combined treatment with an antisense Bcl-2 oligonucleotide (Genasense) and mitoxantrone in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res* 7, 3920-3927.

- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.
- Davis, S., Weiss, M.J., Wong, J.R., Lampidis, T.J., and Chen, L.B. (1985). Mitochondrial and plasma membrane potentials cause unusual accumulation and retention of rhodamine 123 by human breast adenocarcinoma-derived MCF-7 cells. *J Biol Chem* 260, 13844-13850.
- Decaudin, D., Castedo, M., Nemati, F., Beurdeley-Thomas, A., De Pinieux, G., Caron, A., Pouillart, P., Wijdenes, J., Rouillard, D., Kroemer, G., *et al.* (2002). Peripheral benzodiazepine receptor ligands reverse apoptosis resistance of cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 62, 1388-1393.
- Demierre, M.F., Higgins, P.D., Gruber, S.B., Hawk, E., and Lippman, S.M. (2005). Statins and cancer prevention. *Nat Rev Cancer* 5, 930-942.
- Denmeade, S.R., and Isaacs, J.T. (2005). The SERCA pump as a therapeutic target: making a "smart bomb" for prostate cancer. *Cancer Biol Ther* 4, 14-22.
- Devarajan, E., Sahin, A.A., Chen, J.S., Krishnamurthy, R.R., Aggarwal, N., Brun, A.M., Sapino, A., Zhang, F., Sharma, D., Yang, X.H., *et al.* (2002). Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene* 21, 8843-8851.
- Deveraux, Q.L., and Reed, J.C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13, 239-252.
- Dietschy, J.M., Turley, S.D., and Spady, D.K. (1993). Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J Lipid Res* 34, 1637-1659.
- Dolce, V., Scarcia, P., Iacopetta, D., and Palmieri, F. (2005). A fourth ADP/ATP carrier isoform in man: identification, bacterial expression, functional characterization and tissue distribution. *FEBS Lett* 579, 633-637.
- Don, A.S., Kisker, O., Dilda, P., Donoghue, N., Zhao, X., Decollogne, S., Creighton, B., Flynn, E., Folkman, J., and Hogg, P.J. (2003). A peptide trivalent arsenical inhibits tumor angiogenesis by perturbing mitochondrial function in angiogenic endothelial cells. *Cancer Cell* 3, 497-509.

- Duncan, I.W., Culbreth, P.H., and Burtis, C.A. (1979). Determination of free, total, and esterified cholesterol by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 162, 281-292.
- Duncan, R.E., El-Sohemy, A., and Archer, M.C. (2004). Mevalonate promotes the growth of tumors derived from human cancer cells in vivo and stimulates proliferation in vitro with enhanced cyclin-dependent kinase-2 activity. *J Biol Chem* 279, 33079-33084.
- Egle, A., Harris, A.W., Bouillet, P., and Cory, S. (2004). Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6164-6169.
- Endo, A. (1992). The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J Lipid Res* 33, 1569-1582.
- Feo, F., Canuto, R.A., Bertone, G., Garcea, R., and Pani, P. (1973). Cholesterol and phospholipid composition of mitochondria and microsomes isolated from morris hepatoma 5123 and rat liver. *FEBS Lett* 33, 229-232.
- Feo, F., Canuto, R.A., Garcea, R., and Gabriel, L. (1975). Effect of cholesterol content on some physical and functional properties of mitochondria isolated from adult rat liver, fetal liver, cholesterol-enriched liver and hepatomas AH-130, 3924A and 5123. *Biochim Biophys Acta* 413, 116-134.
- Fernandez-Checa, J.C. (2003). Redox regulation and signaling lipids in mitochondrial apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 304, 471-479.
- Fernandez-Checa, J.C., and Kaplowitz, N. (2005). Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 204, 263-273.
- Fernandez-Checa, J.C., Kaplowitz, N., Garcia-Ruiz, C., Colell, A., Miranda, M., Mari, M., Ardite, E., and Morales, A. (1997). GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *Am J Physiol* 273, G7-17.
- Ferreira, C.G., van der Valk, P., Span, S.W., Jonker, J.M., Postmus, P.E., Kruyt, F.A., and Giaccone, G. (2001). Assessment of IAP (inhibitor of apoptosis) proteins as predictors of response to chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol* 12, 799-805.

- Fleischer, S., Brierley, G., Klouwen, H., and Slautterback, D.B. (1962). Studies of the electron transfer system. 47. The role of phospholipids in electron transfer. *J Biol Chem* 237, 3264-3272.
- Forti, S., and Menestrina, G. (1989). Staphylococcal alpha-toxin increases the permeability of lipid vesicles by cholesterol- and pH-dependent assembly of oligomeric channels. *Eur J Biochem* 181, 767-773.
- Fulda, S., Jeremias, I., and Debatin, K.M. (2004). Cooperation of betulinic acid and TRAIL to induce apoptosis in tumor cells. *Oncogene* 23, 7611-7620.
- Garcia-Ruiz, C., Morales, A., Ballesta, A., Rodes, J., Kaplowitz, N., and Fernandez-Checa, J.C. (1994). Effect of chronic ethanol feeding on glutathione and functional integrity of mitochondria in periportal and perivenous rat hepatocytes. *J Clin Invest* 94, 193-201.
- Gimpl, G., Burger, K., and Fahrenholz, F. (1997). Cholesterol as modulator of receptor function. *Biochemistry* 36, 10959-10974.
- Goldstein, J.L., DeBose-Boyd, R.A., and Brown, M.S. (2006). Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 124, 35-46.
- Green, D.R. (2006). At the gates of death. *Cancer Cell* 9, 328-330.
- Green, D.R., and Evan, G.I. (2002). A matter of life and death. *Cancer Cell* 1, 19-30.
- Greenhouse, W.V., and Lehninger, A.L. (1977). Magnitude of malate-aspartate reduced nicotinamide adenine dinucleotide shuttle activity in intact respiring tumor cells. *Cancer Res* 37, 4173-4181.
- Grundy, S.M. (1983). Absorption and metabolism of dietary cholesterol. *Annu Rev Nutr* 3, 71-96.
- Guan, Z., Grunler, J., Piao, S., and Sindelar, P.J. (2001). Separation and quantitation of phospholipids and their ether analogues by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 297, 137-143.
- Gupta, G.P., and Massague, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127, 679-695.
- Halestrap, A.P., and Brennerb, C. (2003). The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem* 10, 1507-1525.

- Halestrap, A.P., and Davidson, A.M. (1990). Inhibition of Ca²⁺(+)-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem J* 268, 153-160.
- Hall, E.A., Ren, S., Hylemon, P.B., Rodriguez-Agudo, D., Redford, K., Marques, D., Kang, D., Gil, G., and Pandak, W.M. (2005). Detection of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR, in human liver cells. *Biochim Biophys Acta* 1733, 111-119.
- Han, D., Hanawa, N., Saberi, B., and Kaplowitz, N. (2006). Mechanisms of liver injury. III. Role of glutathione redox status in liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291, G1-7.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hatefi, Y., and Stiggall, D.L. (1978). Preparation and properties of succinate: ubiquinone oxidoreductase (complex II). *Methods Enzymol* 53, 21-27.
- Hirsch, T., Decaudin, D., Susin, S.A., Marchetti, P., Larochette, N., Resche-Rigon, M., and Kroemer, G. (1998). PK11195, a ligand of the mitochondrial benzodiazepine receptor, facilitates the induction of apoptosis and reverses Bcl-2-mediated cytoprotection. *Exp Cell Res* 241, 426-434.
- Hishita, T., Tada-Oikawa, S., Tohyama, K., Miura, Y., Nishihara, T., Tohyama, Y., Yoshida, Y., Uchiyama, T., and Kawanishi, S. (2001). Caspase-3 activation by lysosomal enzymes in cytochrome c-independent apoptosis in myelodysplastic syndrome-derived cell line P39. *Cancer Res* 61, 2878-2884.
- Holinger, E.P., Chittenden, T., and Lutz, R.J. (1999). Bak BH3 peptides antagonize Bcl-xL function and induce apoptosis through cytochrome c-independent activation of caspases. *J Biol Chem* 274, 13298-13304.
- Horton, B.J., Horton, J.D., and Sabine, J.R. (1972). Metabolic controls in precancerous liver. II. Loss of feedback control of cholesterol synthesis, measured repeatedly in vivo, during treatment with the carcinogens N-2-fluorenylacetamide and aflatoxin. *Eur J Cancer* 8, 437-443.
- Hostetler, K.Y., Van den Bosch, H., and Van Deenen, L.L. (1971). Biosynthesis of cardiolipin in liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 239, 113-119.

- Hu, S., Vincenz, C., Ni, J., Gentz, R., and Dixit, V.M. (1997). I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272, 17255-17257.
- Ichas, F., and Mazat, J.P. (1998). From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochim Biophys Acta* 1366, 33-50.
- Ikonen, E. (2008). Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 125-138.
- Jones, P., Kafonek, S., Laurora, I., and Hunninghake, D. (1998). Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study). *Am J Cardiol* 81, 582-587.
- Kawata, S., Yamasaki, E., Nagase, T., Inui, Y., Ito, N., Matsuda, Y., Inada, M., Tamura, S., Noda, S., Imai, Y., *et al.* (2001). Effect of pravastatin on survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma. A randomized controlled trial. *Br J Cancer* 84, 886-891.
- Keilin, D., and Hartree, E.F. (1945). Properties of catalase. Catalysis of coupled oxidation of alcohols. *Biochem J* 39, 293-301.
- Kim, J.S., He, L., and Lemasters, J.J. (2003). Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 304, 463-470.
- Kokoszka, J.E., Waymire, K.G., Levy, S.E., Sligh, J.E., Cai, J., Jones, D.P., MacGregor, G.R., and Wallace, D.C. (2004). The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* 427, 461-465.
- Korsmeyer, S.J., Wei, M.C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K.J., and Schlesinger, P.H. (2000). Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 7, 1166-1173.
- Kosower, E.M., Kosower, N.S., and Wegman, P. (1977). Membrane mobility agents. IV. The mechanism of particle-cell and cell-cell fusion. *Biochim Biophys Acta* 471, 311-329.
- Krajewska, M., Krajewski, S., Banares, S., Huang, X., Turner, B., Bubendorf, L., Kallioniemi, O.P., Shabaik, A., Vitiello, A., Peehl, D., *et al.* (2003). Elevated

- expression of inhibitor of apoptosis proteins in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 9, 4914-4925.
- Kruit, J.K., Groen, A.K., van Berkel, T.J., and Kuipers, F. (2006). Emerging roles of the intestine in control of cholesterol metabolism. *World J Gastroenterol* 12, 6429-6439.
 - Kumar, D., Kirshenbaum, L., Li, T., Danelisen, I., and Singal, P. (1999). Apoptosis in isolated adult cardiomyocytes exposed to adriamycin. *Ann N Y Acad Sci* 874, 156-168.
 - Lange, Y., Strebel, F., and Steck, T.L. (1993). Role of the plasma membrane in cholesterol esterification in rat hepatoma cells. *J Biol Chem* 268, 13838-13843.
 - Le Bras, M., Borgne-Sanchez, A., Touat, Z., El Dein, O.S., Deniaud, A., Maillier, E., Lecellier, G., Rebouillat, D., Lemaire, C., Kroemer, G., *et al.* (2006). Chemosensitization by knockdown of adenine nucleotide translocase-2. *Cancer Res* 66, 9143-9152.
 - Lersch, C., Schmelz, R., Erdmann, J., Hollweck, R., Schulte-Frohlinde, E., Eckel, F., Nader, M., and Schusdziarra, V. (2004). Treatment of HCC with pravastatin, octreotide, or gemcitabine--a critical evaluation. *Hepatogastroenterology* 51, 1099-1103.
 - Li, Y.C., Park, M.J., Ye, S.K., Kim, C.W., and Kim, Y.N. (2006). Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents. *Am J Pathol* 168, 1107-1118; quiz 1404-1105.
 - Liao, J.K., and Laufs, U. (2005). Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45, 89-118.
 - Lin, B., Kolluri, S.K., Lin, F., Liu, W., Han, Y.H., Cao, X., Dawson, M.I., Reed, J.C., and Zhang, X.K. (2004). Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell* 116, 527-540.
 - Lin, D.T., and Lechleiter, J.D. (2002). Mitochondrial targeted cyclophilin D protects cells from cell death by peptidyl prolyl isomerization. *J Biol Chem* 277, 31134-31141.
 - Liu, J.R., Opipari, A.W., Tan, L., Jiang, Y., Zhang, Y., Tang, H., and Nunez, G. (2002). Dysfunctional apoptosome activation in ovarian cancer: implications for chemoresistance. *Cancer Res* 62, 924-931.

- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157.
- Lucken-Ardjomande, S., Montessuit, S., and Martinou, J.C. (2008). Bax activation and stress-induced apoptosis delayed by the accumulation of cholesterol in mitochondrial membranes. *Cell Death Differ* 15, 484-493.
- Lluís, J.M., Colell, A., Garcia-Ruiz, C., Kaplowitz, N., and Fernandez-Checa, J.C. (2003). Acetaldehyde impairs mitochondrial glutathione transport in HepG2 cells through endoplasmic reticulum stress. *Gastroenterology* 124, 708-724.
- Madesh, M., and Hajnoczky, G. (2001). VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release. *J Cell Biol* 155, 1003-1015.
- Malhi, H., Gores, G.J., and Lemasters, J.J. (2006). Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 43, S31-44.
- Margulis, L. (1971). The origin of plant and animal cells. *Am Sci* 59, 230-235.
- Mari, M., Caballero, F., Colell, A., Morales, A., Caballeria, J., Fernandez, A., Enrich, C., Fernandez-Checa, J.C., and Garcia-Ruiz, C. (2006). Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab* 4, 185-198.
- Mari, M., Colell, A., Morales, A., Paneda, C., Varela-Nieto, I., Garcia-Ruiz, C., and Fernandez-Checa, J.C. (2004). Acidic sphingomyelinase downregulates the liver-specific methionine adenosyltransferase 1A, contributing to tumor necrosis factor-induced lethal hepatitis. *J Clin Invest* 113, 895-904.
- Martensson, J., Lai, J.C., and Meister, A. (1990). High-affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7185-7189.
- Martinez, F., Eschegoyen, S., Briones, R., and Cuellar, A. (1988). Cholesterol increase in mitochondria: a new method of cholesterol incorporation. *J Lipid Res* 29, 1005-1011.
- Martinou, J.C., and Green, D.R. (2001). Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 63-67.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J.M., Susin, S.A., Vieira, H.L., Prevost, M.C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J.C., *et al.* (1998). Bax and adenine

- nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 281, 2027-2031.
- Matouschek, A., Rospert, S., Schmid, K., Glick, B.S., and Schatz, G. (1995). Cyclophilin catalyzes protein folding in yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6319-6323.
 - Maxfield, F.R., and Tabas, I. (2005). Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* 438, 612-621.
 - Maxfield, F.R., and Wustner, D. (2002). Intracellular cholesterol transport. *J Clin Invest* 110, 891-898.
 - McDonnell, J.M., Fushman, D., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J., and Cowburn, D. (1999). Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell* 96, 625-634.
 - McDonnell, T.J., and Korsmeyer, S.J. (1991). Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature* 349, 254-256.
 - McTaggart, S.J. (2006). Isoprenylated proteins. *Cell Mol Life Sci* 63, 255-267.
 - Miller, W.L. (2007). Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *Biochim Biophys Acta* 1771, 663-676.
 - Miller, W.L., and Strauss, J.F., 3rd (1999). Molecular pathology and mechanism of action of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69, 131-141.
 - Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-148.
 - Mitchell, P. (1979). Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science* 206, 1148-1159.
 - Modica-Napolitano, J.S., Koya, K., Weisberg, E., Brunelli, B.T., Li, Y., and Chen, L.B. (1996). Selective damage to carcinoma mitochondria by the rhodacyanine MKT-077. *Cancer Res* 56, 544-550.
 - Montero, J., Morales, A., Llacuna, L., Lluís, J.M., Terrones, O., Basanez, G., Antonsson, B., Prieto, J., Garcia-Ruiz, C., Colell, A., *et al.* (2008). Mitochondrial cholesterol contributes to chemotherapy resistance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 68, 5246-5256.

- Moreadith, R.W., and Lehninger, A.L. (1984). The pathways of glutamate and glutamine oxidation by tumor cell mitochondria. Role of mitochondrial NAD(P)⁺-dependent malic enzyme. *J Biol Chem* 259, 6215-6221.
- Morgan, J., and Oseroff, A.R. (2001). Mitochondria-based photodynamic anti-cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 49, 71-86.
- Morton, R., Cunningham, C., Jester, R., Waite, M., Miller, N., and Morris, H.P. (1976). Alteration of mitochondrial function and lipid composition in Morris 7777 hepatoma. *Cancer Res* 36, 3246-3254.
- Motola-Kuba, D., Zamora-Valdes, D., Uribe, M., and Mendez-Sanchez, N. (2006). Hepatocellular carcinoma. An overview. *Ann Hepatol* 5, 16-24.
- Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettlesheim, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.L., *et al.* (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381, 335-341.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., *et al.* (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85, 817-827.
- Newmeyer, D.D., and Ferguson-Miller, S. (2003). Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 112, 481-490.
- Norman, A.W., Demel, R.A., de Kruyff, B., and van Deenen, L.L. (1972). Studies on the biological properties of polyene antibiotics. Evidence for the direct interaction of filipin with cholesterol. *J Biol Chem* 247, 1918-1929.
- Okuda, K. (2000). Hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 32, 225-237.
- Oltersdorf, T., Elmore, S.W., Shoemaker, A.R., Armstrong, R.C., Augeri, D.J., Belli, B.A., Bruncko, M., Deckwerth, T.L., Dinges, J., Hajduk, P.J., *et al.* (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 435, 677-681.
- Palmieri, F. (1994). Mitochondrial carrier proteins. *FEBS Lett* 346, 48-54.
- Palmieri, F. (2004). The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch* 447, 689-709.

- Paris, R., Morales, A., Coll, O., Sanchez-Reyes, A., Garcia-Ruiz, C., and Fernandez-Checa, J.C. (2002). Ganglioside GD3 sensitizes human hepatoma cells to cancer therapy. *J Biol Chem* 277, 49870-49876.
- Petros, A.M., Olejniczak, E.T., and Fesik, S.W. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta* 1644, 83-94.
- Reinhart, P.H., Taylor, W.M., and Bygrave, F.L. (1982). A procedure for the rapid preparation of mitochondria from rat liver. *Biochem J* 204, 731-735.
- Rich, P.R. (2003). The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochem Soc Trans* 31, 1095-1105.
- Robinson, J.B., Jr., Inman, L., Sumegi, B., and Srere, P.A. (1987). Further characterization of the Krebs tricarboxylic acid cycle metabolon. *J Biol Chem* 262, 1786-1790.
- Rodriguez, J., and Lazebnik, Y. (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* 13, 3179-3184.
- Rogers, K.S., Higgins, E.S., and Grogan, W.M. (1980). Influence of dietary cholesterol on mitochondrial function in the rat. *J Nutr* 110, 248-254.
- Rouslin, W., MacGee, J., Gupte, S., Wesselman, A., and Epps, D.E. (1982). Mitochondrial cholesterol content and membrane properties in porcine myocardial ischemia. *Am J Physiol* 242, H254-259.
- Scharnagl, H., Schinker, R., Gierens, H., Nauck, M., Wieland, H., and Marz, W. (2001). Effect of atorvastatin, simvastatin, and lovastatin on the metabolism of cholesterol and triacylglycerides in HepG2 cells. *Biochem Pharmacol* 62, 1545-1555.
- Schnaitman, C., and Greenawalt, J.W. (1968). Enzymatic properties of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria. *J Cell Biol* 38, 158-175.
- Sever, N., Song, B.L., Yabe, D., Goldstein, J.L., Brown, M.S., and DeBose-Boyd, R.A. (2003). Insig-dependent ubiquitination and degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase stimulated by sterols and geranylgeraniol. *J Biol Chem* 278, 52479-52490.
- Shimizu, S., Ide, T., Yanagida, T., and Tsujimoto, Y. (2000a). Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *J Biol Chem* 275, 12321-12325.

- Shimizu, S., Konishi, A., Kodama, T., and Tsujimoto, Y. (2000b). BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3100-3105.
- Shimizu, S., Narita, M., and Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399, 483-487.
- Simons, K., and Ehehalt, R. (2002). Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest* 110, 597-603.
- Singer, S.J., and Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731.
- Siperstein, M.D. (1995). Cholesterol, cholesterologenesis and cancer. *Adv Exp Med Biol* 369, 155-166.
- Slater, H.R., and Robertson, F.W. (1979). A comparison of delipidated sera used in studies of sterol synthesis by human mononuclear leukocytes. *J Lipid Res* 20, 413-416.
- Soccio, R.E., and Breslow, J.L. (2004). Intracellular cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 1150-1160.
- Soengas, M.S., Capodici, P., Polsky, D., Mora, J., Esteller, M., Opitz-Araya, X., McCombie, R., Herman, J.G., Gerald, W.L., Lazebnik, Y.A., *et al.* (2001). Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 409, 207-211.
- Stuken, E., Porat, A., Shimron, F., Fass, E., Kaloyanova, D., Brugger, B., Wieland, F.T., Elazar, Z., and Helms, J.B. (2003). Intra-Golgi protein transport depends on a cholesterol balance in the lipid membrane. *J Biol Chem* 278, 53112-53122.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prevost, M.C., Alzari, P.M., and Kroemer, G. (1999a). Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* 189, 381-394.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., *et al.* (1999b). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.
- Suzuki, M., Youle, R.J., and Tjandra, N. (2000). Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 103, 645-654.

- Tamm, I., Kornblau, S.M., Segall, H., Krajewski, S., Welsh, K., Kitada, S., Scudiero, D.A., Tudor, G., Qui, Y.H., Monks, A., *et al.* (2000). Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clin Cancer Res* 6, 1796-1803.
- Tatsuta, M., Iishi, H., Baba, M., Iseki, K., Yano, H., Uehara, H., Yamamoto, R., and Nakaizumi, A. (1998). Suppression by pravastatin, an inhibitor of p21ras isoprenylation, of hepatocarcinogenesis induced by N-nitrosomorpholine in Sprague-Dawley rats. *Br J Cancer* 77, 581-587.
- Terrones, O., Antonsson, B., Yamaguchi, H., Wang, H.G., Liu, J., Lee, R.M., Herrmann, A., and Basanez, G. (2004). Lipidic pore formation by the concerted action of proapoptotic BAX and tBID. *J Biol Chem* 279, 30081-30091.
- Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meinel, E., Neipel, F., Mattmann, C., Burns, K., Bodmer, J.L., Schroter, M., *et al.* (1997). Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386, 517-521.
- Thurnher, D., Turhani, D., Pelzmann, M., Wannemacher, B., Knerer, B., Formanek, M., Wacheck, V., and Selzer, E. (2003). Betulinic acid: a new cytotoxic compound against malignant head and neck cancer cells. *Head Neck* 25, 732-740.
- Tietze, F. (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 27, 502-522.
- Turrens, J.F., and Boveris, A. (1980). Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 191, 421-427.
- Ugawa, T., Kakuta, H., Moritani, H., Matsuda, K., Ishihara, T., Yamaguchi, M., Naganuma, S., Iizumi, Y., and Shikama, H. (2000). YM-53601, a novel squalene synthase inhibitor, reduces plasma cholesterol and triglyceride levels in several animal species. *Br J Pharmacol* 131, 63-70.
- van Blitterswijk, W.J., van der Meer, B.W., and Hilkmann, H. (1987). Quantitative contributions of cholesterol and the individual classes of phospholipids and their degree of fatty acyl (un)saturation to membrane fluidity measured by fluorescence polarization. *Biochemistry* 26, 1746-1756.
- Van Blitterswijk, W.J., Van Hoeven, R.P., and Van der Meer, B.W. (1981). Lipid structural order parameters (reciprocal of fluidity) in biomembranes derived from

- steady-state fluorescence polarization measurements. *Biochim Biophys Acta* 644, 323-332.
- Vaux, D.L., Cory, S., and Adams, J.M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440-442.
 - von Ahsen, O., Renken, C., Perkins, G., Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., and Newmeyer, D.D. (2000). Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome c release. *J Cell Biol* 150, 1027-1036.
 - Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10, 45-65.
 - Walensky, L.D., Kung, A.L., Escher, I., Malia, T.J., Barbuto, S., Wright, R.D., Wagner, G., Verdine, G.L., and Korsmeyer, S.J. (2004). Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. *Science* 305, 1466-1470.
 - Wang, J.L., Liu, D., Zhang, Z.J., Shan, S., Han, X., Srinivasula, S.M., Croce, C.M., Alnemri, E.S., and Huang, Z. (2000). Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7124-7129.
 - Wang, W., Yang, L., and Huang, H.W. (2007). Evidence of cholesterol accumulated in high curvature regions: implication to the curvature elastic energy for lipid mixtures. *Biophys J* 92, 2819-2830.
 - Woldegiorgis, G., and Shrago, E. (1985). Adenine nucleotide translocase activity and sensitivity to inhibitors in hepatomas. Comparison of the ADP/ATP carrier in mitochondria and in a purified reconstituted liposome system. *J Biol Chem* 260, 7585-7590.
 - Wolf, B.B., Schuler, M., Li, W., Eggers-Sedlet, B., Lee, W., Taylor, P., Fitzgerald, P., Mills, G.B., and Green, D.R. (2001). Defective cytochrome c-dependent caspase activation in ovarian cancer cell lines due to diminished or absent apoptotic protease activating factor-1 activity. *J Biol Chem* 276, 34244-34251.
 - Yang, Q.H., Church-Hajduk, R., Ren, J., Newton, M.L., and Du, C. (2003). Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev* 17, 1487-1496.
 - Zamzami, N., and Kroemer, G. (2001). The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 67-71.

- Zhang, T.D., Chen, G.Q., Wang, Z.G., Wang, Z.Y., Chen, S.J., and Chen, Z. (2001). Arsenic trioxide, a therapeutic agent for APL. *Oncogene* 20, 7146-7153.
- Zhuang, L., Kim, J., Adam, R.M., Solomon, K.R., and Freeman, M.R. (2005). Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *J Clin Invest* 115, 959-968.

Anexo

Parte de los resultados incluidos en la presente tesis fueron usados para el artículo:

Mitochondrial cholesterol contributes to chemotherapy resistance in hepatocellular carcinoma Montero, J., Morales, A., Llacuna, L., Lluís, J.M., Terrones, O., Basanez, G., Antonsson, B., Prieto, J., Garcia-Ruiz, C., Colell, A., Fernández-Checa, J.C. *Cancer Research* (2008) 68, 5246-5256.

Mitochondrial Cholesterol Contributes to Chemotherapy Resistance in Hepatocellular Carcinoma

Joan Montero,^{1,2} Albert Morales,^{1,2} Laura Llacuna,^{1,2} Josep M. Lluís,^{1,2} Oihana Terrones,³ Gorka Basañez,³ Bruno Antonsson,⁴ Jesús Prieto,^{2,5} Carmen García-Ruiz,^{1,2} Anna Colell,^{1,2} and José C. Fernández-Checa^{1,2}

¹Liver Unit and Centro de Investigaciones Biomédicas Esther Koplowitz, IMDiM, Hospital Clínic i Provincial, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, and Department of Cell Death and Proliferation, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona, Spain; ²Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBERehd); ³Unidad de Biofísica (Centro Mixto Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea), Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao, Spain; ⁴Merck Serono Internacional, Geneva, Switzerland; and ⁵Liver Unit and Division of Hepatology and Gene Therapy, University Clinic and Center for Applied Medical Research, University of Navarra, Pamplona, Spain

Abstract

Cholesterol metabolism is deregulated in carcinogenesis, and cancer cells exhibit enhanced mitochondrial cholesterol content whose role in cell death susceptibility and cancer therapy has not been investigated. Here, we describe that mitochondria from rat or human hepatocellular carcinoma (HC) cells (HCC) or primary tumors from patients with HC exhibit increased mitochondrial cholesterol levels. HCC sensitivity to chemotherapy acting via mitochondria is enhanced upon cholesterol depletion by inhibition of hydroxymethylglutaryl-CoA reductase or squalene synthase (SS), which catalyzes the first committed step in cholesterol biosynthesis. HCC transfection with siRNA targeting the steroidogenic acute regulatory protein StAR, a mitochondrial cholesterol-transporting polypeptide which is overexpressed in HCC compared with rat and human liver, sensitized HCC to chemotherapy. Isolated mitochondria from HCC with increased cholesterol levels were resistant to mitochondrial membrane permeabilization and release of cytochrome *c* or Smac/DIABLO in response to various stimuli including active Bax. Similar behavior was observed in cholesterol-enriched mitochondria or liposomes and reversed by restoring mitochondrial membrane order or cholesterol extraction. Moreover, atorvastatin or the SS inhibitor YM-53601 potentiated doxorubicin-mediated HCC growth arrest and cell death *in vivo*. Thus, mitochondrial cholesterol contributes to chemotherapy resistance by increasing membrane order, emerging as a novel therapeutic niche in cancer therapy. [Cancer Res 2008;68(13):5246–56]

Introduction

Cholesterol is an integral component of cellular membranes that plays an essential role in maintaining their integrity and function (1). In addition to the regulation of membrane order, cholesterol induces membrane packing in lateral microdomains (rafts) of the plasma membrane, providing a scaffold for a variety of membrane-

associated signaling proteins (2, 3). Due to this role in modulating membrane structure and function, cholesterol levels in cell membranes are tightly regulated. The main sources of cellular cholesterol involve either its uptake from cholesterol-rich low-density lipoproteins or its *de novo* synthesis through the conversion of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA into mevalonate by 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMG-CoAR), the rate-limiting step in cholesterol synthesis, which is transcriptionally regulated by endoplasmic reticulum-based transcription factor SREBP-2 (1, 4).

Cholesterol accumulation and enhanced cholesterol-rich lipid rafts have been reported in several solid tumors that modulate tumor cell growth and survival by activating particular signaling pathways such as Akt (5, 6). In addition, cholesterol metabolism is abnormal in many malignancies with loss of cholesterol feedback and HMG-CoAR up-regulation despite enhanced cholesterol levels (7). Moreover, malignant cells exhibit elevated levels of mevalonate, which has been shown to promote tumor growth *in vivo* and proliferation of breast cancer cells (8). Consistent with this scenario, statins, which block HMG-CoAR by competing with mevalonate for binding to the active site, have been proposed for cancer prevention and/or treatment, although their efficacy as anticancer agents has not always been established (9). Furthermore, even in those cases where statins showed promising results, it remained unclear whether the therapeutic effects were due to the cholesterol-lowering activity or to the down-regulation of isoprenoids, which are known to modulate multiple proteins by posttranslational modifications (9, 10).

Mitochondria are cholesterol-poor organelles with estimates ranging from 0.5% to 3% of the content found in plasma membranes (1, 11). However, unphysiologic mitochondrial cholesterol levels have been described in solid tumors. For instance, mitochondrial cholesterol levels of tumors from Buffalo rats bearing transplanted Morris hepatomas were 2- to 5-fold higher than the content found in mitochondria prepared from host liver, and correlated with the degree of tumor growth and malignancy (12–15). Although the mechanisms underlying the mitochondrial cholesterol accumulation in cancer cells are poorly understood, recent observations have reported the activity of cholesterol-transporting polypeptides, including the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in human HepG2 cells that contribute to the mitochondrial intermembrane trafficking of cholesterol (16). Although cholesterol enrichment in mitochondria can impair specific mitochondrial components accounting, in part, for the mitochondrial dysfunction described in cancer cells (13, 15, 17–20),

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

A. Colell and J.C. Fernández-Checa share senior authorship.

Requests for reprints: José C. Fernández-Checa, Liver Unit, Hospital Clínic i Provincial, C/Villarroel, 170, 08036-Barcelona, Spain. Phone: 34-93-227-5709; Fax: 34-93-451-5272; E-mail: checa229@yahoo.com.

©2008 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6161

its effect in cell death susceptibility and cancer therapy has not been previously examined. This may be of potential relevance because strategies targeting mitochondria have been proposed as potential use in cancer therapy (21), and alterations in the mitochondrial apoptotic pathway, particularly the modulation of the mitochondrial membrane permeabilization (MMP), may contribute to cancer growth and desensitization to cancer therapy (21, 22).

Hepatocellular carcinoma (HC) is one of the main causes of cancer-related deaths that frequently arises on a background of chronic inflammation and exhibits high resistance to current therapy (23). Thus, because mitochondria are known to play a key role in cell death (22) and cholesterol-regulated mitochondrial membrane order has been reported to modulate MMP and the subsequent release of apoptotic proteins (19), the purpose of this study was to examine the role of mitochondrial cholesterol in the susceptibility of HC cells (HCC) to chemotherapy *in vitro*, the mechanisms involved, and the relevance in an *in vivo* HC model. Our findings indicate that mitochondrial cholesterol contributes to chemotherapy resistance through altered membrane order, hence emerging as a novel therapeutic target in cancer therapy.

Materials and Methods

Materials and recombinant proteins. Dioleoylphosphatidylcholine, tetraoleoylcardiolipin, and cholesterol were purchased from Avanti Polar Lipids. Dodecyl octaethylene glycol monoether (C₁₂E₈), Methyl- β -cyclodextrin, melittin, *Staphylococcus aureus* α -toxin, tetanolysin, and fluorescein-isothiocyanate-labeled dextrans of 70 kDa (FD-70) were obtained from Sigma. Recombinant full-length human Bax with an amino-terminal His6 tag (Bax), caspase 8-cleaved murine BID with an amino-terminal His6 tag (tBid), and human Bcl-2 lacking the carboxy-terminal hydrophobic domain (Bcl-2DC) were purified as previously described (24). Oligomeric Bax (oligo-Bax) was obtained by incubating Bax in 100 mmol/L KCl, 10 mmol/L HEPES, 0.1 mmol/L EDTA (pH 7.0) buffer (KHE buffer) containing octylglucoside (2%, w/v) for 1 h at 4°C.

Cell culture, hepatocyte isolation, and mitochondria and mitoplasts preparation. The human hepatoblastoma cell line, HepG2, and the rat hepatoma cell line, Reuber H35, were both obtained from the European Collection of Animal Cell Cultures and grown at 37°C in 5% CO₂. Culture medium was supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mmol/L L-glutamine, and 1% nonessential amino acids and antibiotics. In some experiments, 10% of delipidated FBS was used. Primary rat hepatocytes were isolated by collagenase perfusion and cultured as described previously (25). Cell viability in response to chemotherapy was determined by trypan blue exclusion. Rat and human liver mitochondria were isolated as described in Supplementary Methods. Mitochondria from HCC were obtained by rapid centrifugation through Percoll density gradient as described previously (19). Mitoplasts and outer mitochondrial membranes were prepared by the fractionation of rat liver mitochondria with digitonin as described previously (19), monitoring the monoamine oxidase activity for efficiency. In some experiments, the mitochondrial suspension was incubated with 2-(2-methoxyethoxy)ethyl-8-(*cis*-2-*n*-octylcyclopropyl) octane (A₂C, 125 nmol/mg protein) at 37°C for 30 min as described in detail (19).

Human hepatocarcinoma samples. Fresh-frozen samples from tumor lesions were obtained from 6 patients (men, ages 57–73 y) with HC and approved by the ethics committee. The samples were collected from the surgical specimen after resection ($n = 2$) or from the liver explant at transplantation ($n = 4$). In four cases, the tumor was multifocal, and in two cases, uninodular. The underlying liver disease was alcoholic cirrhosis in three cases, Hepatitis B virus-induced cirrhosis in two, and Hepatitis C virus-induced cirrhosis in one. In addition, normal liver tissue was obtained from the surgical specimen after partial hepatectomy because of colorectal cancer metastatic to the liver.

Determination of cholesterol and phospholipid levels. The amount of cholesterol in mitochondria was measured by high performance liquid chromatography (HPLC) using a Waters μ Bondapak C18 10- μ m reversed-phase column (30 cm \times 4 mm inner diameter; ref. 26). The quantitation of phospholipids is described in detail in the Supplementary Methods.

Immunocytochemistry and laser confocal imaging. Cells were fixed for 10 min with 3.7% paraformaldehyde in 0.1 mol/L phosphate buffer before permeabilization with 0.1% saponin in 0.5% bovine serum albumin (BSA)/PBS buffer for 5 min. Cells were incubated for 1 h with mouse monoclonal antibody anti-cytochrome *c* (1:200; PharMingen), rinsed with PBS, and incubated for 45 min with the secondary antibody. In some cases, filipin (50 μ g/mL) was added during the secondary antibody incubation as described before (27). Images were obtained by confocal microscopy as described in Supplementary Methods.

Modulation of cholesterol content and membrane order determination. Cholesterol enrichment was achieved by incubating rat liver mitochondria with a cholesterol-BSA complex at room temperature for 5 min as described (19). Parallel control experiments were performed using only BSA. Cholesterol depletion in mitochondrial membranes from HepG2 or H35 cells was achieved by treatment with Me- β -cyclodextrin (MCD; 40 mmol/L) for 30 min. Mitochondrial membrane order was evaluated by fluorescence anisotropy of the mitochondria-bound dye 1,6-diphenyl-1, 3, 5-hexatriene (DPH) as described previously (17, 19), determining the S_{DPH} from the steady-state fluorescence anisotropy values as described (28).

Silencing of StAR by siRNA. The siRNA-targeting StAR and scrambled siRNA were commercially purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. Transfection was performed using Lipofectamine2000 (Invitrogen) following the instruction of the manufacturer. Briefly, 5 \times 10⁵ HepG2 or H35 cells were incubated with the transfection mixtures containing 100 pmol of the siRNA-targeting StAR or the scrambled control siRNA. Cells were assayed 48 h after transfection for mRNA and protein StAR levels, and for susceptibility to chemotherapy.

HCC xenograft model and treatment. Five- to six-week-old male BALB/c athymic (nu/nu) nude mice were kept under pathogen-free conditions and given free access to standard food and sterilized water. All procedures were performed according to protocols approved by the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer Ethical Committee. HepG2 cells (2.5 \times 10⁶ in 200 μ L of PBS) were injected s.c. into the flanks of the mice. Tumors were measured periodically with a vernier caliper, and the volume was calculated as length \times width² \times 0.5, which has been validated previously in comparison with other established methods (29). After 2 to 3 wk, mice were randomly divided into 3 experimental groups: group A, solvent (control); group B, atorvastatin (10 mg/kg); and group C, YM-53601 (15 mg/kg). After 2 wk of daily treatment by p.o. gavage, some animals received an i.p. injection of doxorubicin (10 mg/kg). Differences in tumor volume during the next week were evaluated in each group and expressed as percentage of change in tumor growth with respect to the volume measured before chemotherapy administration.

Terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP nick-end labeling assay and tumor progression. After sacrifice, tumors were fixed and paraffin sections (5 μ m) from each area were stained with terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) reagent using a commercial kit (*In Situ* Cell Death Detection kit; POD from Roche). Immunohistochemical staining of CD34, a specific endothelial cell marker commonly used for microvessel quantification, was performed with rat monoclonal anti-CD34 antibody (Abcam) at a dilution of 1:50 (2 mg/mL). The slices were examined with a Zeiss Axioplan microscope equipped with a Nikon DXM1200F digital camera. Serum α -feto protein levels were measured by the Centro Diagnóstico Médico (Hospital Clinic).

Statistics. Results were expressed as mean \pm SD with the number of individual experiments detailed in figure legends. Statistical significance of the mean values was established by the two-tailed distribution Student's *t* test.

Supplementary methods. This section describes the procedures for Western blot analysis, quantitative real-time PCR, large unilamellar vesicle (LUV) preparation, and fluorimetric assays.

Results

Mitochondrial cholesterol in established HCC. Because previous findings reported enhanced mitochondrial cholesterol content in solid Morris hepatoma tumors with respect to host liver (12–15), we first assessed the mitochondrial cholesterol levels from established HCC. HepG2 and H35 cells were fractionated into mitochondria and analyzed for lipid composition. Electron microscopy and Western blot analysis of PERK, Na⁺/K⁺ ATPase α 1, and Rab5A indicated insignificant contamination with endoplasmic reticulum, plasma membrane, and endosomes, respectively, in the final mitochondrial fraction (Fig. 1A). Monitoring Lamp1 levels by Western blot analysis further indicated the lack of lysosomal contamination in the final mitochondrial fraction (Fig. 1A). As shown, the total cholesterol levels in mitochondria from H35 and HepG2 cells were 3- to 10-fold higher with respect to rat and human liver mitochondria without changes in total phospholipids content (Fig. 1B), confirming previous results in implanted hepatoma tumors *in vivo* (12–15). Interestingly, the levels of mitochondrial cholesterol from primary tumors of patients with HC were higher than the content of mitochondria from nontumor human liver tissue and similar to those found in HepG2 cells (Fig. 1B). Moreover, the enhanced levels of free cholesterol of H35 or HepG2 cells examined by confocal microscopy by filipin staining colocalized with mitochondria, and this increase was further verified by HPLC analyses of isolated mitochondria (Fig. 1C). Finally, these findings on mitochondrial cholesterol up-regulation correlated with enhanced expression of the transcription factor SREBP-2 and HMG-CoAR in H35 and HepG2 cells with respect to rat and human liver samples (Fig. 1D). Together, these findings validate the use of HCC lines to study the role of mitochondrial cholesterol in chemotherapy susceptibility.

HMG-CoAR or squalene synthase inhibition sensitizes HCC to mitochondria-targeted chemotherapy. We next examined the role of mitochondrial cholesterol in the susceptibility of HCC to chemotherapy targeting mitochondria. Arsenic trioxide or lonidamine, a derivative of indazole-3-carboxylic acid, are both antineoplastic drugs that target mitochondria and induce mitochondrial permeability transition (MPT; refs. 30, 31). Thapsigargin-based prodrugs developed for the treatment of prostate cancer (32) are potent inhibitors of endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPases and induce MPT by Ca²⁺ overload, whereas doxorubicin, an anthracycline antibiotic drug, stimulates mitochondrial reactive oxygen species (ROS) generation (33). Both cell lines displayed a reduced susceptibility to increasing doses of thapsigargin, lonidamine, arsenic trioxide, or doxorubicin compared with primary rat hepatocytes (Fig. 2A). Various statins including lovastatin or atorvastatin have been shown to be effective in reducing cholesterol levels in HepG2 cells (34). Lovastatin pretreatment sensitized H35 cells to mitochondria-targeting drugs (Fig. 2B) with similar results observed with HepG2 cells (Supplementary Fig. S1). Dying cells displayed apoptotic features, such as caspase-3 activation (Supplementary Fig. S2A) and chromatin disruption (Supplementary Fig. S2B). Moreover, the susceptibility of H35 cells to bafilomycin A, an inhibitor of the vacuolar type H⁺-ATPase that impairs lysosomal function and promotes apoptosis independently of MMP (35), was not increased by lovastatin (Supplementary Fig. S1; Fig. 2B) and was not accompanied by enhanced cytochrome *c* release (Supplementary Fig. S3), suggesting that the sensitizing effect of lovastatin is specific for mitochondria-targeting drugs. To further verify the specific role of cholesterol in chemotherapy

resistance, we investigated the effect of SS inhibition, which blocks cholesterol biosynthesis without affecting the isoprenoid metabolism (Supplementary Fig. S4). Cell treatment with YM-53601, a specific SS inhibitor (36), at a dose nontoxic to primary rat hepatocytes (Supplementary Fig. S5), potentiated the susceptibility of H35 cells to thapsigargin, lonidamine, and doxorubicin (Fig. 2C) to a similar extent as seen by lovastatin treatment. Importantly, both lovastatin and YM-53601 reduced the mitochondrial cholesterol levels in both H35 and HepG2 cells (Fig. 2D). Finally, the susceptibility of H35 cells to doxorubicin by lovastatin was prevented by mevalonate, independently of the inhibition of farnesyltransferase, whereas mevalonate failed to restore resistance to doxorubicin after SS inhibition (Supplementary Fig. S6). Moreover, 7-dehydrocholesterol, the immediate precursor of cholesterol synthesis (Supplementary Fig. S4), decreased the susceptibility to doxorubicin by SS inhibition (Supplementary Fig. S6). Collectively, these findings suggest the involvement of mitochondrial cholesterol in the resistance of HCC to drug-induced cell death independently of alterations in isoprenoid metabolism.

siRNA-mediated StAR silencing sensitizes HCC to chemotherapy. To further substantiate that mitochondrial cholesterol enrichment in HCC contributes to mitochondrial-targeting chemotherapy resistance, we investigated the role of silencing StAR. StAR is a cholesterol-transporting polypeptide involved in the intramitochondrial trafficking of cholesterol, which regulates the synthesis of steroids in specialized tissues (11, 16). The levels of StAR were higher in H35 and HepG2 cells compared with rat and human liver samples being more abundant in HepG2 cells than in H35 cells (Fig. 3A), which correlated with the mitochondrial cholesterol levels observed in these cell lines (Fig. 1B). Transfection with siRNA-targeting StAR resulted in a significant reduction of StAR protein and mRNA expression compared with cells transfected with scrambled control siRNA (Fig. 3B), causing a significant reduction of mitochondrial cholesterol levels (Fig. 3C). More importantly, the susceptibility of HepG2 cells to doxorubicin, thapsigargin, or arsenic trioxide was potentiated by transfection with StAR siRNA (Fig. 3D), with similar results observed with H35 cells (Fig. 3D). Thus, these findings validate the observations with HMG-CoAR and SS inhibition, further supporting a key role for mitochondrial cholesterol in the sensitization of HCC to chemotherapy targeting mitochondria.

Mitochondrial cholesterol modulates membrane order and MPT. Cholesterol, particularly free cholesterol, regulates membrane physical properties (1, 27, 28). Thus, we next determined the membrane order from the steady-state fluorescence anisotropy of DPH-labeled mitochondria. Mitochondria from H35 and HepG2 cells showed higher membrane order (S_{DPH}) compared with mitochondria from rat and human liver (Fig. 4A). Phospholipids can also regulate membrane order. However, the content of phosphatidylcholine, the major phospholipid in membranes, remained unchanged in mitochondria from H35 and HepG2 cells with respect to rat or human liver samples, whereas phosphatidylethanolamine levels in mitochondria from HepG2 cells but not H35 cells were slightly lower than those found in human liver mitochondria (Supplementary Fig. S7). Moreover, mitochondria from H35 and HepG2 cells exposed to the cholesterol-binding agent MCD exhibited a significant depletion of cholesterol levels compared with untreated mitochondria, which translated in reduced membrane order (Fig. 4A). In contrast, incubation of rat liver mitochondria with a cholesterol-albumin complex (19) resulted in significant cholesterol loading, reaching the levels

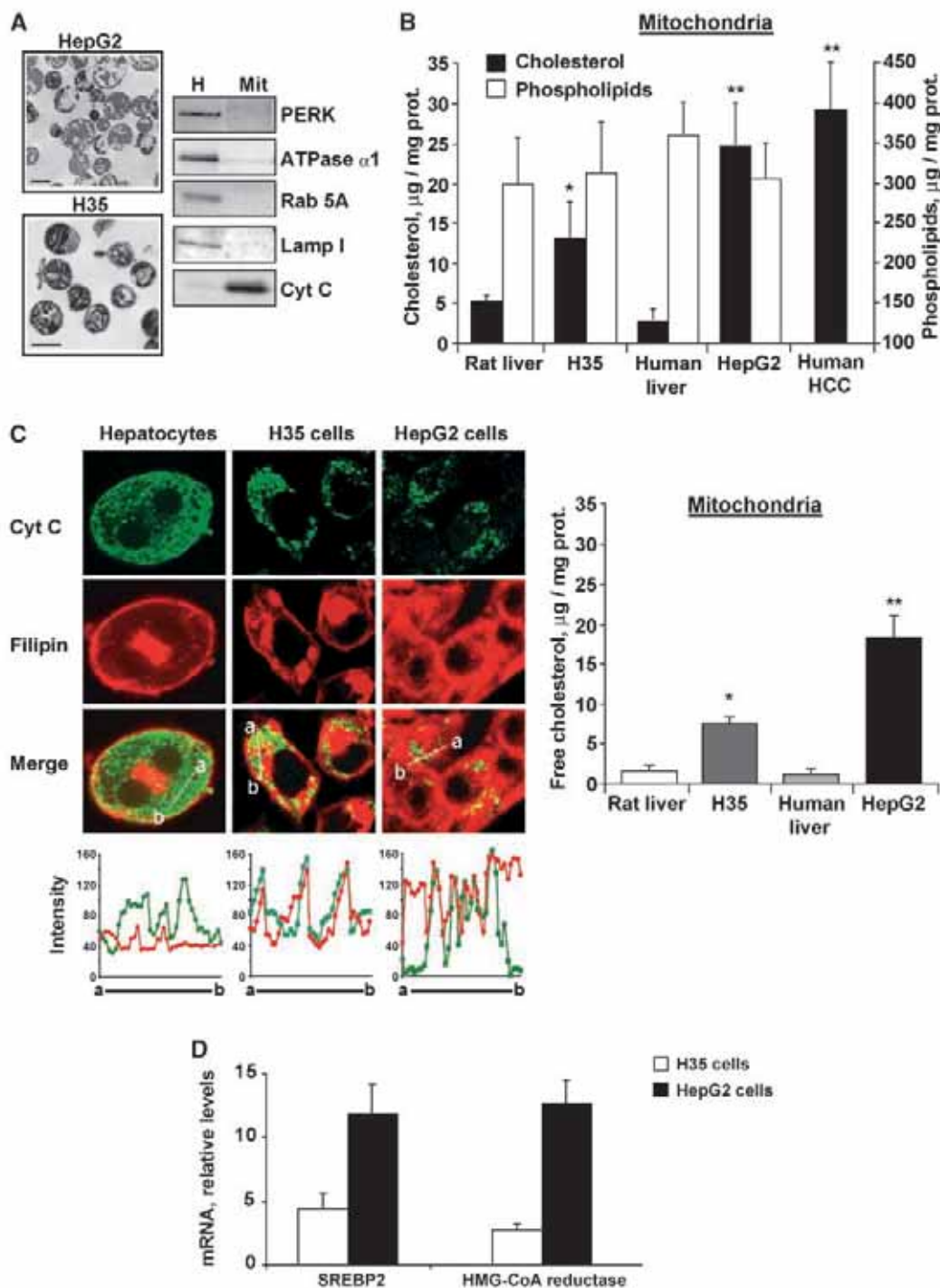


Figure 1. Increased cholesterol content in mitochondria from rat (*H35*), human (*HepG2*) hepatoma cell lines, and human HC samples. *A*, electron microscopy analysis showing purified mitochondria from *H35* and *HepG2* cells after cellular subfractionation (scale bars, 1 μm); and Western blot analysis of PERK, Na^+/K^+ ATPase $\alpha 1$, Rab5A, Lamp1, and cytochrome *c* expression in homogenates (*H*) or mitochondrial fraction (*Mit*) from *H35* cells. *B*, total cholesterol (black bars) and phospholipid levels (white bars) performed by HPLC on lipid extracts from the mitochondrial fraction from *H35*, *HepG2* cells, and human HC samples. *C*, colocalization of mitochondria and free cholesterol by confocal microscopy using mouse anti-cytochrome *c* (*cyt C*) and filipin, respectively. The graphs on the bottom represent the fluorescence intensity profiles plotted from *a* to *b* direction for the different cell lines. In addition, mitochondrial-free cholesterol content analyzed by HPLC. Results in *B* and *C* are mean \pm SD values from at least three independent experiments. * and **, $P < 0.01$ versus rat and human liver mitochondria, respectively. *D*, quantitative real-time reverse transcription-PCR mRNA expression of SREBP-2 and HMG-CoA reductase in *H35* and *HepG2* cells compared with rat and human liver, respectively. Absolute mRNA values were determined, normalized to hypoxanthine phosphoribosyltransferase and reported as relative levels referred to the expression in nontumor counterpart. *Prot.*, protein.

found in mitochondria from H35 cells that increased the membrane order (Fig. 4A). Indeed, the mitochondrial membrane order correlated with the cholesterol content (Fig. 4A). Cholesterol distribution after cholesterol enrichment by the cholesterol-albumin complex was estimated in mitoplasts. Although the bulk of cholesterol (60–70%) was found in the outer membrane, in agreement with previous findings (19), the levels of cholesterol in mitoplasts from cholesterol-enriched mitochondria were higher (2- to 3-fold) than those found in mitoplasts from control mitochondria (data not shown).

We next analyzed the role of cholesterol in the response of mitochondria to MPT triggers. Isolated mitochondria from H35 cells with or without MCD treatment were incubated with the superoxide anion-generating system, xanthine plus xanthine oxidase (X-XO), shown to induce the release of mitochondrial cytochrome *c* (37). Although rat liver mitochondria released cytochrome *c* in response

to X-XO, mitochondria from H35 were resistant to X-XO-induced cytochrome *c* release (Fig. 4B); moreover, cholesterol extraction by MCD restored the sensitivity of mitochondria from H35 cells to X-XO-mediated cytochrome *c* release (Fig. 4B), with similar findings observed in mitochondria from HepG2 cells (Fig. 4B).

Ca²⁺ induces the transition of the MPT pore causing mitochondrial matrix swelling and release of the proapoptotic proteins (38). Rat liver mitochondria enriched in cholesterol by the cholesterol-albumin complex were resistant to swelling (data not shown), and cytochrome *c* and Smac/DIABLO release (Fig. 4C) induced by Ca²⁺. Moreover, mitochondria from H35 cells were insensitive to Ca²⁺-induced Smac/DIABLO and cytochrome *c* release (Fig. 4D), whereas cholesterol depletion by MCD restored the response to Ca²⁺ (Fig. 4D). Thus, mitochondrial cholesterol regulates membrane order and the release of apoptotic proteins by MPT triggers.

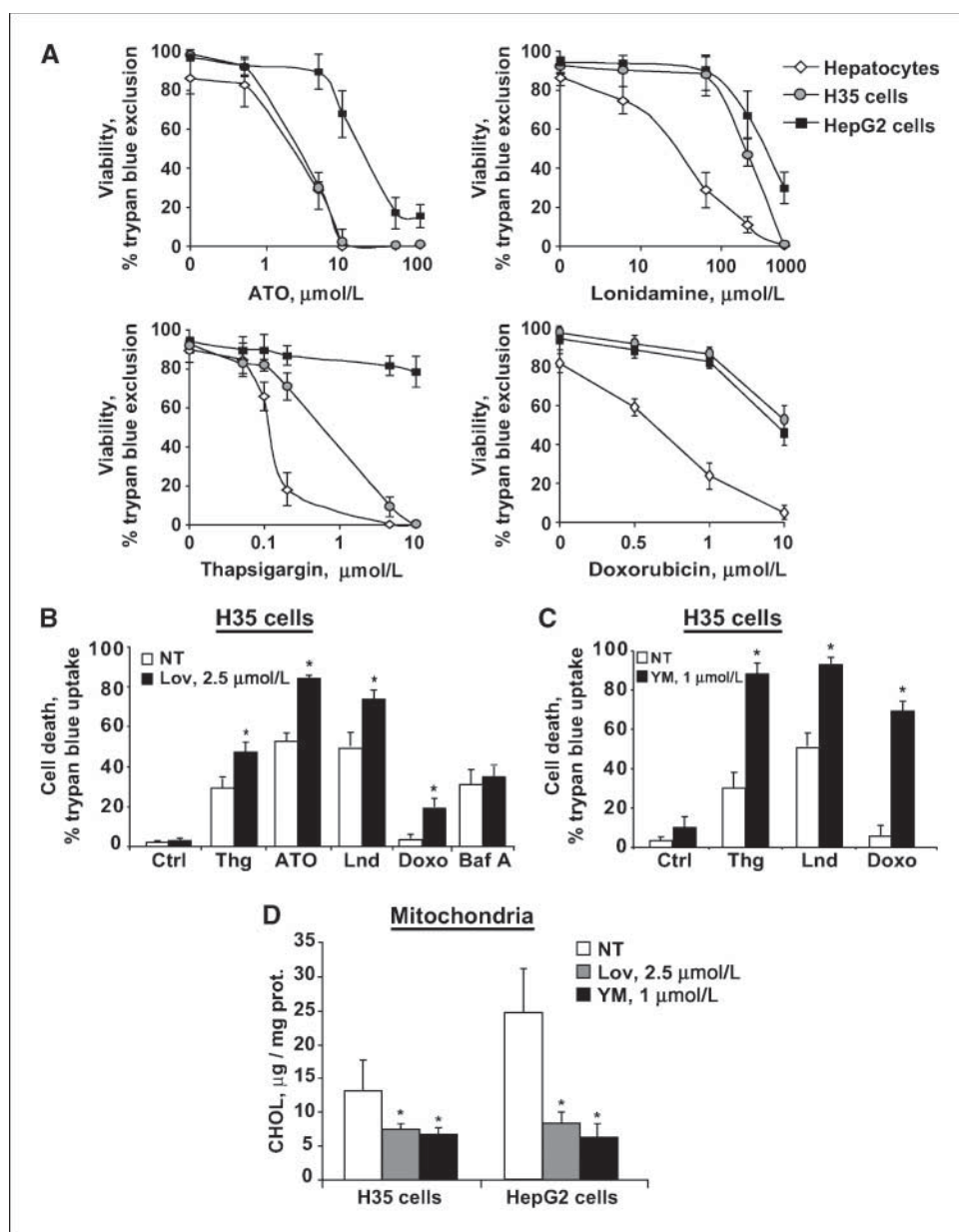


Figure 2. Inhibition of cholesterol synthesis sensitizes cells to different compounds that act on mitochondria. **A**, primary rat hepatocytes, H35, and HepG2 cells were incubated with increasing doses of arsenic trioxide (ATO), lonidamine, thapsigargin (Thg), or doxorubicin for 24 h. Cell viability was determined by trypan blue exclusion. At least 100 cells in 4 different fields were counted and expressed as a percentage of total cells. **B** and **C**, disruption of cholesterol biosynthesis by lovastatin or by the SS inhibitor YM-53601 (YM) sensitizes H35 cells to chemotherapeutic agents. H35 hepatoma cells untreated (NT) or incubated with lovastatin (Lov) or YM-53601 for 24 h were exposed to thapsigargin (0.2 $\mu\text{mol/L}$), lonidamine (0.2 $\mu\text{mol/L}$), arsenic trioxide (5 $\mu\text{mol/L}$), doxorubicin (Doxo; 1 $\mu\text{mol/L}$), bafilomycin A (Baf A; 10 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h. Cell death was determined by trypan blue exclusion ($n = 3$). **D**, total cholesterol levels of mitochondria from H35 and HepG2 cells 24 h after treatment with lovastatin (2.5 $\mu\text{mol/L}$) or YM-53601 (1 $\mu\text{mol/L}$); $n = 4$; *, $P < 0.05$ versus untreated cells. Ctrl, control.

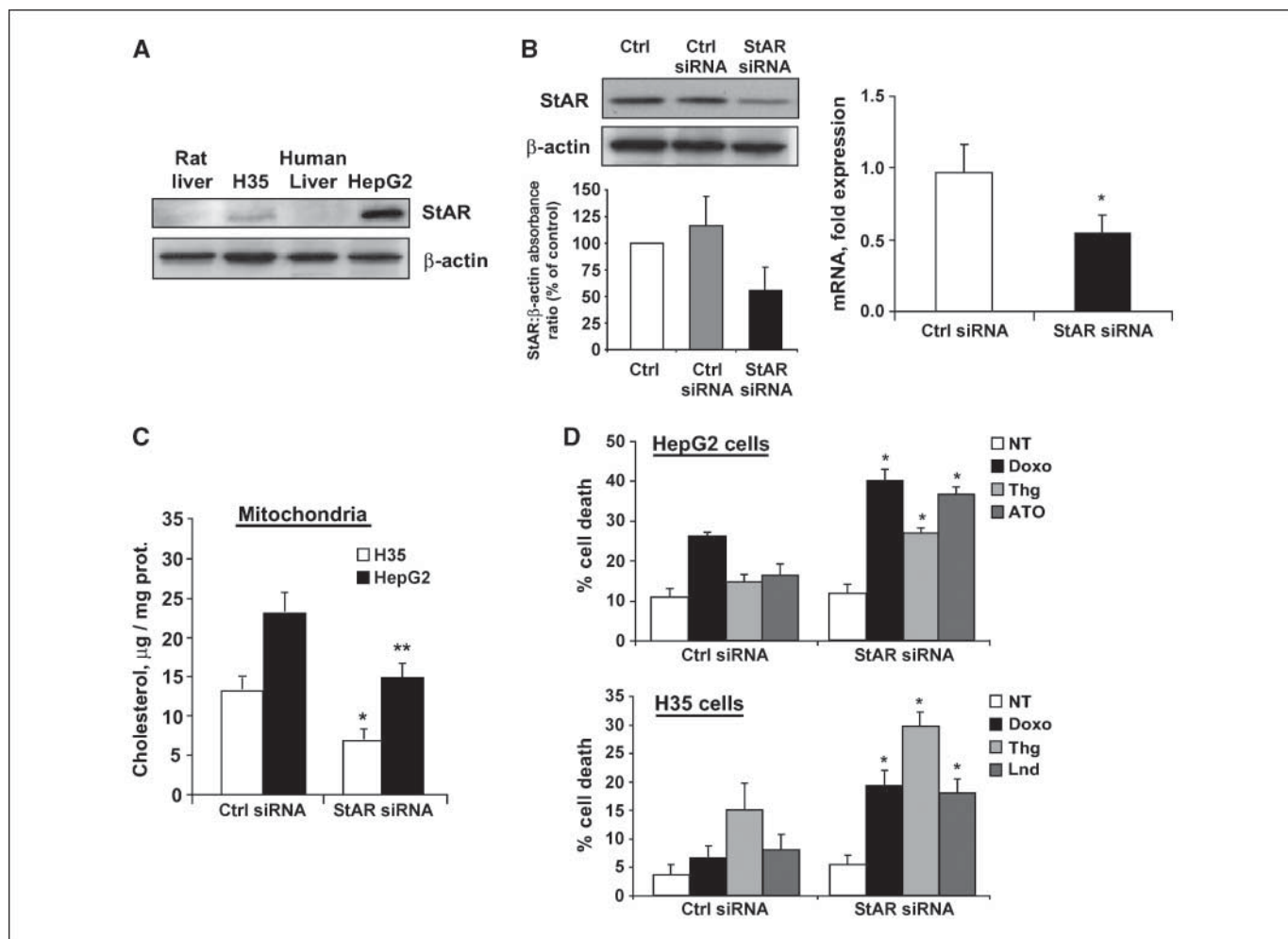


Figure 3. StAR suppression by siRNA increases the cytotoxicity induced by doxorubicin. *A*, representative immunoblot showing StAR protein abundance in H35 and HepG2 cellular extracts and in homogenates from rat and human liver. *B*, StAR mRNA silencing. HepG2 cells were transfected with the StAR siRNA or the control siRNA (*Ctrl siRNA*) as described in Materials and Methods. Cells were allowed to recover in regular culture medium for 48 h, and the levels of StAR protein were quantified by Western blot in cellular extracts (*left*; $n = 3$) and mRNA levels by real-time RT-PCR (*right*; $n = 3$). *C*, mitochondrial cholesterol levels from HepG2 and H35 cells 48 h after StAR mRNA silencing analyzed by HPLC. *D*, 48 h after transfection with StAR or control siRNA, cells were exposed to doxorubicin ($1 \mu\text{mol/L}$), thapsigargin ($0.2 \mu\text{mol/L}$), lonidamine (*Lnd*; 0.2mmol/L), and arsenic trioxide ($5 \mu\text{mol/L}$), and cell death was analyzed 48 h later by trypan blue exclusion. At least 100 cells in 4 different fields were counted and expressed as a percentage of total cells; $n = 3$; *, $P < 0.05$ versus control siRNA-transfected cells treated with doxorubicin.

Cholesterol impairs Bax-driven mitochondrial release of apoptotic proteins and permeabilization in liposomes. Mitochondrial release of prodeath factors by Bax or Bak can occur by their oligomerization and insertion into the mitochondrial outer membrane independent of MPT (22). Thus, we next examined the effect of cholesterol on Bax-driven mitochondrial permeabilization. Whereas tBid-activated Bax (tBid/Bax) stimulated the release of cytochrome *c* in control mitochondria, cholesterol-enriched mitochondria were resistant to tBid/Bax-mediated cytochrome *c* release (Fig. 5A). Similar findings were observed in the release of Smac/Diablo by cholesterol enrichment (data not shown). The incubation of cholesterol-enriched mitochondria with A₂C, a fatty acid derivative that intercalates into the lipid bilayer resulting in its fluidization (19), restored the ability of tBid/Bax to release cytochrome *c* (Fig. 5A), establishing a cause-and-effect relationship between mitochondrial membrane order and release of apoptotic proteins by Bax. Moreover, mitochondria from H35 cells were insensitive to tBid/Bax-induced release of cytochrome *c* that was restored by lovastatin treatment (Fig. 5A), which caused a

significant reduction in the mitochondrial cholesterol levels (Fig. 2D).

To further extend these observations, we next examined the effect of cholesterol on the poration of large unilamellar vesicles (LUVs) by active Bax. LUVs with or without cholesterol were loaded with self-quenching concentrations of FD-70, and the release of LUV-entrapped FD-70 was monitored as an increase in the fluorescence signal due to marker dilution in the external medium (24). As shown, the release of vesicular content by tBid/Bax was impaired in cholesterol-containing LUVs (Fig. 5B). In contrast, cholesterol was required for the release of vesicular contents induced by tetanolysin, a cholesterol-dependent pore-forming toxin known to open proteinaceous channels by inserting a transmembrane α -barrel in the bilayer (Fig. 5B; ref. 39). Treatment of LUVs with MCD reversed the inhibitory effect of cholesterol upon Bax-driven liposome permeabilization and disrupted the cholesterol-dependent channel-forming function of tetanolysin (Fig. 5B). Furthermore, cholesterol inhibited the membrane-permeabilizing activity of tBid/Bax or Bax preoligomerized with octylglucoside (Oligo-Bax)

in a dose-dependent manner (Fig. 5B). Similar to the effect found on Bax, and consistent with previous observations, cholesterol also decreased the permeabilizing activity of melittin, a widely studied antimicrobial peptide thought to breach membrane permeability barrier by forming lipid-containing toroidal pores instead of purely proteinaceous channels (40). In contrast, similar to tetanolysin and consistent with previous findings, cholesterol actually increased the release of vesicular contents induced by the channel-forming protein *S. aureus* α -toxin (Fig. 5B; ref. 41). Antiapoptotic proteins such as Bcl-2 antagonize the release of mitochondrial prodeath factors during apoptosis. To address whether cholesterol modulates Bcl-2 activity, LUVs with or without cholesterol were incubated with Bcl-2DC before tBid/Bax treatment. As seen, Bax-driven membrane permeabilization of LUVs was inhibited by Bcl-2DC in a dose-dependent manner, despite the presence of membrane cholesterol (Fig. 5C). Consistent with the findings in cholesterol-enriched rat liver mitochondria, the resistance to Bax-induced permeabilization of cholesterol-containing LUVs was reversed by

the fluidizing agent A₂C (Fig. 5D). Finally, we examined whether cholesterol altered the membrane-inserting capacity of preoligomerized Bax (Oligo-Bax) using lipid monolayers. Addition of oligo-Bax into cholesterol-containing or cholesterol-devoid lipid monolayers at different initial surface pressures allowed us to determine critical surface pressures values (π_0) for oligo-Bax, which is a measure of the membrane penetrability of the protein. As seen, π_0 values for oligo-Bax in cholesterol-containing monolayers were notably lower than in monolayers devoid of cholesterol (Fig. 5D). Together, these findings suggest that cholesterol-mediated rigidification of the bilayer directly modulates Bax permeabilizing activity, at least, in part, by reducing the capacity of Bax to insert into the lipid matrix of the membrane.

HMG-CoAR or SS inhibition potentiates chemotherapy in tumor xenografts. We further evaluated whether cholesterol regulates cancer therapy *in vivo* using tumor xenografts. Nude mice were s.c. injected with human hepatoma HepG2 cells, and tumor-bearing animals were then subjected to lipid-lowering treatments.

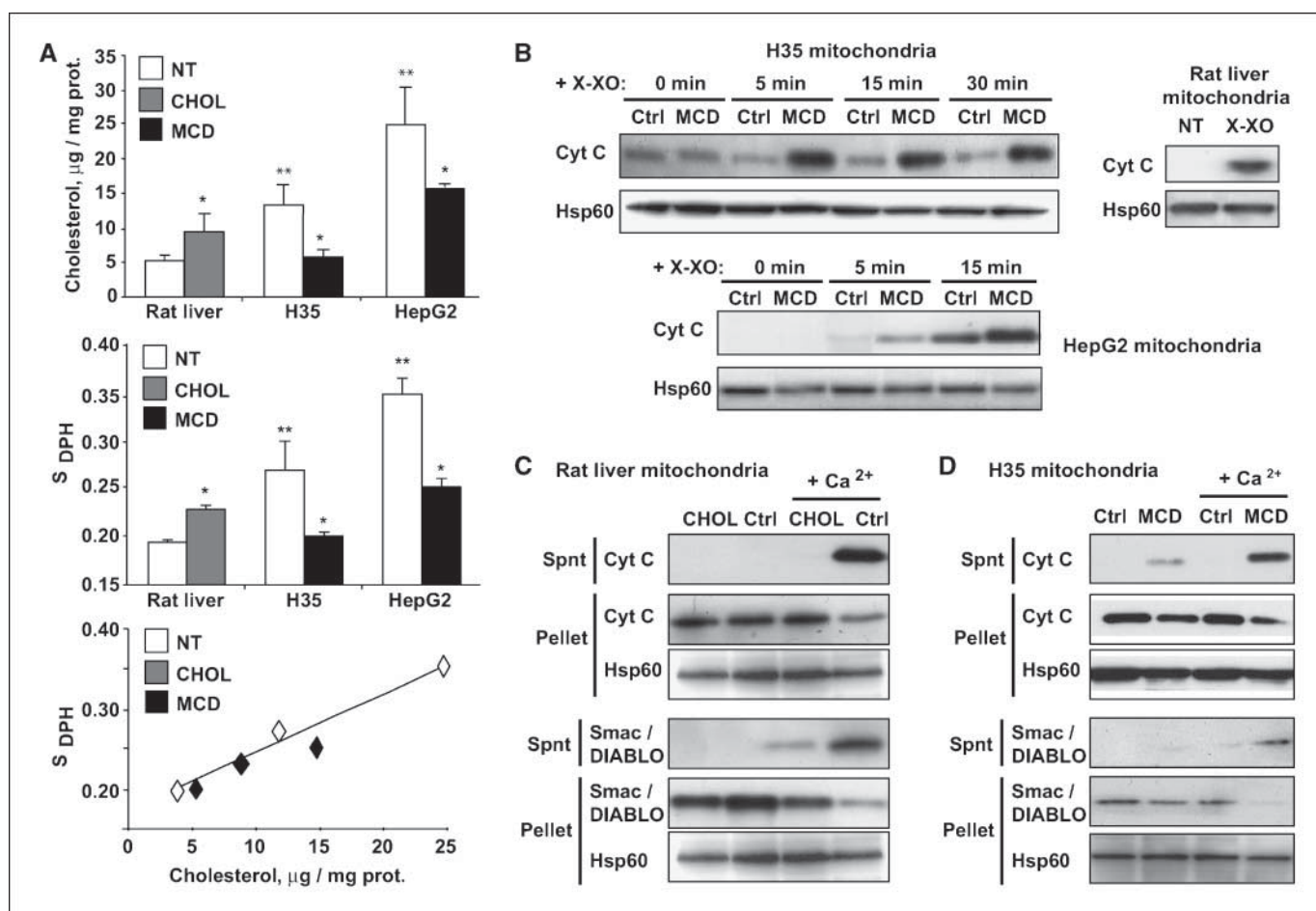


Figure 4. Mitochondrial cholesterol modulation regulates the release of cytochrome *c* and Smac/Diablo by ROS and Ca²⁺. **A**, total cholesterol levels determined by HPLC of untreated mitochondria or after cholesterol enrichment by a cholesterol-albumin complex (*CHOL*) and Me- β -cyclodextrin treatment (*MCD*; top). Middle, membrane order (*S_{DPH}*) determined from the fluorescence anisotropy monitored at 366 nm (emission, 440 nm) of mitochondria labeled with DPH, using polarizing filters in both excitation and emission planes, and normalized as per milligram of mitochondrial protein.; *n* = 3; *, *P* < 0.05 versus untreated mitochondria; **, *P* < 0.05 versus rat liver mitochondria. Bottom, correlation between mitochondrial cholesterol content and membrane order (*S_{DPH}*). **B**, control and cholesterol-depleted (*MCD*) mitochondria from H35 and HepG2 cells were incubated with xanthine (0.1 mmol/L) plus xanthine oxidase (40 mU/mL; *X-XO*), and the effect on the release of cytochrome *c* was analyzed by Western blot in the supernatants at the indicated times. Rat liver mitochondria were exposed to *X-XO*, and the release of cytochrome *c* was analyzed by Western blot in the supernatants. **C**, release of apoptogenic proteins by Ca²⁺ in control and cholesterol-enriched mitochondria from rat liver. Supernatants and pellets from mitochondria with or without CaCl₂ (100 μ M/L) treatment for 1 h were used to analyze the levels of cytochrome *c* and Smac/DIABLO. **D**, representative immunoblots of cytochrome *c* and Smac/DIABLO in supernatants and pellets of control and Me- β -cyclodextrin-treated mitochondria from H35 cells, with or without CaCl₂ (100 μ M/L) exposure for 30 min. **B** to **D**, the blots shown are representative of 3 to 4 independent experiments showing similar results. The mitochondrial hsp60 protein was visualized as a loading control.

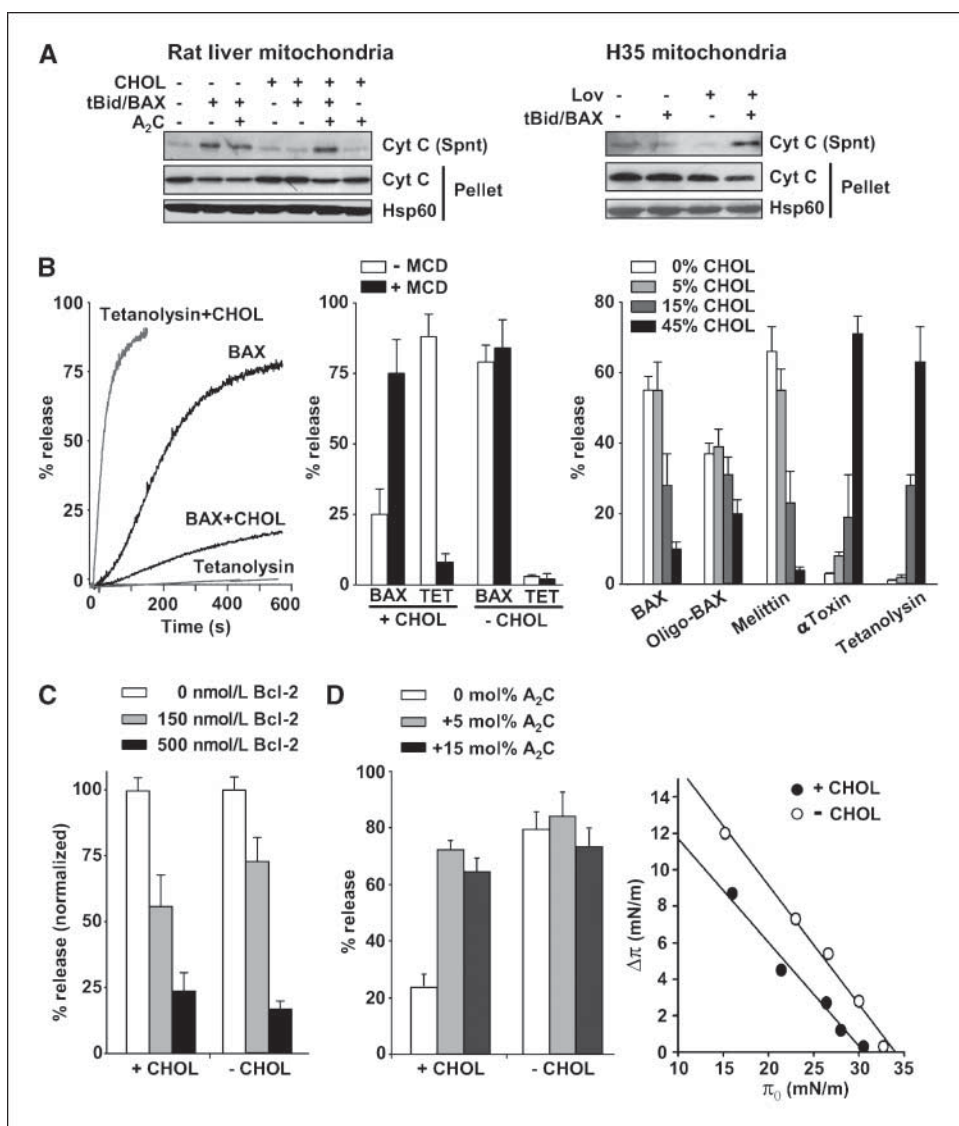


Figure 5. Cholesterol inhibits BAX-driven membrane permeabilization. *A*, representative immunoblots of cytochrome *c* in supernatants and pellets of mitochondria from control and cholesterol-enriched rat liver mitochondria (*CHOL*) with or without A₂C incubation (125 nmol/mg protein) after 45 min of tBid+Bax (20 nmol/L) treatment (*left*). *Right*, representative immunoblots of cytochrome *c* in supernatants and pellets of mitochondria from H35 cells treated or not with lovastatin (2.5 μmol/L) followed by 45 min of tBid+Bax (20 nmol/L) treatment. *B*, representative kinetics of BAX + tBID- (50 nmol/L) and tetanolysin-induced (10 nmol/L) FD70 release from LUV composed of phosphatidylcholine (PC)/cardiolipin (CL) 90/10 (mol/mol; -*CHOL*) or PC/CL/cholesterol 45/10/45 (mol/mol; +*CHOL*; *left*). *Middle*, BAX+tBID- (*BAX*; 50 nmol/L) and tetanolysin-induced (*TET*; 10 nmol/L) FD70 release from LUV, in the presence or absence of 2 mmol/L methyl-β-cyclodextrin MCD (*n* = 2). *Right*, vesicular FD-70 release induced by BAX+tBID (20 nmol/L), BAX oligomerized (*oligo-BAX*; 50 nmol/L), melittin (200 nmol/L), *S. aureus* α-toxin (α toxin; 20 nmol/L), and tetanolysin (5 nmol/L) in LUV composed of PC/CL 90/10 (mol/mol) in which PC was substituted by increasing amounts of cholesterol (*n* = 3–6). *C*, FD-70 release in LUV composed as in *B* and exposed to indicated amounts of Bcl-2 for 5 min before treatment with BAX+tBID (50 nmol/L). The data are normalized as a percentage of the release produced by BAX+tBID in the absence of Bcl-2 (*n* = 2). *D*, dose-dependent effect of A₂C on FD70 release from LUV composed of PC/CL/CHOL 45/10/45 (mol/mol) in which PC was substituted by increasing amounts of A₂C and then exposed to Bax and tBid (50 nmol/L each; *left*). *Columns*, mean two to four independent measurements; *bars*, SD. *Right*, cholesterol reduces the ability of oligomerized Bax by octylglucoside to penetrate into lipid monolayers at different surface pressures. Lipid composition was PC/CL 80/20 (-*CHOL*) and PC/CL/CHOL 40/20/40 (+*CHOL*). Critical surface pressures values were 34.6 mN/m (-*CHOL*) and 30.2 mN/m (+*CHOL*). Oligomeric Bax concentration was 400 nmol/L.

Atorvastatin was chosen for *in vivo* studies as it has been shown to be more effective than other statins both in humans and experimental animals (42, 43). We observed that both atorvastatin and YM-53601 administration significantly decreased the intra-tumor cholesterol levels (Fig. 6A). No differences in the pattern or in the amount of microvessel formation were observed in any of the experimental groups (Supplementary Fig. S8), suggesting that cholesterol content plays a minor role in tumor vascularization in this xenograft model. However, although atorvastatin notably reduced the size of the tumors or the increase in α-feto protein

levels in serum (data not shown) after 2 weeks of administration, such effect was not observed with YM-53601 treatment (Fig. 6B), indicating that inhibition of tumor progression by statins may be in part caused by isoprenoids down-regulation, in agreement with previous studies (9, 10). Interestingly, however, mice treated with atorvastatin or the SS inhibitor displayed a greater reduction in tumor growth after doxorubicin administration compared with untreated mice (Fig. 6C). Furthermore, a higher number of apoptotic cells assessed by TUNEL staining was observed in tumors from atorvastatin or YM-53601 treated mice after

doxorubicin administration compared with doxorubicin alone (Fig. 6D), indicating an increased susceptibility of HCC to the chemotherapeutic agent. Together, these data highlight the potential relevance of the increased mitochondrial cholesterol in modulating the response of HC to chemotherapy *in vivo*.

Discussion

Since its description decades ago in heterotopic Morris hepatoma xenografts in Buffalo rats, the mitochondrial enrichment in cholesterol has been viewed mainly as a key factor underlying, in part, the mitochondrial dysfunction characteristic of cancer cells (7). In this study, however, we investigated the role of cholesterol accumulation in mitochondria from HCC in response to chemotherapy *in vitro* and *in vivo* and the mechanisms involved. First, we confirmed that established human and rat HCC exhibit increased mitochondrial cholesterol levels with respect to nontumor mitochondria of human and rat liver, as reported in solid hepatoma mitochondria compared with host liver (12–15), which paralleled those found in mitochondria from primary tumors of patients with HC. Close to 70% of the cholesterol found in mitochondria from HCC was unesterified, which, in contrast to esterified cholesterol, is known to regulate membrane dynamics and order (1, 2, 19, 27, 28).

Moreover, the up-regulation of mitochondrial cholesterol content in HCC correlates with increased expression of SREBP-2 and HMG-CoAR, thus validating the cholesterol deregulation of cancer cells (7–9) and their use to examine the susceptibility to chemotherapy.

Our data uncover the resistance of HCC to chemotherapy-induced cell death that was reversed when cholesterol levels were reduced by inhibition of HMG-CoAR or SS. Although this strategy depletes cholesterol in different types of membranes other than mitochondria such as in specific domains of the plasma membrane, which has been described to modulate cancer therapy by regulating survival pathways such as Akt (5, 6), we provide evidence supporting a specific role for the mitochondrial cholesterol in modulating the susceptibility of HCC to chemotherapy. First, we show that the sensitivity of HepG2 and H35 cells to arsenic trioxide and lonidamine is potentiated by cholesterol depletion by HMG-CoAR or SS inhibition. Arsenic trioxide and lonidamine both induced MPT-mediated apoptosis by targeting the adenine nucleotide translocator (ANT)1 isoform (30, 31). Four ANT isoforms have been described, which are encoded by closely related genes that belong to the mitochondrial carrier family, and ANT is a major component of the MPT that mediate MMP and cell death (44). Mitochondria from murine cells lacking ANT 1 and ANT2 can

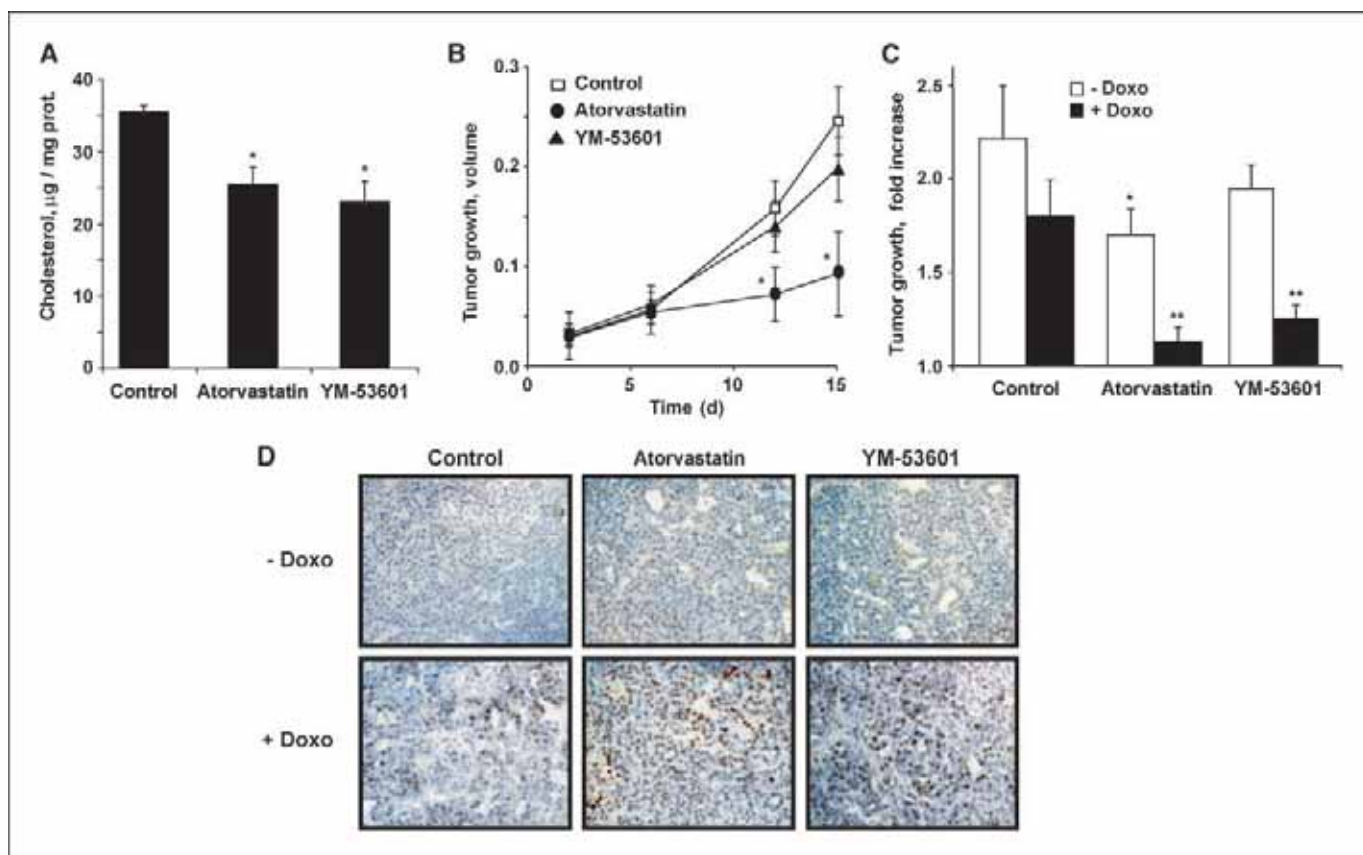


Figure 6. Reduction of cholesterol synthesis potentiates doxorubicin therapy in an *in vivo* murine model. HepG2 cells (2.5×10^6 cells per animal) were implanted s.c. in the flanks of athymic mice as described in Materials and Methods. When tumors averaged 50 mm^3 in size (2–3 wk), mice were randomly divided into the experimental groups and treated by a daily p.o. gavage with atorvastatin (10 mg/kg body weight) or YM-53601 (15 mg/kg body weight) for 2 wk. **A**, cholesterol levels from control (vehicle treated), atorvastatin, and YM-53601-treated tumors. ($n = 5$). *, $P < 0.05$ versus control. **B**, tumor growth measured periodically at the indicated days over the treatment. The volume was calculated as length \times width $^2 \times 0.5$. The experiment was performed twice with similar results. *, $P < 0.05$ versus vehicle-treated tumor. **C**, after 2 wk of treatment, some animals received an i.p. injection of doxorubicin (10 mg/kg). Fold increase of tumor growth was evaluated in each experimental group ($n = 5$) by calculating the changes in tumor size observed after administration of the chemotherapy agent. The experiment was performed twice with similar results. *, $P < 0.05$ versus doxorubicin-treated control mice. **D**, apoptosis induced by the chemotherapy agent in tumors from animals treated either with statins or SS inhibitor was analyzed by TUNEL-positive staining areas. Representative images of three samples per group performed showing similar results.

still undergo Ca^{2+} -induced swelling and MPT, although at a higher threshold (45), which have been viewed as evidence against a role for ANT in MPT and hence in MMP. However, the ability of ANT1/ANT2-deficient cells to undergo MMP might be due to the functional compensation by a novel ANT isoform identified recently (46) or by other mitochondrial carriers able to form pores in the inner membrane, such as the ornithine/citrulline transporters or the phosphate carrier (47).

Furthermore, additional evidence for a role of mitochondrial cholesterol in chemotherapy susceptibility derives from the outcome observed by StAR silencing. StAR is a polypeptide responsible for the intramitochondrial transport of cholesterol (11, 16) and both HepG2 and H35 cells overexpress StAR levels. StAR silencing by siRNA sensitizes these cell lines to chemotherapy-induced cell death. Consistent with its role in the mitochondrial trafficking of cholesterol, the sensitization to chemotherapy by StAR down-regulation could reflect impaired cholesterol transport from the outer to the inner mitochondrial membranes. However, our data indicate that StAR depletion by siRNA resulted in the net decrease of mitochondrial cholesterol levels, implying lower delivery of cholesterol to mitochondria from extramitochondrial sources by other proteins including (StAR)-related lipid transfer (StART) family members. Although the molecular mechanisms of StAR are poorly understood, recent findings have shown that StAR interacts with specific outer mitochondrial membrane proteins such as VDAC1 and the phosphate carrier protein (48). Whether StAR works in concert with other StART members via interaction with specific proteins of the outer mitochondrial membrane to deliver cholesterol to mitochondria remains to be investigated. Thus, collectively, these data strongly suggest that the enrichment of mitochondria in cholesterol plays a role in the resistance of chemotherapy acting via mitochondria.

To explore the mechanism of the mitochondrial cholesterol-mediated resistance to chemotherapy, we focused on the membrane properties of isolated mitochondria from HCC. We observed that mitochondria from HepG2 and H35 cells exhibit higher order which is reversed by cholesterol extraction with MCD or fluidization by A_2C , translating in increased MMP and release of cytochrome *c* and Smac/Diablo in response to Ca^{2+} , superoxide anion, and active Bax. An important piece of evidence supporting the specificity of cholesterol in the regulation of MMP is the fact that the *in vitro* enrichment of rat liver mitochondria in cholesterol to about the same levels seen in H35 cells reproduces the resistance to MMP and release of intermembrane apoptotic proteins induced by active Bax. Consistent with these observations, cholesterol-containing LUVs are also resistant to the poration induced by Bax, and cholesterol dose-dependently inhibited the vesicular release induced by melittin, which has been proposed to permeabilize membranes by forming toroidal lipidic pores (40). Because positive monolayer curvature stress contributes to MMP by Bax (24), it is conceivable that cholesterol may stabilize mitochondrial membranes against Bax permeabilizing action through induction of negative curvature, consistent with the accumulation of cholesterol in high-curvature regions of membranes (49). Remarkably, cholesterol decreased the capacity of Bax to penetrate into the membrane, which is considered to be a critical step in Bax activation. Thus, through modulation of membrane order and curvature stress, cholesterol may regulate Bax activity and the formation of lipidic pores in mitochondrial membranes and, hence, cell death susceptibility.

We also observed that tumor growth and chemotherapy susceptibility in heterotopic murine tumor xenografts were modulated by HMG-CoAR or SS inhibition, with both strategies decreasing tumor mitochondrial cholesterol levels. The generation of farnesyl diphosphate from mevalonate branches into isoprenoids and squalene, which is then committed for cholesterol synthesis (Supplementary Fig. S4). Isoprenoids are known to modify the function of proteins through posttranslational modifications such as the Rho family of small GTPases that coordinates many aspects of cell motility through the reorganization of actin cytoskeleton and changes in gene transcription (9, 10). The isoprenylation is essential for Rho-mediated invasion of various tumors, including melanoma, pancreatic, and breast cancer cells (50). In the *in vivo* xenograft model, we observed that HMG-CoAR but not SS reduced tumor growth, suggesting that inhibition of tumor progression by statins may be in part caused by isoprenoids down-regulation. However, the susceptibility of HC xenografts to chemotherapy are observed upon statins or SS inhibition, supporting the relevance of cholesterol rather than isoprenoids generation in the resistance of HCC to chemotherapy. Thus, our findings regarding the role of SS inhibition on chemotherapy along with recent reports in different types of cancer cells such as human prostate carcinoma cell lines (51) highlight the relevance of cholesterol modulation in cancer therapy.

Interestingly in line with our data, recent findings in liposomes confirmed that mitochondrial Bax activation is inhibited by cholesterol (52). Moreover, mitochondria from HeLa cells treated with U18666A, which caused mitochondrial cholesterol up-regulation, showed a delay in the release of Smac/Diablo and cytochrome *c*, as well as in Bax oligomerization and partial protection against stress-induced apoptosis (52).

In summary, although enhanced cholesterol levels in cell membranes including mitochondria from cancer cells have been long known, we show here for the first time the relevance of the cholesterol-mediated regulation of mitochondrial membrane dynamics in the response of HCC to mitochondrial-targeting chemotherapy *in vitro* and *in vivo*. Moreover, the potentiation of HC chemotherapy by SS inhibition, which reduces cholesterol levels including in mitochondria, without perturbing isoprenoid metabolism, validates the specificity of cholesterol in chemotherapy resistance, and revitalizes the potential benefit of cholesterol down-regulation in cancer therapy.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

Received 11/8/2007; revised 3/14/2008; accepted 4/16/2008.

Grant support: Research Center for Liver and Pancreatic Diseases Grant P50 AA 11999 funded by the US National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism; Plan Nacional de I+D Grants SAF2005-03923, SAF2005-03943, SAF2006-06780, BFU2005-06095, and FIS06/0395; the Centro de Investigacion Biomedica en Red de Enfermedades Hepaticas y Digestivas supported by the Instituto de Salud Carlos III; the Ramon y Cajal Research Program (Ministry of Education and Science; A. Colell and A. Morales); and a predoctoral fellowship from the Basque Government (O. Terrones).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

We thank Susana Nuñez for the technical assistance and Dr. Bataller for the donation of human liver samples; Virginia Villar from Clinic and Center for Applied Medical Research, Pamplona, for her assistance in providing human HC samples; and the Servicio Científico-Técnico of IDIBAPS for electron microscopy, confocal imaging, and flow cytometry analysis.

References

1. Maxfield FR, Tabas I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* 2005;438:612-21.
2. Gimpl G, Burger K, Fahrenholz F. Cholesterol as modulator of receptor function. *Biochemistry* 1997;36:10959-74.
3. Simons K, Ehehalt R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest* 2002;110:597-603.
4. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002;109:1125-31.
5. Zhuang L, Kim J, Adam RM, Solomon KR, Freeman MR. Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *J Clin Invest* 2005;115:958-68.
6. Li YC, Park MJ, Ye S-K, Kim C-W, Kim Y-N. Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents. *Am J Pathol* 2006;168:1107-18.
7. Siperstein MD. Cholesterol, cholesterologenesis and cancer. *Adv Exp Med Biol* 1995;369:155-66.
8. Duncan RE, El-Sohehy A, Archer MC. Mevalonate promotes the growth of tumors derived from human cancer cells *in vivo* and stimulates proliferation *in vitro* with enhanced cyclin-dependent kinase-2 activity. *J Biol Chem* 2004;279:33079-84.
9. Demierre MF, Higgins PDR, Gruber SB, Hawk E, Lippman SM. Statins and cancer prevention. *Nat Rev Cancer* 2005;5:930-42.
10. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:89-118.
11. Soccio RE, Breslow JL. Intracellular cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1150-60.
12. Feo F, Canuto RA, Bertone G, Garcea R, Pani P. Cholesterol and phospholipid composition of mitochondria and microsomes isolated from morris hepatoma 5123 and rat liver. *FEBS Lett* 1973;33:229-32.
13. Crain RC, Clark RW, Harvey BE. Role of lipid transfer proteins in the abnormal lipid content of Morris hepatoma mitochondria and microsomes. *Cancer Res* 1983;43:3197-202.
14. Campbell AM, Capuano A, Chan SHP. A cholesterol-binding and transporting protein from rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2002;1567:123-32.
15. Feo F, Canuto RA, Garcea R, Gabriel L. Effect of cholesterol content on some physical and functional properties of mitochondria isolated from adult rat liver, fetal liver, cholesterol-enriched liver and hepatomas AH-130, 3924A and 5123. *Biochim Biophys Acta* 1975;413:116-34.
16. Hall EA, Ren S, Hylemon PB, et al. Detection of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR, in human liver cells. *Biochim Biophys Acta* 2005;1733:111-19.
17. Colell A, García-Ruiz C, Morales A, et al. Transport of reduced glutathione in hepatic mitochondria and mitoplasts from ethanol-treated rats: effect of membrane physical properties and S-adenosyl-L-methionine. *Hepatology* 1997;26:699-708.
18. Coll O, Colell A, García-Ruiz C, Kaplowitz N, Fernandez-Checa JC. Sensitivity of the 2-oxoglutarate carrier to alcohol intake contributes to mitochondrial glutathione depletion. *Hepatology* 2003;38:692-702.
19. Colell A, García-Ruiz C, Lluís JM, Coll O, Marí M, Fernández-Checa, JC. Cholesterol impairs the adenine nucleotide translocator-mediated mitochondrial permeability transition through altered membrane fluidity. *J Biol Chem* 2003;278:33928-35.
20. Baggetto LG, Clottes E, Vial C. Low mitochondrial proton leak due to high membrane cholesterol content and cytosolic creatine kinase as two features of the deviant bioenergetics of Ehrlich and AS30-D tumor cells. *Cancer Res* 1992;52:4935-41.
21. Galluzzi L, Larochette N, Kroemer G. Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy. *Oncogene* 2006;5:4812-30.
22. Green DR. At the gates of death. *Cancer Cell* 2006;9:328-30.
23. Motola-Kuba D, Zamora-Valdes D, Uribe M, Mendez-Sanchez M. Hepatocellular carcinoma. An overview. *Ann Hepatol* 2006;5:16-4.
24. Terrones O, Antonsson B, Yamaguchi H, et al. Lipidic pore formation by the concerted action of proapoptotic Bax and tBid. *J Biol Chem* 2004;279:30081-91.
25. Mari M, Colell A, Morales A. Acidic sphingomyelinase downregulates the liver-specific methionine adenosyltransferase 1A, contributing to tumor necrosis factor-induced lethal hepatitis. *J Clin Invest* 2004;113:895-904.
26. Duncan IW, Culbreth PH, Burtis CA. Determination of free, total, and esterified cholesterol by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1979;162:281-92.
27. Mari M, Caballero F, Colell A, et al. Mitochondrial free loading sensitizes to TNF and Fas mediated steatohepatitis. *Cell Metab* 2006;4:185-98.
28. Van Blitterswijk WJ, van Hoeven RP, van der Meer B.W. Lipid structural order parameters (reciprocal of fluidity) in biomembranes derived from steady-state fluorescence polarization measurements. *Biochim Biophys Acta* 1981;644:323-32.
29. Hudd C, Euhus DM, LaRegina MC, Herbold DR, Palmer DC, Johnson FE. Effect of cholecystokinin on human cholangiocarcinoma xenografted into nude mice. *Cancer Res* 1985;45:1372-6.
30. LeBras M, Borgne-Sanchez A, Touat Z, et al. Chemoprevention by knockdown of adenine nucleotide translocase-2. *Cancer Res* 2006;66:9143-52.
31. Don AS, Kisker O, Dilda P, et al. A peptide trivalent arsenical inhibits tumor angiogenesis by perturbing mitochondrial function in angiogenic endothelial cells. *Cancer Cell* 2003;3:497-509.
32. Denmeade SR, Isaacs JT. The SERCA pump as a therapeutic target: making a "smart bomb" for prostate cancer. *Cancer Biol Ther* 2005;4:14-22.
33. Kumar D, Kirshenbaum L, Li T, Danelisen I, Signal P. Apoptosis in isolated adult cardiomyocytes exposed to adriamycin. *Ann N Y Acad Sci* 1999;874:156-68.
34. Scharnagal H, Schinker R, Gierens H, Nauck M, Wieland H, März W. Effect of atorvastatin, simvastatin and lovastatin on the metabolism of cholesterol and triacylglycerides in HepG2 cells. *Biochem Pharmacol* 2001;62:1545-55.
35. Hishita T, Tada-Oikawa S, Tohyama K, et al. Caspase-3 activation by lysosomal enzymes in cytochrome c-independent apoptosis in myelodysplastic syndrome-derived cell line P39. *Cancer Res* 2001;61:2878-84.
36. Ugawa T, Kakuta H, Moritani H, et al. YM-53601, a novel squalene synthase inhibitor, reduces plasma cholesterol and triglyceride levels in several animal species. *Br J Pharmacol* 2000;131:63-70.
37. Madesh M, Hajnoczky G. VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release. *J Cell Biol* 2001;155:1003-15.
38. Ichas F, Mazat JP. From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochim Biophys Acta* 1998;1366:33-50.
39. Rottem S, Cole RM, Habid WH, Barile MF, Hardegree MC. Structural characteristics of tetanolysin and its binding to lipid vesicles. *J Bacteriol* 1982;152:888-92.
40. Allende D, Simon SA, McIntosh TJ. Melittin-induced bilayer leakage depends on lipid material properties: evidence for toroidal pores. *Biophys J* 2005;88:1828-37.
41. Forti S, Menestrina G. Staphylococcal α -toxin increases the permeability of lipid vesicles by cholesterol- and pH-dependent assembly of oligomeric channels. *Eur J Biochem* 1989;181:767-73.
42. Jones P, Kafonek S, Laurora I, Huninghake D. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study). *Am J Cardiol* 1998;81:582-87.
43. Auerback BJ, Krause BR, Bisgaier CL, Newton RS. Comparative effects of HMG-CoA reductase inhibitors on apo B production in the casein-fed rabbit: atorvastatin versus lovastatin. *Atherosclerosis* 1995;115:173-80.
44. Halestrap AP, Brenner C. The adenine nucleotide translocator: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem* 2003;10:1507-25.
45. Kokoszka R, Waymire KG, Levy SE, et al. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* 2004;427:461-5.
46. Dolce V, Scarcia P, Iacopetta D, Palmieri F. A fourth ADP/ATP carrier isoform in man: identification, bacterial expression, functional characterization and tissue distribution. *FEBS Lett* 2005;579:633-7.
47. Palmieri F. The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch* 2004;447:689-709.
48. Bose M, Whittall RM, Miller L, Bose HS. Steroidogenic activity of StAR requires contact with mitochondrial VDAC1 and PCP. *J Biol Chem* 2008;14:8837-45.
49. Wang W, Yang L, Huang HW. Evidence of cholesterol accumulated in high curvature regions: implication to the curvature elastic energy for lipid mixtures. *Biophys J* 2007;92:2819-30.
50. Collisson EA, Kleer C, Wu M, et al. Atorvastatin prevents RhoC isoprenylation, invasion, and metastasis in human melanoma cells. *Mol Cancer Ther* 2003;2:941-48.
51. Brusselmanns K, Timmermans L, Van de Sande T, et al. Squalene synthase: A determinant of raft-associated cholesterol and modulator of cancer cell proliferation. *J Biol Chem* 2007;282:18777-85.
52. Lucken-Ardjomande S, Montessuit S, Martinou JC. Bax activation and stress-induced apoptosis delayed by the accumulation of cholesterol in mitochondrial membranes. *Cell Death Differ* 2008;15:484-93.