

# Muerte Celular

## Mecanismos Moleculares Implicados en la Toxicidad de Xenobióticos

M. J. Gómez-Lechón

### TOXINAS

#### Intrínsecas

Efecto en todos los individuos expuestos  
Efecto dosis-dependiente  
Efecto predecible en animales

#### Latentes

Requieren ser biotransformadas  
para ejercer su efecto tóxico.

#### Activas

Son tóxicas *per se*  
No requieren ser  
biotransformadas para  
ejercer su efecto tóxico.

#### Idiosincrásicas

Efecto solo en algunos individuos

## Toxicidad por fármacos como consecuencia del metabolismo por citocromo P450

- 1 Compuestos que producen especies activas del oxígeno (ROS)
  - Paraquat, quinonas etc.
- 2 Compuestos que sufren *bioactivación* dando origen a metabolitos reactivos
  - Radicales, epóxidos, N-óxidos, S-óxidos etc.

El balance entre la bioactivación, detoxicación y los mecanismos de defensa de la célula, es lo que determina si un metabolito reactivo puede o no producir efectos tóxicos en las células

## Naturaleza y magnitud del daño celular por tóxicos

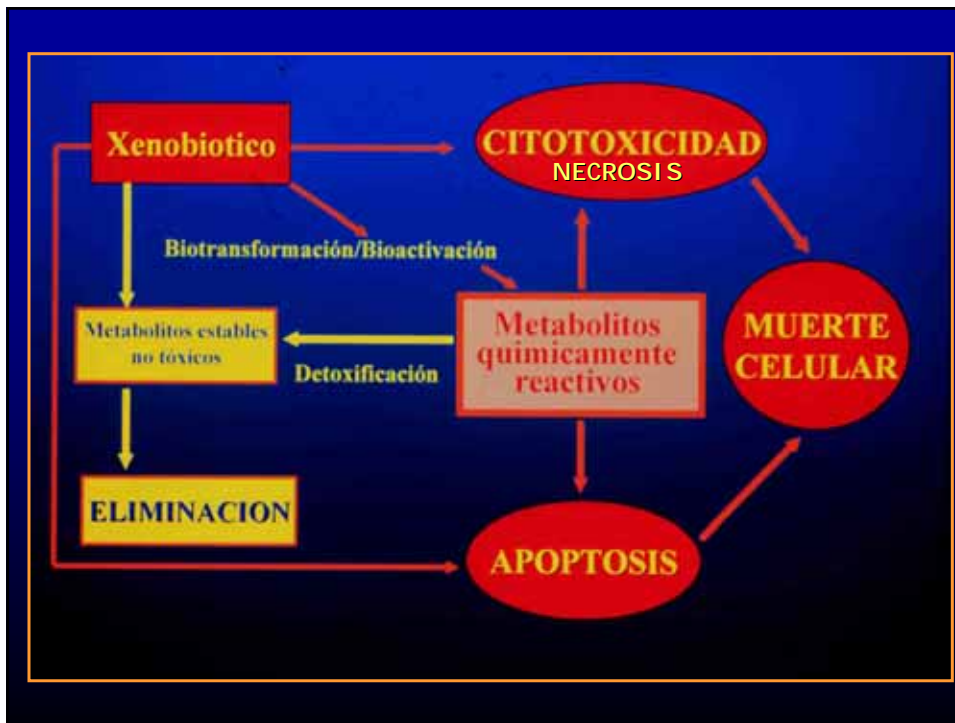
**Dosis** del tóxico administrada

**Balance** biotransformación/detoxificación

**Accesibilidad** del tóxico o sus metabolitos a estructuras/macromoléculas diana

**Relevancia** de las macromoléculas diana

**Reversibilidad:** Capacidad defensiva y de reparación de la célula frente a la agresión

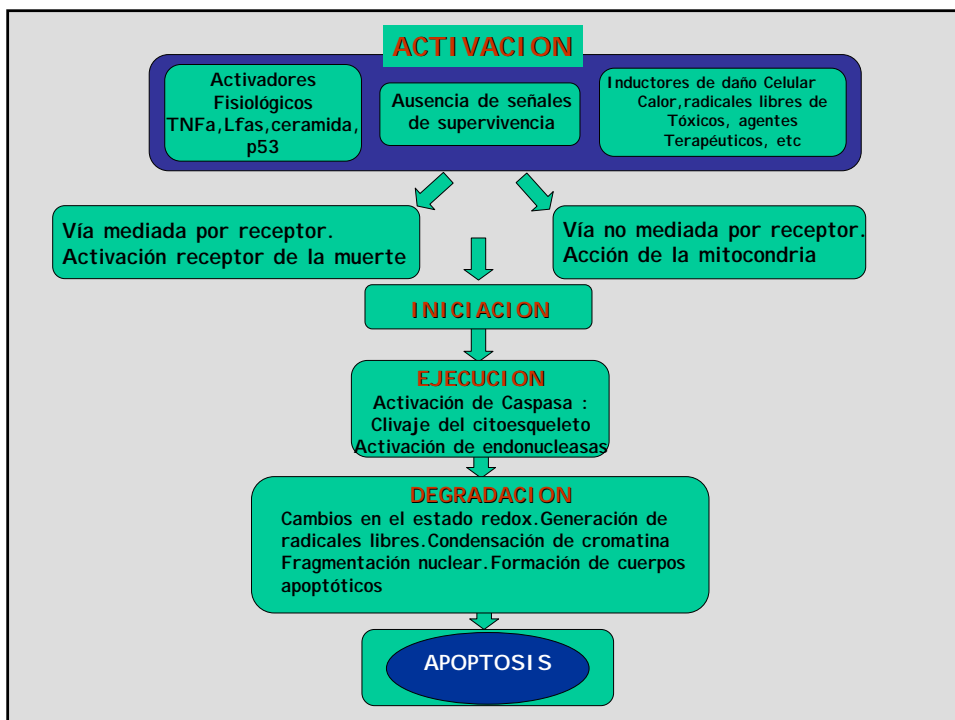
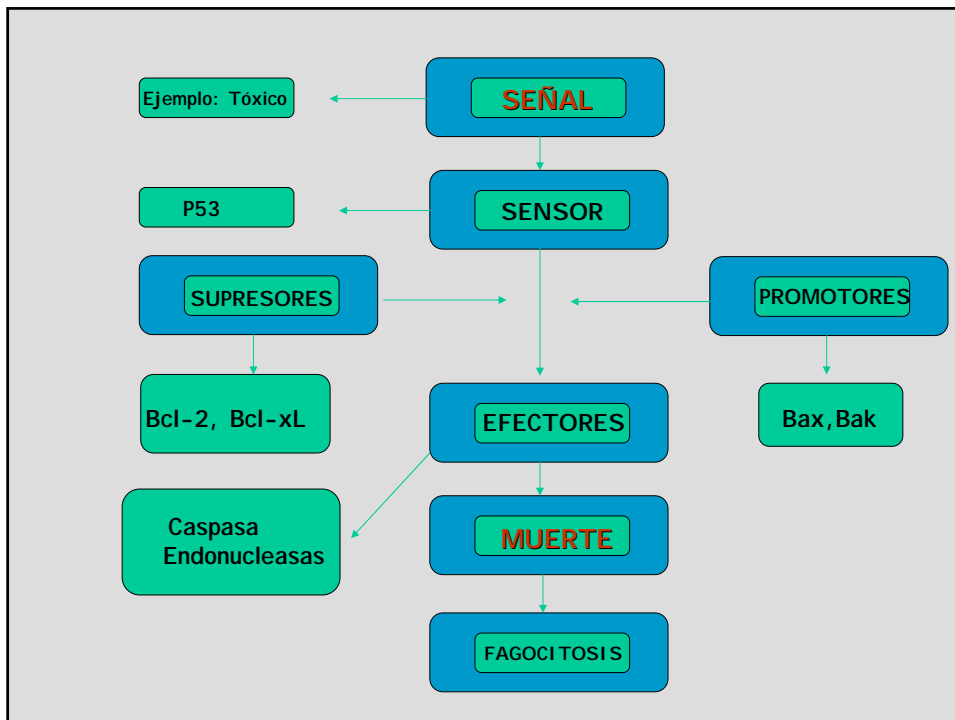


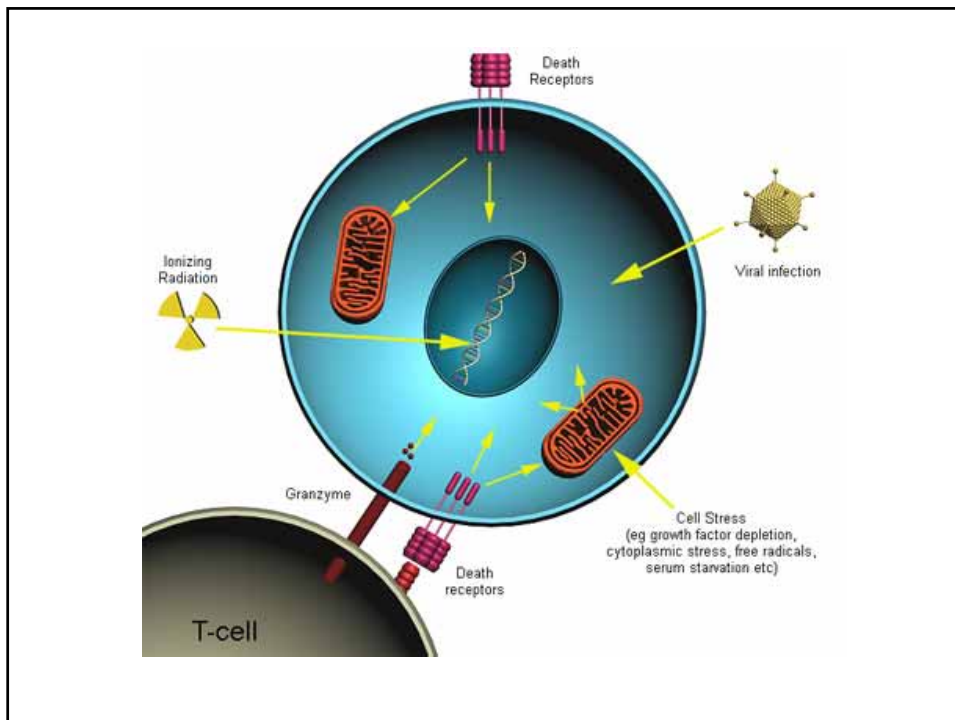
**EVENTOS CELULARES DURANTE LA APOPTOSIS**

**Apoptosis**

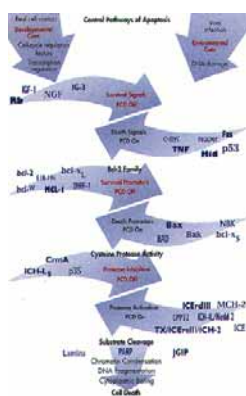
**Crónica de una Muerte Anunciada...**

The slide features a fluorescence microscopy image of two cells with red fluorescent nuclei, indicating DNA fragmentation during apoptosis. To the right is a cartoon illustration of a guinea pig on a guillotine, symbolizing the 'pre-announced death' of the cell. The text 'EVENTOS CELULARES DURANTE LA APOPTOSIS' is at the top, 'Apoptosis' is in large bold letters in the middle, and 'Crónica de una Muerte Anunciada...' is at the bottom.





## SECUENCIA DE EVENTOS CELULARES DURANTE LA APOPTOSIS



ACTIVACION	SEÑALIZACION	EJECUCION
Exterior Interior	Sensores (p53) Supresores Promotores Ceramide Oncogenes	Caspasas Endonucleasas Calpains Granzima B

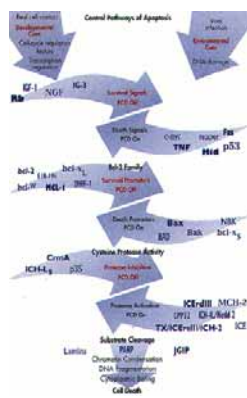
## SECUENCIA DE EVENTOS CELULARES DURANTE LA APOPTOSIS



**ACTIVACION**    SEÑALIZACION    EJECUCION

- Pérdida de actividad supresora de la apoptosis
- Falta de factores de supervivencia/crecimiento
- Disminución del contacto intercelular
- Unión de un ligando a un receptor de membrana
- Estimulos externo adversos :tóxicos, estrés, etc

## SECUENCIA DE EVENTOS CELULARES DURANTE LA APOPTOSIS



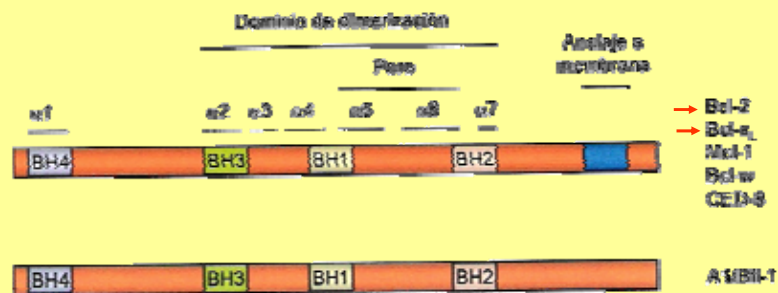
**ACTIVACION**    SEÑALIZACION    EJECUCION

- Ca<sup>2+</sup> (activación de lipasas, proteasas, etc)
- Sensores (p53, factor de transcripción que se activa en respuesta a lesión del DNA)
- Ceramida (glucolípidio sintetizado en el RE y mitocondria. Su traslocación a la mitocondria y disminuye el PMM e induce la formación del PT)
- Oncogenes (c-myc)
  - Supresores
  - Promotores

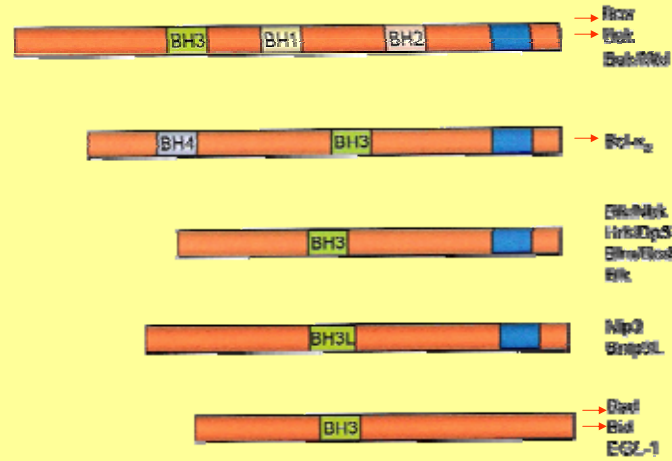
## Molecular Regulation of Apoptosis Bcl-2 Family Members

- 1) Familia de proteínas que en función de su estructura y actividad se dividen en anti- and pro- apoptoticas.
- 2) Presentan diferentes dominios conservados de homología (BH)
- 3) Los dominios de homología son : BH1, BH2, BH3 y BH4..
- 4) Los dominios BH interactúan unos con otros creando oligómeros entre proteínas pro y anti-apoptoticas.
- 5) Poseen un dominio transmembrana que facilita su inserción en las membranas (incluyendo la membrana externa de la mitocondria)
- 6) Modifican la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa.

### Miembros antiapoptóticos

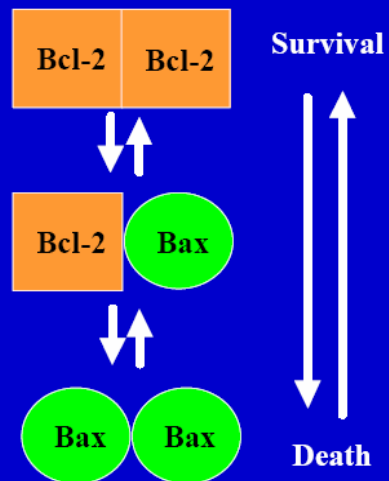


### Miembros proapoptóticos



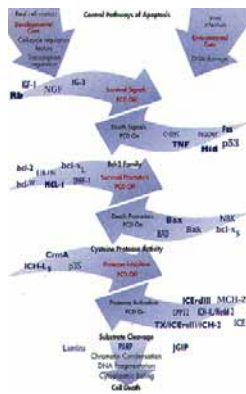
## Bcl-2 Homolog discovered

- 1993-Bcl-2 IP identified Binding Partner-Bax
- Bax Homologous to Bcl-2
- Had the opposite activity when overexpressed.





## SECUENCIA DE EVENTOS CELULARES DURANTE LA APOPTOSIS



ACTIVACION

SEÑALIZACION

EJECUCION

↓

Caspasas (cisteina-proteasas)  
 Iniciadoras  
 Efectoras  
 Endonucleasas  
 Calpains  
 Gramzima B

## Caspase's

JBC V 274 Pg 200-49

- First identified as the enzyme which activates (converts) Interleukin 1 $\beta$  (ICE).
- Cysteine protease which cleaves after Aspartic Acid. (Asp)
- Activated by proteolysis (after Asp).
- Substrates include themselves and other Caspase's
- Thus amplification cascades are possible.
- Apoptosis substrates are numerous (~40 and rising) and include PARP, DFF(ICAD), BID.

# Molecular Regulation of Apoptosis Caspases

Apoptosis relies on a cascade of Caspase Activity

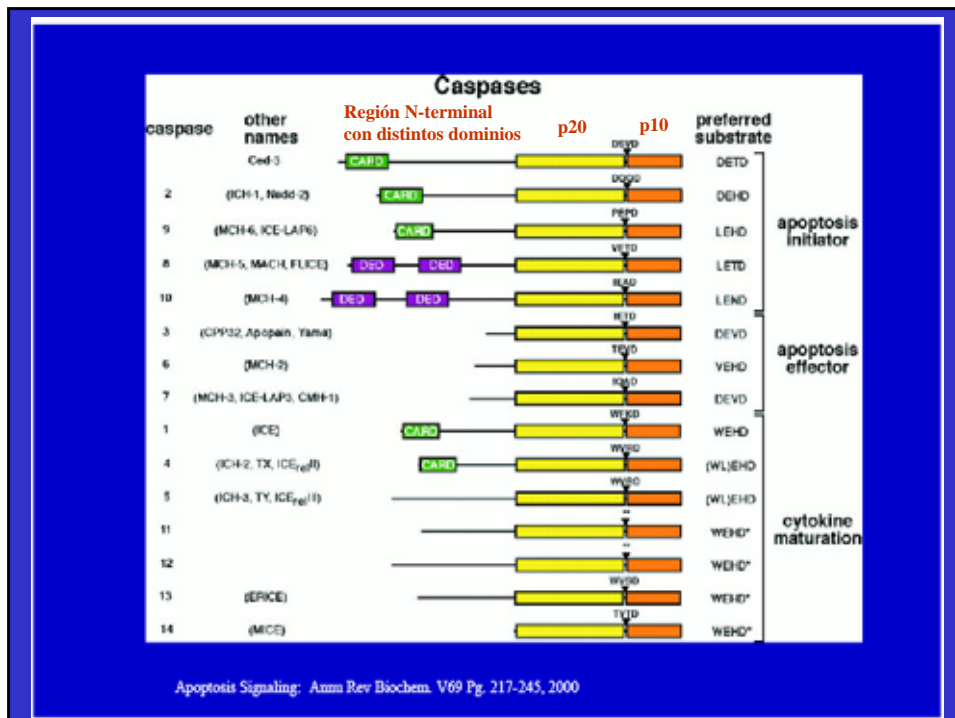
Two distinct classes

## a) Initiator Caspases

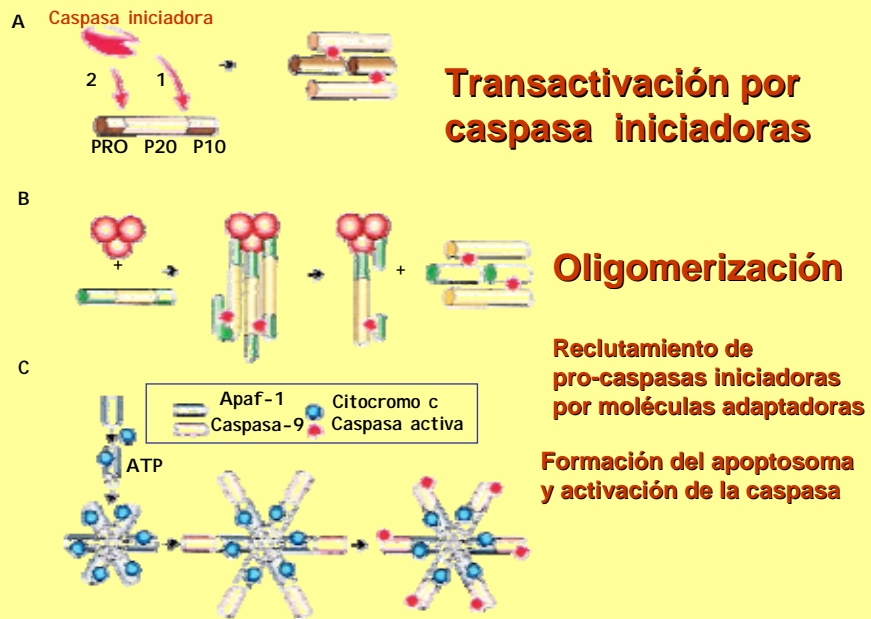
- activated by upstream signaling events that cause procaspase to aggregate and undergo autocleavage
- cleave and activate the effector caspases

## b) Effector Caspases

- activated by initiator caspases
- responsible for cleaving most apoptotic substrates

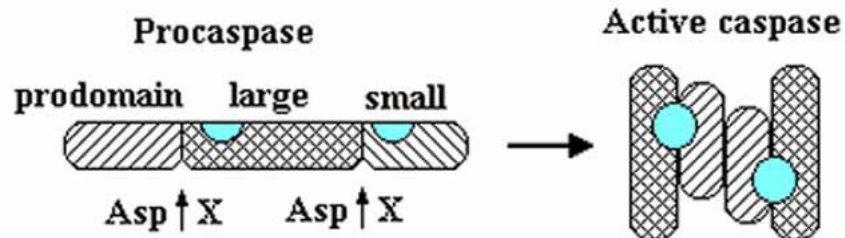


## ACTIVACION DE LAS CASPASAS



### Transactivación por caspasa iniciadoras

Caspases are synthesized as inactive zymogens  
 La activación requiere el procesamiento en 2 sitios



# Molecular Regulation of Apoptosis Pathways

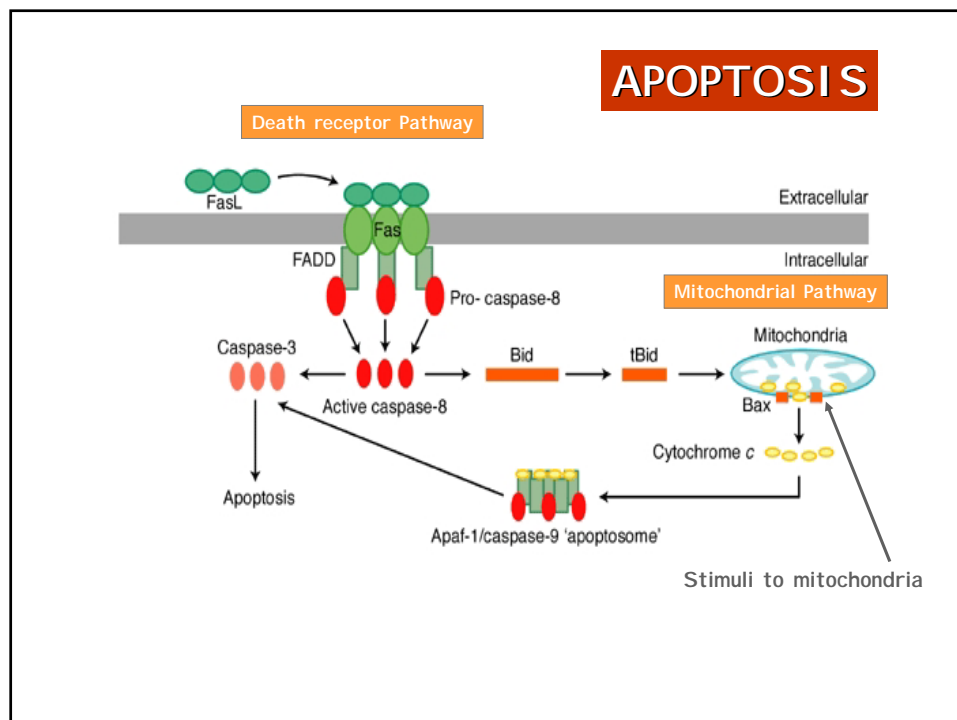
Two major apoptotic pathways:

## 1) Intrinsic pathway

apoptosis initiated by problems within the cell  
(DNA damage, oxidative stress, mitochondrial damage)

## 2) Extrinsic pathway

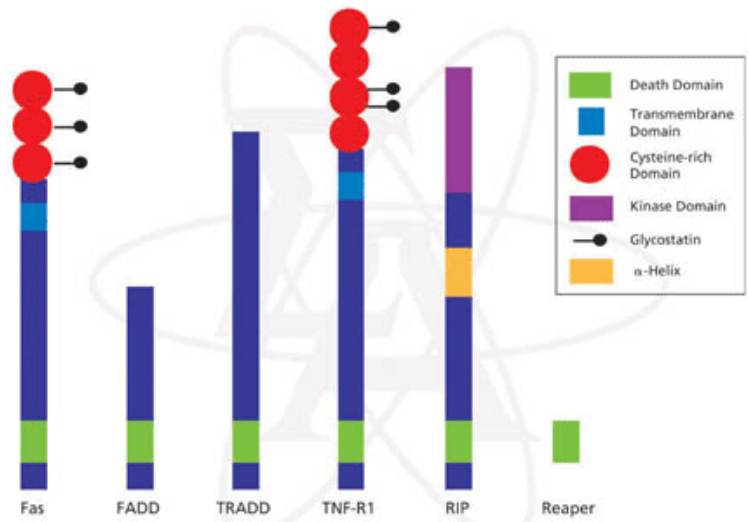
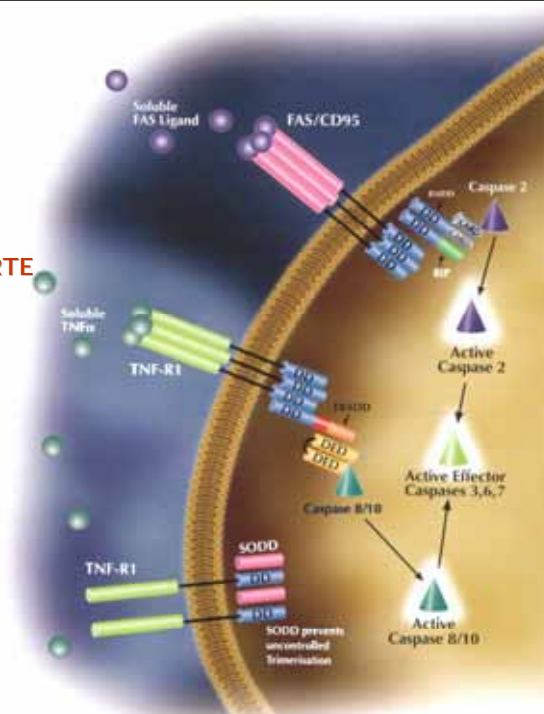
apoptosis initiated by cell signaling from outside the cell:  
ligands



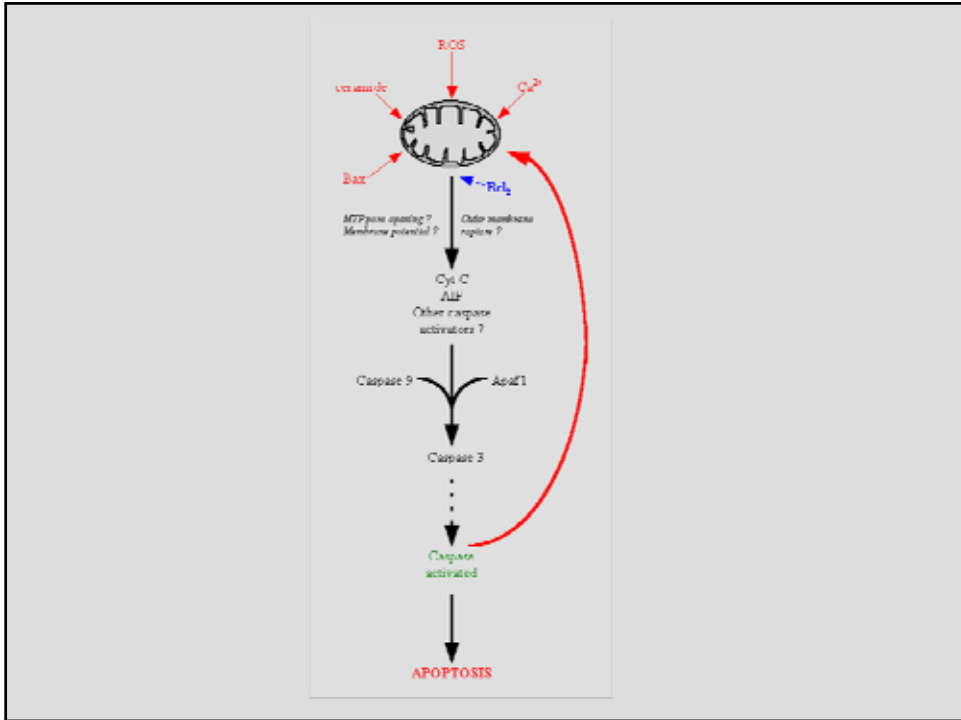
# APOPTOSIS

## VIA EXTRINSECA

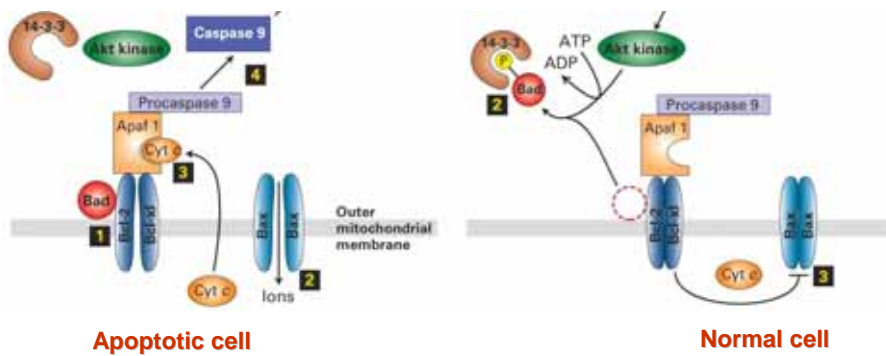
### RECEPTORES DE MUERTE



RECEPTORES DE MUERTE

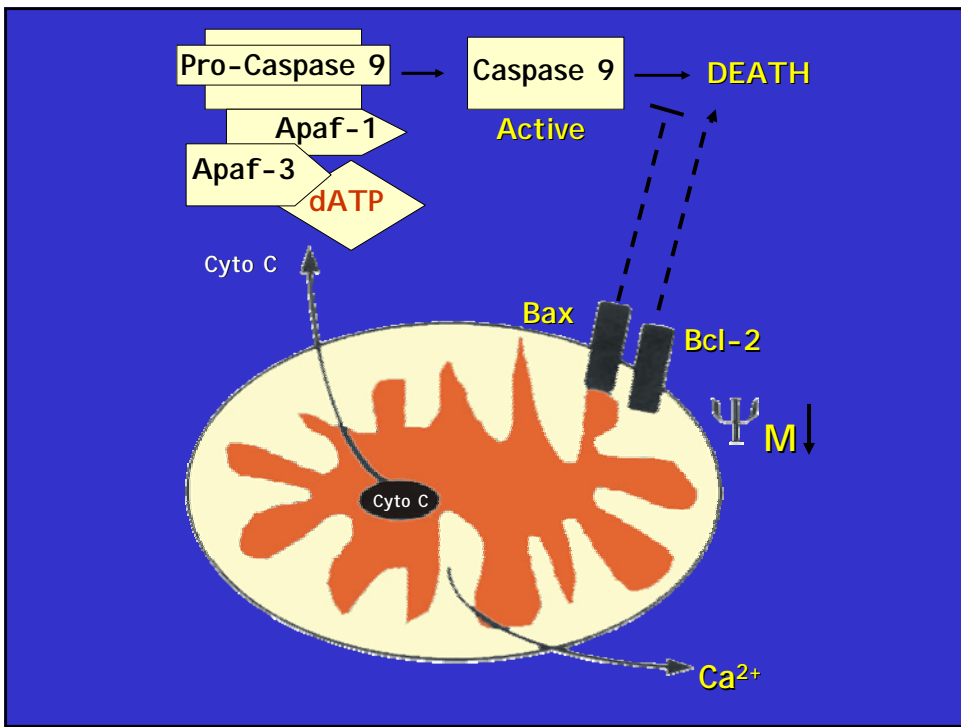
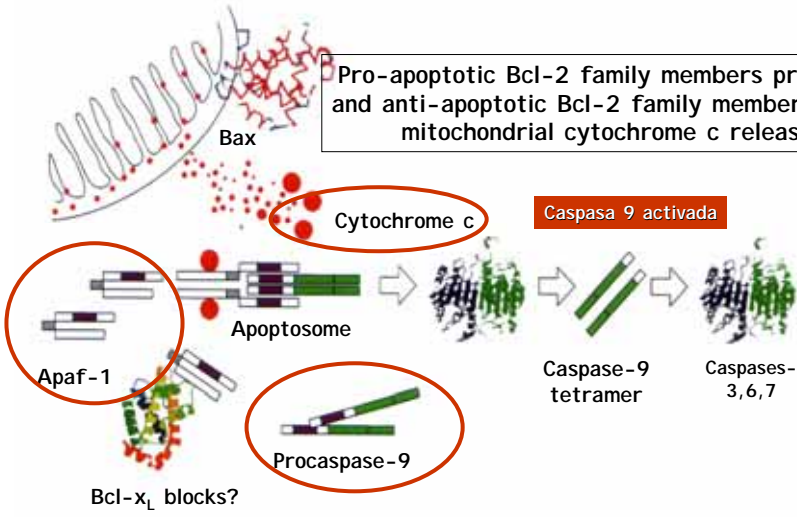


## Molecular Regulation of Apoptosis Bcl-2 Family Members

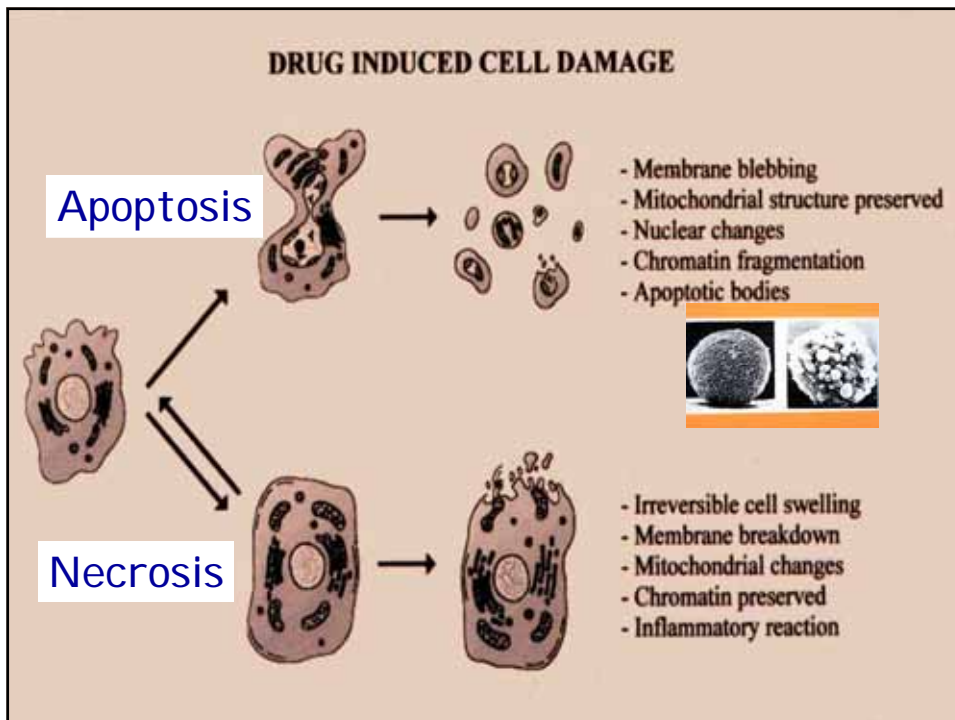
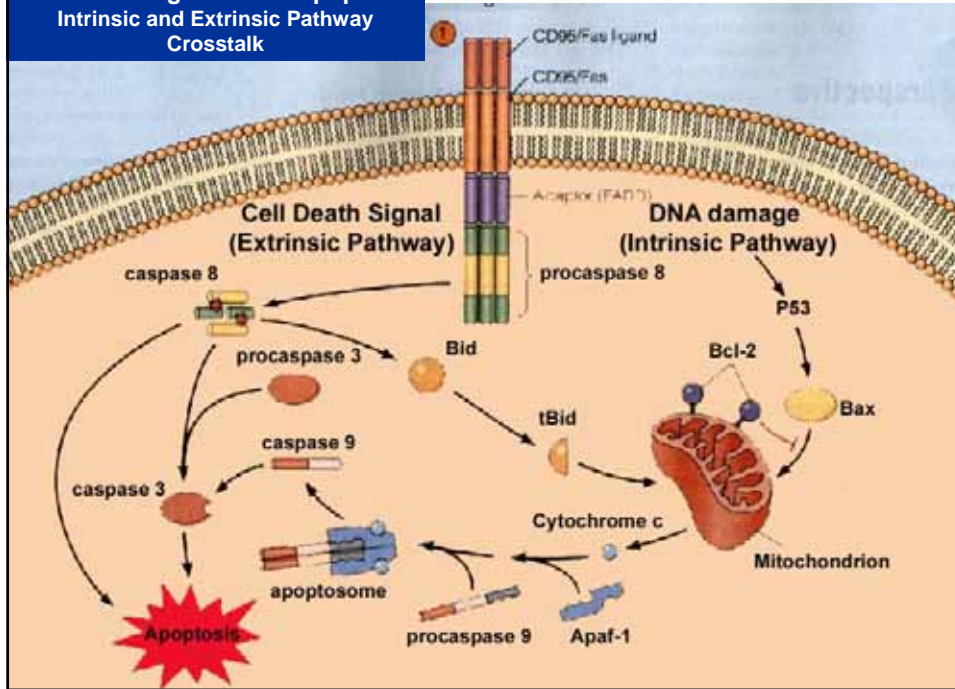


# Mitochondria

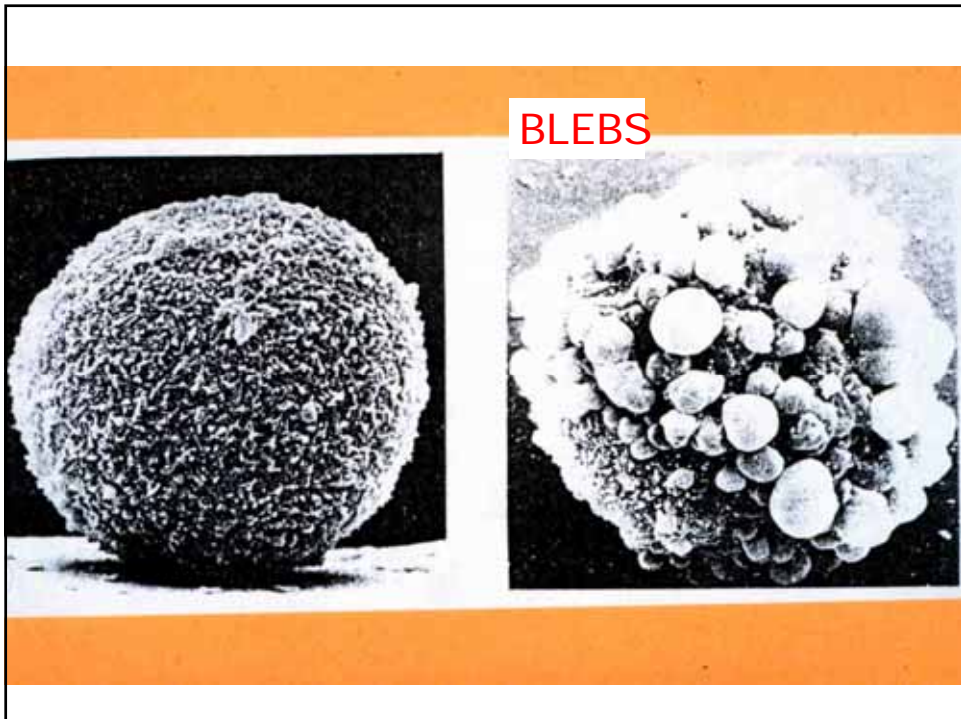
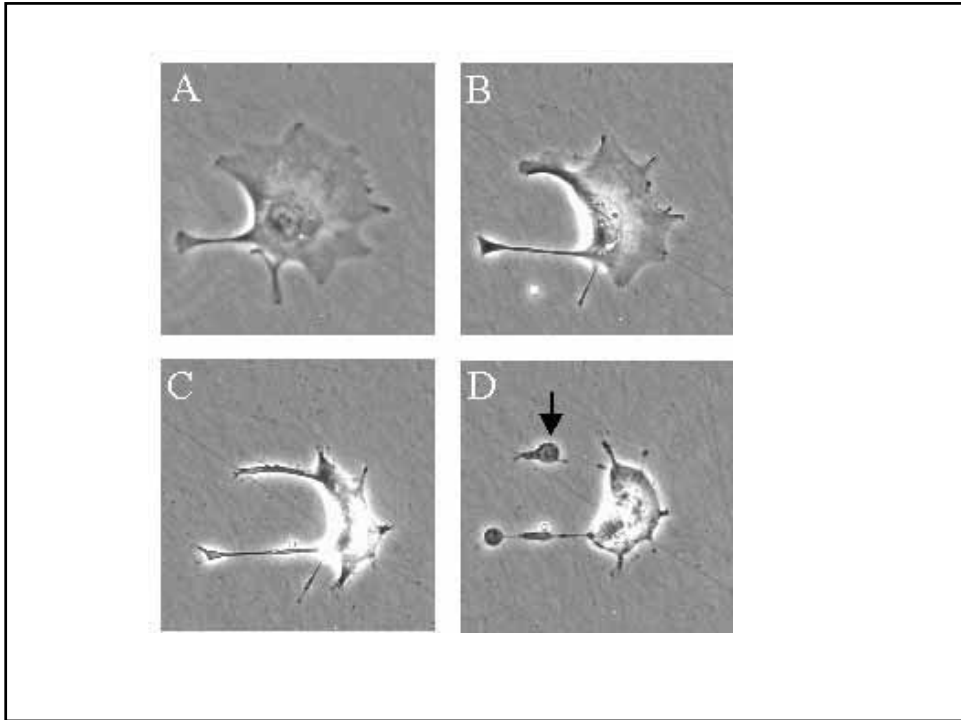
Pro-apoptotic Bcl-2 family members promote, and anti-apoptotic Bcl-2 family members block mitochondrial cytochrome c release



**Molecular Regulation of Apoptosis**  
**Intrinsic and Extrinsic Pathway**  
**Crosstalk**







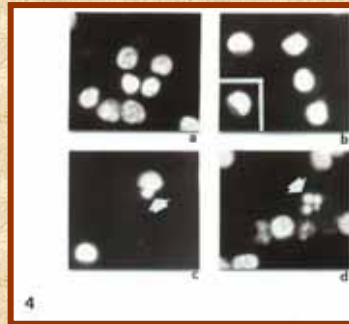
## ***APOPTOSIS VERSUS NECROSIS***

- Proceso fisiológico o patológico
- Altamente regulado
- Activa síntesis de proteína y RNA
- Condensación de la cromatina y fragmentación del DNA
- La membrana plasmática permanece intacta hasta el final: formación de cuerpos apoptóticos
- Eliminación por heterofagia
- No sale contenido celular al exterior
- No produce inflamación
- Participan enzimas celulares que causan cambios bioquímicos y morfológicos muy característicos
- No existe hinchamiento mitocondrial, aunque la mitocondria juega un papel activo

- Accidental
- Siempre patológica
- No regulada
- La membrana plasmática se destruye tempranamente
- Salida de contenido celular
- Inflamación
- Cambios bioquímicos y morfológicos: hinchamiento del citoplasma (oncosis) e hinchamiento mitocondrial

Stimuli	Drugs
ATP	Amsacrine
Actinomycin D	Aphidicolin
A23187 Ca <sup>2+</sup> -Mg <sup>2+</sup> ionophore	1-β-D-Arabinofuranosylcystosine
Cytochalasin B	BCNU
Calcium	Camptothecin
Cycloheximide	Cisplatin
Anti-CD3/T-cell receptor antibo	Etoposide
Epipodophyllo-toxins	5-Fluorodeoxyuridine
Gliotoxin	5-Fluorouracil
Glucocorticoids	Methotrexate
Hyperthermia	Melphalan
Irradiation ( soft beta or gamm	Teniposide
Lymphotoxin	Vincristine
RU486	
TCDD	
Tumor necrosis factor	
TGF-β1	

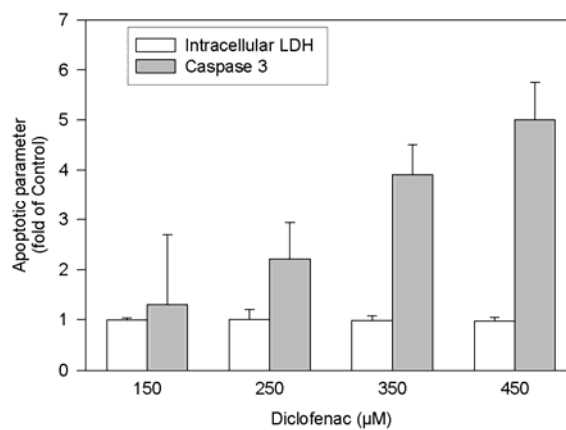
Table II: Example of stimuli and drugs reported to induce apoptosis



# DI CLOFENAC

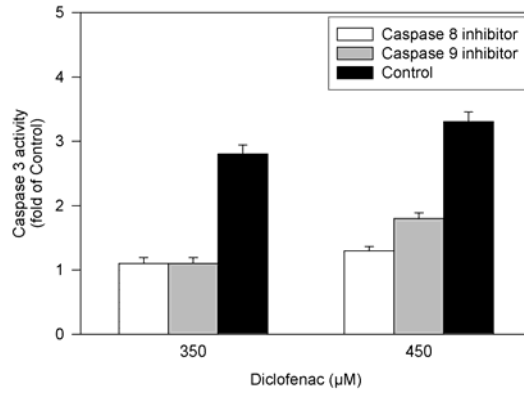
Un ejemplo estudiado *In Vitro*

Concentration-dependent activation of caspase 3 by diclofenac

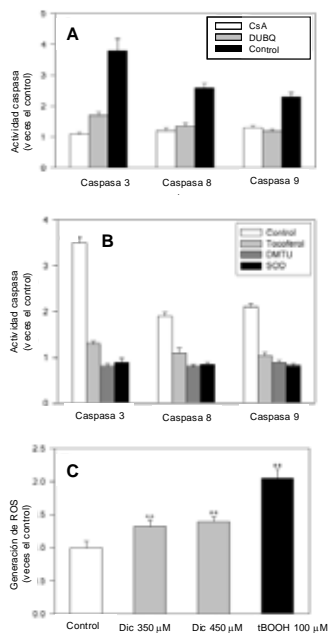


Hepatocytes were treated for 12 hours to increasing concentrations of the drug not overlapping necrosis.

### Effect of inhibitors of effector caspases on the caspase cascade activation



Hepatocytes were exposed simultaneously to diclofenac in the presence of cell permeable caspase inhibitors of the caspases 8 and 9. Inhibition of caspase 3 activation was evaluated after 12 hours of treatment.



### ¿qué produce la apoptosis por diclofenac?

Efecto de inhibidores específicos de MPT bloqueando la liberación del citocromo C de las mitocondrias.

Prevención de la activación de las caspasas 3, 8 and 9 en respuesta al tratamiento con 350 μM diclofenac por antioxidantes.

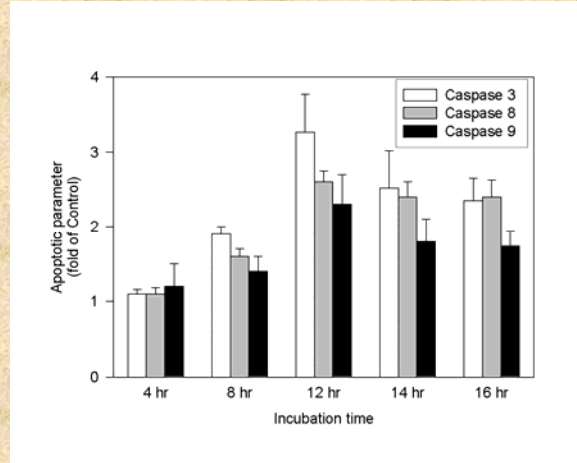
Efecto de antioxidantes en la alteración del MPT por diclofenac

Prevención de la activación de las caspasas 3, 8 and 9 en respuesta al tratamiento con 350 μM diclofenac por antioxidantes.

Generación de ROS intracelular por diclofenac y tBOOH (control positivo) tras 5 horas de tratamiento.

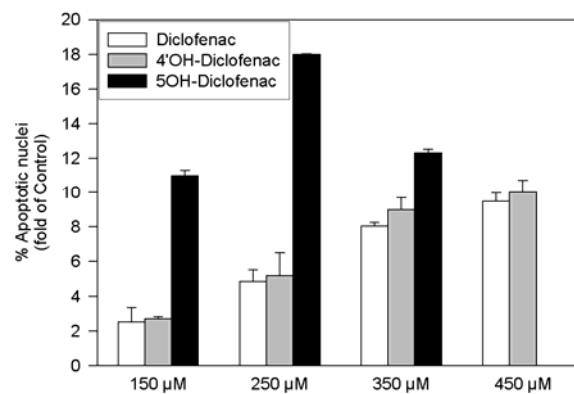
La vía mitocondrial y la generación de ROS están implicados en la apoptosis

### Kinetics of caspase cascade activation by diclofenac



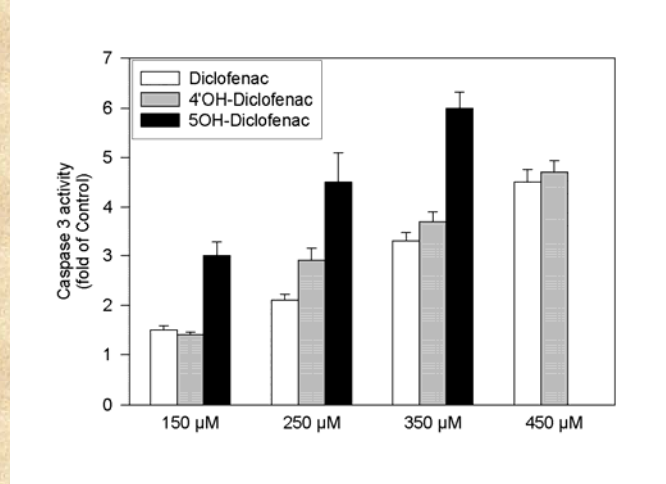
The time-course of caspase 3, 8 and 9 activation by 350  $\mu\text{M}$  diclofenac was assayed in hepatocytes treated with the drug at time intervals up to 24 h.

### Dose-dependence of activation of apoptosis by diclofenac and its major metabolites

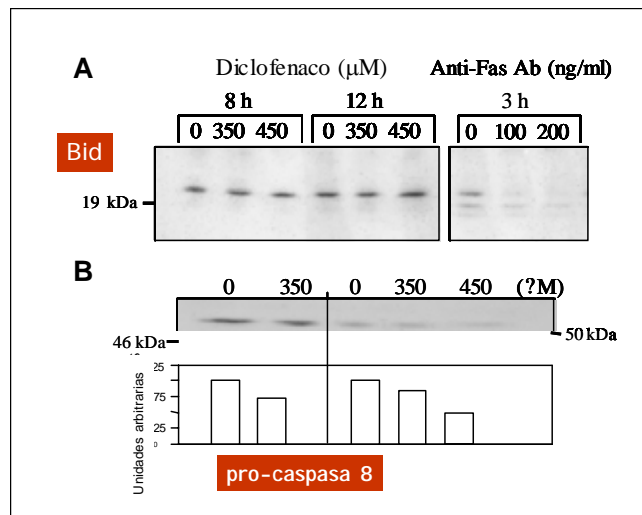


Effect on the percentage of sub-diploid nuclei after 24 hours of treatment with the drugs.

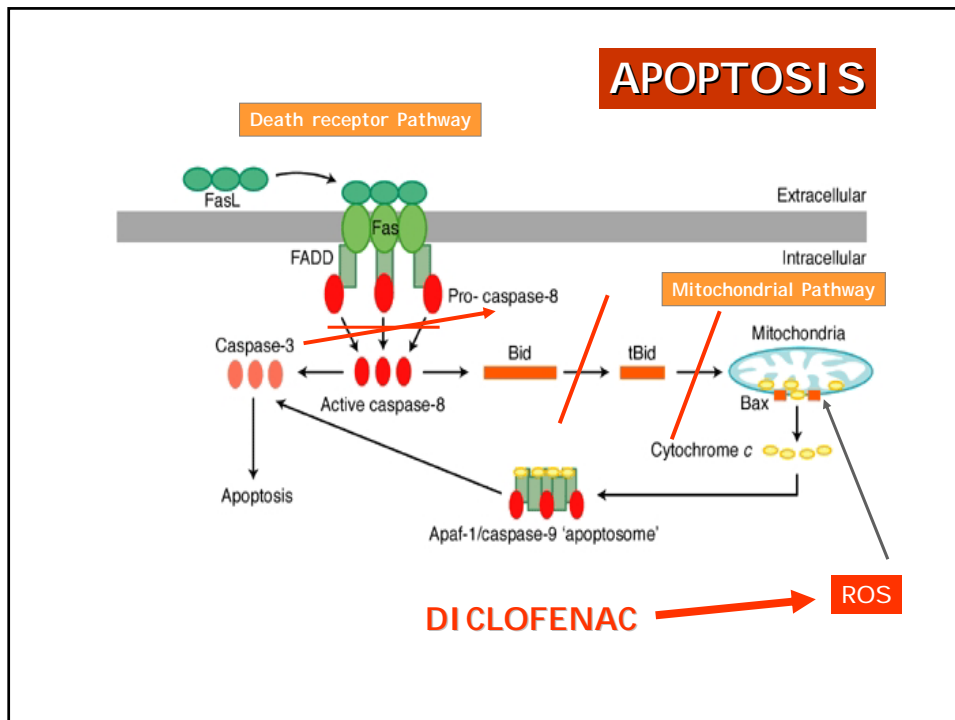
**Dose-dependence of activation of caspase 3 by diclofenac and its major metabolites**



Caspase 3 activity was measured after 12 hours of exposure to the drugs.



- (A) Expresión de la proteína Bid no fragmentada en el citosol de hepatocitos de rata tratados durante 8 ó 12 horas con diclofenaco 350 ó 450 μM (panel izquierdo) o de células Jurkat incubadas durante 3 horas con un anticuerpo monoclonal anti-Fas (CH-11) (panel derecho).
- (B) Expresión de pro-caspasa 8 en extractos mitocondriales de hepatocitos tratados 12 horas con diclofenaco



## Conclusion:

- The results indicate that diclofenac induces apoptosis at concentrations not overlapping cell necrosis.
- This is related to CYP-mediated metabolism and one of the major metabolites 5OH-diclofenac is the major cause of this effect.
- Oxidative injury at the mitochondrial level is involved in MPT induction, which allows the release of mitochondrial proteins, which in turn activate caspase 8, 9 and caspase 3.
- Cytochrome c release seems to be caspase-independent and not mediated by activation of Bid.
- Caspase 3 could be responsible for processing other caspases including caspase 8.

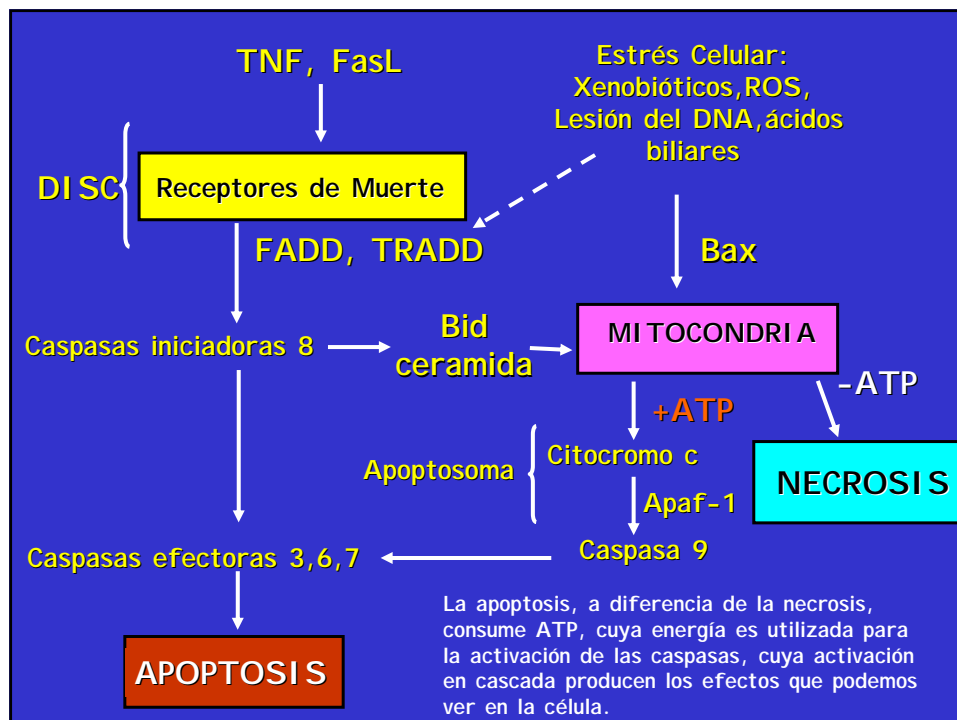
## APOPTOSIS VERSUS NECROSIS

In necrotic cell death, there is a rapid decline in energy levels not seen in apoptosis and ATP is essential for apoptosis to occur.

Cells can be made to undergo necrosis in response to an apoptotic stimulus, if levels of ATP are experimentally depleted.

The type of cell death is therefore dependent on the intensity of the insult, the length of exposure and the spatial positioning of the cell.

In cases of high level of cell injury or severe ATP depletion the apoptosis cannot be initiated and necrotic cell death ensues.

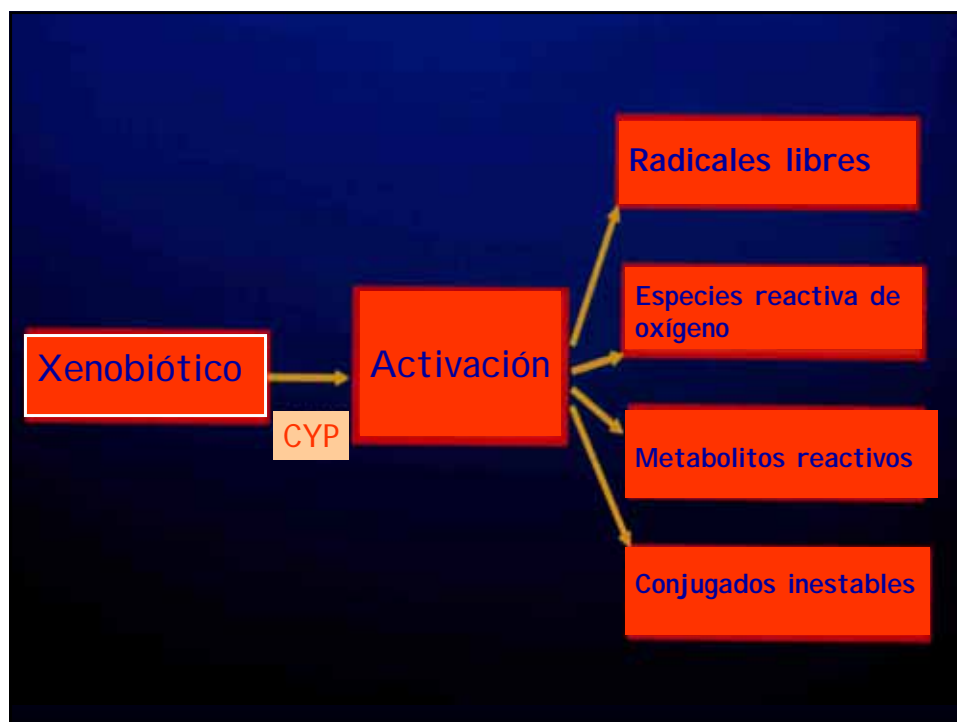


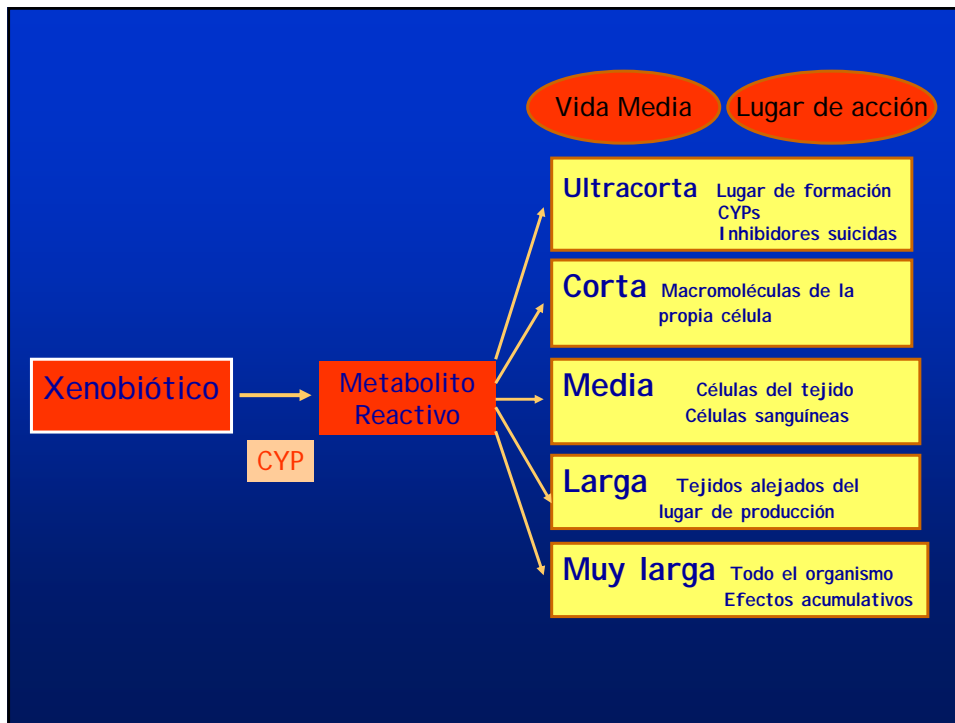


## MECANISMOS MOLECULARES DE LA TOXICIDAD INTRINSECA

# NECROSIS

Muerte celular es la consecuencia final de la integración de lesiones irreversibles en funciones celulares vitales, por fallo de los sistemas endógenos de defensa, con expresión bioquímica y morfológica





## MECANISMOS MOLECULARES DE LA TOXICIDAD INTRINSECA

### Primarios

- ❖ *Inhibición de enzimas, procesos bioquímicos*
- ❖ *Alteración del metabolismo energético celular*
- ❖ *Bioactivación y generación de especies reactivas*
- ❖ *Alteración del balance redox (estrés oxidativo)*

### Secundarios

- ❖ *Peroxidación de lípidos*
- ❖ *Alteración de la homeostasis iónica ( $Ca^{2+}$ )*
- ❖ *Unión covalente, desnaturalización de proteínas, daño al DNA*

### Terciarios

- ❖ *Alteración de funciones metabólicas no esenciales para la célula pero sí para el organismo.*
- ❖ *Cambios morfológicos apreciables*
- ❖ *Muerte celular (necrosis/apoptosis)*

## Alteración de procesos bioquímicos por acción directa de los xenobióticos

### Deficiencia de metabolitos o cofactores.

<i>Compuesto</i>	<i>Intermediario</i>	<i>Efecto</i>
Etionina	S-AMEtionina	Deficiencia adenina/ATP
Galactosamina	UDP-galactosamina	Deplección UTP, UDP
Etanol	NADPH	Desequilibrio NADH/NAD+

### Cambios en la Fluidez de membrana

❖ La integridad estructural de las membranas depende de una relación adecuada colesterol/fosfolípido (plasmática y mitocondrial)

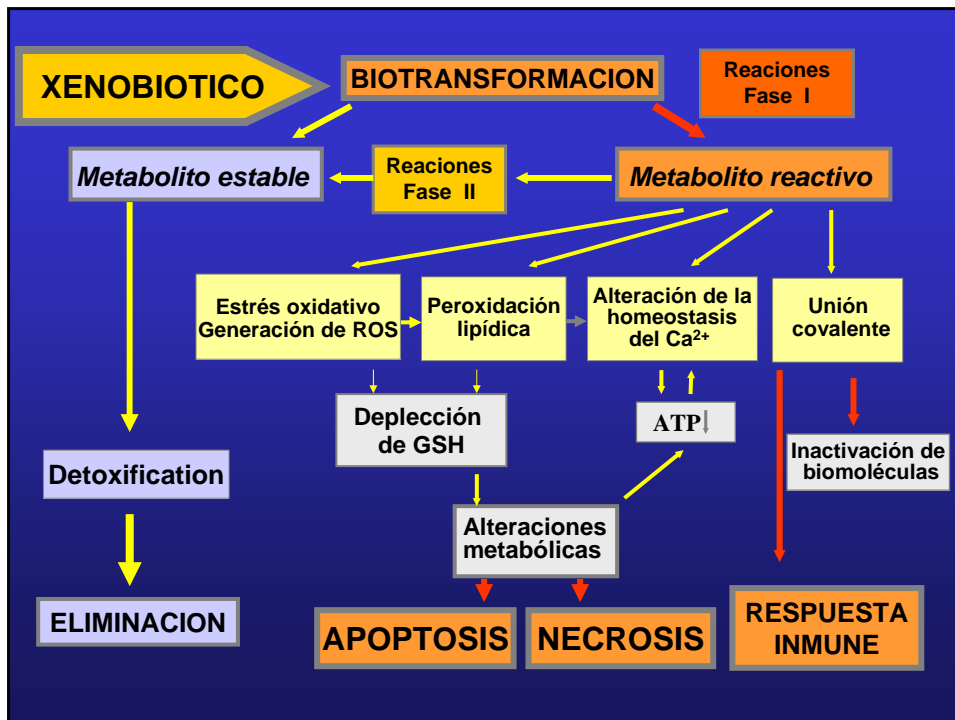
❖ Aumento de colesterol conlleva un aumento de rigidez de la membrana:

Alteración de la permeabilidad

Inactivación de enzimas de membrana (bombas iónicas Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa, Ca<sup>++</sup> ATPasa)

Alteraciones del transporte

**Ejemplos: etinilestradiol, etanol**



## Alteración del Balance energético

**Aumento del consumo de ATP para:  
(demanda energética)**

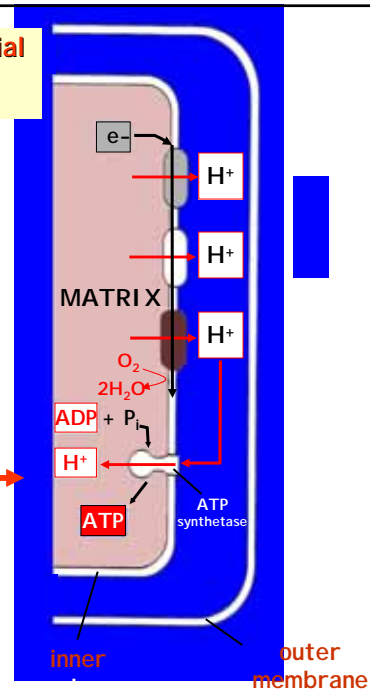
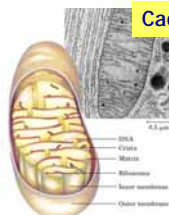
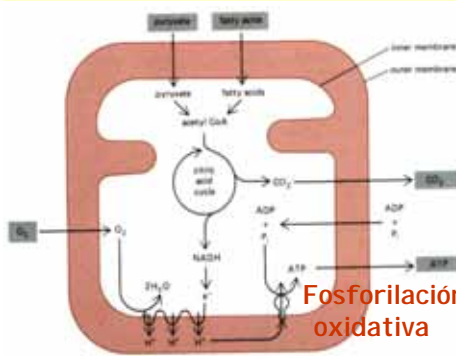
Síntesis de novo de GSH (ciclo del  $\gamma$ -glutamil)  
*Conjugación con metabolitos (GSH-t)*  
*Oxidación de GSH y Eliminación de GS-SG*  
Alteración de los gradientes iónicos (ATPasas)

**Disminución de la producción de ATP  
a causa de:**

Disfunción mitocondrial

### Inhibición del metabolismo mitocondrial

Transporte electrónico  
Fosforilación oxidativa



## ESTRES OXIDATIVO

### Qué es el estrés oxidativo...?

→ Alteración en la célula del balance entre los sistemas oxidantes (generadores de especies reactivas) y los antioxidantes (preventivos, secuestradores y reparadores).

→ Si el balance queda desplazado a favor de procesos oxidativos se produce:

**Aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Anión superóxido  
Radical hidroxilo  
Peroxidos

**Disminución de GSH y pool de nucleótidos NAD(P)H**

## PEROXIDACION LIPIDICA

### Definición

Reacción radicalaria que, en presencia de oxígeno y lípidos insaturados se propaga en cadena, y conduce a la degradación oxidativa de los lípidos de la membrana celular

### Efectos

Alteración de las propiedades físico-químicas de las membranas y de la funcionalidad de los enzimas alojados en ellas Se producen **productos de degradación altamente tóxicos** para la célula (aldehidos, hidroperóxidos, cetonas, etc)

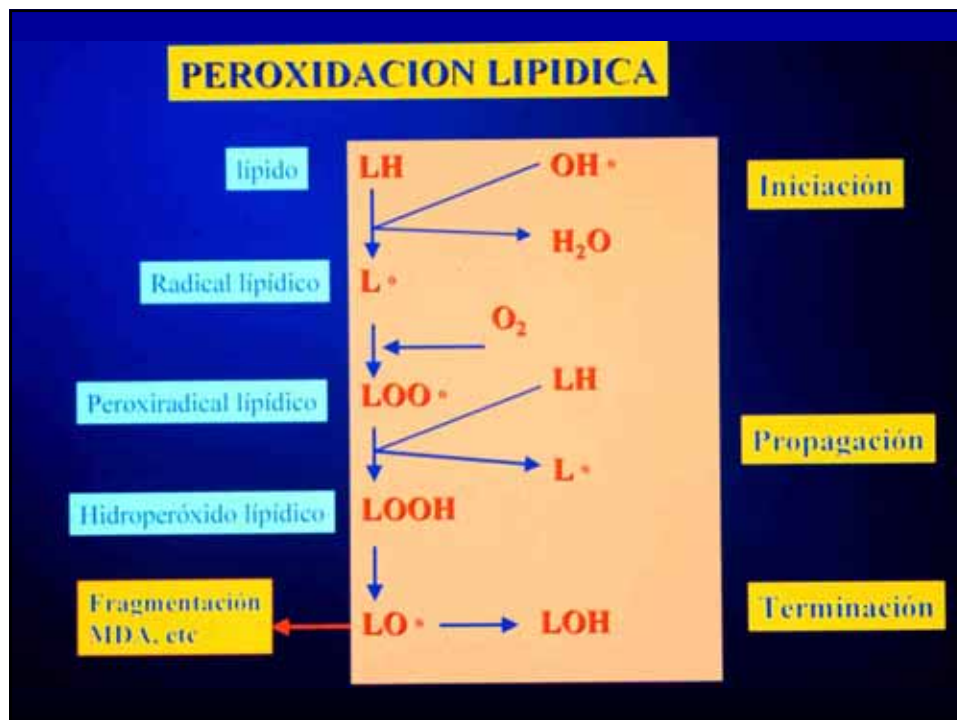
## PEROXIDACION LIPIDICA

Ocasionada por:

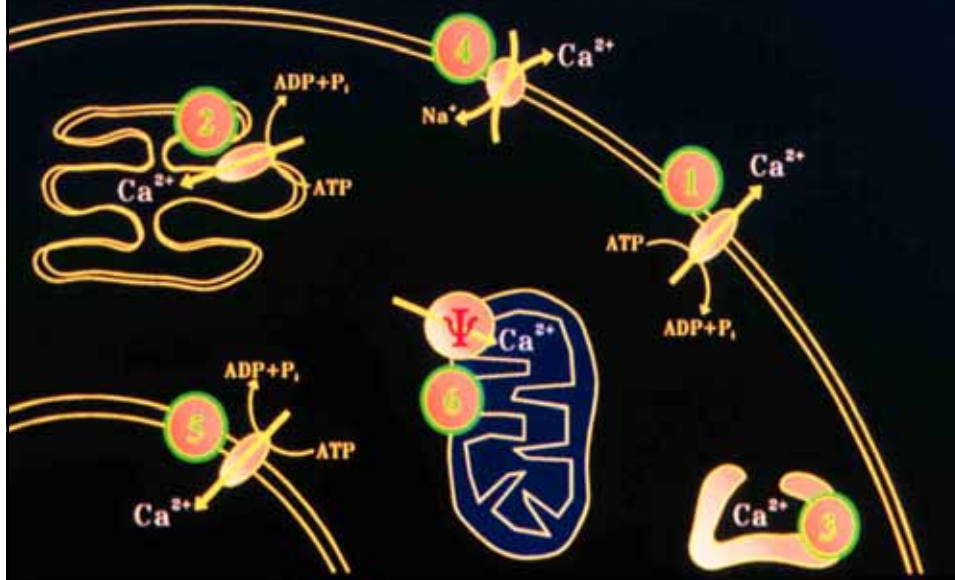
**Radicales libres** generados durante la biotransformación de los xenobióticos (CYP)

**Especies reactivas de oxígeno** generadas durante el metabolismo celular oxidativo

Compuestos capaces de sufrir **repetidos ciclos de oxidación y reducción** en el interior de la célula



## REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE CALCIO



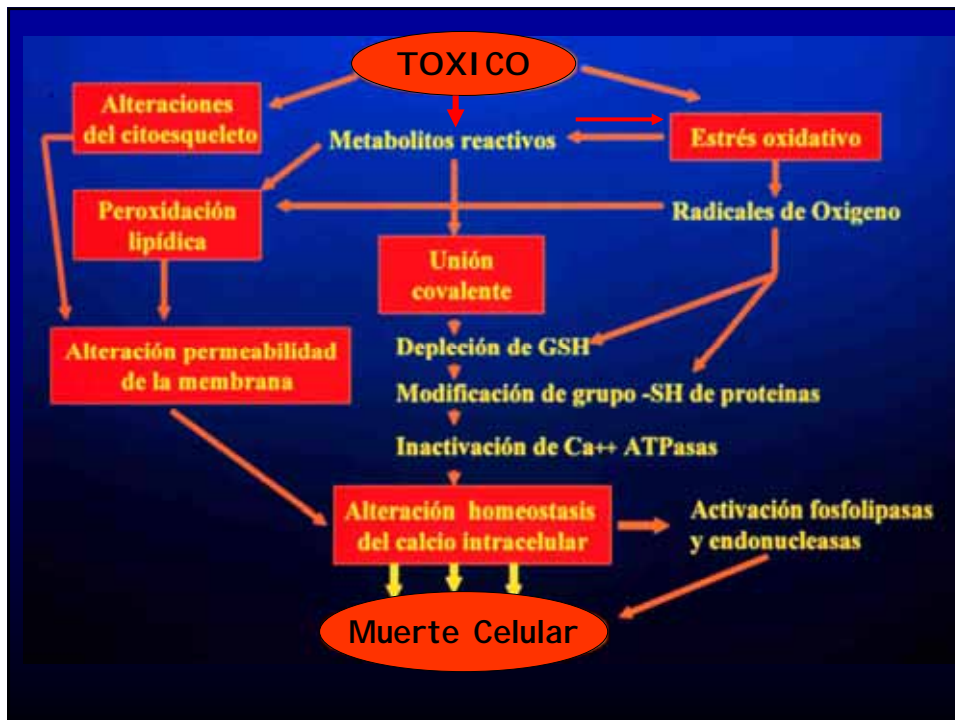
### EFFECTOS DE LA ALTERACION DE LA HOMEOSTASIS INTRACELULAR DEL CALCIO

Aumento de la salida de calcio desde los reservorios intracelulares (mitocondria o RE) o de su entrada desde el exterior

Alteración de la recaptación de calcio por la mitocondria y el RE, o de su bombeo al exterior

## CONSECUENCIAS DE LA ALTERACION DE LA HOMEOSTASIS INTRACELULAR DEL CALCIO

- Activación de fosfolipasas
- Activación de proteasas no lisosómicas
- Activación de endonucleasas
- Formación de blebs en las membranas





# DI CLOFENAC

Un ejemplo estudiado *In Vitro*

## *Diclofenac toxicity*

- Non-steroidal antiinflammatory drug
- Certain cases of adverse reactions reported
- Case-reports consistent with a direct effect of the drug/metabolites and other indicating idiosyncrasic toxicity
- Diclofenac undergoes an extensive hepatic metabolism involving aromatic hydroxylations and conjugations.
- CYP-mediated metabolic activation of the drug and the formation of reactive metabolite(s) is related to diclofenac hepatotoxicity in animals and man

# La estrategia...

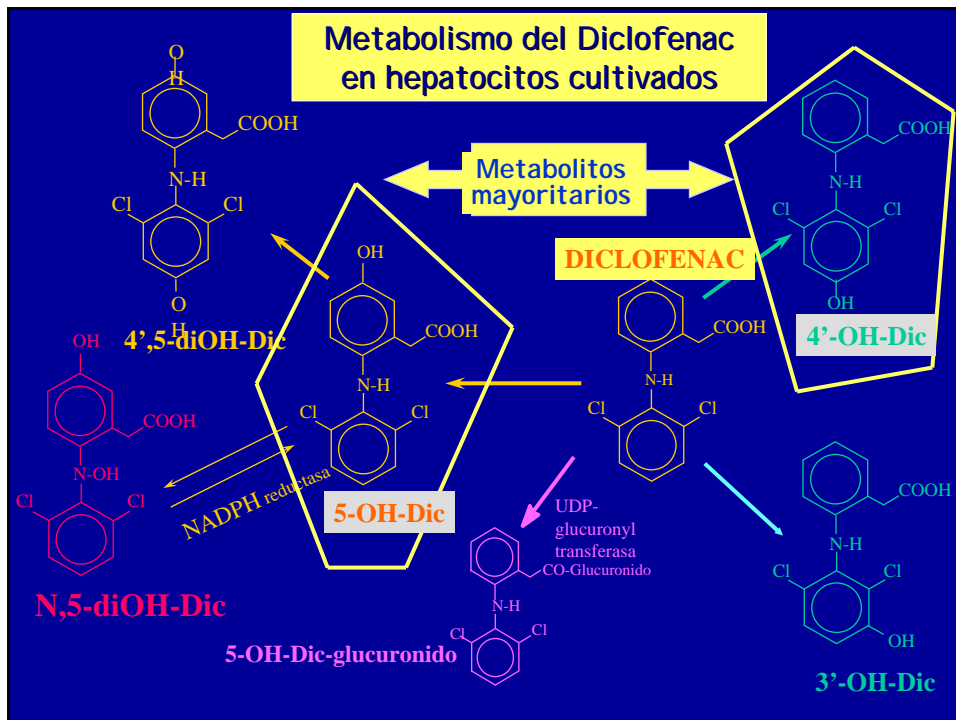
## Análisis del perfil metabólico



Predicción del metabolismo de un nuevo fármaco : Por qué no in vitro?

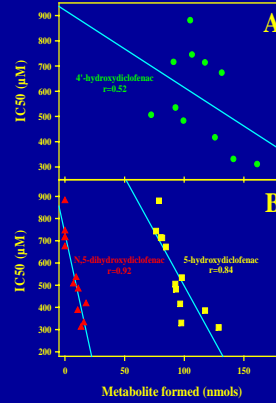
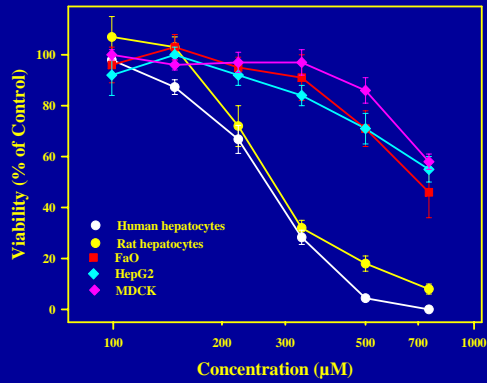


## Metabolismo del Diclofenac en hepatocitos cultivados



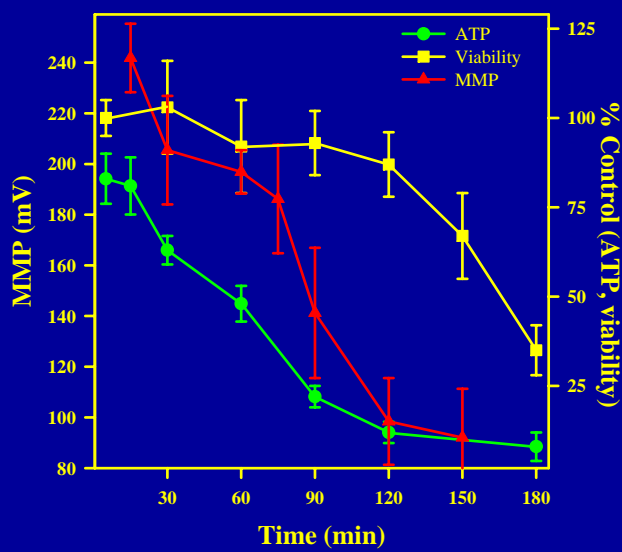
### Determinación de la toxicidad basal.

Diclofenac: un ejemplo de hepatotoxina que necesita ser bioactivada.

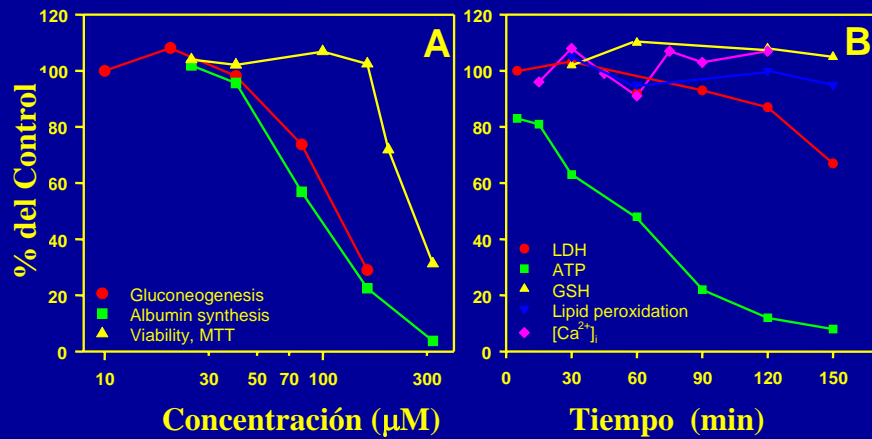


Toxicidad del Diclofenac  
Correlación entre la producción de metabolitos y el IC50

### Efecto del diclofenac sobre la función mitocondrial



## Toxicidad del Diclofenac: Funcionalidad celular y mecanismos implicados



## Direct toxicity of diclofenac to hepatocytes

- Toxicity appears associated to drug metabolism
- ATP depletion is the earliest and most relevant biochemical event
- Diclofenac and its metabolites impair mitochondrial function
- Toxicity correlates with the formation of 5OH-Dic and N,5 (OH)<sub>2</sub>Dic by hepatocytes

