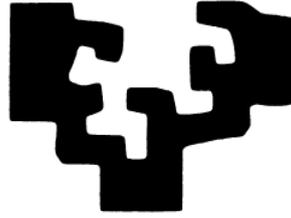


eman ta zabal zazu



universidad
del país vasco

euskal herriko
unibertsitatea

Departamento de Neurociencias

TESIS DOCTORAL

Interacción entre quinasas y moléculas apoptóticas en la muerte oligodendroglial excitotóxica

Manuel Canedo Antelo

Leioa, 2016

Abreviaturas	I-VI
Introducción	1
1. Excitotoxicidad.....	3
1.1. Elementos de la señalización glutamatérgica en el SNC.....	3
2. Relevancia clínica del daño mediado por glutamato a la sustancia blanca	5
3. Características de la excitotoxicidad oligodendroglial	6
3.1. Disrupción de la homeostasis del Ca ⁺²	7
3.2. Mitocondria y homeostasis del Ca ⁺²	7
3.3. Estrés de Retículo Endoplasmático (RE).....	8
4. Vías apoptóticas asociadas al fenómeno excitotóxico mediado por la activación de los receptores AMPA.....	11
4.1. Vía apoptótica intrínseca o mitocondrial.....	11
4.2. Vía apoptótica extrínseca.....	12
4.3. Proteínas de la Familia Bcl-2 como reguladoras del proceso apoptótico.....	15
5. Factor de transcripción p53 en situaciones de estrés celular	16
5.1. Participación de p53 en la cascada de señalización apoptótica	18
5.2. Modulación de la actividad de p53	19
6. Vías de las MAPKs en situaciones de estrés celular	20
6.1. MAPKs activadas por estrés: eje señalizador ASK1/JNK/p38.....	22
6.1.1. Activación de ASK1 mediada por estrés oxidativo.....	23
6.1.2. Activación de ASK1 mediada por alteraciones en la homeostasis del Ca ⁺²	24
6.1.3. Activación de ASK1 mediada por estrés de RE	24
6.2. Vía JNK/SAPK.....	25
6.3. Vía p38.....	26
7. Caseína Quinasa 2 (CK2) en la regulación de la supervivencia o muerte celular	27
7.1. Participación de CK2 en la supervivencia celular.....	27
7.2. Participación de CK2 en vías de señalización propias de mecanismos apoptóticos.....	28
7.3. Modulación del estrés de RE a través de la actividad de CK2.....	29
8. Vía de señalización PI3K/AKT/mTOR	30
8.1. Principales intervenciones de AKT a favor de la supervivencia celular	30
8.2. Mecanismo de activación de AKT	32
8.2.1. PTEN como principal regulador negativo de la vía PI3K/AKT/mTOR.....	32

9. Papel de las PKC's en los mecanismos que gobiernan el destino celular	35
9.1. Implicación de PKC δ en la supervivencia y muerte celular.....	36
9.1.1. Intervenciones de PKC δ a favor de los procesos de muerte celular.....	36
9.1.2. Intervenciones de PKC δ en el mantenimiento de la supervivencia celular.....	38
Objetivos.....	39
Materiales y Métodos	43
1. Experimentación con animales	45
2. Obtención de poblaciones de oligodendrocitos procedentes de células precursoras (OPCs)	45
3. Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa	48
4. Inmunocitoquímica	49
4.1. Caracterización oligodendrocitos procedentes del cultivo glial mixto en función de su estadio de diferenciación	50
4.2. Expresión de la molécula antiapoptótica c-FLIP en oligodendrocitos.....	51
4.3. Tinción PACS2/CoxIV y PACS2/Bid.....	52
4.4. Detección de P-p53 (Ser15)/CoxIV	52
4.5. Tinción p53 total/Hoesch	53
4.6. Tinción p-PTEN (Ser380/Thr382/Thr 383).....	53
4.7. Tinción CK2 α /KDEL	53
5. Ensayos de toxicidad oligodendroglial in vitro	55
6. Ensayos de excitotoxicidad sobre nervios ópticos aislados de ratones PLP-Ds Red	58
7. Cuantificación del daño celular.....	59
7.1. Ensayo fluorimétrico Calceína-AM	59
7.2. Medición del estrés oxidativo	60
7.3. Determinación del gradiente del potencial mitocondrial.....	60
7.4. Liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)	61
7.5. Evaluación histológica del daño en nervios ópticos aislados	62
8. Análisis de la expresión proteica mediante <i>western blot</i>	62
8.1. Electroforesis	63
8.2. Electrotransferencia	63
8.3. Detección de proteínas	64
8.4. Análisis y cuantificación de los resultados	67
8.5. Reutilización de membranas para proteínas de pesos moleculares próximos	67

9. Ensayo de Inmunoprecipitación (IP)	67
10. Ensayo quinasa <i>in vitro</i>	69
10.1. Transformación de bacterias	69
10.2. Inducción de la expresión de proteínas en bacterias	70
10.3. Pre-tratamiento del cultivo de oligodendrocitos	71
11. Silenciamiento génico mediante sh-RNA	72
11.1. Transformación de bacterias	72
11.2. Transfección y selección de las células correctamente transfectadas	73
12. Análisis estadístico	74

Resultados75

1. Caracterización de los cultivos de oligodendrocitos procedentes de cultivos gliales mixtos.....	77
2. Mecanismos apoptóticos tempranos desencadenados por AMPA en oligodendrocitos.....	80
2.1. La caspasa-8 es un elemento clave en las etapas iniciales del proceso apoptótico	80
2.2. La activación de los receptores AMPA en oligodendrocitos ocasiona la pérdida del elemento represor de caspasas, c-FLIP.....	83
2.3. El procesamiento de Bid participa en la muerte excitotóxica oligodendroglial mediada por AMPA	85
3. Papel del factor de transcripción p53 en el daño provocado por AMPA en oligodendrocitos	93
3.1. La activación de los receptores AMPA provoca la activación de p53	93
3.2. La fosforilación de p53 es un mecanismo inductor de su activación.....	98
3.3. Implicación de las quinasas JNK y p38 en la señalización inducida por AMPA y en la activación de p53	101
3.4. La vía de señalización JNK/p38/p53 está regulada por la quinasa ASK-1	106
4. Estudio de la relevancia de CK2 en oligodendrocitos sometidos a estímulos excitotóxicos.....	115
4.1. La estimulación de los receptores AMPA ocasiona la activación de CK2 en oligodendrocitos y su participación en la muerte celular.....	115
4.2. Relación entre la quinasa CK2 y el eje JNK/p38/p53 tras estímulos excitotóxicos.....	121
4.3. Participación de CK2 en la modulación del estrés de RE inducido por AMPA	123
4.4. El silenciamiento génico de CK2 en oligodendrocitos reduce las señales de daño tras excitotoxicidad	128
5. Desregulación de la vía PTEN/AKT/mTOR en oligodendrocitos tras su exposición a AMPA.....	131

5.1. La activación de los receptores AMPA en oligodendrocitos altera la ruta de supervivencia mediada por AKT	131
5.2. PTEN es el principal regulador negativo de la vía de supervivencia PI3K/AKT en oligodendrocitos sometidos a excitotoxicidad	133
5.3. Análisis de la regulación de la actividad de PTEN mediante su fosforilación	135
6. Activación de las vías endógenas de supervivencia mediadas por PKC δ durante el estímulo excitotóxico en oligodendrocitos	139
Discusión	145
1. Antecedentes.....	147
2. Vía apoptótica extrínseca en la muerte excitotóxica oligodendroglial	148
3. Factor de transcripción p53 en la apoptosis oligodendroglial por excitotoxicidad	150
4. MAPKs activadas por estrés en el mecanismo apoptótico responsable de la muerte excitotóxica oligodendroglial.....	153
4.1. Caseína Quinasa 2 como elemento modulador del estrés de RE y de la activación del eje ASK-1/JNK/p38	154
5. Vía PI3K/Akt/mTOR en el daño oligodendroglial tras excitotoxicidad	158
6. Eje PKC δ /ERK/CREB como vía endógena de supervivencia frente a insultos excitotóxicos	161
7. Observaciones finales	163
Conclusiones	165
Bibliografía	169

Abreviaturas

Aquellas abreviaturas cuya sigla no se corresponda con las palabras que la definen en castellano, se definirán en inglés.

AIF: Apoptosis Inducing Factor

AMPA : 2-amino-3-(3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-il)-propanoato

ASK-1 : Apoptosis Signal-regulating Kinase 1

ATF4: Activating Transcription factor 4

ATF6: Activating Transcription factor 6

Bak: Bcl-2 homologous antagonist/killer protein

Bax: Bcl-2 associated X protein

Bid: BCL-2 homology domain 3 (BH3)-only protein

BiP/GRP78: glucose regulated protein 78

BSA : Bovine Serum Albumin)

CaMK: calcium/calmodulin-dependent kinase

cDNA: complementary DNA

c-FLIP: Cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme)-inhibitory protein

CHOP: CEBP homologous protein

CK2: Casein kinase 2

CM-H₂DCFDA: 5-(and 6)-chloromethyl-2',7-dichlorodihydro fluorescein diacetate, acetyl ester

CNTF: Ciliary neurotrophic factor

COX-IV: Cytochrome c oxidase subunit IV

CREB: cAMP- Responsive Element-Binding protein

CSF: Cerebrospinal fluid

CTZ: Ciclotiazide

DISC: Death.inducing signalling complex

DIV: Días *in vitro*

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA: Deoxyribonucleic Acid

DNQX: 6,7-Dinitroquinoxaline-2,3-dione

DTT: Dithiothreitol

EAAT: Excitatory Aminoacid Transporter

EAE: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid

EGTA: Ethylene Glycol Tetraacetic Acid

eIF2 α : Eukaryotic initiation factor 2-alpha

RE: Retículo Endoplasmático

ERAD: ER associated degradation

ERK: Extracellular signal-regulated kinases

FBS: Fetal Bovine Serum

FGF: Fibroblast Growth Factor

FN: Factor de normalización

Galc: Galactocerebrósido c

GAPDH: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase)

GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein

GLTSCR2/PICT1: glioma tumour supresor critical region 2/ protein interacting with the carboxil terminus-1

GS: Glutathione sepharose

GSK3: Glucógeno sintasa quinasa 3

GST: Glutation S-transferase

HBSS: Hank's Balanced Salt Solution

HEPES: 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HRP: Horseradish peroxidase

Iba-1: Ionized calcium binding adaptor molecule 1

Ig: Inmunoglobulina

IP: Inmunoprecipitación

IRE1: inositol-requiring enzyme 1

IVK: Ensayos de fosforilación in vitro de las kinasas

JNK: c-Jun N-terminal Kinase

KA: kainate

LDH: Lactato Deshidrogenasa

MAG: Myelin-associated glycoprotein

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

MBP: Myelin Basic Protein

MDM2: Murine Doble Minute 2

MOG: Myelin oligodendrocyte glycoprotein)

MOMP: Mitochondrial outer membrane Permeabilization

mRNA: messenger RNA

MS: multiple esclerosis

mTOR: Mammalian Target of Rapamycin

NG2: Glial antigen 2

NGS: Normal Goat Serum

NFκB: Nuclear Factor-kappaB

NMDA: N-metil-D-aspartato

NSS: Normal Sheep Serum

NT-3: Neurotrofina 3

O4: Oligodendrocyte marker O4

Olig2: Oligodendrocyte transcription factor 2

OPC: Oligodendrocyte Precursor Cell

p38: GRB2-related adapter protein 2

p53: protein 53

PACS2: Phosphofurin acidic cluster sorting protein 2

PAGE: Polyacrylamide gel eletrophoresis

PBS: Phosphate buffer saline

PDL: Poly-D-Lysine

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDGF: Platelet-Derived Growth Factor

PERK: PKR-like ER protein kinase/pancreatic eIF2α kinase

PFA: Paraformaldehído

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase

PKC: Protein Kinase C

PKCδ: Protein Kinase C delta

PMSF: Phenylmethylsulfonyl Fluoride

Prx-1: Peroxiredoxin-1

PTEN: Phosphatase and tensin homolog

PUMA: p53 Upregulated Modulator of Apoptosis

PVDF: Polyvinylidene fluoride membrane

RAK/FKR: fyn-related kinase

RCAN: Regulator of Calcineurin

RE: Retículo endoplasmático

RIPA buffer: Radioimmunoprecipitation assay buffer

RNA: Ribonucleic Acid

ROCK quinasa: Rho-associated protein kinase

ROS: Reactive Oxygen Species

RT-PCR: Real Time PCR

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

Ser: Serina

Sh-RNA: short hairpin RNA

SNC: Sistema nervioso central

t-bid: truncated BID

TBST: Tris Buffer Saline Tween 20

TNF α : tumour necrosis factor α

TRAF2: TNF receptor-associated factor 2

Trx: tioredoxina

T₃: Triiodotironina

T₄: L-Tiroxina

UPR: unfolded protein response

WB: Western Blot

XBP-1: X box-binding protein response

XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis protein

$\Delta\Psi_m$: mitochondrial membrane potential

Introducción

1. Excitotoxicidad

El fenómeno de excitotoxicidad fue descrito en la década de los 50 como un proceso desencadenado por la sobre-exposición de ciertos tipos celulares a determinados aminoácidos excitadores, fenómeno que desemboca finalmente en procesos de muerte celular (Lucas y Newhouse, 1957). Esta observación inicial, fue extendida a todas aquellas neuronas del Sistema Nervioso Central (SNC) que poseían receptores para los aminoácidos excitadores causantes del daño (Olney y cols, 1969), sentándose así las bases para considerar la relevancia de los fenómenos excitotóxicos en la afectación y pérdida neuronal características de multitud de enfermedades neurodegenerativas (Choi y cols, 1988; Lipton y cols, 1994).

A posteriori, el concepto de excitotoxicidad fue ampliado también a las células gliales del SNC. Concretamente la población oligodendroglial, responsable de la mielinización axonal, es altamente vulnerable a concentraciones extracelulares anormales de glutamato, capaces de provocar la sobre-activación de los receptores ionotrópicos de este receptor. Este hecho ha sido puesto de manifiesto en multitud de trabajos que dejan claro que la activación sostenida de los receptores glutamatérgicos genera daño tanto en oligodendrocitos in vitro (Matute y cols., 1997; Sánchez-Gómez y Matute, 1999) como in vivo (Matute, 1998; Li y Stys, 2000). Además, la inhibición del fenómeno excitotóxico se reveló eficaz a la hora de paliar los síntomas en la Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE), paradigma experimental en modelos animales para la esclerosis múltiple (Pitt y cols, 2000; Smith y cols, 2000). Todos estos trabajos constituyen la base a partir de la cual surge la idea del fenómeno excitotóxico como parte fundamental de la etiología de, entre otras, las enfermedades desmielinizantes (Matute y cols, 2001).

1.1. Elementos de la señalización glutamatérgica en el SNC

El glutamato supone el principal neurotransmisor excitador del SNC e interviene además en gran parte de las principales funciones cerebrales como cognición, memoria y aprendizaje. Por otra parte, es fundamental en el desarrollo del sistema nervioso mediante acciones a nivel de la estructura sináptica así como en la plasticidad, migración y diferenciación neuronal (Michaelis y cols, 1998). Por su rol central en cuestiones tan diversas, alteraciones en la homeostasis de este neurotransmisor pueden suponer uno de los mecanismos desencadenantes o partícipes en los procesos de daño y muerte celular.

En condiciones de excitotoxicidad, aquellas células integradas en la red de señalización glutamatérgica, es decir, aquellos tipos celulares que poseen receptores y transportadores para este neurotransmisor constituyen precisamente las poblaciones celulares potencialmente vulnerables a este tipo de circunstancia. Por ello, el estudio de los receptores y transportadores del glutámico ha

constituido una de las aproximaciones básicas para dilucidar las características del fenómeno excitotóxico en los distintos tipos celulares afectados.

Los receptores glutamatérgicos están localizados en la membrana citoplasmática y se clasifican en dos grandes grupos: receptores metabotrópicos y receptores ionotrópicos. Los receptores metabotrópicos son monoméricos y están acoplados a proteínas-G, mientras que los ionotrópicos son heterómeros que forman canales de alta permeabilidad catiónica, especialmente a Na^+ y Ca^{+2} (Michaelis y cols, 1998; Mayer y cols, 2005). A su vez en base a criterios farmacológicos, electrofisiológicos y moleculares, los receptores ionotrópicos se subdividen en: receptores NMDA (activados por N-metil-D-aspartico), receptores AMPA (activados por ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazolpropiónico) y receptores kainato (KA) (activados por este agonista).

Los receptores NMDA se componen de las subunidades NR1, NR2A-D y NR3A-B. Poseen alta permeabilidad al Ca^{+2} , son bloqueados por Mg^{+2} y sus antagonistas más utilizados son el MK-801 y el D-AP5 (D-2-amino-5-fosfonovalenato) (Dingledine y cols, 1999; Cull Candy y cols, 2004).

En relación a los receptores tipo AMPA y Kainato, ambos son activados por kainato, si bien los segundos presentan mayor afinidad por este agonista. Los receptores AMPA nativos del SNC están compuestos mayoritariamente por las subunidades GluR1-GluR4 mientras que los kainato se componen de las subunidades GluR5-7 y KA1-KA2 (Matute y cols, 2006). La permeabilidad de ambos al Ca^{+2} es inferior a la mostrada por los receptores NMDA, si bien poseen la capacidad de generar excitotoxicidad tanto en neuronas como en oligodendrocitos. Existe una gama de compuestos que permiten la manipulación de ambos subtipos de receptores con relativa simplicidad: los receptores AMPA/Kainato son antagonizados mediante CNQX, DNQX, y NBQX (Fletcher y cols, 1988; Sheardown y cols, 1990). Para discriminar entre uno y otro subtipo, se suele emplear el compuesto GYKI53655, como inhibidor selectivo de los receptores AMPA. Otra característica de ambos receptores (AMPA y KA) es que presentan una rápida desensibilización que dificulta el registro de las respuestas fisiológicas al aplicar sus agonistas. Este hecho se soluciona empleando ciclotiazida (CTZ) o concavalina A para evitar la desensibilización de los receptores tipo AMPA o kainato, respectivamente (Partin y cols, 1993).

Además de los receptores, el sistema de transportadores del glutamato constituye el otro componente fundamental en la regulación de la transmisión glutamatérgica. Se han descrito cinco subtipos distintos de transportadores que pueden expresarse en neuronas y/o células de la glía. Los transportadores gliales EAAT-1 (GLAST) y EAAT-2 (GLT-1) son expresados tanto por astrocitos como por oligodendrocitos (Domercq y cols, 1999) y son responsables de la mayor parte del transporte del glutámico, jugando un papel fundamental en el mantenimiento de niveles aceptables de glutámico en el ámbito extracelular.

2. Relevancia clínica del daño mediado por glutamato a la sustancia blanca

La sustancia blanca supone alrededor de un 50% del volumen cerebral, hecho que refleja la relevancia que la muerte oligodendroglial inducida por glutamato puede suponer como parte de la patofisiología de enfermedades del SNC. De hecho, la pérdida de oligodendrocitos y/o el daño a nivel de la sustancia blanca cerebral son fenómenos observados en isquemia, traumatismos, enfermedades neurodegenerativas, esclerosis múltiple (MS) (Matute y cols, 2006), así como en enfermedades psiquiátricas (Davis y cols, 2003).

En referencia a la esclerosis múltiple, línea de investigación central de nuestro laboratorio, se trata de una enfermedad en la que el sistema inmune ataca a la sustancia blanca cerebral y de la médula espinal con consecuencias fatales para el individuo, tales como parálisis. La población oligodendroglial y consecuentemente la mielina se pierden debido a la liberación de citoquinas tóxicas por parte de las células inmunes, por la presencia de autoanticuerpos y por la existencia de concentraciones anormalmente elevadas de glutamato (Matute y cols, 2001; Srinivasan y cols, 2005).

La encefalomielitis autoinmune experimental (EAE), modelo animal que exhibe las características clínicas y patológicas propias de la MS, constituye una aproximación metodológica habitual en su estudio. La aplicación de antagonistas de los receptores AMPA y KA, atenúa la severidad de la EAE (Pitt y cols, 2000; Smith y cols, 2000; Groom y cols, 2003). El bloqueo de estos receptores en combinación con agentes anti-inflamatorios, supone un mecanismo protector eficaz incluso en estadios avanzados de EAE, incrementando la supervivencia oligodendroglial y la remielinización, mientras que disminuye el grado de parálisis, apoptosis y daño axonal (Kanwar y cols, 2004).

La concentración de glutamato en el líquido cerebro espinal (CSF), mayor en pacientes con MS aguda en comparación con MS silente o controles (Stover y cols, 1997), se ha asociado con el transcurso y severidad de la misma (Barkhatova y cols, 1998). Son variados los factores que pueden contribuir al incremento en los niveles de glutamato en el CSF: la microglía activada puede liberar glutamato revirtiendo la función de su transportador, proceso que es potenciado en condiciones patológicas (Noda y cols, 1999). El estrés oxidativo, puede contribuir al incremento en la concentración de glutamato extracelular dado que los radicales libres reducen la eficiencia de los transportadores de glutamato (Volterra y cols, 1994). Además, se tiene constancia de alteraciones en la expresión de los receptores glutamatérgicos oligodendrogliales (EAAT-1 y EAAT-2) como consecuencia de la exposición a la citoquina pro-inflamatoria TNF α (Pitt y cols, 2003, Vallejo-Illarramendi y cols, 2006).

En conjunto, las alteraciones citadas convergen en la acumulación extracelular de glutamato y en el inicio del mecanismo excitotóxico, evento subyacente en la etiología de la MS.

3. Características de la excitotoxicidad oligodendroglial

Los fenómenos de excitotoxicidad con los que abrimos el presente capítulo han sido vinculados inicialmente a neuronas y en el caso concreto del glutámico, a la sobre-activación de los receptores tipo NMDA. Dada la alta permeabilidad de estos receptores al Ca^{+2} se los consideró, en un principio, como los más relevantes a la hora de mediar los procesos de muerte neuronal excitotóxica desarrollados bajo diversas condiciones. Sin embargo, es conocido el hecho por el cual la activación de los receptores tipo AMPA o kainato puede provocar un efecto excitotóxico superior incluso en determinados tipos neuronales, como las motoneuronas (Weiss y cols, 1999; Carriedo y cols, 2000).

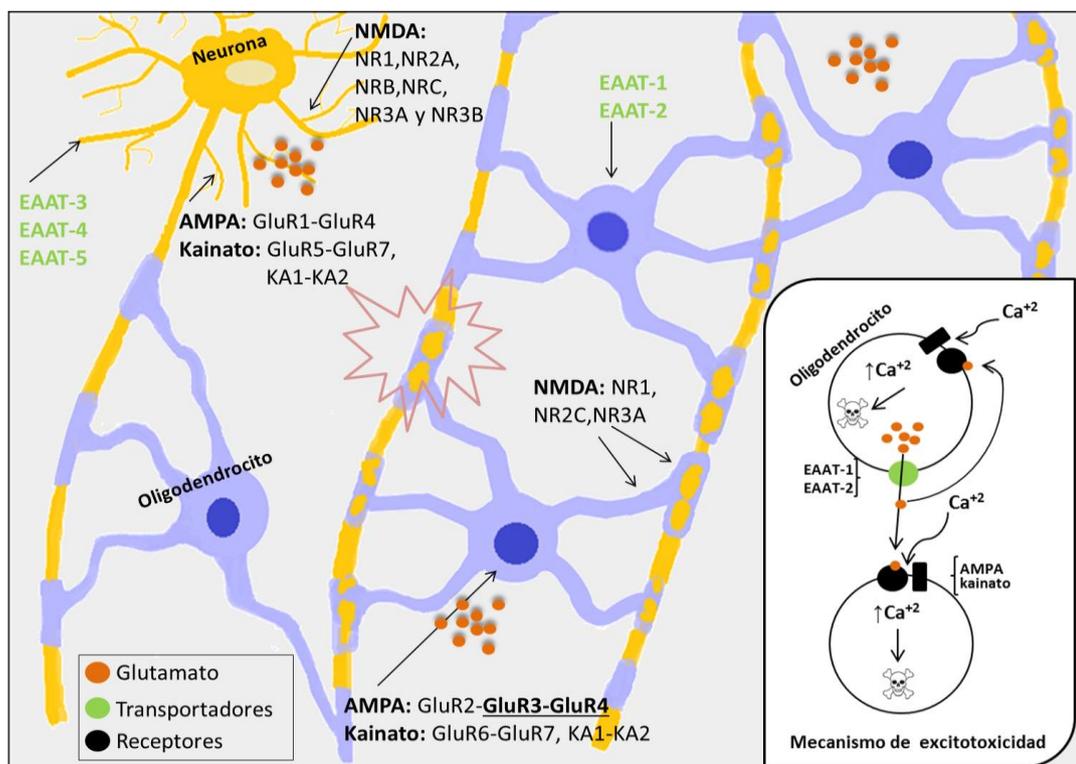


Figura 1. El fenómeno excitotóxico afecta tanto a neuronas como a oligodendrocitos, dado que ambos tipos celulares poseen receptores y transportadores de glutámico. La presencia de los distintos subtipos de receptores (NMDA, AMPA y Kainato) así como de los transportadores de glutámico, tanto en neuronas como en oligodendrocitos, hace vulnerables a ambos tipos celulares frente a concentraciones excitotóxicas de dicho neurotransmisor. En el caso concreto de los oligodendrocitos, la vulnerabilidad frente al glutámico, implica fundamentalmente a los receptores AMPA y Kainato. Además, existen una serie de matices entre las neuronas y las células oligodendrogiales en referencia a las distintas subunidades que integran cada tipo de receptor, así como en su localización subcelular. En el margen inferior derecho de la imagen, se muestra en detalle la participación de los receptores y transportadores del glutámico en los mecanismos de excitotoxicidad oligodendroglial.

En el tipo celular que nos ocupa, las células de estirpe oligodendroglial, se ha detectado la presencia de las subunidades GluR3 y GluR4 de los receptores AMPA así como todas las subunidades de los receptores Kainato excepto la GluR5 (Matute y cols, 1997). En cuanto a la expresión de los receptores

tipo NMDA, existen una serie de trabajos en los que se ha observado la expresión de las subunidades NR1, NR2C, NR3A a nivel de los procesos distales y de la vaina de mielina generada por los oligodendrocitos (Káradóttir y cols, 2005; Salter y Fern, 2005; Micu y cols, 2006). En concordancia con estos datos, la exposición aguda o crónica de cultivos oligodendrogiales a los agonistas kainato y AMPA ocasiona toxicidad celular mientras que tanto los agonistas de los receptores NMDA como los de los receptores metabotrópicos no alteran la viabilidad basal de estos cultivos (Alberdi y cols, 2002). Por ello, la manipulación de los receptores tipo AMPA o Kainato constituye la herramienta más adecuada a la hora de investigar la afectación de las células oligodendrogiales bajo contextos de excitotoxicidad glutamatérgica.

3.1. Disrupción de la homeostasis del Ca^{+2}

Una de las características más inmediatas y notorias del fenómeno excitotóxico, observada ya en los estudios realizados sobre excitotoxicidad neuronal mediada por la sobre-activación de los receptores tipo NMDA, fue la notable entrada de iones Ca^{+2} a través del receptor, que interrumpe la finamente regulada homeostasis celular de este catión (Choi y cols, 1995). Al menos cuatro procesos básicos controlan dicha homeostasis: la entrada de Ca^{+2} desde el espacio extracelular al citoplasma, la liberación de Ca^{+2} desde los almacenes intracelulares al citosol, la liberación de Ca^{+2} desde el citoplasma al exterior celular y la captación de Ca^{+2} a los compartimentos intracelulares (Petersen y cols, 1994).

Este evento crítico, también se observó a posteriori en la muerte neuronal mediada por receptores AMPA/Kainato. La muerte oligodendroglial por excitotoxicidad determinada principalmente, como ya hemos mencionado, por la activación de los receptores AMPA/kainato también se ve condicionada en gran medida por la presencia de Ca^{+2} en el medio extracelular (Sánchez-Gómez, 1999; Alberdi y cols, 2002). Se trata pues, de un evento central en la muerte celular por excitotoxicidad, sea cual fuere el subtipo de receptor glutamatérgico implicado. Sin embargo, si bien constituye condición *sine qua non* para el avance del mecanismo excitotóxico, ha de converger con otras alteraciones intracelulares cuyo sumatorio desemboca finalmente en la muerte celular (Duchen y cols, 2000; Alberdi y cols, 2002).

3.2. Mitocondria y homeostasis del Ca^{+2}

Una diana intracelular directa de la toxicidad mediada por el Ca^{+2} es la mitocondria. La afectación de este orgánulo durante los eventos citotóxicos generados por sobre-activación de los receptores glutamatérgicos, supone otro de los fenómenos centrales e inherentes a los mecanismos de excitotoxicidad. La mitocondria, es un orgánulo celular con una gran capacidad para captar altas concentraciones de Ca^{+2} de forma dependiente del potencial eléctrico (Duchen y cols, 2000; Hajnóczky y cols, 2003). Este sistema de tamponado celular se ve en ocasiones sobrepasado, perturbando de

forma primaria la propia estabilidad mitocondrial. Dichas alteraciones provocarán entre otros, la despolarización de la membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi_m$) (Duncheon y cols, 2000), parámetro directamente vinculado al control de la respiración mitocondrial, la síntesis de ATP, la capacidad de captación de Ca^{+2} y a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), todos ellos eventos cuya desregulación es incompatible con la supervivencia celular (Ward y cols, 2000). Al igual que en neuronas, también en los oligodendrocitos se ha puesto de manifiesto la reducción del potencial mitocondrial tras la exposición a los agonistas glutamatérgicos (Sánchez-Gómez y cols, 2003). Esta reducción, va acompañada por un incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) tras la sobre-activación de los receptores AMPA o KA oligodendrogiales, siendo más notorio en el caso de los primeros (Ibarretxe y cols, 2006). En los oligodendrocitos, la alta producción de ROS supera desde etapas muy tempranas las capacidades de tamponamiento celular dirigidas a paliar el estrés oxidativo. En concordancia con esta afirmación, los niveles de Glutatión reducido (GSH) disminuyen rápidamente tras la aplicación de agonistas glutamatérgicos, lo cual refleja una incapacidad manifiesta a la hora de neutralizar de forma efectiva el estrés oxidativo emergente, característico del fenómeno excitotóxico (Sánchez-Gómez y cols, 2003; Ibarretxe y cols, 2006).

La convergencia de las anomalías generadas a nivel de la señalización del Ca^{+2} , la consecuente despolarización de la membrana mitocondrial y el estrés oxidativo en aumento, ocasionan el colapso funcional y estructural de la mitocondria. En este punto, se produce la liberación de una serie de moléculas propias del espacio intermembrana mitocondrial al citosol, hecho clave en la determinación del tipo de mecanismo que gobernará el subsecuente proceso de muerte celular.

3.3. Estrés de Retículo Endoplasmático (RE)

El retículo endoplasmático, es un orgánulo celular presente en todas las células eucariotas, que aglutina el 50% de las membranas celulares así como el 10% del volumen celular. Se trata de un orgánulo fundamental, entre otros, en los procesos de síntesis y plegamiento proteico. Además, el RE posee una función clave como parte de los mecanismos que regulan la homeostasis del Ca^{+2} ya que almacena y libera Ca^{+2} rápidamente en función de las necesidades fisiológicas de la célula. Sin embargo, bajo condiciones de estrés celular, esta función podría verse comprometida y contribuir al incremento del Ca^{+2} acumulado en la mitocondria y por tanto a la amplificación del mecanismo apoptótico emergente (Verkhrastry y cols, 2005; Ruiz y cols, 2009; Rizzuto y cols, 2009). Las alteraciones en la homeostasis del Ca^{+2} pueden ser una de las causas que perturben, a su vez, la otra función fundamental desempeñada por el RE: el procesamiento proteico (Marciniak y Ron, 2006). La acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen reticular constituye la base del denominado estrés de RE (Rutkowski y Kaufman, 2004; Wang y Kaufman, 2014). Este tipo estrés, mediará la activación de

una serie de cascadas de señalización intrínsecas, integradas en lo que se ha denominado “*unfolded protein response*” (UPR), que supone una compleja red de señalización (ver fig.2) dirigida en primer término a recuperar la funcionalidad del retículo y en última instancia a preservar la integridad celular en su conjunto (Merksamer y Feroz, 2010; Walter y Ron, 2011). Sin embargo, si esta respuesta adaptativa frente al estrés celular se ve superada por la intensidad o duración del mismo, puede acabar contribuyendo finalmente al progreso de la cascada apoptótica en ciernes (Woehlbier y Hetz, 2011; Jäger y cols, 2012).

La vía UPR se basa en la integración de tres rutas o brazos de señalización principales. El punto inicial de dichas rutas lo marca la activación de una serie de proteínas transmembrana presentes en el RE que funcionan como “sensores de estrés”: el factor de transcripción activador (ATF6), la enzima dependiente de inositol (IRE-1) y la quinasa del RE de tipo PKR (PERK) (Wu y Kaufman, 2006). En condiciones de no estrés, los extremos N-terminales de estas proteínas transmembrana están unidas a la proteína intraluminal denominada BIP/GRP78 (proteína de unión a inmunoglobulina/ proteína 78 regulada por glucosa), manteniéndose de esta forma inactivas. Durante la irrupción de un agente generador de estrés celular se producirá un exceso de proteínas mal plegadas, que se unirán a BIP y se acumularán en la zona luminal del RE. En este contexto de “secuestro” de BIP por parte del exceso de proteínas mal plegadas, tendrá lugar la activación de la vía UPR (Carrara y cols, 2013; Wang y Kaufman, 2014). La no asociación de IRE1 y PERK con BIP, inducirá la homodimerización y activación de ambas proteínas transmembrana.

Por un lado, PERK fosforila al factor de iniciación eucariota (eIF2 α), hecho observado en oligodendrocitos bajo condiciones de excitotoxicidad (Ruiz y cols, 2010), impidiendo la traducción de la mayoría de los ARNm y por tanto frenando la biosíntesis proteica. Sin embargo la transcripción de ciertos ARNm, como el responsable de la expresión de ATF4, puede verse favorecida mediante la fosforilación de eIF2 α . La expresión de ATF4, resulta fundamental dentro de la respuesta que ofrece el RE ante situaciones de estrés, pues regula la expresión de ATF3, BiP/GRP78 y la proteína homóloga a C/EBP (CHOP), así como genes relacionados con procesos de autofagia, respuesta antioxidante y apoptosis (Carrara y cols, 2013; Wang y Kaufman, 2014).

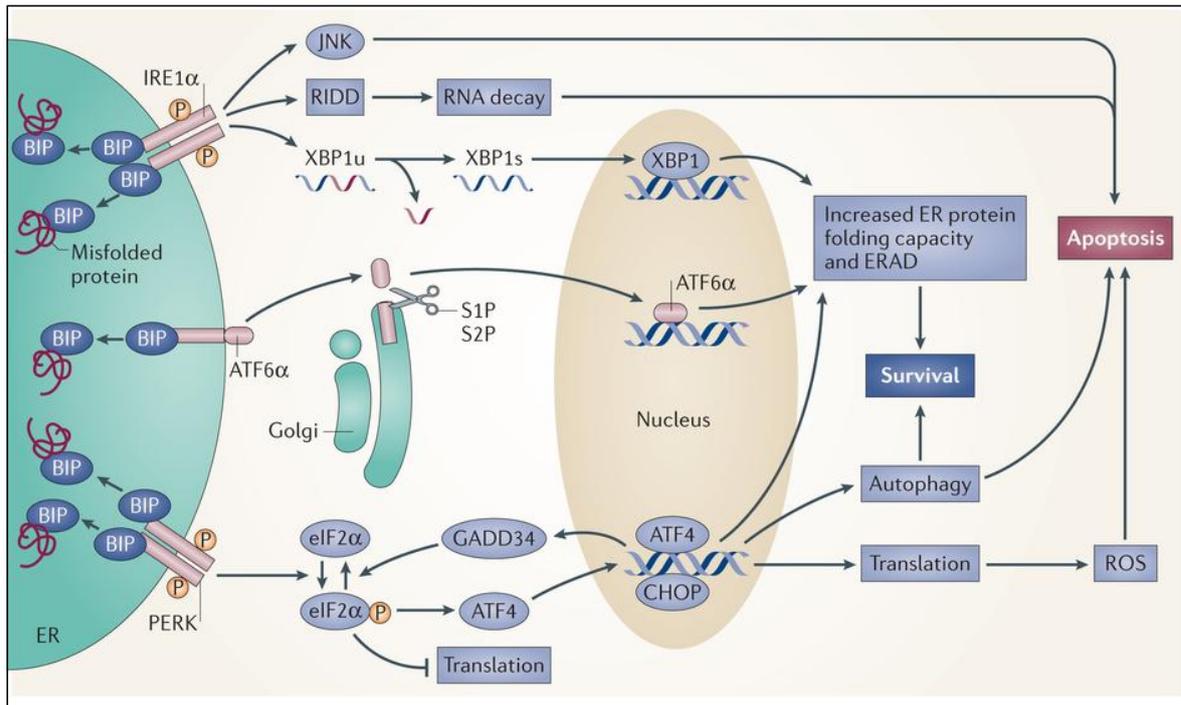


Figura 2. Principales moléculas y vías de señalización integradas en la vía UPR desencadenada por el estrés de RE. Una de las principales alteraciones generadoras del estrés de RE, es la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen de este orgánulo celular. Estas proteínas, “secuestran” a la chaperona luminal GRP78 (BIP), que bajo condiciones normales (ausencia de estrés) mantiene inactivas a PERK, IRE1 α y ATF6. La activación de las distintas vías del mecanismo UPR promueve, en primera instancia, el correcto procesamiento proteico, el transporte y la degradación de proteínas asociadas al RE (ERAD) a la par que limita la síntesis proteica de novo. Si el estímulo inductor de daño es demasiado intenso y por tanto inflige un estrés de RE demasiado severo, la acumulación de proteínas mal plegadas junto con las alteraciones en la homeostasis del Ca²⁺, no podrán ser contrarrestadas y la señalización mediada por la vía UPR acabará contribuyendo a la cascada apoptótica emergente a través de diferentes mecanismos. Adaptado de Wang y Kaufman, 2014.

La segunda vía integrada en el mecanismo UPR e iniciada por la activación de IRE1 α comienza una vez liberado este de la acción inhibitoria de BIP, hecho que posibilita la dimerización y autofosforilación que conducen a su activación. Mediante su actividad endoribonucleasa IRE1 α crea, a través del splicing alternativo del ARNm responsable de la proteína de unión a X-Box (XBP1), la versión activa de este factor de transcripción (XBP1s) (Carrara y cols, 2013; Coelho y Domingos, 2014; Wang y Kaufman, 2014; Tohmonda y cols, 2015).

Por último, la tercera vía de señalización que conforma la UPR, está iniciada por ATF6 también tras su liberación de BIP, seguida de su traslado al aparato de Golgi, donde será procesado por proteasas. El fragmento N-terminal de ATF6 migrará entonces al núcleo y al igual que ATF4 o XBP1s actuará como factor de transcripción cuya acción incrementa la expresión de proteínas como BIP o GRP94, componentes de la vía de degradación asociada al RE (ERAD) para la eliminación de proteínas mal plegadas (Wu y cols, 2006; Wang y Kaufman, 2014).

4. Vías apoptóticas asociadas al fenómeno excitotóxico mediado por la activación de los receptores AMPA

4.1. Vía apoptótica intrínseca o mitocondrial

Las distintas perturbaciones celulares descritas hasta el momento implican alteraciones en la señalización mediada por el Ca^{+2} en íntima conexión con la marcada afectación mitocondrial y con el estrés generado a nivel del RE, como ejes centrales del proceso apoptótico desencadenado por la sobre-activación de los receptores AMPA, en oligodendrocitos. Bajo estas condiciones se pueden generar, en función de la intensidad del estímulo, mecanismos de muerte celular de tipo apoptótico o necrótico (Sánchez-Gómez, 2003). Los mecanismos apoptóticos, por definición, están bioquímicamente regulados y acarrear la participación de una serie de moléculas así como la sucesión de etapas bien definidas que posibilitan su estudio. Cuando el estrés oxidativo y la sobrecarga de Ca^{+2} inducen la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP), la viabilidad celular está irremediablemente comprometida. Una de las consecuencias de la disrupción en la integridad de la membrana mitocondrial es la liberación de proteínas presentes en el espacio intermembrana al citosol pudiendo activar tanto mecanismos de muerte dependientes como independientes de caspasas (Galluzzi y cols, 2009). Entre las proteínas liberadas, ocupa un lugar destacado el citocromo-c cuya presencia citosólica temprana supone, en este caso, la activación de vías apoptóticas dependientes de caspasas (Sánchez-Gómez y cols, 2003). A este respecto, está ampliamente documentada la interacción del citocromo-c con la proteína adaptadora denominada APAF-1 (*apoptotic peptidase activating factor*) así como con la pro-caspasa 9 (iniciadora), dando lugar a una supraestructura conocida como Apoptosoma, que conducirá a la activación de la propia caspasa 9 y finalmente de la caspasa-3 (efectora). Esta sucesión de eventos, expuestos en la Figura 3, se conoce como ruta apoptótica intrínseca o mitocondrial (Galluzzi y cols, 2009; Tait y Green, 2010).

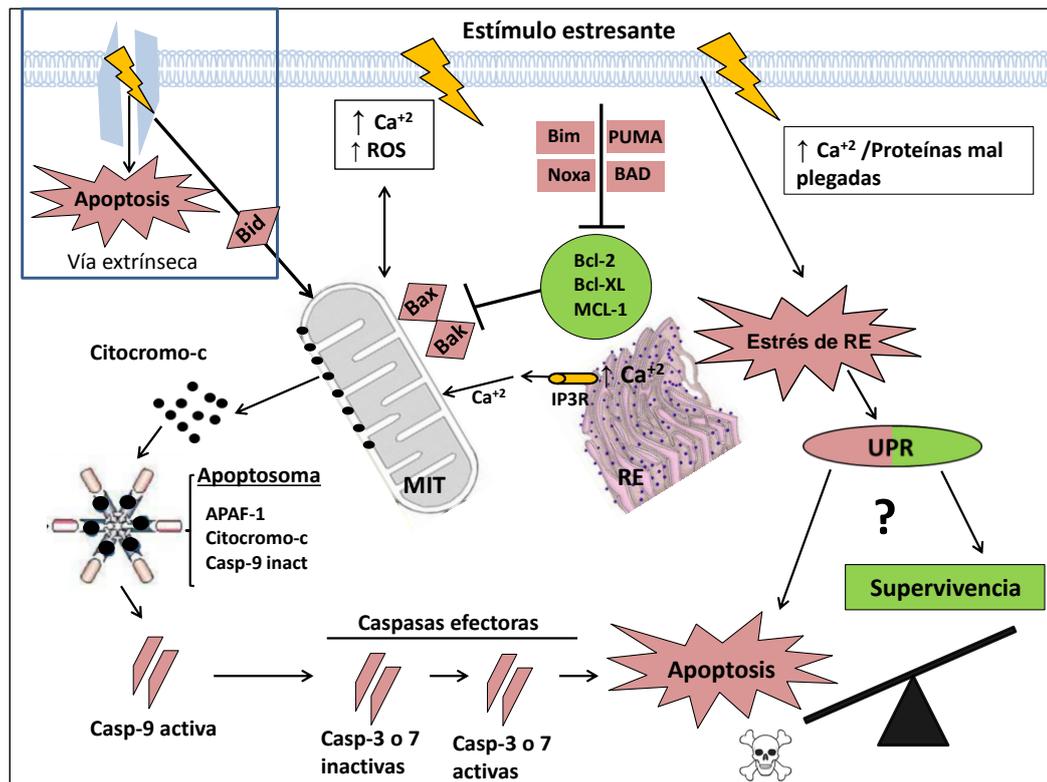


Figura 3. Principales eventos de la vía apoptótica intrínseca o mitocondrial y conexión con el estrés a nivel de RE. Un potencial agente citotóxico, puede generar un daño o estrés celular caracterizado por el incremento de la concentración intracelular de Ca^{+2} y en la producción de ROS, fenómenos que convergen en la activación de una cascada de señalización apoptótica cuyo núcleo central radica en las alteraciones a nivel mitocondrial: si el balance entre la acción de las denominadas moléculas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, MCL-1) y las moléculas pro-apoptóticas (Bim, PUMA, Noxa, Bad) se desplaza a favor de las segundas, la acción de multitud de vías y moléculas impulsoras de los procesos apoptóticos convergerá en la mitocondria, activándose moléculas pro-apoptóticas y efectoras a este nivel (Bak o Bax), contribuyendo a la alteración de la integridad estructural y funcional de dicho orgánulo. Además, el estrés de RE puede impulsar también, a varios niveles, el mecanismo apoptótico: por un lado contribuyendo a la sobrecarga de Ca^{+2} mitocondrial y por otro, si el grado de estrés celular es demasiado severo, podría hacerlo de forma directa, a través de la vía UPR. La permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP) supone un punto de no retorno ya que posibilita la liberación de proteínas del espacio intermembrana mitocondrial al citosol. Entre las moléculas liberadas, el citocromo-c junto con APAF-1 y la pro-caspasa 9, formará el Apoptosoma que posibilitará la activación de la caspasa-9 (iniciadora). Finalmente la caspasa-9, ya activa, promueve a su vez la activación de las caspasas efectoras (3 y 7) y con ello la ejecución de las etapas finales del programa apoptótico.

4.2. Vía apoptótica extrínseca

Existe otro nivel de complejidad dentro de los mecanismos apoptóticos representado por la denominada vía apoptótica extrínseca, ligeramente esbozada en la imagen anterior (fig.3), cuyo esquema de acontecimientos no implica necesariamente a la mitocondria. Esta vía, se inicia a nivel de receptores de membrana que transmiten señales extracelulares de daño. Dichos receptores oligomerizan en presencia de sus ligandos, como paso inicial para la formación del DISC (*death-inducing signaling complex*) a través del reclutamiento, en la región intracelular del receptor, de moléculas adaptadoras como FADD (*Fas-associated death domain factor*) que a su vez se unirán a las

pro-caspasas -8 o -10 (Fig.4). Una vez conformada la estructura completa del DISC, se producirá la activación de la caspasa-8 (Cullen y Martin, 2009; Parrishy cols, 2013). En este punto de la vía, existe un mecanismo de regulación negativa que se opone a la activación de sendas caspasas (Fig.4): la molécula denominada c-FLIP (*FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme (FLICE)-inhibitory protein*) es una proteína de estructura muy similar a la de las pro-caspasas reclutadas en el DISC, si bien carece de dominio funcional catalítico (Sakamaki y cols, 2015). La pérdida de c-FLIP se ha asociado a una mayor vulnerabilidad ante procesos de muerte celular caracterizados por una alta contribución de la vía apoptótica extrínseca (Zhou y cols, 2007; Garibal y cols, 2010; Yu y cols, 2011; Martín-Pérez y cols, 2012). Si las capacidades inhibitorias de c-FLIP se ven superadas se produce la activación, mediante dimerización y autoprosesado, de la caspasa-8 (iniciadora) que a su vez puede activar directamente a las caspasas -3 y -7 (células tipo I) o participar en la activación de moléculas que modularán etapas intermedias, previas a la activación de las caspasas efectoras (células tipo II) (Jost y cols, 2009; Hao y Mak, 2010).

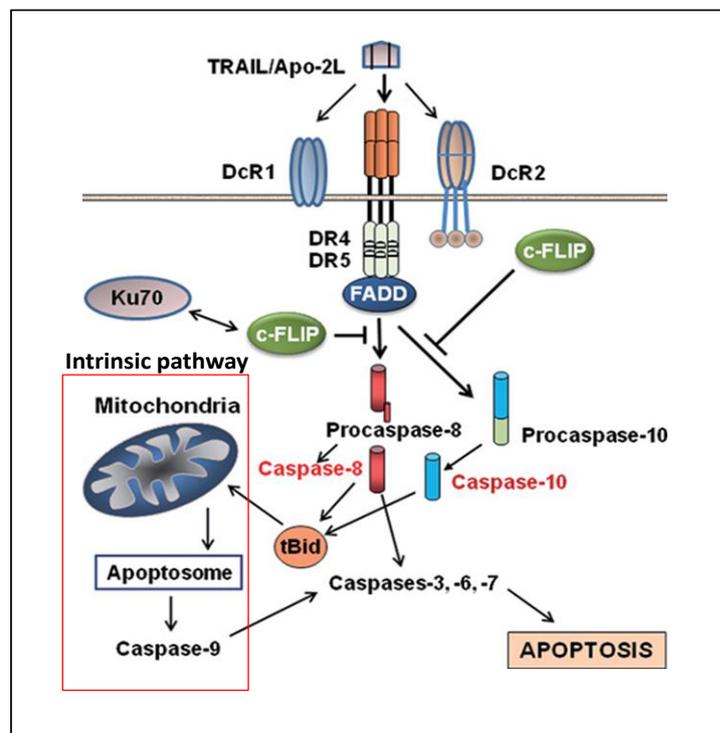


Figura 4. Detalle de la vía apoptótica extrínseca y conexión con la vía intrínseca o mitocondrial. La interacción de los ligandos con los receptores de muerte, ocasiona el ensamblaje del DISC a través del reclutamiento de moléculas adaptadoras como FADD (*Fas-associated death domain*) y la pro-caspasa-8, resultando finalmente en la activación de esta última. El inhibidor intrínseco c-FLIP (*FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme (FLICE)-inhibitory protein*) antagoniza la correcta formación del DISC y por tanto la activación de las caspasas 8 y 10. Si la acción pro-supervivencia de c-FLIP se ve superada o es eliminada, se producirá la activación de las caspasas 8 y 10 que a su vez, podrán intervenir en el procesamiento y activación de Bid (miembro sólo BH3 de la familia de proteínas Bcl-2) dando lugar a la aparición de su isoforma activa, t-Bid (*truncated Bid*). En este punto, t-Bid contribuye a la magnificación de las alteraciones mitocondriales que convergen en la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y en la liberación del citocromo-c. De esta forma, la vía apoptótica intrínseca iniciada a nivel de los receptores de membrana se conecta con los fenómenos mitocondriales característicos de la vía apoptótica intrínseca (reseñada en rojo) (Adaptado de Saha, 2012).

En el ámbito concreto de los procesos de muerte oligodendroglial de tipo apoptótico desencadenados por la activación moderada de los receptores AMPA, es conocida la importancia de la liberación del citocromo-c (vía apoptótica mitocondrial) y la subsecuente participación de varias caspasas iniciadoras y efectoras dentro del contexto apoptótico desencadenado. Concretamente, existen evidencias de la participación de las caspasas -9, -3 y -8 (Sánchez-Gómez y cols, 2003). El hecho por el cual la caspasa-8 parece desempeñar algún papel en dicho proceso, abre una ventana a la posible convergencia de ambas vías apoptóticas (intrínseca y extrínseca) durante la muerte excitotóxica oligodendroglial mediada por activación de los receptores AMPA. Como hemos mencionado, uno de los modelos de actuación de la caspasa-8 es su participación en una serie de etapas intermedias (células tipo II), previas a la activación de las caspasas efectoras. Esta contribución más indirecta al proceso apoptótico constituye un mecanismo de conexión entre las vías apoptóticas extrínseca e intrínseca y se enmarca dentro de la amplia sucesión de etapas, finamente reguladas, requeridas por los mecanismos apoptóticos que implican afectación mitocondrial. Como se puede ver en la figura 4, tras la formación del DISC y la consecuente activación de la caspasa-8, dicha molécula puede mediar el proceso de activación de Bid (*BH3 interacting-domain death agonist*) procesándolo y dando lugar a la aparición de su forma activa, conocida como t-Bid (*truncated Bid*) (Kantari y Walczak, 2011; Schug y cols, 2011). En este punto cabe resaltar que, aun hallándose activa la caspasa-8, Bid ha de estar a su vez “predispuesto” para su activación. En este sentido, se ha descrito como la fosforilación de Bid en ciertos residuos limita su tasa de procesamiento (Thr59 en humanos y Ser 61 y 64 en ratones) por la caspasa-8 (Vogel y cols, 2006; Niemi y MacKeigan, 2013). Además, otros estudios han determinado que la molécula Bid en estado no fosforilado ha de ser trasladada por PACS-2 (*Phosphofurin acidic cluster sorting protein 2*) (Simmen y cols, 2005; Brasacchio y cols, 2014), hacia las inmediaciones de la mitocondria, pues es este el ámbito celular donde tiene lugar su procesado por parte de la caspasa-8 (Chandra y cols, 2004; Schug y cols; 2011). Una vez entra en escena t-Bid, este desarrolla sus actividades a favor de la permeabilización de la membrana mitocondrial, por ejemplo promoviendo la inserción estable de Bax o Bak (Kim y cols, 2009; Ren y cols, 2010).

4.3. Proteínas de la Familia Bcl-2 como reguladoras del proceso apoptótico

Hasta el momento hemos dejado patente, en base a los trabajos previos citados, el carácter apoptótico con marcada afectación mitocondrial que caracteriza a la muerte oligodendroglial bajo parámetros excitotóxicos. De forma colateral se ha mencionado la existencia de la familia de proteínas Bcl-2, como conjunto de moléculas que posee gran potencialidad a la hora de regular en uno u otro sentido el avance de procesos apoptóticos como el que nos ocupa (Ola y cols, 2011; Czabotar, 2014).

Esta familia de proteínas se caracteriza por poseer cuatro dominios de homología con Bcl-2, denominados BH1-4 y engloba tanto a miembros pro-apoptóticos como anti-apoptóticos clasificados en función de los dominios de homología BH1-4 que posean (Fig.5). En líneas generales los miembros del grupo “pro-supervivencia”, entre ellos Bcl-2 o Bcl-xL, portan los cuatro dominios de homología (BH1-4) mientras que los integrantes del grupo “pro-apoptótico” carecen del dominio BH4. Además, dentro de este último grupo, existen a su vez dos subgrupos: los miembros multidominio (BH1-3), entre los que cabe destacar a Bax o a Bak (efectores) y los miembros “sólo BH3”, como Bid o PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) que únicamente portan el dominio de homología BH3 (Chipuck y cols, 2006; Galluzi y cols, 2009).

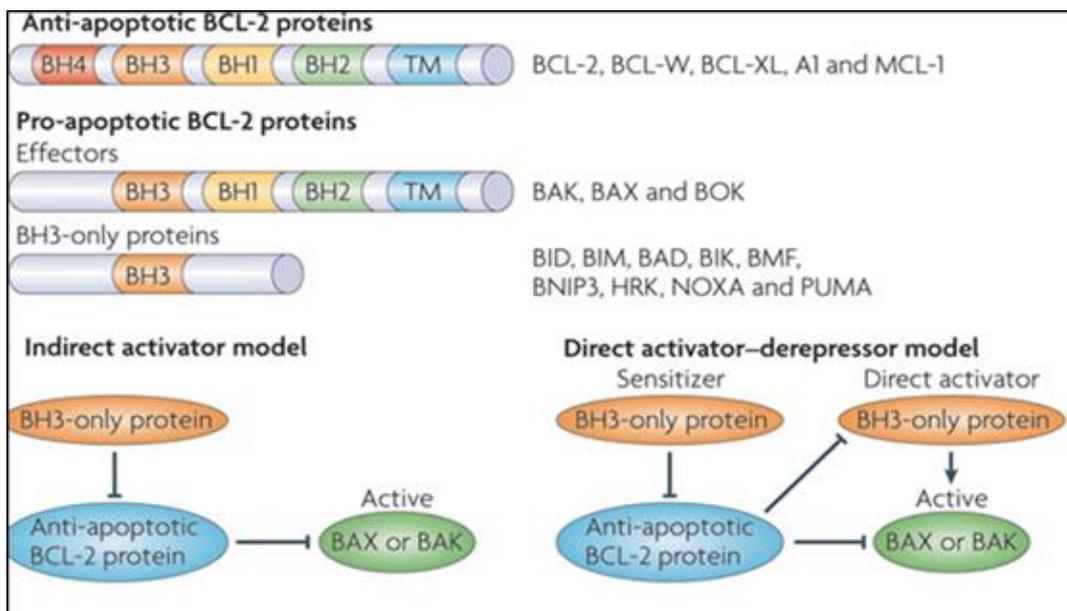


Figura 5. Familia de proteínas Bcl-2 y mecanismos de activación propuestos para los efectores pro-apoptóticos Bax y Bak. Las proteínas de la familia Bcl-2 poseen 4 dominios de homología con Bcl-2 (BH1-4) y se clasifican en miembros anti-apoptóticos (con los 4 dominios de homología) y miembros pro-apoptóticos. Esta última categoría se subdivide a su vez en miembros pro-apoptóticos multidominio (efectores) (Bax, Bak y Bok) y moléculas “sólo BH3” (Bid, Bim, Bad, Bik, Bmf, Bnip3, Hrk, Noxa o Puma). En base a la interacción establecida entre las moléculas efectoras y las moléculas “sólo BH3” se establecen dos posibles modelos de actuación para estas proteínas, dentro de los contextos apoptóticos. Por un lado, en el primer modelo (indirecto), la proteína “sólo BH3” podría antagonizar el papel represor de los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 sobre las moléculas pro-apoptóticas efectoras y posibilitar así la activación y acción de moléculas como Bax o Bak. En el segundo modelo (directo), podría darse una situación similar a la del primer mecanismo propuesto (actuando la molécula “sólo BH3” como sensibilizador), acompañada además por la acción directa de otras moléculas “sólo BH3” para la completa activación de las moléculas pro-apoptóticas efectoras. Adaptado de Tait y Green, 2010.

Dentro del contexto apoptótico mediado por la activación moderada de los receptores glutamatérgicos oligodendrogiales, se tiene constancia de la participación de algunas proteínas de la familia Bcl-2 en el control de dicho proceso apoptótico: se ha determinado la participación antagónica de Bcl-2 y Bad en los procesos apoptóticos mediados por Kainato (Sánchez-Gómez y cols, 2003). Además, se ha puesto de manifiesto el papel central de Bax en los procesos excitotóxicos mediados por activación de receptores AMPA o Kainato en oligodendrocitos, pues su ausencia limita con gran eficacia tanto las perturbaciones mitocondriales que conducen al colapso de dicho orgánulo como la consecuente activación de las caspasas (Sánchez-Gómez y cols, 2011).

En relación al establecimiento de Bax como elemento partícipe y fundamental en los eventos deletéreos para el mantenimiento de la funcionalidad e integridad mitocondrial, es preciso mencionar que en trabajos previos se ha revelado la participación de algunas moléculas “sólo BH3” durante el proceso de oligomerización e inserción estable de Bax o Bak en la membrana mitocondrial (Tait y Green, 2010; Shamas y cols, 2011) (Fig.5). Por tanto queda abierta, también en el caso de la excitotoxicidad glutamatérgica oligodendrogial, la posibilidad de que otras moléculas de la familia Bcl-2 participen en los eventos que, a nivel de señalización, conducen al colapso mitocondrial.

5. Factor de transcripción p53 en situaciones de estrés celular

El factor de transcripción p53 constituye uno de los principales supresores tumorales de las células, hasta el punto de que se le ha concedido el sobrenombre de “guardián del genoma”. Por ello, p53 resulta clave a la hora de activar multitud de respuestas celulares frente a una amplia gama de estímulos tóxicos (Giaccia y Kasdan, 1998). Bajo condiciones basales (ausencia de estrés celular), los niveles de p53 permanecen relativamente bajos y controlados en gran medida a través de las interacciones que mantiene con su principal regulador negativo, MDM2 (*murine doble minute 2*), que conducen fundamentalmente a la ubiquitinización y degradación de p53 (Moll y cols, 2003; Nag y cols, 2014). Una particularidad de este sistema de regulación estriba en el hecho de que el propio MDM2 constituye a su vez uno de los genes diana de la actividad transcripcional de p53. En situaciones celulares comprometidas, que desencadenan un incremento y/o activación de p53 a nivel transcripcional, será habitual observar incrementos en los niveles de MDM2 con el objetivo último de devolver a p53 a su estado basal (Shi y Wu, 2012; Pant y cols, 2013). Sin embargo, en la mayoría de situaciones que implican algún tipo de estrés celular, se desencadenan contextos en los que están activas multitud de moléculas y vías de señalización con posible influencia sobre la interacción p53-MDM2 (Kruse y Gu, 2009; Hu y cols, 2012; Nag y cols, 2013). Algunas de estas moléculas, actúan como mediadores que inducen modificaciones post-transcripcionales tales como fosforilación, acetilación, metilación y sumoilación sobre p53 o el propio MDM2, de tal manera que interrumpen la interacción

entre ambas moléculas y por tanto tienden a estabilizar a p53. La estabilización de p53 acarrea normalmente un incremento de su actividad a nivel transcripcional que puede redundar en la activación de distintas respuestas celulares frente al estrés como son: la parada del ciclo celular (reversible o irreversible), mecanismos de reparación del ADN o procesos de muerte celular programada (apoptosis) (Fig.6) (Zhang y cols, 2009; Loughery y Meek, 2013; Khoo y cols, 2014). Precisamente en este último punto, relativo a los procesos apoptóticos mediados por p53, es dónde centraremos nuestra atención durante el presente apartado.

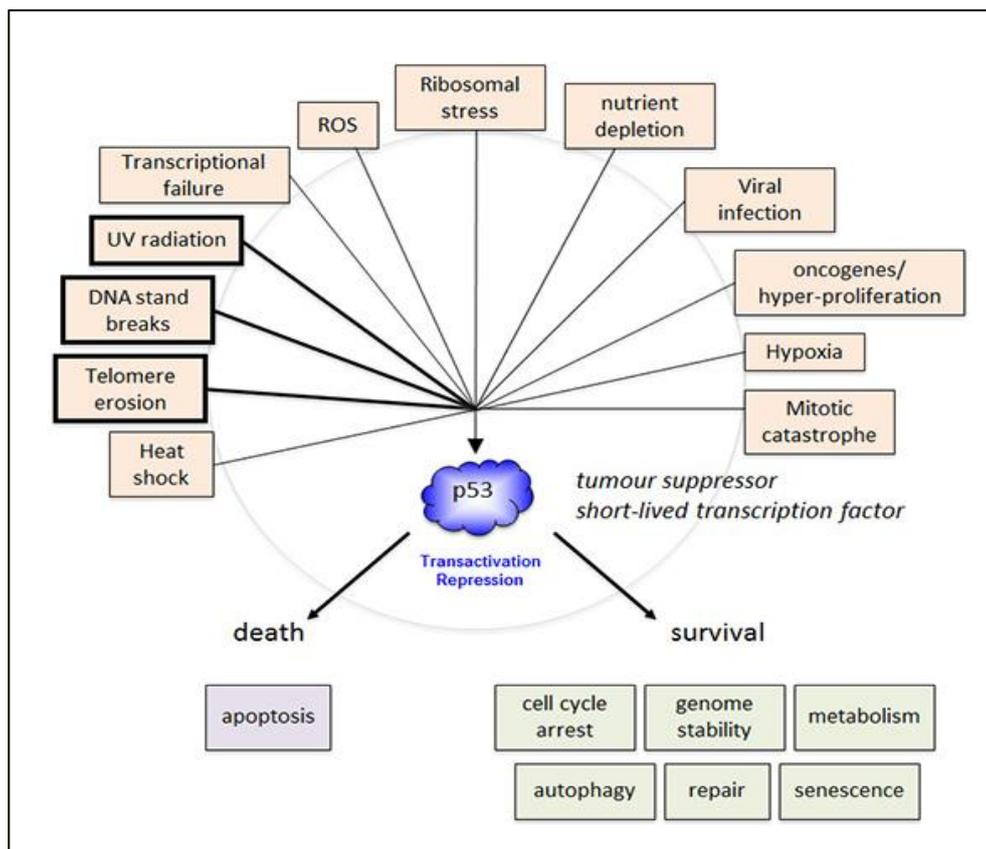


Figura 6. Mecanismos o procesos de estrés celular que desencadenan la activación del factor de transcripción p53 así como las distintas respuestas celulares mediadas por éste, tras su activación. Una amplia gama de fenómenos subyacentes a variadas situaciones de estrés celular pueden conducir a la activación de p53, a través de su estabilización, potenciando alguna de sus múltiples facetas de actuación. A su vez, la activación de p53 puede desembocar, dependiendo del tipo celular así como de la intensidad y tipo de estímulo citotóxico, en la potenciación de diversas respuestas celulares frente al estrés, entre ellas, apoptosis. Adaptado de Loughery y Meek, 2013.

5.1. Participación de p53 en la cascada de señalización apoptótica

La función transcripcional de p53 ha sido la más estudiada en relación a los procesos apoptóticos en los que participa. Existen multitud de genes pro-apoptóticos cuya inducción mediada por p53 ha sido puesta de manifiesto, pudiendo verse afectada la codificación tanto receptores de muerte (FAS) como proteínas apoptóticas de la familia Bcl-2 como Bax, Bid, Bim, Noxa y PUMA (Chipuk y cols, 2005; Vousden y Prives, 2009; Akhter y cols, 2014).

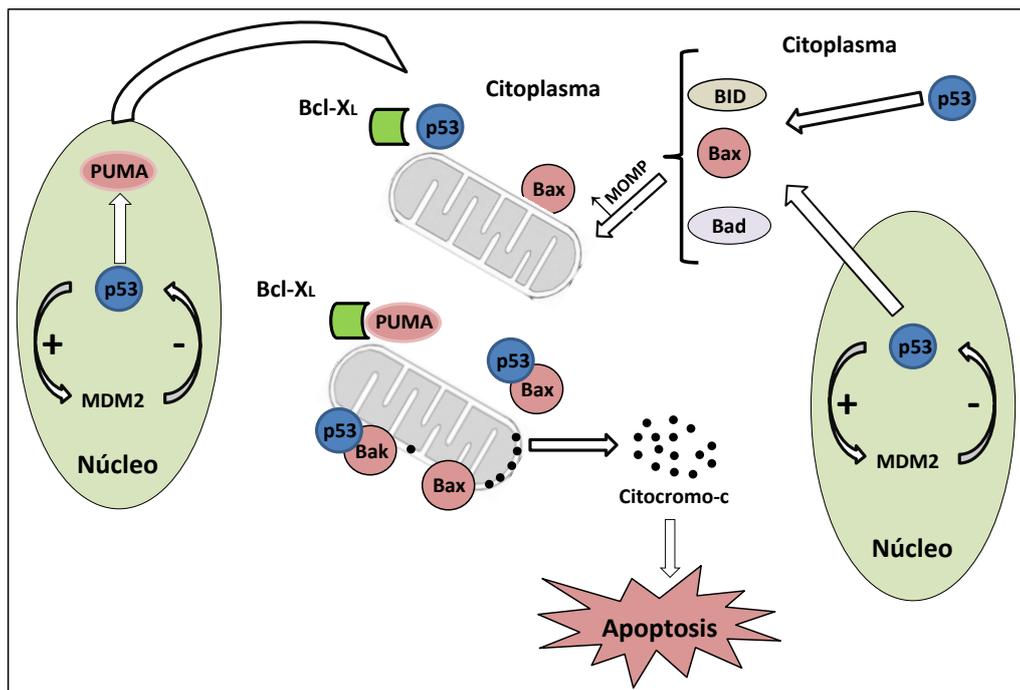


Figura 7. Acciones de p53 dependientes e independientes de su actividad transcripcional. La transducción de señales apoptóticas mediadas por p53 depende en gran medida de su acción como factor de transcripción a la hora de incrementar la expresión de determinadas moléculas pro-apoptóticas, entre otras, ciertas proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2. Sin embargo, el propio p53 puede contribuir de forma más directa a los acontecimientos que, a nivel mitocondrial, se desencadenan dando lugar a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y a la liberación de moléculas pro-apoptóticas almacenadas en el interior de la mitocondria: una localización mitocondrial de p53 puede interferir en las acciones anti-apoptóticas de moléculas como Bcl-2 o Bcl-X_L o fomentar, por ejemplo, la total activación de moléculas pro-apoptóticas como Bak. Además, pueden existir conexiones entre ambas componentes de la dualidad de acción de p53 tal y como se ha descrito en el caso de PUMA: la mayor actividad transcripcional de p53 genera incrementos en los niveles de PUMA que, a su vez, posibilitan la interrupción del “secuestro” del p53 citoplasmático por parte de proteínas anti-apoptóticas como Bcl- X_L. De esta forma p53, una vez liberado, puede mediar los cambios conformacionales de Bax que conducen a su correcta inserción a nivel mitocondrial.

Adicionalmente se han descrito, de forma más reciente, funciones citoplasmáticas y mitocondriales desempeñadas por p53 con independencia de su actividad transcripcional (Moll y cols, 2005; Schuler y Green, 2005; Galluzi y cols, 2008; Marchenko y Moll, 2014; Gu y cols, 2015). Una vez en la mitocondria, p53 interviene en la despolarización de la membrana mitocondrial externa (MOMP) promoviendo así

la liberación de moléculas pro-apoptóticas existentes en el espacio intermembrana de dicho orgánulo. Este evento, como ya se ha dicho, está bajo el influjo de un equilibrio finamente regulado entre la acción de las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 (como Bcl-2 o Bcl-X_L) y las proteínas pro-apoptóticas multidominio de esta misma familia (especialmente Bax y Bak). En el desplazamiento de este equilibrio a favor de la apoptosis, juegan un papel clave ciertos miembros “sólo BH3” de la familia Bcl-2, bien directamente promoviendo la activación de Bax y Bak (Bid, Bim) o bien indirectamente actuando como “sensibilizadoras” al impedir la acción inhibitoria ejercida por las moléculas anti-apoptóticas sobre la activación de Bax o Bak (Letai y cols, 2003) (Fig.5). A este respecto, se han sugerido acciones miméticas para p53 en relación a ambos tipos de proteínas “sólo BH3”, pues podría actuar como activador (acción directa sobre Bax o Bak) y/o como “sensibilizador” (limitando la acción anti-apoptótica de moléculas como Bcl-2 o Bcl-X_L) (Mihara y cols, 2003; Moll y cols, 2006; Sot y cols, 2007).

Ambas modalidades de actuación propuestas para p53 (acción transcripcional o acción citoplasmática/mitocondrial) constituyen su potencial contribución al programa apoptótico y se han planteado, en principio, como funciones independientes. Sin embargo, parece existir cierto grado de conexión entre las actividades transcripcionales de p53 y sus acciones a nivel citoplasmático y mitocondrial. En este sentido, como ejemplo, uno de los genes diana de p53 denominado PUMA, controla la cantidad de p53 citoplasmático “secuestrado” por las proteínas antiapoptóticas Bcl-X_L generando, en condiciones de alta activación de p53 a nivel nuclear (transcripcional), un mayor ratio de p53 “libre” y en un incremento en la actividad de este a nivel mitocondrial pudiendo redundar, entre otros, en un mayor grado de activación de Bax (Chipuck y cols, 2005; Follis y cols, 2013) (Fig.7).

5.2. Modulación de la actividad de p53

Como hemos mencionado anteriormente, las modificaciones post-transcripcionales que ciertos mediadores ejercen sobre p53 son fundamentales a la hora de modular su actividad, por ejemplo modificando su interacción con MDM2. Dichas modificaciones son, por tanto, fundamentales para entender el papel de p53 en la amplia gama de respuestas celulares de las que es partícipe. En general, dentro de los procesos apoptóticos de los que es en gran medida responsable, estados hiperfosforilados de p53 determinan su estabilización e incrementan su acción transcripcional (Brooks y Gu, 2003; Bode y Dong, 2004; Loughery y Meek, 2013). Pero además, fosforilaciones de ciertos residuos concretos dentro de la estructura de p53, parecen determinar también su localización celular y por ende la especificidad de sus acciones (Castrogiovanni y cols, 2015; Wang y cols, 2015).

Por ello, el estudio de dichas modificaciones transcripcionales, puede constituir un método óptimo para discernir cuál/es de las vertientes de acción de p53 intervienen en un mecanismo apoptótico

determinado. Las MAPKs (*Mitogen activated protein kinases*) son unas de las moléculas implicadas en la fosforilación de p53 bajo determinados contextos apoptóticos (Wu, 2004; Gong y cols, 2010).

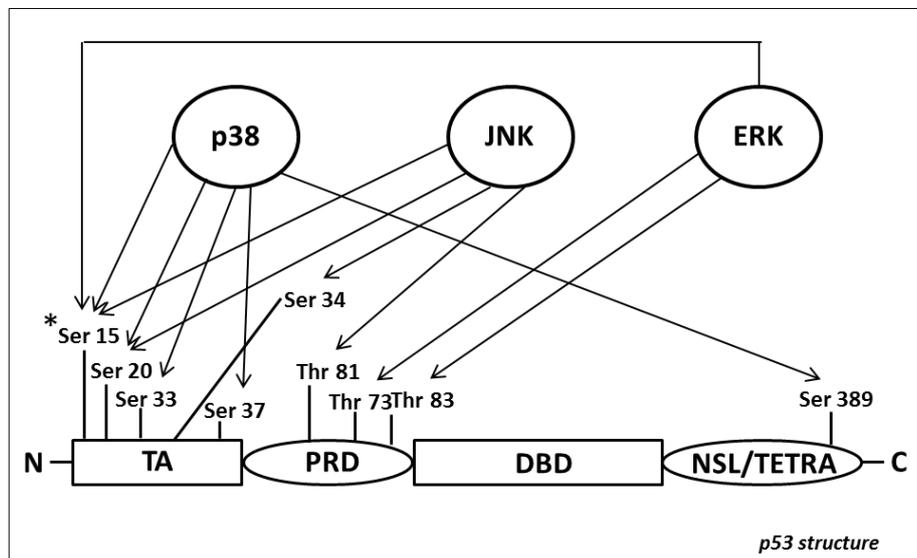


Figura 8. Dominios funcionales de p53 y su fosforilación por las MAPKs. La estructura de p53 consta de: TA (transactivation domain), PRD (Proline rich domain), DBD (DNA binding domain) y región C-terminal compuesta por NSL (nuclear localization sequence) y TETRA (Tetramerization domain). Durante una situación de estrés celular, las MAPKs (especialmente JNK y p38) se encuentran presumiblemente, activas. En este contexto, fosforilan y activan a p53 iniciando respuestas celulares mediadas por éste. Adaptado de Wu, 2004.

A este nivel, destacar el papel de la fosforilación de p53 en el residuo Ser 15, pues se ha relacionado con su localización y acción a nivel mitocondrial en determinados contextos apoptóticos (Park y cols, 2005; Saleem y cols, 2009; Wang y cols, 2015).

6. Vías de las MAPKs en situaciones de estrés celular

La vía de las quinasas activadas por mitógeno (MAPK) constituye uno de los sistemas de señalización intracelular directamente implicados en la regulación de funciones celulares tan diversas como la proliferación, diferenciación y apoptosis celular. Cada vía de las MAPK responde a una estructura jerárquica que comprende tres clases de proteínas quinasas: MAPK quinasa quinasa (MAP3K), MAPK quinasa (MAP2K) y MAPK. La activación de esta vía de señalización se transmite mediante sucesivas fosforilaciones de los elementos constituyentes básicos, propios de cada nivel.

De manera general, puede decirse que las MAPKs están divididas en tres grupos: las MAPK/ERKs (*extracellular signal – regulated kinases*), las p38 MAPKs y las SAPK/JNKs (*stress-activated protein kinases/Jun N-terminal kinases*) y en los tres casos su activación puede provocar la fosforilación de

moléculas diana en el citosol o bien pueden traslocarse al núcleo donde regularán la actividad de múltiples factores de transcripción.

Las MAPK de la familia ERK cuentan con dos isoformas, ERK1 (p44) y ERK2 (p42). Estas dos isoformas son las mejor conservadas y son activadas a través de la fosforilación de sus residuos serina/treonina por otra quinasa, MAPKK, también conocida como MEK1/2. Las ERK1/2 se encuentran implicadas en la cascada que incluye a Ras/Raf/MEK/ERK y que supone una de las vías clave en la integración de la señalización extracelular (Chambard y cols, 2007). Las consecuencias de la activación de ERK en la supervivencia celular dependen en gran medida de tipo celular así como de la etapa de desarrollo en la que se encuentre la célula. Si bien existen situaciones en las que la activación de ERK contribuye al proceso apoptótico, en líneas generales prevalece su función pro-supervivencia (Lu y Xu, 2006; Steelman y cols, 2011).

Entre las MAPKs activadas por estrés, tanto JNK como p38 son activadas por multitud de condiciones estresantes para la célula, entre otras: especies reactivas de oxígeno (ROS), alteraciones en la presión osmótica, factor de necrosis tumoral (TNF- α) o estrés de retículo endoplasmático (ER) (Son y cols, 2011; Darling y Cook, 2014). La activación de p38 y/o JNK bajo situaciones de estrés celular constituye un evento central que rige el devenir de multitud de procesos apoptóticos, hecho por el cual les dedicaremos el siguiente subapartado.

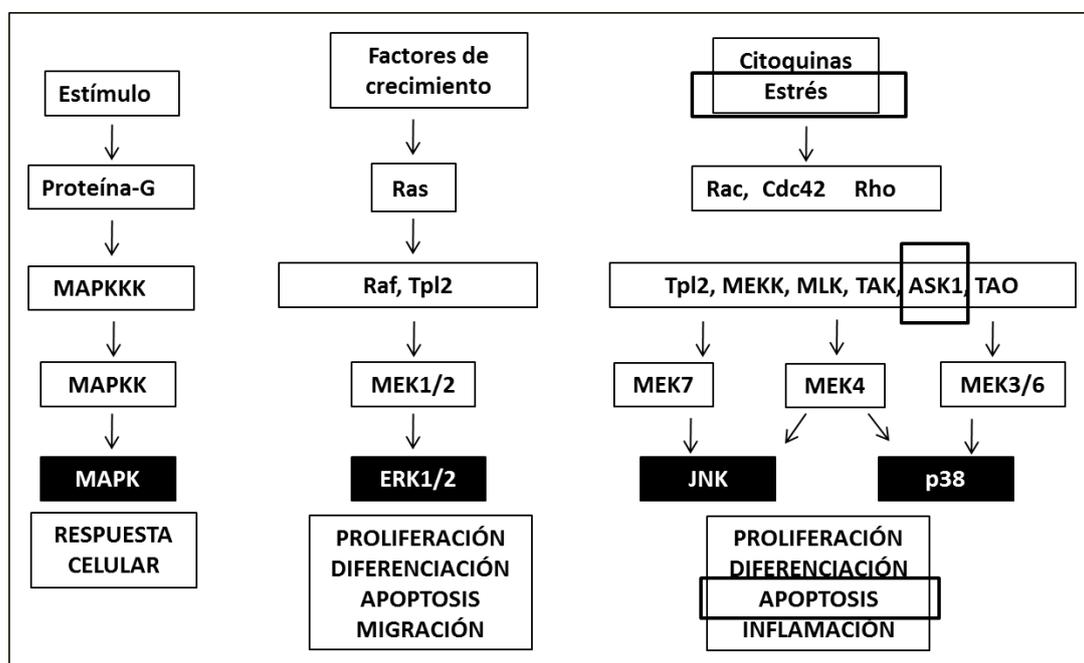


Figura 9. Cascada de señalización de las MAPKs. Un estímulo potencialmente citotóxico, desencadena la activación de la cascada de señalización de las MAPKs integrada por los distintos niveles de proteínas quinasa. La transducción de señales entre dichos niveles de la ruta está mediada por sucesivas fosforilaciones y provoca, en última instancia, la activación de JNK y/o p38, mientras que la activación de ERK ha sido ligada principalmente a otro tipo de contextos. En función de las características del agente desencadenante del estrés así como del tipo celular, se generan una serie de respuestas celulares entre las que ocupa un lugar destacado (principalmente en el caso de p38 y JNK) la muerte celular programada o apoptosis.

6.1. MAPKs activadas por estrés: eje señalizador ASK1/JNK/p38

Si bien existen mecanismos/proteín quinasas que, de forma independiente contribuyen a la activación de JNK y p38, ciertos estímulos apoptóticos promueven la activación de ambas quinasas, en ocasiones de forma paralela. En este punto, juega un papel determinante la quinasa-1 regulada por señal apoptótica (ASK-1). Se trata de una de las moléculas que conforman el nivel superior MAP3K, que activa las vías MAPK quinasa 4 (MKK4)/MKK7-JNK y MKK3/6-p38 (Ichijo y cols, 1997; Takeda y cols, 2003). ASK-1 es activada por multitud de mecanismos desencadenados bajo el influjo de diversos estímulos citotóxicos como, estrés oxidativo mediado por incremento de ROS (Matsuzawa y cols, 2005; Soga y cols, 2012), disrupción en la homeostasis del Ca^{+2} y consecuente activación de la Calmodulin quinasa 2 (CaMKII) (Brnjic y cols, 2010; Liu y cols, 2013) o por el estrés del retículo endoplasmático (Nishitoh y cols, 2002; Cai y cols, 2013), entre otros (Fig.10).

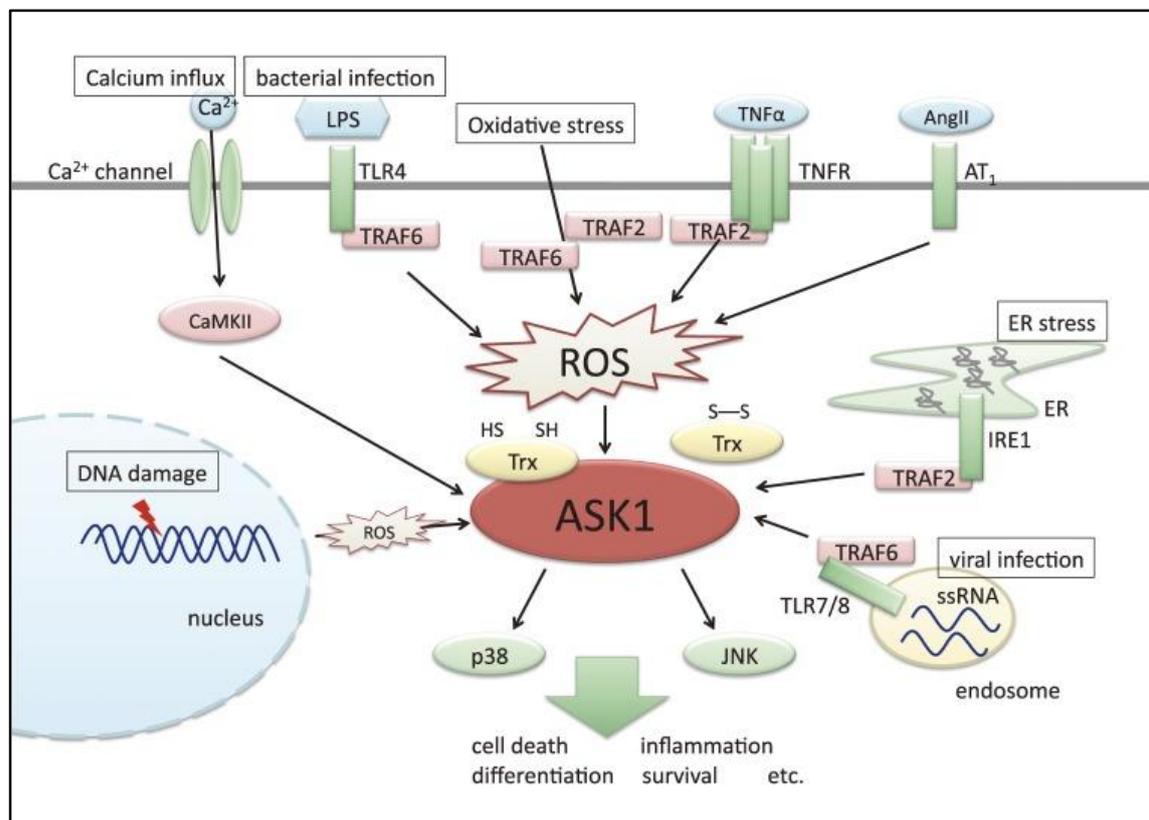


Figura 10. Principales fenómenos propios de contextos de estrés y daño celular que convergen en la activación de ASK-1/JNK y/o p38. Multitud de fenómenos subyacentes a variadas situaciones de estrés celular y también caracterizados como parte de la secuencia de acontecimientos propios de la excitotoxicidad glutamatérgica oligodendroglial, pueden mediar la activación de ASK-1 y por ende de JNK y/o p38 curso abajo en la vía de señalización de las MAPKs activadas por estrés. Entre estos fenómenos, la activación de la CaMKII mediada por la disrupción previa de la homeostasis del Ca^{+2} , el estrés oxidativo reflejado en el incremento de ROS, o el estrés a nivel del retículo endoplasmático a través de la vía de IRE1 α , ocupan un lugar destacado a la hora de activar a ASK-1. Adaptado de Hayakawa y cols, 2012.

6.1.1. Activación de ASK1 mediada por estrés oxidativo

En relación al proceso de activación de ASK-1 mediado por ROS, existen moléculas implicadas en la respuesta celular frente a este tipo de estrés, que limitan el proceso de activación de ASK-1. Dicha quinasa, homo-oligomeriza durante los procesos que conducen a su activación a través de su cola C-terminal, dando lugar a lo que se conoce como sinaglosoma (Noguchi y cols, 2005). A este nivel, una de las moléculas que conforman la respuesta antioxidante celular denominada Trx (tioredoxina), juega un papel crucial: la forma reducida de Trx está presente en esta vía a dos niveles, bien unida a p38 o bien en el sinaglosoma (Nishiyama y cols 2001; Nadeau y cols, 2007; Tsuchilla y cols, 2015). Cuando Trx se encuentra unida a ASK-1 lo está a través de su extremo N-terminal de tal forma que impide su actividad quinasa. Bajo determinados contextos citotóxicos que implican un grado de estrés oxidativo demasiado acusado, Trx se oxida y se disocia de ASK-1 posibilitando así la activación de dicha quinasa mediante autofosforilación en el residuo Thr845 (Tobiume y cols, 2002; Soga y cols, 2012). Sin embargo, de forma más reciente se ha establecido otro nivel de complejidad dentro del mecanismo de activación de ASK-1 mediado por el estrés oxidativo, que implica a otra enzima antioxidante: la enzima Perredoxin-1 (Prx-1), es una enzima participe en el mantenimiento del balance redox a través de su intervención en los procesos de eliminación de ROS y que a ha sido relacionada con los fenómenos apoptóticos ASK-1 dependientes. Concretamente, varios trabajos proponen la participación de Prx-1 como parte del mecanismo de regulación negativa que limita la activación de ASK-1 en apoyo del ya descrito para Trx (Kim y cols, 2008; He y cols, 2012).

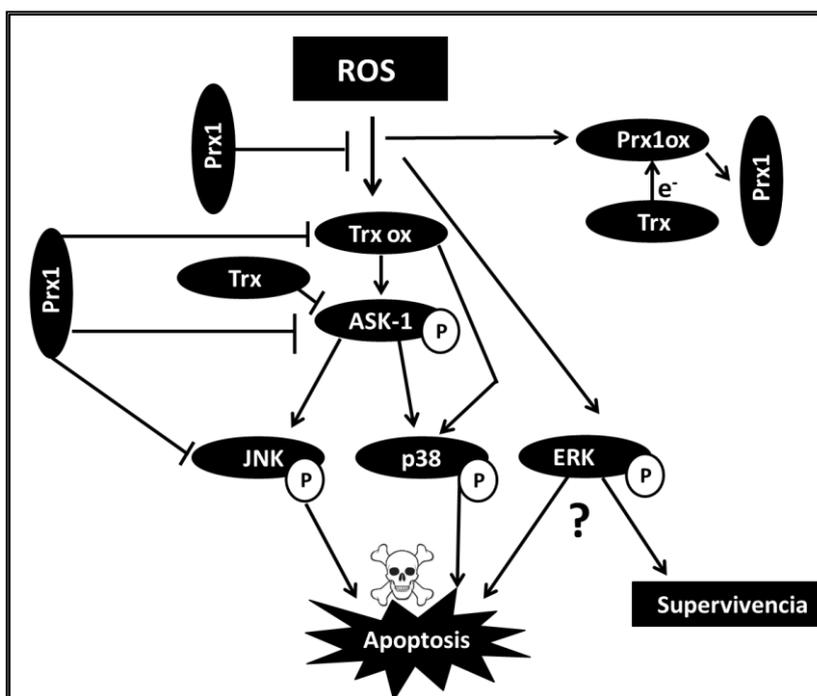


Figura 11. Principales actividades antioxidantes de Prx-1 y Trx como defensas celulares ante el estrés oxidativo. Prx-1 puede constituir una de las defensas celulares primarias de la frente a ROS a varios niveles. Bajo condiciones de no estrés ASK-1 está asociado con su inhibidor fisiológico, Trx, a través del dominio N-terminal no catalítico. En condiciones de estrés, esta interacción se rompe y es Prx-1 el que se une a ASK-1 a través de su dominio de unión a Trx, manteniéndolo inactivo. Además, Prx-1 puede interaccionar con JNK de forma indirecta a través de GST-pi (Glutacion-S-transferasa pi) y así mantenerlo inactivo.

6.1.2. Activación de ASK1 mediada por alteraciones en la homeostasis del Ca^{+2}

Otro fenómeno propio de los mecanismos apoptóticos ocasionados por la sobre-estimulación de los receptores AMPA oligodendrogiales y que también puede converger en la activación de ASK-1 es, como ya hemos mencionado, la alteración en la homeostasis del Ca^{+2} . Los efectos de la entrada masiva de Ca^{+2} al interior celular pueden ser canalizados, al menos en parte, por la activación de las Calmodulin quinasas (proteín quinasas dependiente de Ca^{+2} /Calmodulina). Estas enzimas, se activan a raíz de incrementos en la concentración intracelular de iones Ca^{+2} y transfieren grupos fosfato del ATP a residuos Ser/Thr de otras proteínas. Una de las proteínas potencialmente activables mediante dichas fosforilaciones es precisamente, ASK-1. Multitud de trabajos han corroborado la participación de la CaMKII como elemento conector entre la señalización alterada del Ca^{+2} y la activación del eje de señalización pro-apoptótica ASK-1/JNK/p38 (Brnjic y cols, 2010; Liu y cols, 2013; Chen y cols, 2013). El punto clave de interacción entre la CaMKII y ASK-1 parece estribar en que la activación de la primera promueve la fosforilación de la segunda en el residuo Thr 845, modificación fundamental para su activación (Takeda y cols, 2003; Hattori y cols, 2009).

6.1.3. Activación de ASK1 mediada por el estrés de RE

Finalmente, el estrés a nivel del retículo endoplásmico, supone otro de los fenómenos propios de multitud de situaciones de estrés celular y puede, bajo determinadas condiciones, mediar la activación de ASK-1 y promover el proceso apoptótico emergente. Como hemos mencionado en el apartado relativo a este fenómeno propio de la excitotoxicidad glutamatérgica, el estrés infligido a nivel de este orgánulo celular desencadena la activación de la vía UPR, hecho también constatado en oligodendrocitos expuestos a AMPA (Ruíz y cols, 2010). Entre las vías de señalización integradas en la UPR, la representada por la activación de IRE-1 α puede desempeñar, bajo determinadas circunstancias, un papel fundamental en la activación de la vía de las MAPKs: si un potencial agente estresante ocasiona un grado de daño o estrés reticular irreparable, la respuesta mediada por IRE-1 α inicialmente adaptativa y pro-supervivencia, deja paso a su contribución al proceso apoptótico emergente, estableciendo así la conexión entre el estrés reticular y la activación de la vía de señalización SAPK/JNK. De forma concreta, dicha conexión se establece de tal forma que IRE-1 α recluta a TRAF-2 (*TNF receptor associated factor 2*) y a través de su actividad quinasas acopla el estrés de RE al proceso de activación de JNK mediado por ASK-1 (Urano y cols, 2000; Yang y cols, 2009; Tabas y Ron, 2011; Cai y cols, 2013) (ver figuras 10 y 12).

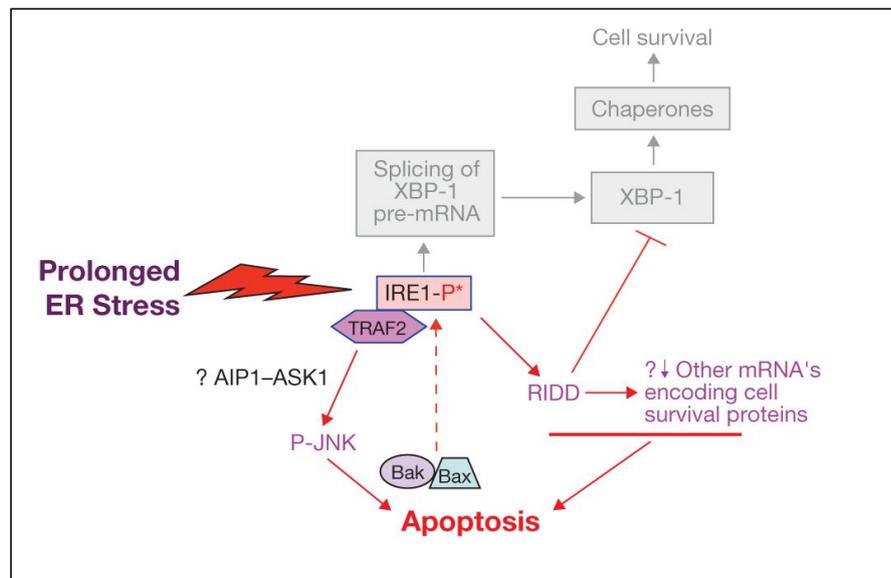


Figura 12. Vía de señalización IRE1/TRAF2-ASK1/JNK activada bajo condiciones severas de estrés de RE. La transducción de señales entre el complejo IRE-1/TRAF2 puede afectar a ASK-1 y resultar en la activación de JNK. Además, la participación de miembros de la familia Bcl-2 como Bax o Bak en el fenómeno apoptótico podría verse potenciada redundando a su vez en la magnificación de los fenómenos IRE-1 α dependientes. Adaptado de Tabas y Ron, 2011.

Una vez se produce la activación de ASK-1 mediada por alguno o quizás varios de los fenómenos expuestos anteriormente, continua el proceso de transmisión de la señal apoptótica hacia el siguiente nivel de la vía, constituido por las MAP2K, llegando finalmente a nivel de las MAPKs (JNK y p38) que a su vez influenciarán múltiples vías y ramificaciones de la cascada de señalización apoptótica en curso.

6.2. Vía JNK/SAPK

Las 10 isoformas existentes para esta quinasa y originadas a partir del splicing alternativo de 3 genes diferentes JNK1, JNK2, JNK3 (Davis, 2000; Johnson y Nakamura, 2007), juegan un papel determinante tanto a nivel de la vía apoptótica extrínseca como a nivel de la vía mitocondrial o intrínseca. Estas quinasas, desempeñan su papel a la hora de activar señalización pro-apoptótica mediante la sobre-regulación de genes pro-apoptóticos y/o a través de la transactivación de factores de transcripción específicos o de forma más directa modulando las actividades de proteínas mitocondriales pro y anti-apoptóticas a través de fosforilaciones.

Concretamente, una vez activado por las MAPKs, el JNK fosforilado puede translocarse al núcleo donde entre otros fosforila y activa a c-Jun (Davis y cols, 2000; Chang y cols, 2001). La fosforilación de c-Jun ocasiona la formación de AP-1, que a su vez ha sido implicado en la expresión de una amplia variedad de proteínas, algunas de las cuales de marcado carácter pro-apoptótico (Dhanasekaran y Reddy 2008; Turjanski y cols, 2007). Además, JNK puede fosforilar y modular a otros factores de

transcripción como JunD, ATF2, ATF3, Elk1, Elk3, p53, AR, NFAT4, HSF-1 y c-Myc (Johnson y Nakamura, 2007). Se ha visto que la participación de JNK, a nivel nuclear, es un evento fundamental durante los procesos apoptóticos que afectan a neuronas del sistema nervioso central durante condiciones retirada de factores tróficos (Björkblom y cols, 2008).

Además de sus implicaciones a nivel nuclear, se han explorado con éxito otras posibles acciones de JNK en el ámbito mitocondrial. A este respecto, JNK modula la activación de determinadas proteínas pro y anti-apoptóticas, participando de forma esencial en los procesos que conducen a la liberación del citocromo-c (Tournier y cols, 2000), dada su relevancia en los procesos de activación de moléculas pro-apoptóticas como Bid (Liu y Lin, 2005; Deng y cols, 2003), Bim y Bmf (Lei y Davis, 2003) o Bad (Donovan y cols, 2002; Wang y cols, 2007).

La vía SAPK/JNK modula multitud de procesos apoptóticos, alguno de los cuales mecanismos ocasionan muerte oligodendroglial (Stariha y Kim, 2001; Jurewicz y cols, 2006) también bajo condiciones de excitotoxicidad glutamatérgica (Liu y cols, 2002; Rosin y cols, 2004).

6.3. Vía p38

La ruta de señalización que implica a p38 puede ser activada por multitud de factores extracelulares que van desde citoquinas pro-inflamatorias, componentes de bacterias y estrés (Zarubin y Han, 2005). En clara conjunción con la cascada de señalización mediada por JNK, está involucrada en la determinación del destino celular, dado que muchas de las señales que pueden activarla se dan bajo contextos de estrés celular.

En general, los mecanismos mediante los cuales p38 puede mediar apoptosis o supervivencia celular implican la regulación de la expresión de moléculas de la familia Bcl-2 (Cai y cols, 2006). Entre otras acciones, p38 puede regular mediante distintos mecanismos a Bax: incrementando los niveles de ARNm y proteína (Porras y cols, 2004), mediando su translocación a la mitocondria (Capano y Crompton, 2006; Kim y cols, 2006), o como parte del complejo de señalización mitocondrial que favorece la activación de Bax y la liberación del citocromo-c (Owens y cols, 2009). Por otra banda, los niveles y actividad de Bim pueden ser alterados por p38 (Cai y cols, 2006; Cai y cols, 2008). Además, p38 supone una de las quinasas cuyas fosforilaciones sobre p53 pueden modular la actividad/localización del mismo en contextos apoptóticos (Perfettini, 2005; Gong y cols, 2010).

Las acciones pro-apoptóticas de p38 dentro de la cascada de señalización implicada en los procesos de muerte celular, se complementan a través de regulación negativa que, a través de fosforilaciones, ejerce sobre la actividad de moléculas anti-apoptóticas como Bcl-2 (Torcia y cols, 2001; Markou y cols, 2009). Se ha descrito también la posible interacción de p38 y c-FLIP, dando como resultado de dicho vínculo la inhibición de la acción anti-apoptótica de este último al impedir su reclutamiento en el DISC

(Tourian y cols, 2004). Finalmente, resaltar que, las vías de supervivencia PI3K/AKT o ERK (cuando esta actúa como tal) pueden verse reguladas de forma negativa por p38 (Porras y cols, 2004; Zuluaga y cols, 2007). Por todo ello, se puede concluir que la activación de p38 constituye uno de los fenómenos característicos y fundamentales de multitud de contextos apoptóticos.

7. Caseína Quinasa 2 (CK2) en la regulación de la supervivencia o muerte celular

La caseína quinasa 2 (CK2), es una serina/treonina proteína quinasa altamente conservada, de distribución ubicua en eucariotas, presente en multitud de compartimentos celulares y relacionada con una amplia variedad de sustratos mediante las interacciones y fosforilaciones que sobre ellos ejerce (Meggio y Pinna, 2003). La estructura molecular de CK2 se corresponde a la de un complejo tetramérico caracterizado por la presencia de dos subunidades alfa catalíticas (CK2 α and CK2 α') y dos subunidades beta reguladoras (CK2 β) (Hanif y cols, 2010). Durante sus acciones como quinasa, CK2 difiere de otras proteínas quinasas por el hecho de que fosforila tanto residuos Ser/Thr como Tyr en motivos ácidos (Vilk y cols, 2008) empleando para ello tanto ATP como GTP como donadores de grupos fosfato (Olsten y cols, 2004; Olsten y cols, 2005). Se trata pues, de una quinasa que por sus características singulares fue considerada de forma clásica como la quinasa más promiscua de las células eucariotas, afirmación que ha sido corroborada a posteriori en estudios proteómicos realizados en células humanas, en los que se observó que gran parte de los sitios de fosforilación fisiológicos contienen secuencias consenso para CK2 (Salvi y cols, 2009; Bian y cols, 2013).

Dado el amplio patrón de distribución y las múltiples acciones de CK2, se han identificado unos 300 sustratos a través de los cuales CK2 media procesos como: proliferación, supervivencia, apoptosis y transformación celular (Meggio y Pinna, 2003; Trembley y cols, 2009; Ruzzene y cols, 2010). Como hemos mencionado, CK2 es una quinasa ubicua que está activa de forma constitutiva, si bien existen evidencias de su recolocalización así como de incrementos en su actividad como respuesta, entre otros, ante situaciones de estrés celular (Gerber y cols, 2000; Davis y cols, 2002; Yamame y Kinsella, 2005).

7.1. Participación de CK2 en la supervivencia celular

Existen multitud de evidencias que sostienen que la expresión de CK2 contribuye, en líneas generales, al mantenimiento de la viabilidad celular. Este hecho es especialmente notorio en tumores, pues se asocian en multitud de casos con una alta expresión y actividad de CK2 (Di Maira y cols, 2005; Silva y cols, 2008; Martins y cols, 2010; Ortega y cols, 2014) mientras que, por el contrario, la inhibición de CK2 facilita los procesos de muerte de las células tumorales (Dixit y cols, 2012; Qaiser y cols, 2014).

En este sentido, la influencia que la actividad de CK2 ejerce sobre multitud de moléculas y vías de señalización puede explicar la modulación general pro-supervivencia que parece caracterizar a dicha quinasa: existe constancia de la regulación al alza de la vía de señalización PI3K/AKT mediada por la acción de CK2, bien mediante fosforilación directa de AKT a nivel de la ser 129 (Di Maira y cols, 2005; Di Maira, 2009; Ponce y cols, 2011) o bien mediante la fosforilación e inactivación de PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) (Torres y Pulido, 2001; Kang y cols, 2011; Lima-Fernandes y cols, 2014). Así mismo se ha descrito la relación, entre CK2 y la activación de NF κ B, cuando esta promueve mecanismos de señalización pro-supervivencia (Chantome y cols, 2004; Dominguez y cols, 2009). Además, existen estudios que ponen de manifiesto la participación de CK2 en la activación de la vía JAK/STAT mediante la fosforilación de las quinasas Janus (JAK) 1 y 2 (Zheng y cols, 2011). También se ha constatado una potencial relación de CK2 con c-FLIP en la respuesta pro-supervivencia frente a determinados procesos apoptóticos (Wang y cols, 2006).

Sin embargo, CK2 no sólo media la supervivencia celular a través de la potenciación de rutas consideradas pro-supervivencia sino que limita la acción de ciertas moléculas pro-apoptóticas, especialmente a nivel mitocondrial. En este sentido y haciendo referencia a una de las moléculas citadas en apartados anteriores, CK2 se ha revelado como una de las quinasas con capacidad para fosforilar a Bid, impidiendo así el proceso de activación de este (Olsen y cols, 2006; Hellwig y cols, 2010).

7.2. Participación de CK2 en vías de señalización propias de mecanismos apoptóticos

En contraposición a la visión de CK2 como quinasa cuyas acciones únicamente redundan en la potenciación de la viabilidad celular, existen una serie de investigaciones en las que, bajo ciertos contextos apoptóticos muy concretos, CK2 parece intervenir de forma opuesta (Sayed y cols, 2001; Lithfield y cols, 2003). Concretamente, tras la acción de determinados agentes estresantes parece establecerse una relación entre CK2 y la activación pro-apoptótica de JNK (Min y cols, 2003; Hilgard y cols, 2004). Además de su conexión con JNK, se ha establecido también un vínculo entre CK2 y p53. Concretamente, CK2 en complejo con el factor de la cromatina FACT (hsPT16 y SSRP1) fue identificada como la quinasa responsable de la fosforilación de p53 a nivel de la ser 392 tras la exposición a luz UV in vitro (Sayed y cols, 2000; Keller y cols, 2001; Keller y Lu, 2002), asociándose dicha fosforilación con incrementos en la unión de p53 al DNA y por tanto en su actividad transcripcional.

7.3. Modulación del estrés de RE a través de la actividad de CK2

En íntima relación con la posible participación de CK2 en toma de decisiones entre la supervivencia o muerte celular y dada la acción antagónica que a este respecto puede caracterizar a la vía UPR es preciso esbozar, en líneas generales, las principales acciones de CK2 dentro de la misma: existen evidencias de la influencia directa de CK2 sobre las vías de señalización iniciadas por PERK e IRE1 α , si bien todavía no se han encontrado acciones directas sobre la vía mediada por ATF6 (Fig. 13). Concretamente, diversos estudios proponen la actividad de CK2 como inhibitoria con respecto a la activación de PERK y consecuentemente en la activación de la diana molecular de dicha quinasa, eIF2 α , pues tanto la inhibición farmacológica como el silenciamiento génico de CK2, incrementan la tasa de fosforilación / activación de eIF2 α (Manni y cols, 2012; Ampofo y cols, 2013; Intemann y cols, 2014).

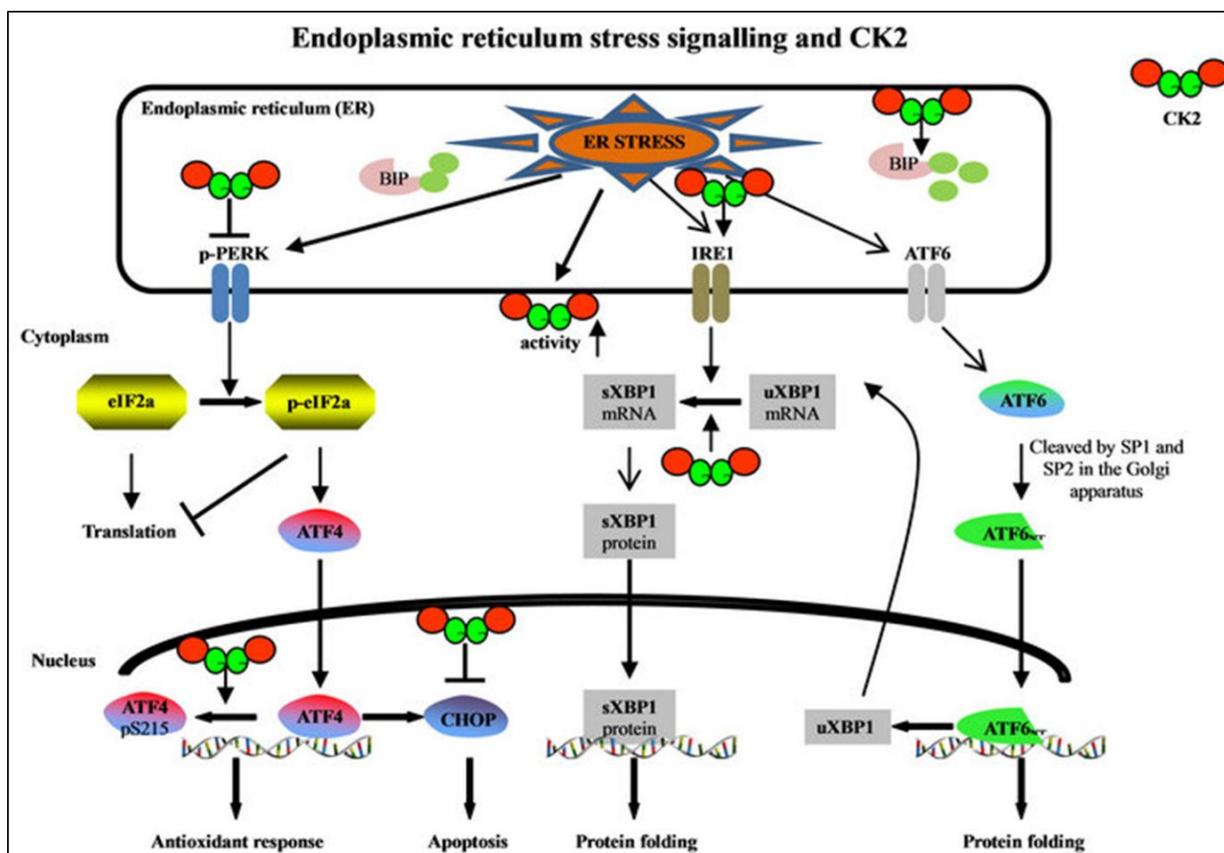


Figura 13. Influencia de CK2 sobre los distintos ejes de señalización integrados en la UPR, bajo condiciones de estrés de RE. A través de la inhibición o el silenciamiento génico de CK2 se han observado sus acciones a nivel de las diferentes vías de la UPR. A este respecto, se ha constatado su acción inhibitoria sobre la actividad de PERK y por tanto sobre la fosforilación de la diana de esta quinasa, eIF2 α . También se ha determinado la participación de CK2 en el eje de señalización iniciado por IRE1 α , en este caso potenciando su grado de fosforilación y activación. En cuanto a la vía iniciada mediante la disociación de ATF6 y GRP78, no se han encontrado evidencias tan directas de la influencia de CK2 sobre elementos integrados en dicho eje de señalización. Adaptado de Götz y Monternach, 2013.

Contrariamente, el papel propuesto para CK2 con respecto a la vía de señalización mediada por la activación de IRE1 α se antoja inverso al anterior: en trabajos realizados sobre células gliales, el estrés de retículo endoplasmático ocasionado por el uso de Thapsigargina (estímulo inductor de estrés de RE y por tanto de la UPR) y relativo a la activación de la vía iniciada por IRE1 α se ve afectado por la inhibición de CK2, pues bajo este paradigma experimental la inhibición de CK2 reduce la activación de IRE1 α y la aparición de la forma XBP1s (Hosoi y cols, 2012; Manni y cols, 2012) (ver figura 13).

8. Vía de señalización PI3K/Akt/mTOR

Desde su descubrimiento como oncogen, la serina/treonina quinasa Akt, también conocida como proteína quinasa B (PKB), ha sido foco de atención en infinidad de estudios debido a su papel crítico en la regulación de diversos procesos celulares, incluyendo la supervivencia o la proliferación celular. La cascada de señalización de Akt puede estar activada por receptores tirosina quinasa, receptores de citoquinas, receptores acoplados a proteínas G y otros estímulos que inducen la producción de fosfatidil-inositol trifosfato mediante la intervención de la quinasa PI3K (*Phosphoinositide 3-Kinase*) y cuyo resultado es el mantenimiento del ciclo y la proliferación celular (Brazil y cols, 2004; Yip y cols, 2015).

8.1. Principales intervenciones de Akt a favor de la supervivencia celular

Las tres isoformas de Akt median muchos de los eventos regulados por PI3K entre los cuales destaca la oposición a los mecanismos apoptóticos a través de diferentes vías, entre las cuales: pueden inactivar a ASK-1 mediante fosforilación en el residuo Ser83 y por tanto limitar procesos apoptóticos ASK1-dependientes (Kim y cols, 2001; Vauzour y cols, 2007; Autret y cols, 2008). Además, Akt fosforila a la proteína pro-apoptótica BAD, hecho que provoca la asociación de esta a 14-3-3, quedando así incapacitada como inhibidor de la acción antiapoptótica de Bcl-xL/Bcl-2 (Prasad y cols, 2009). Se ha descrito también la inactivación de la caspasa-9 mediada por Akt, hecho que limita la implicación apoptótica de la citada caspasa (Jeong y cols, 2008). Por otro lado, es conocida la influencia de Akt sobre p53 dado que la fosforilación de MDM2 mediada por Akt posibilita su entrada al núcleo y la salida, ya ubiquitinizado, de p53 para su posterior degradación (Liao y Hung, 2010). La molécula PACS-2, mencionada en el apartado dedicado a la vía apoptótica extrínseca y relacionada con el transporte de Bid a la mitocondria, es fosforilada por Akt, inhibiendo así sus potenciales acciones pro-apoptóticas (Aslan y cols, 2009).

La vía PI3K/Akt se ha revelado fundamental no sólo a la hora de impedir la activación de moléculas y vías de señalización pro-apoptóticas sino también a la hora de incrementar la expresión y actividad de moléculas pro-supervivencia como por ejemplo XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*) (Lu y cols, 2011; Bing y cols, 2015) o CREB (*cAMP Response Element Binding Protein*) (Caravatta y cols, 2008; Zhang y cols, 2013).

Por todo ello, sumado al hecho por el cual la inactivación de la vía PI3K/Akt puede provocar muerte apoptótica tanto dependiente como independiente de caspasas (Alvero y cols, 2009; Park y cols, 2009), el análisis de los mecanismos que regulan el estado de activación de la vía PI3K/Akt/mTOR constituye una aproximación adecuada a la hora de estudiar las moléculas y vías participes de una determinada cascada de señalización apoptótica.

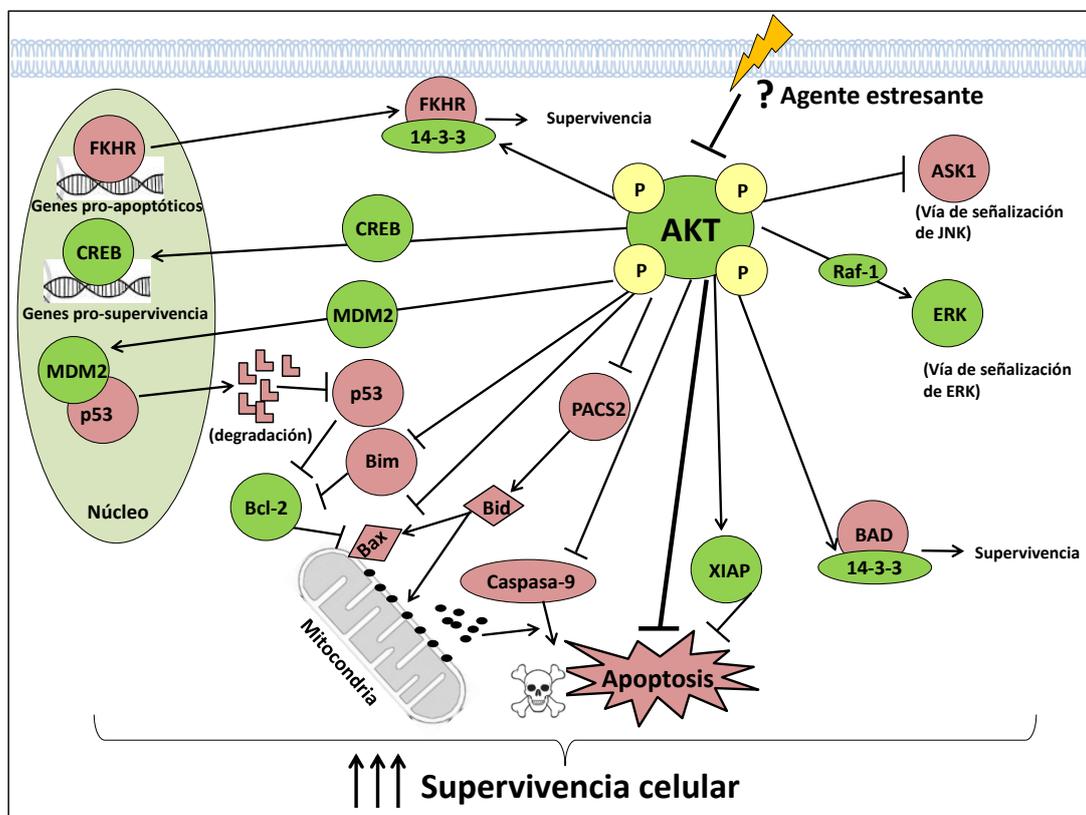


Figura 14. Principales mecanismos pro-supervivencia mediados por la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR. Mediante diversos mecanismos, Akt incrementa la presencia y/o acción de una amplia batería de moléculas y vías anti-apoptóticas como MDM2, XIAP, ERK o CREB a la par que limita las actividades pro-apoptóticas de moléculas como p53, Bad, Bim o Bid, entre otras. El sumatorio de las distintas intervenciones Akt dependientes a nivel de la señalización intracelular, constituyen una barrera pro-supervivencia celular a superar por cualquier agente causante de estrés o daño celular.

En conclusión, el grado de activación de Akt es fundamental y media gran parte de las respuestas celulares dependientes de PI3K como crecimiento, metabolismo, supervivencia y homeostasis de la glucosa (Manning y Cantley, 2007). Se considera por tanto, el eje PI3K-Akt como la vía canónica de la

señalización mediada por PI3K, cuya importancia para la supervivencia celular ante situaciones de estrés ha sido estudiada en diversos tipos celulares, inclusive en las células oligodendrogliales (Molina-Holgado, 2002; Cui y cols, 2006; Wang y cols, 2011).

8.2. Mecanismo de activación de AKT

Akt contiene un dominio PH (plecstrina) gracias al cual, tras la producción de PIP3, se ancla a la membrana plasmática (Engelman y cols, 2006) donde será activada mediante un proceso de fosforilación dual. En primer término, la proteína quinasa 1 dependiente de fosfoinosítidos (PDK1) fosforila a Akt en la Thr308 como requisito previo para la activación completa de Akt (Alessi y cols, 1997; Yip y cols, 2015). Sin embargo a través de un mecanismo descubierto a posteriori, otras quinasas o complejos quinasa como DNA-PK o mTOR-2 (*Mammalian target of Rapamycin*) fosforilan a Akt en el residuo Ser 473 otorgándole su máximo nivel de activación (Sarbasov y cols, 2004; Bozulich y Hemmings, 2009; Chen y cols, 2010). Antagónicamente existen una serie de fosfatasa como PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*), PP2A (*Protein phosphatase 2*) o PHLPP (Pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase), que mantienen la vía PI3K/Akt dentro del rango fisiológico de activación adecuado (Liao y Hung, 2010).

8.2.1. PTEN como principal regulador negativo de la vía PI3K/AKT/mTOR

PTEN (Phosphatase and tensin homolog) ha sido establecido como uno de los genes supresores tumorales cuya mutación ocurre con gran frecuencia en multitud de contextos cancerígenos. Este gen es responsable de una proteína del mismo nombre, la fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa (PTEN) cuya principal actividad dentro de la vía PI3K/Akt/mTOR radica en la conversión del fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PI(3,4,5)P3) de membrana en PI(4,5)P2, antagonizando así el papel de la fosfoinosítido-3-quinasa (PI3K) (Milella y cols, 2015; Jerde y cols, 2015; Xi y Chen, 2015). De esta forma, PTEN inactiva una serie de proteínas quinasa curso abajo en la vía, como Akt y la isozima 1 piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK1). A través de la regulación negativa que ejerce sobre dicha vía de señalización, PTEN interviene en las múltiples funciones y respuestas celulares dependientes de la vía PI3K/Akt/mTOR como son proliferación, crecimiento y apoptosis celular (Milella y cols, 2015; Jerde y cols, 2015).

La estructura de PTEN comprende varias regiones principales: un dominio fosfatasa N-terminal, un dominio central (C2) y una cola C-terminal. El dominio fosfatasa y el C2 constituyen la entidad enzimática necesaria y suficiente para el procesamiento de (PI(3,4,5)P3). En cuanto a la cola C-terminal,

se trata de un fragmento flexible que interviene principalmente en los mecanismos de regulación de PTEN (Wang y Jiang, 2008).

Los mecanismos de regulación de PTEN constituyen un amplio y complejo campo de estudio pues abarcan modificaciones post-transcripcionales, interacciones proteína-proteína e interacciones proteína-lípido. Dentro de las modificaciones post-transcripcionales, se incluyen: fosforilación (Al-Kouri y cols, 2005; Cordier y cols, 2012), acetilación (Okumura y cols, 2006), ubiquitinización (Wang y cols, 2007) y sumoilación (Huang y cols, 2012).

Centrándonos en el papel de las fosforilaciones, es preciso mencionar que, la cola C-terminal posee al menos seis puntos de fosforilación: Thr-366, Ser370, Ser-380, Thr-382, Thr-383 y Thr-385, implicados en la modulación de la distribución subcelular de PTEN, en su estabilidad y como consecuencia en la función de PTEN (Worby y Dixon, 2014; Chia y cols, 2015). En líneas generales, como se puede ver en la Figura 15, estados defosforilados de la cola C-terminal redundan en la aparición de una conformación “abierta”, promueven el reclutamiento de la fosfatasa a la membrana plasmática y por ende su activación (Rahdar y cols, 2009). Son varias las quinasas que pueden mediar dichas fosforilaciones: la Casein Quinasa 2 (CK2) fosforila a PTEN principalmente en las Ser370 y Ser 385 (Torres y Pulido 2001) si bien, multitud de estudios consideran la fosforilación del clúster Ser380/Thr382/383 como un evento CK2 dependiente (Berggren y cols, 2009; Patsoukis y cols, 2013). A este respecto, se ha propuesto que las fosforilaciones Ser370 y 385 pueden constituir un evento ligado y potenciador de la fosforilación del citado clúster (Odriozola y cols, 2007). En cualquier caso, la importancia de dicho clúster radica en que su fosforilación ha sido relacionada ampliamente con estados inactivos de PTEN y en consecuencia de activación de la vía PI3K/Akt/mTOR y por tanto con la supervivencia celular (Chia y cols, 2015; Yang y cols, 2015). Por otro lado, la GSK3B (glucógeno sintasa quinasa-3b) fosforila los residuos Ser362 y Thr366 (Al Kouri y cols, 2005; Maccario, 2007). Además, la molécula GLTSCR2/ PICT-1 (*Glioma tumour supresor critical región 2/ protein interacting with the carboxil terminus-1*) interacciona con PTEN y potencia su fosforilación en la Ser380 si bien los efectos sobre la actividad de PTEN son contrarios a los mediados por CK2, es decir, tiende a incrementar la actividad fosfatasa de PTEN (Okara y cols, 2006; Yim y cols, 2007). Otro de los dominios presentes en la estructura de PTEN, el C2, es susceptible de ser fosforilado por ROCK (*RhoA-associated kinase*) en la Ser229, Thr 232, Thr319 y Thr 321 (Li y cols, 2005; Li y cols, 2014;). También RAK (Quinasa asociada a Fyn), puede fosforilar a PTEN en dicha región, concretamente a nivel de la Tyr 336 (Yim y cols, 2009).

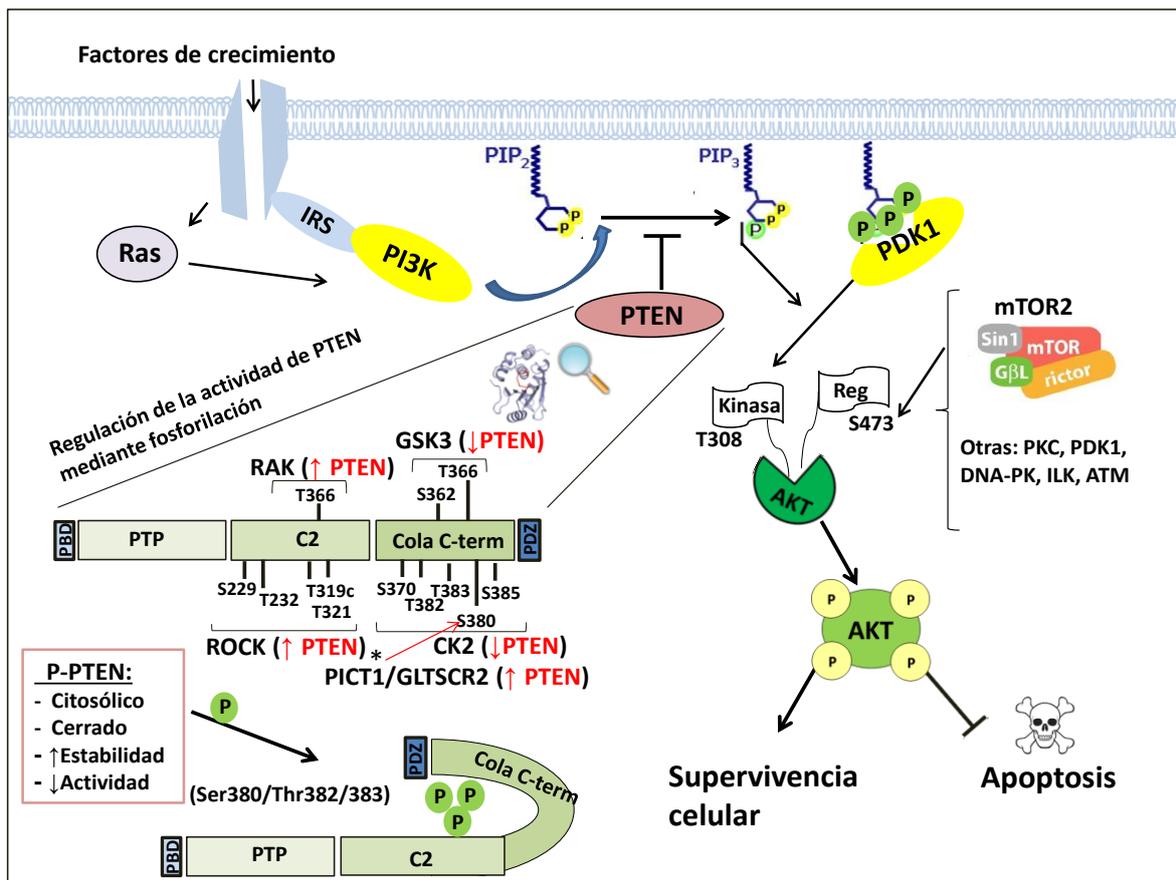


Figura 15. Mecanismo de activación de AKT mediado por la acción de PI3K y detalle de la modulación (mediante fosforilaciones) del principal regulador negativo de la vía, PTEN. La fosforilación de PI-4,5-P₂ mediada por PI3K y la consecuente producción de PI-3,4,5-P₃ supone la base para la activación mediante fosforilación (llevadas a cabo principalmente por PDK-1 y mTOR2) de AKT. Además, una batería de fosfatasa, cuyo principal representante es PTEN, regulan negativamente la vía PI3K/AKT/mTOR con el objetivo de mantenerla dentro de los niveles fisiológicos de activación. La actividad de PTEN a su vez es regulada, entre otras, mediante fosforilaciones llevadas a cabo por diversas quinasas (ROCK, RAK, CK2, GSK3, PICT1/GLTSCR2). Como resultado de las distintas fosforilaciones, tanto la estabilidad como la localización celular y la actividad de PTEN se ven modificadas, alterando en su conjunto el grado de activación de la vía PI3K/AKT/mTOR y por consiguiente su acción opositora ante un potencial agente citotóxico.

La regulación negativa de la vía PI3K/Akt es fundamental puesto que, tras la vía de señalización mediada por p53, la vía PI3K/Akt/mTOR constituye una de los sistemas de señalización cuya alteración está ampliamente asociada al desarrollo de tumores (Fruman y cols, 2014; Martini y cols, 2014). Por ello, alteraciones a la baja en la actividad de las principales fosfatasa, como PTEN o PP2A, encargadas de controlar el grado de activación de la vía, suponen la causa subyacente a multitud de contextos cancerígenos caracterizados por una activación de la vía PI3K/Akt/mTOR anormalmente elevada (Chalhoub y Baker, 2009; Eichorn y cols, 2009), mientras que la potenciación de la actividad de PTEN constituye el mecanismo responsable de un menor grado de activación de Akt y de una mayor vulnerabilidad celular frente a agentes citotóxicos (Gary y Mattson, 2002; Delgado-Esteban y cols, 2007; Li y cols, 2009).

9. Papel de las PKC's en los mecanismos que gobiernan el destino celular.

La familia de las protein quinasas C (PKC's), es una familia de serina/treonina quinasas que desempeñan su actividad en multitud de tipos celulares. La familia de las PKCs ha sido implicada en variadas respuestas celulares como permeabilidad celular, proliferación, progreso del ciclo celular, tumorigénesis y apoptosis, entre otros (Griner y Kazanietz, 2007; Steinberg, 2008; Poli y cols, 2014). En gran parte de las ocasiones, su función es específica del tejido o tipo celular y depende en gran medida de la interacción entre las distintas isoformas de las PKCs con otras vías de señalización celular.

En base a sus características estructurales y de activación, se ha establecido una clasificación que considera la existencia de 10 isoformas clasificadas en tres subfamilias: PKC's convencionales o clásicas (cPKCs; α , β I, β II, γ), PKCs nuevas (nPKCs: δ , ϵ , η , and θ) y PKCs atípicas (aPKCs: ζ , ι , λ). La activación de las cPKCs requiere diacilglicerol (DAG) como activador principal y fosfatidilserina y Ca^{+2} como cofactores. A este nivel, se establecen diferencias entre las distintas PKCs, pues las nPKCs requieren para su activación DAG y fosfatidilserina pero no Ca^{+2} , mientras que las aPKCs se activan en respuesta a fosfatidilserina pero no por DAG o Ca^{+2} (Fan y cols, 2014; Kang, 2014).

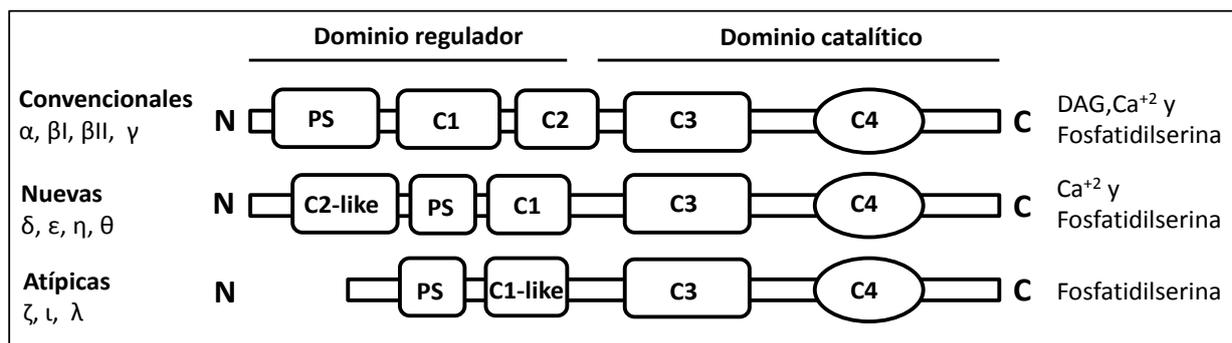


Figura 16. Clasificación de las distintas isoformas de PKCs. La variada composición de los dominios regulador y catalítico de las PKCs genera una serie de patrones estructurales y de activación que da lugar a la clasificación de las distintas isoformas en tres grupos: Protein Quinasas C convencionales (cPKCs), Protein Quinasas C nuevas (nPKCs) y Protein Quinasas C atípicas (aPKCs). PS (Pseudo-sustrato), C1 (sitio de unión a DAG y esteres de forbol), C2 (sitio de unión a fosfatidil serina y Ca^{+2}), C3 (sitio de unión a ATP), C4 (sitio de unión a sustrato). El sitio "C2-like" no puede interactuar con el Ca^{+2} , de igual manera que el "C1-like" no puede hacerlo con DAG o esteres de forbol.

En relación a los mecanismos apoptóticos (uno de los múltiples procesos en los que participan), se ha empleado el PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) como activador de las isoformas clásicas y nuevas para dilucidar el papel que juegan las PKCs, así como una serie de inhibidores farmacológicos específicos que han permitido demostrar su influencia tanto en procesos apoptóticos intrínsecos como extrínsecos (Harper y cols, 2003; Liang y cols, 2014). En líneas generales, se considera que las isoformas α y β tienen carácter anti-apoptótico, mientras que para las isoformas δ y θ prevalece su rol pro-apoptótico (Reyland, 2007). Sin embargo, esta visión entre es demasiado simple para abarcar las

acciones que, al igual que para la mayoría de moléculas, dependen en gran medida del tipo de estímulo y del contexto de señalización intracelular generado y según el cual las isoformas α y β median tanto acciones pro-supervivencia como acciones pro-apoptóticas (Reyland, 2009). Además, como veremos en el siguiente subapartado, las intervenciones de la isoforma δ en el mecanismo apoptótico suponen otro claro ejemplo de la complejidad intrínseca de la señalización PKC dependiente.

9.1. Implicación de PKC δ en la supervivencia y muerte celular

9.1.1. Intervenciones de PKC δ a favor de los procesos de muerte celular

La isoforma delta, de expresión ubicua, ha sido implicada en la regulación de la proliferación y supervivencia celular: en el caso concreto de la PKC- δ , se ha asociado de forma general su sobreexpresión con contextos apoptóticos o de inhibición de la proliferación celular mientras que, por otra parte, se ha descrito su ausencia asociada a procesos de transformación celular (D'Costa y cols, 2006; Hernández-Maqueda, 2013).

Dada su pertenencia al grupo de las n-PKCs se requiere para su activación la presencia de DAG o fosfatidilserina, si bien ciertas fosforilaciones y/o su rotura proteolítica le confieren su máximo grado de funcionalidad. Existen varias quinasas, curso arriba de PKC- δ , implicadas en la fosforilación de ciertos residuos tirosina que regulan las funciones específicas (pro/anti-apoptóticas) de PKC- δ en respuesta a un estímulo concreto. A este respecto, las tirosín quinasas de la familia Src (Src, Fyn, Lyn y Lck) y c-Abl son las principales moléculas responsables de dichas fosforilaciones (Rybin y cols, 2004; Wie y cols, 2014). En función del tipo de estímulo así como del residuo tirosina fosforilado se puede producir o no la activación de la PKC- δ . De forma complementaria, la propia PKC- δ puede ser procesada y activada por la caspasa 3 (efectora) (Carvour y cols, 2008), si bien este puede constituir un fenómeno fundamental para el proceso apoptótico (D'Costa y Denning, 2005; Sun y cols, 2008) o colateral (Persaud y cols, 2005) dependiendo del tipo celular. Una de las principales consecuencias de dicho procesamiento mediado por la caspasa 3, es la aparición del fragmento catalítico (PKC δ -CF), que a su vez puede ser responsable de la fosforilación e inhibición de la proteína antiapoptótica Mcl-1 (Sitailo y cols, 2006; Basu y Pal, 2010).

Además, otras rutas y niveles de señalización con relevancia en los procesos apoptóticos están también bajo la influencia de PKC- δ , pudiendo contribuir al avance del proceso apoptótico en cuestión. A este respecto, se han encontrado interacciones de PKC- δ con la familia de las MAPK, viéndose afectadas por su activación, ERK (Choi y cols, 2006; Lomonaco, 2008; Fan y cols, 2014), p38 (Gerald y cols, 2009) y JNK (Gomel y cols, 2007). También se ha descrito la influencia negativa de PKC δ sobre la vía de supervivencia PI3K/AKT bajo determinados contextos celulares (Li y cols, 2006; Kim y cols, 2008). Por otro lado, el factor de transcripción p53 ha sido propuesto como una de las dianas de acción de

PKC- δ bajo determinadas condiciones apoptóticas (Lee y cols, 2006; Lin y cols, 2009). Se ha observado la convergencia de PKC- δ con c-Abl (quinasa implicada en la ejecución del programa apoptótico) (Barilá y cols, 2003) a varios niveles, promoviendo en todos los casos la cascada de señalización apoptótica (Lasfer y cols, 2006; Qi y cols, 2008; Wie y cols, 2014). En base a las anteriores evidencias que asientan su amplia acción pro-apoptótica, se ha descrito de forma global la activación de PKC- δ mediada por diversos estímulos citotóxicos, siendo su acción vital para el progreso de mecanismos apoptóticos generados por exposición a radiación UV (D'Costa y Denning, 2005), genotoxinas (Yoshida y cols, 2006), estrés oxidativo (Carvour y cols, 2008) o estrés de RE (Larroque- Cardoso, 2013) (ver fig.17).

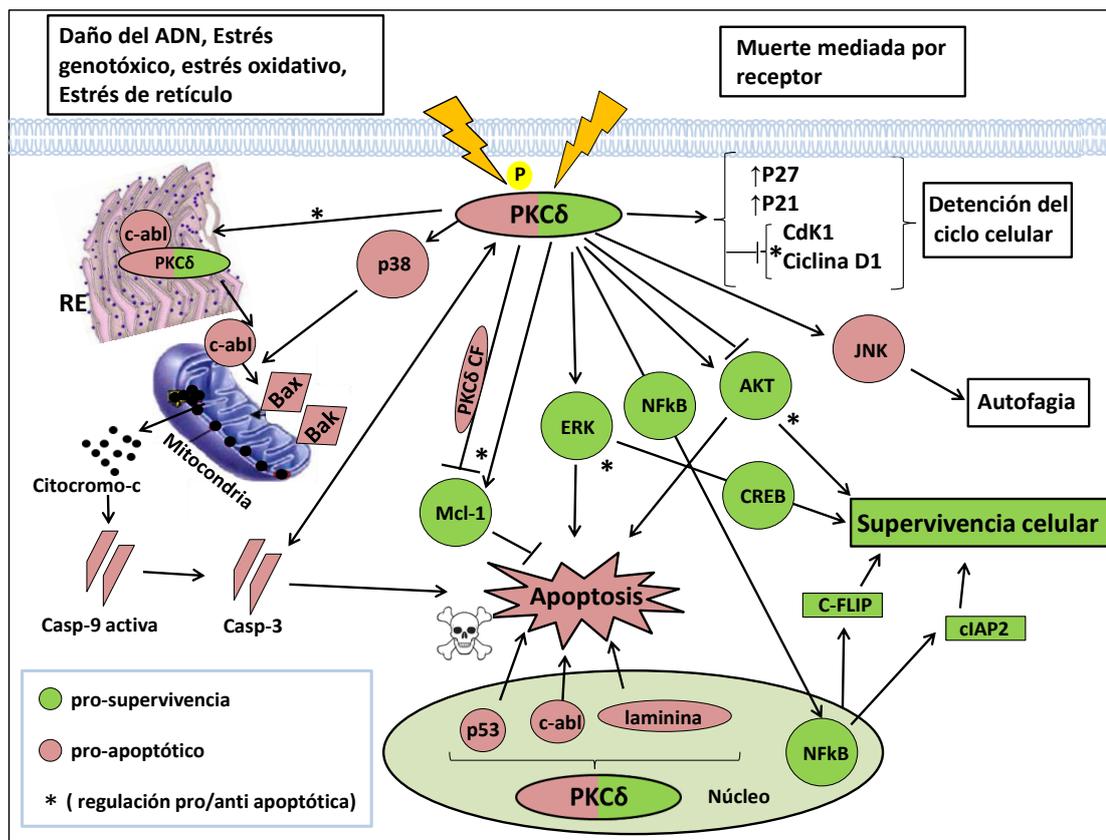


Figura 17. Dualidad de acción de PKC- δ en la señalización que rige el destino celular. La activación de PKC- δ , está íntimamente ligada a su fosforilación y/o procesamiento proteolítico. Una vez activa, interacciones entre c-Abl o p53 con PKC- δ , suponen la base de ciertos mecanismos apoptóticos. El fragmento catalítico (PKC- δ CF) puede mediar la fosforilación causante de la degradación de Mcl-1 (molécula Bcl-2 anti-apoptótica). PKC- δ , puede ocasionar también la detención del ciclo celular, regulando los niveles de moléculas como ciclinas o cdk's. La activación de PKC- δ , puede canalizarse a su vez, a través de la vía JNK conduciendo a la aparición de procesos autofágicos. Como parte del estrés celular ocasionado por la acción de determinados agentes citotóxicos, PKC- δ puede mediar la inhibición de la vía PI3K/AKT y por ende contribuir a la reducción de la viabilidad celular. Sin embargo, PKC- δ puede desempeñar, en función del tipo celular y de las características del estímulo, acciones antagónicas sobre varias de las moléculas citadas y cuyo resultado final es la supervivencia celular. En este sentido, PKC- δ participa en la estabilización de Mcl-1 así como en la activación como vías pro-supervivencia de AKT o ERK, además de incrementar la activación del factor de transcripción NF κ B. Precisamente a través de la activación de NF κ B, media la expresión de moléculas de marcado carácter anti-apoptótico como c-FLIP o cIAP2.

9.1.2. Participación de PKC δ en el mantenimiento de la supervivencia celular

A pesar de sus múltiples atribuciones como quinasa pro-apoptótica, otra serie de estudios han revelado como, bajo determinados contextos, PKC- δ puede formar parte de la respuesta a favor de la supervivencia celular. En este sentido, es capaz de promover efectos antagónicos a los expuestos anteriormente sobre moléculas como AKT (Xia y cols, 2007) o Mcl-1 (Baudot y cols, 2009). Además, la contribución diferencial que según el contexto celular generado pueden ofrecer ciertas moléculas en las decisiones de supervivencia o muerte celular hacen que, especialmente en el caso de ERK, su activación mediada por PKC- δ pueda oponerse al proceso apoptótico de forma contraria a lo expuesto con anterioridad (Muscella y cols, 2009; Mauro y cols, 2010). Por último mencionar que, también se tiene constancia acerca de cómo la activación del factor de transcripción NF κ B puede estar mediada por PKC- δ y a su vez condicionar la expresión de moléculas antiapoptóticas dependientes de la acción de NF κ B como c-FLIP o c-IAP 2 (inducing inhibitor of apoptosis protein-2) (Wang y cols, 2003; Wang y cols, 2006) (ver fig.17).

En conclusión, cuando hablamos de PKC- δ nos referimos a una quinasa con una alta versatilidad a la hora de modular distintas moléculas y vías de señalización implicadas en la toma de decisiones que rigen el destino celular. Por ello, su estado y su localización, la presencia de ciertas moléculas moduladoras de su actividad, así como el potencial encaje que tengan las vías de señalización a las que modula dentro de un determinado contexto y tipo celular guiarán el sentido de sus acciones a favor de la supervivencia o de la muerte celular.

Objetivos

El fenómeno de excitotoxicidad afecta, entre otros tipos celulares, a los oligodendrocitos. La activación prolongada de los receptores AMPA causa muerte oligodendroglial bajo estas condiciones. En líneas generales, el evento excitotóxico modifica gravemente la homeostasis basal de la célula, en un proceso caracterizado por la alteración de la señalización del Ca^{+2} , estrés de RE y por la disrupción de la función y estructura mitocondriales. Precisamente el colapso mitocondrial supone un evento central dentro de la cascada apoptótica emergente. El programa apoptótico activado bajo estas condiciones, implica la participación de una compleja red de señalización intracelular en la que, hasta el momento, se ha incluido a moléculas de la familia de proteínas Bcl-2 como Bax. Nos planteamos los objetivos expuestos a continuación, considerando el potencial de la excitotoxicidad como uno de los fenómenos subyacentes a la muerte neuronal u oligodendroglial que caracteriza a variadas patologías neurológicas y teniendo en cuenta que la exquisita regulación de los mecanismos apoptóticos requiere la participación sinérgica de vías y moléculas todavía no analizadas.

Objetivos

1. Determinar la participación de la vía apoptótica extrínseca y la contribución de moléculas de la familia Bcl-2 como parte del mecanismo general de muerte desencadenado por la activación de los receptores AMPA en oligodendrocitos.
2. Determinar la contribución del factor de transcripción p53 a la muerte oligodendroglial excitotóxica, atendiendo tanto a su vertiente de acción transcripcional como mitocondrial.
3. Analizar el papel de las MAPKs activadas por estrés (JNK y p38) en la cascada de la señalización apoptótica mediada por la activación de los receptores AMPA, en oligodendrocitos.
4. Examinar el papel de la Caseína Quinasa II (CK2) durante el programa apoptótico ejecutado a consecuencia del fenómeno excitotóxico, en oligodendrocitos.
5. Evaluar el estado de activación y la participación de vías pro-supervivencia tales como PI3K/AKT o ERK/CREB en los contextos de excitotoxicidad glutamatérgica, en oligodendrocitos.

Materiales y Métodos

1. Experimentación con animales

Los experimentos realizados contaron con la supervisión y aprobación previa del Comité de Ética en la Investigación y la Docencia (CEID) de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU). Los animales se trataron de acuerdo a las Directivas Nacionales y de la Unión Europea vigentes (RD 53/2013, de 1 de febrero y Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010), y siempre se realizó el máximo esfuerzo para minimizar el sufrimiento animal y el número de animales utilizados.

2. Obtención de poblaciones de oligodendrocitos procedentes de células precursoras (OPCs)

Los cultivos de OPCs se obtuvieron a partir de crías de rata Sprague-Dawley de 0 a 2 días post-natales (P0-P2) siguiendo el protocolo descrito por McCarthy y de Vellis (1980) con pequeñas modificaciones (Chen y cols., 2007), trabajos que asentaron las bases para la realización de cultivos primarios gliales mixtos de corteza de rata o ratón neonatos.

Los animales fueron decapitados y los cerebros se extrajeron y colocaron en placas Petri de 35 mm de diámetro en las que previamente se habían añadido 2 ml de medio HBSSi sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} , a 37°C. Se diseccionaron las cortezas cerebrales mediante una incisión en la zona de contacto de la corteza con la parte ventral del diencéfalo y, una vez aisladas, se retiraron cuidadosamente las meninges y los vasos que las recubren para evitar la contaminación de células sanguíneas, meningeales y fibroblastos. A continuación, se realizó la digestión enzimática del tejido. Para ello, las cortezas limpias se pasaron a un tubo cónico de 10 ml que contenía 4ml de una solución equilibrada de HBSSi sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} suplementado con 0,004% de DNAsa-I y 0,125% de tripsina y se incubaron durante 20 min a 37°C. Al concluir el período de digestión enzimática, se detuvo la reacción añadiendo un volumen equivalente (4 ml) de IMDM + 10% Suero Fetal Bovino (FBS) Hyclone, y se realizó una centrifugación (250g, 5 min) tras la cual, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de IMDM + 10% FBS Hyclone. El homogeneizado resultante fue sometido a un proceso de digestión mecánica mediante el paso sucesivo por agujas de diámetro decreciente (27G, 25G, 23G).

Una vez obtenida una suspensión celular homogénea se procedió a una nueva centrifugación (250g, 5 min) y el pellet se resuspendió en el volumen apropiado de medio de cultivo, IMDM + 10% FBS Hyclone. Las células se sembraron en frascos de cultivo de 75 cm² (previamente tratados con poli-D-lysina; 10 µg/ml, 1h a temperatura ambiente), guardando la proporción correspondiente al tejido cortical de un animal/frasco, y se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂ en un incubador humidificado. Al día siguiente se realizó un cambio de medio destinado a eliminar los restos celulares derivados del proceso

de disociación y fomentar así la viabilidad de las células, ya adheridas a la superficie del frasco de cultivo. A partir de este momento, el medio de cultivo se fue renovando cada 3-4 días hasta que los astrocitos formaron una completa monocapa y los OPCs se establecieron en colonias sobre ella (11-12 días tras el inicio del cultivo). Este proceso de renovación constante del medio de cultivo conllevó, a su vez, la retirada parcial de las células microgliales que forman parte de este tipo de preparaciones.

El aislamiento y siembra de los OPCs se inició mediante una corta agitación de los frascos en un agitador orbital (400 rpm, durante 1 h a 37°C) para eliminar la microglia ligeramente adherida a la monocapa de astrocitos. Los frascos se dejaron en reposo entre 3-4 h a 37°C y 5% de CO₂, con IMDM + FBS Hyclone fresco, se cerraron completamente para impedir el intercambio de gases y se sometieron a un segundo ciclo de agitación durante toda la noche (400 rpm, 37°C). Al día siguiente, una vez desprendidas las células de la monocapa de astrocitos, se recogió el sobrenadante y se filtró a través de una membrana de nylon de 20 µm de tamaño de poro con el fin de discriminar entre la población de OPCs (células pequeñas) y otras de mayor tamaño. La suspensión celular así obtenida se depositó en placas Petri durante 2 h a 37°C y 5% de CO₂, permitiendo la adhesión casi específica de las células microgliales y, por tanto, el enriquecimiento de la población celular en suspensión, constituida en su gran mayoría por OPCs.

La suspensión celular se centrifugó (250g, 5 min), el sobrenadante se descartó y el pellet fue resuspendido en un medio químicamente definido específico para células de estirpe oligodendroglial, denominado medio Sato (descrito originalmente por Sato y colaboradores, de quien tomó su nombre). Este medio consiste en DMEM (con 4,5 g/l de glucosa y 0,11 g/l de piruvato sódico) suplementado con distintos factores que favorecen la supervivencia y proliferación/maduración de los oligodendrocitos (ver Tabla 1).

Compuesto	Concentración
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco)	Medio base
Glutamina	2 mM
BSA fracción V	1 mg/ml
Insulina	5 µg/ml
Penicilina + Streptomina	100 U/ml
N-Acetil-Cisteína	6,3 mg/ml
Transferrina	100 µg/ml
Selenito sódico	4 ng/ml
Progesterona	60 ng/ml
Putrescina	16 µg/ml
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-AA)	5 ng/ml
Factor de crecimiento de fibroblastos (b-FGF)	5 ng/ml

Tabla 1. Composición del medio de cultivo Sato "de proliferación" para células de estirpe oligodendroglial.

Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos de vidrio de 12-14 mm de diámetro, previamente colocados en placas de 24 pocillos y tratados con poli-D-lysina (10 µg/ml, 1 h), a diferentes densidades en función del experimento a realizar, entre 3.000 y 20.000 células por pocillo. Se mantuvieron en estufa durante 2 días, a 37°C y 5% de CO₂, en el medio de cultivo Sato suplementado con los factores mitogénicos PDGF-AA y b-FGF, para expandir el número de células y prevenir su diferenciación.

Tras este período, se realizó un cambio de medio con objeto de iniciar el proceso de maduración celular. Para ello, se retiraron los factores mitogénicos PDGF-AA y b-FGF y se incorporaron las hormonas tiroideas T3 y T4 y los factores neurotróficos CNTF y NT-3, promotores del proceso de diferenciación oligodendroglial (ver tabla 1.2). Las células se mantuvieron en el medio de diferenciación durante 2 días más antes de la realización de los diferentes experimentos.

Compuesto	Concentración
Triiodotironina (T3)	30 ng/ml
L-Tiroxina (T4)	40 ng/ml
Factor neurotrófico ciliar (CNTF)	10 ng/ml
Neurotrofina 3 (NT-3)	1 ng/ml

Tabla 1.2. Componentes adicionales del medio de cultivo Sato que favorecen la maduración de los oligodendrocitos (medio Sato)

Los cultivos obtenidos siguiendo este protocolo constituyen una población de trabajo altamente enriquecida en células de estirpe oligodendroglial. Esta afirmación se ha podido corroborar mediante el análisis de la composición celular de varios cultivos de OPCs así obtenidos. Así, tras 2 días *in vitro* (DIV) en medio Sato de proliferación, y mediante análisis inmunocitoquímicos con marcadores específicos de tipo celular, determinamos que al menos el $95\pm 0.2\%$ de las células eran Olig2⁺ y el $92,5\pm 0.5\%$ eran PDGF-R⁺ (marcadores específicos de estirpe oligodendroglial), siendo el resto de las células astrocitos GFAP⁺ o microglía Iba-1⁺.

3. Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa

La reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR), o PCR cuantitativa, es una técnica que permite la cuantificación de la cantidad inicial de ARN mensajero (ARNm) de una muestra mediante la utilización de *primers* específicos de secuencia.

En nuestro paradigma experimental, una vez aislados los OPCs se sembraron a una densidad tal que permitió obtener, tras 2 DIV en medio de cultivo Sato de proliferación, al menos 1 millón de células por condición experimental. Después de otros 2 DIV en el medio de cultivo de maduración se llevó a cabo la estimulación de los receptores AMPA (CTZ 100 μ M, 5 min; AMPA 10 μ M, 30 min), y se inició el proceso de extracción del ARN total siguiendo el protocolo indicado en el kit de extracción Absolutely RNA Miniprep (Agilent, Catalog 400800). La cantidad final de ARN obtenida se midió en un Nanodrop 2000C Spectrophotometer (Thermo Scientific). Se usó 1 μ g de ARN para realizar la retrotranscripción a ADN mediante la enzima retrotranscriptasa SuperScriptTMIII (Invitrogen) valiéndonos para ello del termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems). El ADNc resultante se empleó para cuantificar, mediante RT-PCR, los niveles relativos de ARNm de los genes de interés sometidos a estudio. Para la cuantificación se utilizó una C1000 Touch Thermal Cycler (BioRad) y el colorante fluorescente SYBRGreen (Invitrogen) como reportero, que se une de forma cuantitativa al amplicón (a mayor producto, mayor fluorescencia emitida). El fluoróforo SYBRGreen se une inespecíficamente al ADN de doble cadena y produce fluorescencia pero estos fluorocromos no son específicos ya que se unen a cualquier molécula de ADN de doble cadena, incluyendo los dímeros de *primer*. Este hecho ha implicado un diseño muy cuidadoso de los *primers* (tabla 2) con el fin de evitar la formación de dímeros y la amplificación de DNA genómico contaminante en la muestra de ADNc. Los *primers* utilizados se diseñaron con el programa Primer Express 2.0 (Applied Biosystems). La cantidad de ADNc fue determinada mediante una curva estándar y los valores obtenidos para los distintos genes de interés normalizados con un Factor de Normalización 2 (FN2) basado en la media geométrica de genes constitutivos (controles endógenos) cuya expresión permanece constante. Los dos genes endógenos

fueron: GAPDH y HPRT. Estos FN2s se calcularon empleando el software y la metodología descrita por Vandesompele y cols (2002).

Gen	Primer sentido	Primer antisentido
CK2 α	TGGTGAATGGGGAAATCAAG	CCTGCCTAATTTTGAACAAGC
CK2 β	GGACCTGGAACCTGATGAAGAG	TTTCCAACATTTGTGCAATGC
P53	CTGGAAGACTCCAGTGGGAATC	CACAAACACGAACCTCAAAGCT
MDM2	AGGATGATGAGGTCTATCGGGTC	GAGGATTCATTTTATTGCACGA
PUMA	CAGTGCGCCTTCACTTTGG	GGGTTGAGAAGGCTTTACATG
Bid	GCCTCTCGGAGGAAGACAAAAG	CAACAGCATGGTCATTATCAGCA
PACS-2	CGTACAAGGGCAGGATCTTGAC	CTTACTATCGAGCGCCGCTG

Tabla 2. Primers empleados en la PCR cuantitativa a tiempo real.

4. Inmunocitoquímica

La base conceptual de esta técnica radica en la habilidad de los anticuerpos para unirse de forma específica a epítopos concretos de la proteína frente a la cual han sido diseñados. De este modo, se forma un complejo antígeno-anticuerpo cuya presencia es revelada de forma indirecta mediante el uso de anticuerpos secundarios acoplados a un fluorocromo que posibilita la visualización de todo el complejo.

Esta técnica ofrece la opción de realizar dobles marcajes con lo que es posible detectar dos antígenos distintos. Se emplearon en este caso, anticuerpos primarios obtenidos a partir de animales distintos. Esto implicó el uso de anticuerpos secundarios unidos a un fluorocromos distintos y que por tanto emiten fluorescencia a distinta longitud de onda. Mediante esta técnica se han determinado tanto la pureza como el estado de diferenciación del cultivo de oligodendrocitos obtenido a partir del cultivo glial mixto, así como la localización y expresión de ciertas moléculas implicadas en los procesos apoptóticos. En ocasiones se han combinado anticuerpos monoclonales hechos en ratón con anticuerpos policlonales hechos en conejo, siendo luego diferenciados mediante el uso de anticuerpos secundarios específicos, bien anti-ratón o anti-conejo unidos a diferentes fluorocromos.

4.1. Caracterización de los oligodendrocitos procedentes del cultivo glial mixto en función de su estadio de diferenciación

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para establecer el grado de diferenciación de las células de estirpe oligodendroglial obtenidas a partir del cultivo glial mixto. En función de su estado de diferenciación, las células de estirpe oligodendroglial expresan distintas proteínas que funcionan como marcadores, bien caracterizados, del grado de maduración de las mismas (Fig.18). En base a este hecho se analizaron algunos de los marcadores de las distintas etapas de maduración de estas células. En nuestro caso, nos centramos en analizar dicha expresión tras 1 o 2 DIV *en Sato de proliferación* y también tras 1 ó 2 DIV *en Sato de maduración*. Para ello, los OPCs fueron sembrados en cubres a una densidad de 3×10^3 células/pocillo en medio Sato de proliferación durante 1 o 2 DIV y/o mantenidos en sato de diferenciación durante 1 o 2 DIV adicionales.

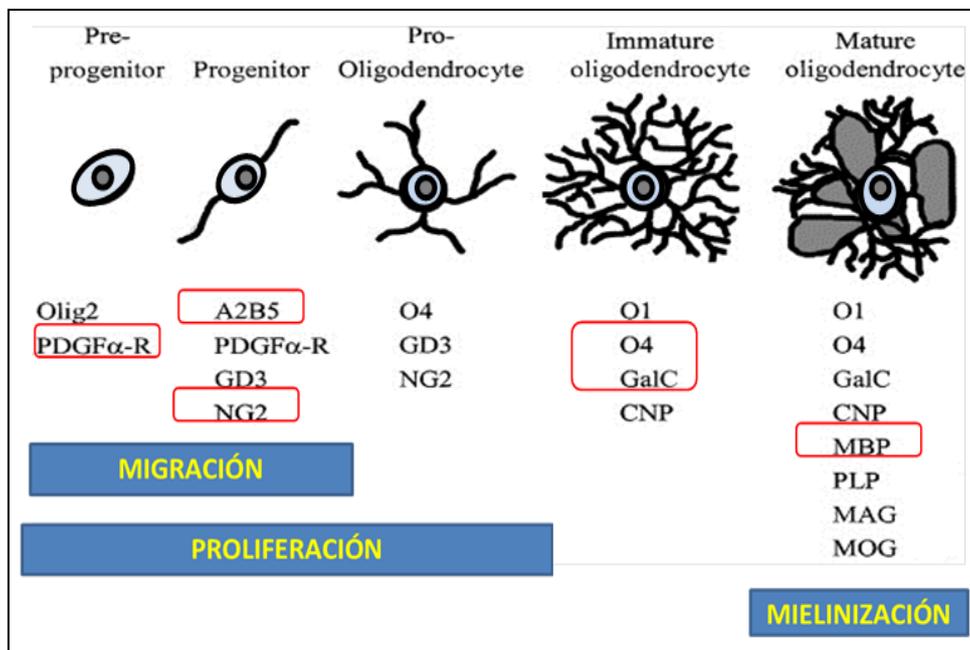


Figura 18. Principales marcadores del proceso de maduración de las células oligodendrogliales.

Para la detección de los antígenos A2B5, NG2, PDGFr, GalC y MBP, se fijaron las células en los respectivos tiempos de análisis post-siembra con paraformaldehído al 4% en PBS 1X durante 20 minutos, tras los cuales se realizaron tres lavados con tampón fosfato salino (PBS) 1X.

Tras la fijación, se procedió al inicio de la inmunocitoquímica propiamente dicha. Como paso inicial, se realizó la permeabilización de las células con Triton X-100 al 0,1% en PBS 1X durante 30 minutos y a temperatura ambiente. A continuación, se realizó el bloqueo empleando 5% de NGS o NSS (dependiendo del huésped en el que se hubiese desarrollado el anticuerpo primario) diluido en Triton X-100 al 0,1% en PBS 1X durante otros 30 minutos, a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, se

incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 3) diluido en la solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, tras realizar tres lavados con PBS 1X se añadieron los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con fluoresceína [Alexa Fluor[®] 488-anti-IgG (H+L) de conejo; Molecular Probes o FITC de ratón (Tabla 4), diluidos 1:200 en PBS 1X con un 5% de NGS, durante 2 h a temperatura ambiente. Tras los pertinentes lavados post-incubación, se montaron los cubres en portaobjetos empleando el líquido de montaje *Glicergel* (Dako).

La detección de los antígenos O₄ y A₂B₅, también específicos de oligodendrocitos, presenta la peculiaridad de verse afectada tanto por la fijación con paraformaldehído (PFA) como por el tratamiento con Triton X-100 empleado para la permeabilización de la membrana plasmática. Debido a esto, la incubación con los anticuerpos primarios frente a O₄ o A₂B₅ para oligodendrocitos se realiza *in vivo*.

Los oligodendrocitos fueron incubados con el anticuerpo anti-O₄ o anti- A₂B₅ (Tabla 3) durante 1 h, manteniéndose en estufa a 37 °C en una atmósfera humidificada, suplementada con 5% de CO₂. Tras el citado período de incubación, se realizan 3 lavados con PBS 1X de 10 min cada uno, para eliminar la presencia de anticuerpo no unido al antígeno. A continuación las células se fijaron con PFA al 4% en PBS durante 20 min, y se lavaron 3 veces en PBS cada 10 min. Posteriormente se añadió el anticuerpo secundario (Tabla 4) conjugado con un fluorocromo que emite en rojo [Anti-Mouse IgM, μ -Chain (Goat) TEXAS RED[®], Calbiochem], diluido 1:200 en el tampón de incubación (PBS + 5% de suero normal de cabra, NGS) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en ambos casos. Tras retirar el anticuerpo secundario, se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se montaron de la misma forma descrita anteriormente para el resto de marcadores de diferenciación.

4.2. Expresión de la molécula antiapoptótica c- FLIP en oligodendrocitos

Dada la escasa aparición de esta molécula en la bibliografía existente a nivel oligodendrogial se determinó, como paso previo a la determinación de su posible papel en nuestro modelo, su presencia en nuestras células. De este modo, se fijaron oligodendrocitos obtenidos del cultivo glial mixto tras 1, 2 o 3 DIV en medio sato de maduración. Se siguió el protocolo habitual de permeabilización y bloqueo, que implica permeabilizaron a temperatura ambiente durante 30 min en PBS + 0,1% Triton X-100 y mantenimiento durante 30 minutos adicionales en solución de bloqueo (PBS + 5% NGS). A continuación se incubaron las células toda la noche, con el anticuerpo primario frente a c- FLIP L/S (tabla 3) diluido 1:100 en la solución de bloqueo (PBS + 5% NGS). Para la detección del mismo, se añadió el anticuerpo secundario (diluido 1:200 en PBS 1X + 5% NGS) durante 2 horas, a temperatura ambiente. Tras retirar el anticuerpo secundario, se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se montaron los cubres en portaobjetos según el protocolo habitual.

4.3. Tinción PACS-2/Cox IV y PACS-2/Bid

Tras someter a los oligodendrocitos al estímulo habitual con AMPA (CTZ 100 μ M, 5 min; AMPA 10 μ M, 30 min), se fijaron las células. A continuación, se permeabilizaron a temperatura ambiente durante 30 min en PBS + 0,1% Triton X-100 y se mantuvieron durante 30 minutos adicionales en solución de bloqueo (PBS + 5% NGS)). Tras el bloqueo, distinguimos entre los pasos seguidos en ambas tinciones:

En el caso de la tinción PACS2/ CoxIV, se incubaron las células con los anticuerpos primarios anti-PACS-2 y anti COX-IV, diluidos 1:100 y 1:200 respectivamente en la solución de bloqueo (tabla 3). Al día siguiente, tras los 3 lavados con PBS 1X, se añadieron los anticuerpos secundarios correspondientes (diluidos 1:200 en PBS + 5% NGS), durante 2 h a temperatura ambiente. Tras retirar el anticuerpo secundario, se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se montaron los cubres en portaobjetos según el protocolo habitual.

En referencia a la tinción PACS-2/ Bid, se incubaron las células con el anticuerpo primario anti-PACS-2 diluido 1:100 en la solución de bloqueo (Tabla 3). Al día siguiente, tras 3 lavados con PBS 1X, se añadió el anticuerpo secundario correspondiente [Donkey anti Goat[®] 488-Invitrogen (diluido 1:200 en PBS + 5% NGS) durante 2 h, a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron las células con el anticuerpo primario anti-Bid total diluido 1:100 en la solución de bloqueo (PBS + 5% NGS). Al día siguiente, tras los correspondientes lavados con PBS 1X, se añadió el anticuerpo secundario correspondiente [Alexa Fluor[®] 594-anti-IgG (H+L) de conejo (diluido 1:200 en PBS + 5% NGS), durante 2 h a temperatura ambiente. Tras retirar el anticuerpo secundario, se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se montaron los cubres en portaobjetos según el protocolo habitual.

4.4. Detección de p-p53 (Ser15)/COX-IV

En este caso, tras realizar el estímulo excitotóxico (CTZ 100 μ M, 5 min; AMPA 10 μ M, 30 min), analizamos mediante inmunocitoquímica el posible cambio de localización y/o expresión del factor de transcripción p53, fosforilado en el residuo Ser15. Esta fosforilación ha sido relacionada con su paso a la mitocondria. Por ello, realizamos una inmunocitoquímica doble que permite valorar un posible incremento/tránsito de p53 a nivel mitocondrial. Tras retirar el estímulo excitotóxico, se fijaron las células siguiendo el procedimiento habitual, anteriormente descrito. A continuación, se permeabilizaron a temperatura ambiente durante 10 min en PBS + 0,1% Triton X-100 y se incubaron durante 1 h en solución de bloqueo (PBS + 5% NGS). Se mantuvieron durante toda la noche a 4 $^{\circ}$ C incubándose con los anticuerpos primarios anti-p-p53 (Ser 15) (diluido 1:100 en la solución de bloqueo) y anti-COX-IV (diluido 1:200 en la solución de bloqueo) (Tabla 3). Al día siguiente se realizaron los correspondientes lavados y se añadieron los anticuerpos secundarios frente a sendos anticuerpos primarios, (diluidos 1:200 en PBS + 5% NGS) durante 2 h. Tras retirar los anticuerpos secundarios, se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se montaron los cubres en portaobjetos según el protocolo habitual.

4.5. Tinción p53 total /Hoechst

Tras realizar el estímulo excitotóxico con AMPA, analizamos en este caso la posible colocalización de p53 a nivel nuclear como posible evento dentro del proceso apoptótico desencadenado por el fenómeno excitotóxico. En este caso, realizamos una inmunocitoquímica que implicó el uso del anticuerpo p53 total, (FL393) así como el marcador de la estructura nuclear denominado Hoechst 33258 (5µg/ml). Las células se fijaron siguiendo el procedimiento habitual, anteriormente descrito. A continuación, se permeabilizaron a temperatura ambiente durante 10 min en PBS + 0,1% Triton X-100 y se incubaron durante 30 min en solución de bloqueo (PBS + 5% NGS). Posteriormente, los oligodendrocitos se mantuvieron durante toda la noche a 4 °C incubados con el anticuerpo primario anti- p53 total (diluido 1:100 en la solución de bloqueo) (Tabla 3). Al día siguiente se realizaron los correspondientes lavados y se añadió el anticuerpo secundario (Tabla 4), durante 2 h a temperatura ambiente (diluido 1:200 en PBS + 5% NGS), tras lo cual se tiñeron los núcleos con Hoechst diluido en PBS durante 10 minutos. Tras retirar el Hoescht, se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se montaron los cubres en portaobjetos según el protocolo habitual.

4.6. Tinción p-PTEN (Ser380/Thr382/Thr 383)

Tras realizar el estímulo excitotóxico con AMPA, analizamos en este caso la posible modificación en el estado de fosforilación de PTEN a nivel del *cluster* Ser380/Thr382/383 como posible evento dentro del proceso excitotóxico oligodendroglial. En este caso, realizamos una inmunocitoquímica que implicó el uso del anticuerpo p-PTEN (Ser380/Thr382/383). Las células se fijaron siguiendo el procedimiento habitual, se permeabilizaron a temperatura ambiente durante 10 min en PBS + 0,1% Triton X-100 y se incubaron durante 30 min en solución de bloqueo (PBS + 5% NGS). Posteriormente, los oligodendrocitos se mantuvieron durante toda la noche a 4 °C incubados con los anticuerpos primarios anti-p-PTEN (Ser380/Thr382/383) (diluido 1:100 en la solución de bloqueo) (Tabla 3). Al día siguiente se realizaron los correspondientes lavados y se añadió el anticuerpo secundario (Tabla 4), durante 2 h a temperatura ambiente (diluido 1:200 en PBS + 5% NGS), tras lo cual se se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se montaron los cubres en portaobjetos según el protocolo habitual.

4.7. Tinción CK2α/KDEL

Esta tinción se diseñó para detectar la posible presencia de CK2 en el RE de los oligodendrocitos. Para ello se fijaron, según el protocolo habitual, oligodendrocitos cultivados durante 2 DIV en medio Sato de maduración. A continuación, las células se permeabilizaron durante 30 min en PBS + 0,1% Triton X-100 y se incubaron 30 min adicionales en solución de bloqueo (PBS + 5% NGS). Posteriormente, los oligodendrocitos se mantuvieron durante toda la noche a 4 °C en presencia de los anticuerpos

primarios anti-CK2 α y anti-KDEL (marcador de RE) diluidos 1:100 en la solución de bloqueo descrita. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se añadieron los anticuerpos secundarios correspondientes (Tabla 4), durante 2 h a temperatura ambiente (diluidos 1:200 en PBS + 5% NGS). Tras retirar los anticuerpos secundarios, se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se montaron los cubres en portaobjetos según el protocolo habitual.

Anticuerpo primario	Dilución	Huésped	Casa Comercial
O4	1:40	Ratón	Cedido por Dra. Christine Thompson, Universidad de Glasgow
PDGFα-R	1:100	Conejo	Sta. Cruz Technologies
NG2	1:500	Conejo	Millipore
Gal-C	1:50	Ratón	Millipore
A2B5	1:100	Ratón	Chemicon Internacional
MBP	1:250	Ratón	Covance
Phospho p53 (Ser 15)	1:100	Conejo	Cell Signaling
p53 (FL393)	1:100	Conejo	Sta. Cruz Technologies
FLIP S/L	1:100	Conejo	Sta. Cruz Technologies
KDEL	1:100	Ratón	MBL
CK2α	1:100	Conejo	Sta. Cruz Technologies
PACS-2	1:100	Conejo	Sta. Cruz Technologies
COX-IV	1:200	Ratón	Sta. Cruz Technologies

Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados en las técnicas inmunocitoquímicas.

Anticuerpo secundario	Dilución	Casa Comercial
PhosphoAnti-Mouse IgM, μ -Chain (Goat) TEXAS RED [®]	1:200	Calbiochem
Alexa Fluor [®] 488-anti-igG (H+L) de conejo	1:50	Molecular Probes
Donkey anti Goat	1:100	Invitrogen
FITC de ratón	1:500	Sigma

Tabla 4. Anticuerpos secundarios utilizados en las técnicas inmunocitoquímica.

5. Ensayos de toxicidad sobre oligodendrocitos *in vitro*

Los tratamientos celulares realizados tuvieron como objetivo determinar y caracterizar moléculas y rutas de señalización que median el daño oligodendroglial ocasionado por la activación de los receptores AMPA. El diseño experimental consistió en la incubación de las células con diversos inhibidores o activadores de aquellas moléculas implicadas, según literatura previa y/o hipótesis planteadas, en estas rutas de señalización intracelular potencialmente vinculadas a los procesos de muerte oligodendroglial de tipo apoptótico. De esta forma, se obtuvo una aproximación inicial acerca del papel que estas moléculas pudiesen desempeñar en nuestro modelo de excitotoxicidad glutamatérgica, antes de evaluar su posible interacción con otros componentes de las cascadas de muerte.

Los ensayos sobre cultivos de oligodendrocitos se realizaron con OPCs aislados de los cultivos gliales mixtos y sembrados en cubres tratados con poli-D-lisina a una densidad de 3.000 células/pocillo. Los OPCs se mantuvieron durante 2 DIV en medio Sato de proliferación lo que permitió una densidad final entorno a 10.000 células/pocillo. A continuación, los OPCs se cultivaron 2 DIV en medio Sato de diferenciación antes de llevar a cabo el estímulo excitotóxico.

La activación de los receptores AMPA se realizó mediante la aplicación previa de ciclotiazida (CTZ; 100 μ M, 5 min), inhibidor alostérico que bloquea la desensitización de los receptores AMPA, antes de la aplicación del agonista (AMPA; 10 μ M, 30 min) (Tabla 5). Todas las incubaciones se realizaron en medio Sato de maduración, a 37 °C y en una atmósfera humidificada suplementada con 5% de CO₂.

Los distintos inhibidores se preincubaron a una concentración y durante un tiempo específico para cada uno de ellos (ver tablas anexas 6-10), incluyéndose en todos los casos un control para analizar el efecto basal del propio inhibidor sobre la viabilidad del cultivo.

Una vez concluido el tiempo de aplicación del agonista AMPA, se retiró el medio y se sustituyó por medio Sato fresco, libre de drogas. Tras 24 h se realizó la cuantificación de la viabilidad celular mediante ensayos fluorimétricos con la sonda calceína-AM (1 μ M, 30 min; Molecular Probes, C-3100).

Todos los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado y los valores mostrados representan las medias normalizadas respecto al control \pm S.E.M.

Nombre	Mecanismo de acción	Concentración	Tiempo preincubación	Casa Comercial
Ciclothiazide (CTZ)	Modulador alostérico Bloquea la desensitización de los receptores tipo AMPA	100 μ M	5 min	Tocris
AMPA	Agonista selectivo de los receptores ionotrópicos tipo AMPA	10 μ M	30 min	Tocris

Tabla 5. Compuestos utilizados en la sobreactivación de los receptores AMPA de oligodendrocitos in vitro.

Abreviatura	Acción farmacológica	Concentración	Tiempo preincubación	Casa Comercial
Z-AVD-FMK	Inhibidor general de caspasas	50 μ M	30 min	Tocris
[Ac-IETD-CHO]	Inhibidor caspasa-8	100 μ M	30 min	Peptides Internat.

Tabla 6. Inhibidores de caspasas.

Abreviatura	Acción farmacológica	Concentración	Tiempo preincubación	Casa Comercial
TBB	Inhibidor CK2	5 μ M	3h	Tocris
DRB	Inhibidor CK2	5 μ M	3h	Sigma
Resorufin	Inhibidor CK2	5 μ M	3h	Sigma
Spermine	Activador CK2	10 μ M	1h	Sigma

Tabla 7. Inhibidores y activador de la Caseín Kinasa 2.

Abreviatura	Acción farmacológica	Concentración	Tiempo preincubación	Casa Comercial
SP600125	Inhibidor JNK-1,JNK-2,JNK-3	20 μ M	30 min	Calbiochem
NQDI	Inhibidor ASK-1	5 μ M	60 min	Sigma
Gastrodine	Inhibidor CaMKII/ASK-1	10 μ M	60 min	Abcam

Tabla 8. Inhibidores de la ruta de las MAPquinas activadas por estrés.

Abreviatura	Acción farmacológica	Concentración	Tiempo preincubación	Casa comercial
Pifithrin-μ	Inhibidor acción mitocondrial p53	1 μ M	60 min	Sigma
Pifithrin-α	Inhibidor acción transcripcional p53	20 μ M	60 min	Sigma

Tabla 9. Inhibidores del factor de transcripción p53.

Abreviatura	Acción farmacológica	Concentración	Tiempo preincubación	Casa Comercial
Phen	Inhibición PTEN	2 μ M	30 min	Calbiochem
Wortmanin	Inhibidor PI3K	50 nM	120 min	Sigma
Y27632	Inhibidor ROCK Quinasa	5 μ M	30 min	Tocris
AR-A014418	Inhibidor GSk3	5 μ M	30 min	Sigma

Tabla 10. Inhibidores y compuestos implicados en la ruta de supervivencia PI3K/Akt.

Abreviatura	Acción farmacológica	Concentración	Tiempo preincub.	Casa Comercial
Gf9203X	Inhibidor PKCs	2 μ M/0.2 μ M	30 min	Tocris
Gö G66976	Inhibidor PKCs dependientes de Ca ⁺²	100 Nm	30 min	Tocris
Rottlerin	Inhibidor de la PKC δ	1 μ M	30 min	Calbiochem

Tabla 11. Inhibidores de las PKCs.

6. Ensayos de excitotoxicidad sobre nervios ópticos aislados de ratones

PLPDsRed

Este tipo de planteamiento experimental tiene como base metodológica los experimentos realizados por Li y cols. en 1999 cuyo fin era la cuantificación de los efectos de la anoxia y del traumatismo en médulas espinales de ratas adultas, que posteriormente fueron adaptados para analizar el efecto de la perfusión de este mismo tejido con ácido glutámico durante 3 h (Li y cols., 2000).

En nuestro caso, se emplearon ratones transgénicos *PLP-DsRed* con 20-25 días postnatales. Los animales fueron anestesiados con isoflurano y se procedió a su decapitación y a la extracción del nervio óptico de forma análoga a la expuesta en el cultivo primario de oligodendrocitos obtenidos a partir del nervio óptico, si bien la disección y retirada de las meninges se lleva a cabo en un medio artificial CSF (aCSF; 126 mM NaCl, 3mM KCl, 2mM MgSO₄, 26 NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 2mM CaCl₂ y 10 mM de glucosa) saturado previamente con oxígeno, tal y como se describe en el trabajo de Sánchez Gómez y colaboradores de 2003. Una vez aislados, se dispusieron los nervios en placas de 48 pocillos que contenían medio CSF y se pre-incubaron durante 1 h a 37 °C y 5% de CO₂ en presencia/ausencia de los inhibidores empleados en cada paradigma experimental (tabla 11). A continuación, se añadió CTZ (150 μ M, 15 minutos), y el agonista AMPA (100 μ M, 2 h). Concluida la estimulación de los receptores AMPA, se retiró el medio y se añadió aCSF fresco sin drogas, tras lo cual se realizaron lecturas sucesivas de la liberación de LDH al medio, utilizando el reactivo CytoTox 96[®] assay (Promega G1781). Las lecturas se llevaron a cabo cada 30 min, desde el tiempo 0 tras la retirada del estímulo hasta los 90 min posteriores. Los valores de LDH se han expresado como el porcentaje de liberación de LDH en cada situación comparado con el 100% de la situación control., en cada tiempo analizado.

Abreviatura	Acción farmacológica	Concentración	Tiempo preincubación	Casa Comercial
TBB	Inhibidor casein Quinasa 2 (CK2)	25 μ M	1h	Tocris
NQDI	Inhibidor de ASK-1	25 μ M	1h	Sigma
BI6C9	Inhibidor de la activación de Bid	50 μ M	1h	Sigma
SP600125	Inhibidor JNK	20 μ M	1h	Calbiochem

Tabla 12. Inhibidores empleados en los ensayos de excitotoxicidad sobre nervio óptico aislado.

7. Cuantificación del daño celular

La determinación de la viabilidad celular se realizó tras el estímulo con AMPA en presencia o ausencia de los inhibidores citados en el apartado anterior (Tablas 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12). Para ello se utilizaron dos tipos de ensayos: cuantificación fluorimétrica de la calceína acetometil-éster (calceína-AM) en cultivos celulares y determinación de la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) para analizar el daño producido en los experimentos realizados sobre nervios ópticos aislados. Además, se analizaron otros parámetros que reflejan contextos de daño celular como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) o la variación del potencial de membrana mitocondrial.

7.1. Ensayo fluorimétrico con calceína- AM

Es un ensayo de tipo fluorimétrico basado en la utilización del fluorocromo calceína-AM, que posee la capacidad de atravesar membranas plasmáticas (Molecular Probes; C-3100). Esta sonda penetra en el interior de la célula y emite fluorescencia sólo en el supuesto de que las células estén vivas. En este contexto, los grupos acetato son eliminados por las esterasas intracelulares activas, reflejo de un metabolismo celular perfectamente viable. El producto fluorescente resultante, permanece dentro de la célula viva, pudiendo ser cuantificado. En este tipo de ensayos se ha empleado una baja densidad de células (10.000 células por pocillo) para facilitar la discriminación de la señal fluorescente por parte del aparato detector.

En nuestro caso, las células se incubaron con la sonda calceína-AM (1 μ M, 30 min, 37 °C y 5% de CO₂) tiempo tras el cual se realizaron dos lavados con PBS para eliminar los restos de medio con sonda. A continuación, se cuantificó la fluorescencia emitida con los fluorímetros de placas SynergyTM HT y SynergyTM H4 (BIO-TEK[®] Instruments, Inc) a las longitudes de onda de excitación y emisión de 485 nm y

520 nm, respectivamente. La fluorescencia emitida por los controles supone el 100 % de viabilidad calculándose a partir de ese valor los niveles de muerte celular ocasionada por el estímulo con AMPA, así como también los posibles efectos intrínsecos de los distintos fármacos sobre la viabilidad basal del cultivo.

7.2. Medición del estrés oxidativo

Durante el estímulo excitotóxico con AMPA, los oligodendrocitos se ven sometidos a un alto grado de estrés oxidativo que puede ser detectado mediante la cuantificación de las especies reactivas de oxígeno. La detección de estas moléculas, se ha llevado a cabo empleando para ello la sonda fluorescente 5-(and-6)-chloromethyl-2',7-dichlorodihydro fluoresceín diacetate, acetyl ester (CM-H₂DCFDA; Molecular Probes, Invitrogen; C-6827). De nuevo, se trata de una sonda con capacidad para introducirse en las células, en cuyo interior será procesada por las esterasas intracelulares. Al igual que en la mayoría de ensayos cuantitativos del grado de estrés celular, se genera un producto que emite fluorescencia al ser oxidado por las especies reactivas de oxígeno presentes en la célula. La fluorescencia emitida, puede ser cuantificada mediante el uso del fluorímetro (SynergyTM HT (BIO-TEK[®] Instruments, Inc). seleccionando unas longitudes de onda concretas para este ensayo (excitación a 485 nm; emisión a 530 nm).

Se realizó la estimulación habitual de los receptores AMPA (CTZ 100 μ M, 5min; AMPA 10 μ M, 30 min) en ausencia o presencia los inhibidores sometidos a estudio. Tras la retirada de los fármacos se añadió directamente la sonda CM-H₂DCFDA (10 μ M; durante 30 min) diluida en medio Sato fresco. En este ensayo, se requiere además conocer el número de células para poner en relación los valores de producción de ROS con las células presentes en cada condición experimental. De este modo, se utilizó una parte de los pocillos disponibles de cada placa para incubar con la sonda calceína-AM (1 μ M) determinando así el número de células presentes en cada condición experimental. Tras incubar ambas sondas durante 30 min, se retiraron haciendo 2 lavados con PBS y a continuación se realizó la lectura en el fluorímetro de placas SynergyTM HT (BIO-TEK[®] Instruments, Inc).

El cálculo de los valores de producción de ROS, se representó como el porcentaje resultante del ratio CM-H₂DCFDA/calceína-AM (% ROS) considerando el valor en las células control, no tratadas, como el 100% de ROS. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los valores mostrados representan las medias normalizadas \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes.

7.3. Determinación del gradiente del potencial mitocondrial

Para medir este parámetro de daño celular, reflejo de la afectación a nivel mitocondrial, se empleó la sonda fluorescente JC-1 (Molecular Probes, Invitrogen; T-3168). Se trata de una sonda catiónica y lipofílica que penetra en la célula y se dirige preferencialmente a la mitocondria en función de estado

del potencial de membrana de este orgánulo. Una vez dentro de la mitocondria, emite fluorescencia que pasa de verde a rojo si se producen incrementos en el potencial mitocondrial. Es por ello que la sonda JC-1, proporciona información sobre el estado celular mediante la formación de agregados que emitirán fluorescencia roja en las células sanas y verde en las que presenten daño, asociándose este último caso con un estado monomérico de la sonda. El ratio entre los valores de emisión en rojo y en verde será indicativo del estado del potencial de membrana mitocondrial y por ende del nivel de daño mitocondrial ocasionado por nuestro estímulo citotóxico.

Tras la ejecución de diseños experimentales similares a los aplicados en los ensayos de toxicidad in vitro, descritos previamente, se añadió la sonda JC-1 a una concentración de 3 μ M tras la retirada del AMPA y del inhibidor sometido a estudio en cada caso. Tras 15 minutos, se eliminó el medio de incubación y se realizaron dos lavados con HBSS sin rojo fenol, con el fin de eliminar interferencias debidas al color del medio. Dado que la sonda JC1 puede permanecer unida al plástico mediante interacciones electrostáticas, se pasaron los cubres que portan las células ya teñidas a otra placa, con HBSS sin rojo fenol para proceder a la lectura de la señal de fluorescencia. Las fluorescencias verde (exc: 485 nm; em: 528 nm) y roja (exc: 485nm; em: 620nm) fueron cuantificadas en el fluorímetro de placas SynergyTM HT (BIO-TEK[®] Instruments, Inc), realizándose lecturas cada 15 min de forma continuada durante un intervalo de 60-90 minutos.

Se consideró como potencial basal de membrana mitocondrial al ratio fluorescencia verde/roja resultante de la situación control (100%), calculándose el resto de valores al normalizarlos frente al control no tratado. Los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado, representando los valores mostrados las medias normalizadas \pm SEM de al menos, tres experimentos independientes.

7.4. Liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)

La liberación de LDH, enzima de ubicación citoplasmática en condiciones basales, al medio extracelular se considera como un parámetro que refleja parte del daño celular acontecido tras un estímulo de carácter citotóxico. La presencia anómala de LDH en el exterior de la célula, puede ser cuantificada mediante una reacción que provoca la conversión de una sal de tetrazolium (INT) en un producto de formazán de color rojo. La intensidad de esta reacción, dependerá de la cantidad de LDH liberada al medio y por tanto constituirá una aproximación al número de células dañadas en cada situación.

La medida de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) se realizó mediante la utilización de un kit comercial de citotoxicidad (CytoTox 96[®] assay; Promega G1781).

Esta técnica se utilizó para cuantificar la toxicidad celular provocada sobre los nervios ópticos aislados de ratones transgénicos *PLP-Ds Red*, tras la activación de los receptores AMPA. Una vez concluida la estimulación de estos receptores en presencia o ausencia de inhibidores de ciertas rutas de

señalización (tabla 11), se dispusieron 50 μ l del sobrenadante de cada pocillo y se incubaron con 50 μ l del sustrato de la LDH durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras la media hora de incubación, se paralizó la reacción en curso con otro reactivo integrado en el kit comercial, denominado “stop solución” como paso previo a la cuantificación colorimétrica, a 490 nm, en el fluorímetro de placas Synergy™ H4 (BIO-TEK® Instruments, Inc). Los valores se representaron como el porcentaje de la actividad de la LDH liberada respecto a las situaciones control (control; 100% liberación).

7.5. Evaluación histológica del daño en nervios ópticos aislados

Para la evaluación histológica del daño infligido al tejido por el estímulo excitotóxico, y tras la cuantificación de liberación de LDH en los tiempos indicados en el apartado anterior, los nervios ópticos se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 1 h. Tras ello, se realizaron 3 lavados con PBS 1X y los nervios intactos se montaron en portaobjetos, empleando el medio de montaje *ProLong Glog antifade* (Invitrogen; Molecular Probes). Finalmente, se analizaron los tejidos en el microscopio confocal (Olympus Fluoview FV500). Mediante el propio software Fluoview se optimizó el número de secciones, que generalmente se situó en torno a 10 secciones en Z, con $<0.75 \mu$ m de grosor, para cada nervio óptico. Para calcular el número de células (oligodendrocitos) presentes, se utilizó el software Image J.

8. Análisis de la expresión proteica mediante western blot

Esta técnica se basa en la identificación y visualización de proteínas en base a la capacidad de reconocimiento entre antígeno y anticuerpo. Las proteínas son separadas en función de su peso molecular en una electroforesis realizada en un gel de acrilamida. Posteriormente, las proteínas son transferidas a una membrana de PVDF (Bio-Rad) y mediante el uso de anticuerpos específicos se reconocen, localizan y cuantifican.

Los OPCs aislados a partir del cultivo glial mixto, se sembraron a una densidad inicial de 40.000 células/cubre en medio sato de proliferación, en placas de 24 pocillos y, tras 2 DIV se realiza el cambio a medio sato de diferenciación durante otros 2 DIV. En este punto, se disponía de unas 120.000 células por cubre (240.000 por condición experimental). En este contexto, se procedió a la activación de los receptores tipo AMPA (CTZ 100 μ M, 5 min; AMPA 10 μ M, 30 min) en presencia/ausencia de los distintos inhibidores y siguiendo los cursos temporales post-estímulo determinados para cada ruta de señalización. Tras finalizar el período de estimulación, se retiró el medio de las células mediante dos lavados consecutivos con PBS, de forma previa a la recogida de la proteína celular total.

Una vez realizados los lavados, las células se lisaron en 50 μ l de tampón RIPA (50 mM Tris pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.5% desoxicolato; 0.1 % SDS; 1 %NP-40) que además contiene inhibidores de fosfatasa

(Halt™ Protease & Phosphatase inhibitor Cocktail 50X; Thermo scientific) y EDTA solution (0.5 M 100X; Thermo scientific). Todo el proceso de recogida de los extractos proteicos se realizó sobre hielo para garantizar entre otras, la paralización de la maquinaria celular en el punto temporal de interés y la propia conservación de los extractos. Posteriormente, las muestras se diluyeron en el tampón de carga (25 mM Tris-HCl pH 6.8; 20 % glicerol; 20 % β-mercaptoetanol; 8 % SDS; 0.02 % azul de bromofenol), para someterlas al proceso de electroforesis.

8.1. Electroforesis

Como paso previo y necesario, los extractos proteicos fueron expuestos a temperaturas que conducen a su desnaturalización (90 °C, durante 5 minutos). Todo ello, en presencia de los agentes desnaturalizantes β-mercaptoetanol, que incidirá en la destrucción de los puentes disulfuro y dodecil sulfato de sodio (SDS), agente que desnaturaliza y recubre las proteínas, para obtener cadenas polipeptídicas aisladas.

Una vez desnaturalizadas, las muestras proteicas se cargaron en un gel de poliacrilamida (Criterion™ TGX™ Precast Gels; Bio-Rad), cuya particularidad radica en poseer un gradiente creciente en la concentración de acrilamida/bisacrilamida. En base a lo anterior, se produce en este tipo de geles un gradiente decreciente relativo al tamaño del poro, que proporciona un incremento a nivel resolutivo a la par que ofrece una mayor versatilidad en la gama de pesos moleculares que permite analizar. Se incluyeron además en cada migración, estándares de pesos moleculares conocidos (Precision Plus Protein Dual Color Standards; Bio-Rad) que nos permitieron determinar tanto la eficiencia de la migración como de la transferencia de las proteínas desde el gel de poliacrilamida a la membrana de PVDF o nitrocelulosa.

Para la electroforesis se empleó un sistema de migración vertical (Bio-Rad), en el que se añadió un tampón de Tris-glicina (200 mM glycina, 25 mM Tris, 0.1 % SDS, pH=8.3), aplicando un voltaje de 200 V. Como resultado del proceso, se obtuvo la separación de las proteínas en función de su peso molecular.

8.2. Electrotransferencia

Una vez concluida la fase de electroforesis, las proteínas fueron transferidas del gel de poliacrilamida a una membrana sintética de PVDF (Trans-Blot Turbo PVDF Pack kit; Bio-Rad) o nitrocelulosa (Trans-Blot Turbo Nitrocellulose Pack kit; Bio-Rad). De esta forma, se obtuvo el resultado del proceso de electroforesis inmobilizado en una membrana, un tipo de soporte que posibilitará la inmunodetección de la proteína/s de interés. Para realizar el paso de gel a membrana, se empleó el sistema de transferencia semi-húmedo (Trans-Blot Turbo Transfer System; Bio-Rad), aplicando un voltaje de 150 mV durante 7 min.

8.3. Detección de proteínas

La muerte oligodendroglial ocasionada por la sobreactivación de los receptores de glutamato tipo AMPA, provoca una serie de alteraciones en los niveles totales o de fosforilación de ciertas proteínas, componentes clave de determinadas rutas de señalización intracelular implicadas en el proceso apoptótico.

Para la detección de proteínas no fosforiladas, las membranas fueron sometidas a un proceso de bloqueo (5 % de leche en polvo y 5 % de suero en TBST 1X) durante una hora y a temperatura ambiente. Por otro lado, si la proteína a detectar era proclive a sufrir fosforilaciones, el bloqueo de la membrana se realizó con la solución PhosphoBlocker™ Blocking Reagent (Cell Biolabs; AKR-103) (5% en TBST 1X, 50mM Tris Base, 200mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH=7.4) que posibilita el máximo rendimiento en la señal obtenida a la hora de visualizar este tipo de proteínas.

Tras el período de bloqueo, se incuban las membranas durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla 12). En el caso de las proteínas fosforiladas, se utilizó una solución de 5 % PhosphoBlocker™ Blocking Reagent en TBST 1X y de 5% de BSA y 1% suero en TBST 1X en el caso de las proteínas no fosforiladas. Para eliminar los restos de anticuerpo primario, se realizan 3 lavados con TBST 1X. A la hora de añadir el anticuerpo secundario (2 horas a temperatura ambiente) conjugado con peroxidasa (Tabla 13), se diluyó en 5 % PhosphoBlocker™ Blocking Reagent o en 1% de suero y 5% de leche en polvo en TBST dependiendo de si se trataba de una proteína fosforilada o no, respectivamente. Finalmente, se procedió al revelado mediante quimioluminiscencia de las bandas proteicas, usando los reactivos Supersignal West Dura (Extended Duration Substrate) o Supersignal West Femto (Maximun Sensitivity Substrate), de la casa comercial Thermo Scientific. Se empleó como aparato de revelado el ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad) cuyo software de manejo es el Quantity One® (1-D analysis software).

Anticuerpo primario	Huésped	Antígeno reconocido	Dilución	Casa Comercial
Phospho 44/42 MAPK (Erk1/Erk2)	Conejo	Treonina 202 y tirosina 204 fosforilados	1:500	Cell signaling
P44/42 MAPK total	Conejo	Secuencia carboxilo terminal	1:1000	Cell signaling
Phospho-Akt (Ser 473)	Conejo	Serina 473 fosforilada	1:500	Cell signaling
Akt total	Conejo	Secuencia carboxilo terminal	1:1000	Cell signaling
Phospho-CREB	Conejo	Serina 133 fosforilada	1:500	Cell signaling
CREB total	Conejo	Secuencia amino terminal	1:1000	Cell signaling
Bax	Conejo	Secuencia carboxilo terminal	1:1000	Upstate
Puma	Conejo	Secuencia carboxilo terminal	1:1000	Cell signaling
NF-κB (C20)	Conejo	Secuencia carboxilo terminal	1:1000	Santa Cruz
Phospho-PTEN	Conejo	Serina 380, treonina 382 y 383 fosforiladas	1:1000	Cell Signaling
PTEN	Conejo	Secuencia carboxilo terminal	1:1000	Cell Signaling
Phospho-c-Jun	Conejo	Serina 63 fosforilada	1:1000	Cell Signaling
Phospho-eIF2α	Conejo	Ser51 fosforilada	1:1000	Cell Signaling
EIF total	Conejo	Secuencia carboxilo terminal	1:1000	Cell Signaling
pIRE-1 alpha	Conejo	Ser 724 fosforilada	1:1000	Thermo Scientific
KDEL	Ratón	Aa 649-654 correspondientes a Grp78 de rata	1:1000	MBL
Phospho-SAPK/JNK	Conejo	Treonina 183 y Tirosina 185 fosforiladas	1:1000	Cell Signaling

JNK total	Conejo	Secuencia carboxilo terminal	1:1000	Cell Signaling
Phospho p38	Conejo	Treonina 180 y Tirosina 182 fosforiladas	1:1000	Cell Signaling
P38 tot	Conejo	Secuencia p38 humano	1:1000	Cell Signaling
FLIPL/S	Conejo	Secuencia N-terminal	1:500	Sta.cruz
CK2α	Conejo	Aa 1-320	1:500	Sta.Cruz
Caspasa-8	Conejo	Aa 217-350	1:1000	Sta.Cruz
Phospho-mTOR	Conejo	Ser2448 fosforilada	1:1000	Cell Signaling
mTOR tot	Conejo	Ser 2481	1:1000	Cell Signaling
Phospho-p53 (Ser15)	Conejo	Ser 15 fosforilada	1:500	Cell Signaling
P53 (FL-393)	Conejo	Aa 1-393 correspondientes a p53 total humano	1:500	Sta.Ctuz
PRX-1	Conejo	Aa 1-199	1:1000	Thermo Scientific
Bid	Conejo	Aa 1-195	1:500	Sta Cruz
Phospho-PTEN	Conejo	Serina-380	1:1000	Cell Signaling

Tabla 13. Anticuerpos primarios empleados en la técnica de western blot.

Anticuerpo secundario	Huesped	Conjugado	Dilución	Casa Comercial
Anti-Conejo	Cabra	HRP	1:5000	Sigma
Anti-Ratón	Oveja	HRP	1:5000	Sigma

Tabla 13. Anticuerpos secundarios utilizados en la técnica de western blot.

8.4. Análisis y cuantificación de los resultados

Mediante un análisis densitométrico, empleando el programa Bio-Rad CFX Manager, se ha determinado la intensidad relativa de las bandas. Se utilizaron los valores obtenidos para la β -actina como factor de normalización, si bien para las proteínas fosforiladas se consideró como referencia de normalización la señal de la proteína en su isoforma total (no fosforilada) en todos los casos posibles. Los resultados reflejan la media \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes.

8.5. Reutilización de membranas para proteínas de pesos moleculares próximos

Cuando los pesos moleculares de dos proteínas resultaron extremadamente próximos, se requirió el uso de la solución de stripping (Restore™ Western Blot Stripping Buffer; Thermo Scientific) durante 10 min. A continuación se lavó la membrana dos veces con TBST y se bloqueó durante 1 h en TBST con 5% de PhosphoBlocker™ Blocking Reagent.

9. Ensayo de Inmunoprecipitación (IP)

Esta técnica nos permite precipitar y por ende concentrar, una proteína concreta, aislándola de todo el conjunto de proteínas existentes en nuestra muestra. El antígeno proteico es precipitado mediante la incubación con un anticuerpo que se une específicamente a la proteína de interés. Este procedimiento requiere, en algunas de sus etapas, que el anticuerpo esté acoplado a un sustrato sólido. Será este duplo anticuerpo-sustrato la que se una a la proteína de interés posibilitando el enriquecimiento o concentración de la misma en nuestra muestra (Fig.19).

Cómo paso previo necesario para la IP, se mezclaron las bolas (Protein A Sepharose Beads; Abcam) con el anticuerpo empleado en cada diseño experimental. Para ello, las bolas de sefarosa se prelavaron 2 veces con PBS y una última vez con RIPA (50 mM Tris pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.5% desoxicolato; 0.1 % SDS; 1 %NP-40) al que además se añadieron inhibidores de fosfatasa (Halt™ Protease & Phosphatase inhibitor Cocktail 50X; Thermo Scientific) EDTA (0.5 M solution 100X; Thermo Scientific), Ortovanadato (Sodium ortovanadate 200X; Sigma) y PMSF (100mM solution 100X; Sigma). Tras el último lavado, se

mezclaron 1.200 μl de RIPA con 205 μl de bolas ya lavadas. Esta suspensión se repartió en 4 tubos eppendorf (300 μl /tubo) y se incubó con las concentraciones recomendadas para cada anticuerpo concreto (ver tabla 14), durante 4 h a 4 $^{\circ}\text{C}$.

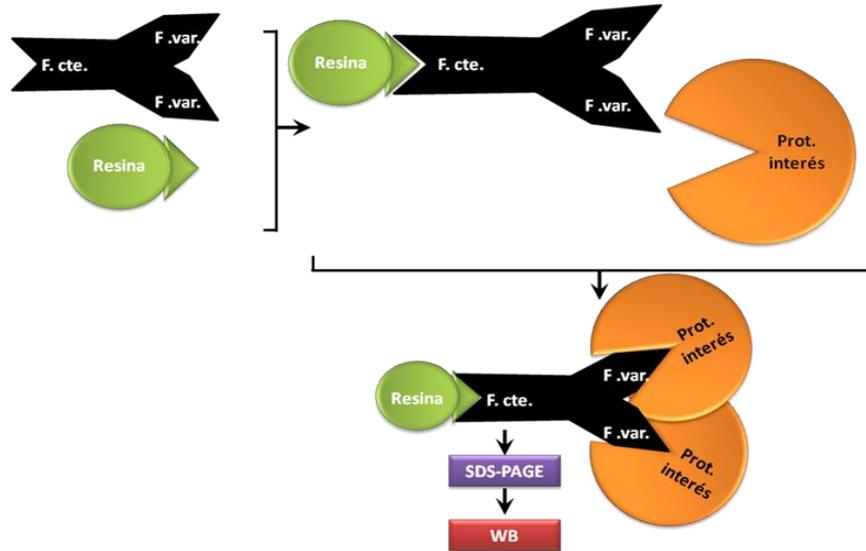


Figura 19. Etapas generales del proceso de inmunoprecipitación

Durante el tiempo de incubación de la suspensión de bolas de sefarosa con el anticuerpo, se aplicó a los oligodendrocitos el estímulo excitotóxico habitual (CTZ 100 μM , 5 min; AMPA 10 μM , 30 min) y se recogió la proteína total en los tiempos indicados y en un volumen de 500 μl de buffer de lisis (RIPA) para cada situación experimental. Para facilitar la total disgregación de los extractos celulares en el buffer de lisis, éstos se dejaron durante 30 min adicionales en una noria a 4 $^{\circ}\text{C}$. Finalmente, los extractos fueron centrifugados a 12000 rpm durante 20 min y a 4 $^{\circ}\text{C}$. Mientras, se realizaron tres lavados con tampón de lisis (RIPA; 500 μl /ependorf) a la suspensión de bolas de sefarosa y anticuerpo, separados por centrifugaciones de 2000g y 2 min de duración cada una.

Una vez concluidos ambos procesos, se reservaron 450 μl de sobrenadante de cada condición experimental, correspondientes al lisado celular total, de los que se emplearon 2 μl para la cuantificación de la proteína presente en las muestras mediante el ensayo de Bradford. El lisado restante fue añadido a los complejos formados por las bolas de sefarosa unidas a anticuerpo, y se permitió la formación de los inmunocomplejos (bolas/anticuerpo/proteína de interés), mediante incubación en la noria durante toda la noche a 4 $^{\circ}\text{C}$. Al día siguiente, los complejos se centrifugaron durante 1 min a 4000 rpm a 4 $^{\circ}\text{C}$ y se lavaron tres veces con buffer de lisis (500 μl de RIPA /ependorf). Como paso final del protocolo, se eluyeron 50 μl de bolas (presentes en cada condición experimental) con 50 μl de tampón de carga 2X (25 mM Tris-HCl pH 6.8; 20 % glicerol; 20 % β -mercaptoetanol; 8% SDS; 0.02 % azul de bromofenol), dejándolas en un thermoblocker 5 min a 90 $^{\circ}\text{C}$. A continuación, se

centrifugó la mezcla a 12000g durante 1 min y se recuperó el sobrenadante, descartando por tanto el pellet de bolas de sefarosa, que hasta ese momento habían constituido el soporte sólido necesario para el desarrollo de la técnica.

Tanto el sobrenadante final, resultado del proceso de IP, como los lisados celulares totales obtenidos previamente, fueron cargados en un gel de poliacrilamida (Criterion™ TGX™ Precast Gels; Bio-Rad) y sometidos a electroforesis según el protocolo anteriormente descrito. Tras bloquear las membranas, se realizaron las incubaciones con anticuerpos específicos (tabla 14). De esta forma se pudo detectar la presencia de proteínas que tras nuestro estímulo pudiesen formar complejos proteicos con la proteína de interés cuya presencia general se reveló inmunoblotando los lisados celulares totales.

Anticuerpo primario	Huésped	Antígeno reconocido	Dilución	Casa Comercial
CK2	Conejo	Aa 1-320	1:500	Sta.Cruz
Phopho p53 (Ser 15)	Conejo	Ser 15 fosforilada	1:1000	Cell Signaling
P53 (FL 393)	Conejo	Aa 1-393 correspondientes a p53 total humano	1:500	Sta. Cruz

Tabla 14. Anticuerpos primarios empleados en los ensayos de inmunoprecipitación

10. Ensayo quinasa *in vitro*

Antes de iniciar el ensayo *in vitro* quinasa propiamente dicho, se necesitaron una serie de pasos previos detallados a continuación y dirigidos a la amplificación de las proteínas de fusión recombinantes que funcionarán como sustratos específicos de nuestra quinasa durante el transcurso del presente ensayo.

10.1. Transformación de bacterias

Como paso inicial, se añadieron 2 µg de ADN correspondiente a las proteínas de fusión recombinantes RCAN3 y RCAN1 (cedidas por Mércé Pérez Riba y descritas en el artículo de Martínez-Hoyer y col de 2013) y 50 µL de bacterias en tubos de polipropileno. La mezcla se incubó durante 30 minutos en hielo, seguido de una exposición a 42 °C durante 45 segundos. A continuación, se incubaron

las bacterias en hielo durante 2 minutos. Seguidamente, se añadieron 300 µL de medio S.O.C. (Sigma) y las bacterias se incubaron en agitación 220 r.p.m. durante una hora a 37 °C. Finalmente, se sembraron 60 µL de cultivo líquido bacteriano en placas LB agar que contenían el antibiótico de resistencia del plásmido sembrado (100 µg/mL de ampicilina o 50 µg/mL de kanamicina) y se incubaron en la estufa a 37 °C durante 16-18 horas.

10.2. Inducción de la expresión de proteínas en bacterias

Una colonia de bacterias se puso a crecer en 50 mL de medio de cultivo 2XYT (Sigma) en presencia de 100 µg/mL de ampicilina durante toda la noche en un agitador a 220 r.p.m. a 37 °C. A la mañana siguiente se diluyó el cultivo diez veces en medio 2XYT en presencia de ampicilina y se dejó crecer en agitación a 220 r.p.m. a 37 °C durante una hora. Al cabo de este tiempo se añadió 1 mM IPTG (Sigma), durante 4 horas en agitación. Finalmente, las bacterias se concentraron por centrifugación a 4000 r.p.m. durante 15 minutos a 4 °C, descartándose el sobrenadante. El precipitado bacteriano se resuspendió en 6 mL de tampón de lisis (20% Sacarosa (Sigma), 10% glicerol (Sigma), 50 mM Tris-HCl pH 8 (Sigma), 200 mM metabisulfito de sodio Na₂O₅S₂ (Sigma), 2 mM MgCl₂ (Sigma), 2 mM DTT (Sigma), 1 mM PMSF (Sigma), 1 mg/mL Aprotina (Sigma), 1 mg/mL Leupeptina (Sigma)).

La suspensión bacteriana fue sometida a 4 series de sonicación (Misonix Inc. Microson™ Ultrasonic Cell Disruptor XL Model DU-2000) a 5000 µm de amplitud de onda durante 10 segundos cada uno, con un turno de reposo de 10 segundos entre ellos, manteniéndose la muestra en todo momento en hielo. El producto de la sonicación se centrifugó a 14.000 r.p.m., recogiendo el sobrenadante y dividiéndolo en alícuotas para guardarlo congelado a -80 °C. Para comprobar que la proteína de interés se había expresado, se cogieron 50 µL de lisado bacteriano, se añadieron 50 µL de tampón de carga. Las proteínas se separaron por electroforesis en SDS-PAGE al 10%. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñó con Azul Coomassie (0.1 % Brilliant blue G (Merck), 45% Metanol (Merck), 45% H₂O, 10% Ácido Acético Glacial (Panreac). Posteriormente para visualizar las proteínas se destiñó con una mezcla de 10% Metanol (Merck), 10% Ácido Acético Glacial (Panreac) y 80% H₂O.

Para iniciar los ensayos in vitro kinasa (IVK), se unió la proteína de fusión GST- RCAN3 a las bolas de glutathione sepharose (GE Healthcare). Inicialmente, se equilibró la columna con el tampón de lisis (10 mM Tris pH 7.6; 150 mM NaCl; 1% IGEPAL-360; 10 mM MgCl₂; 1mM PMSF; 10 µg/mL Aprotina; 10 µg/mL Leupeptina), centrifugando tres veces durante un minuto a 4000 r.p.m. El acoplamiento se hizo pre-incubando 50µL de suspensión de bolas de Glutathione sepharose (GS) con 50 µg de proteína de fusión GST-RCAN3 durante una hora a 4 °C. Con esto se consigue que el dominio GST de las proteínas de fusión se una a la GS.

10.3. Pre-tratamiento del cultivo de oligodendrocitos

Para la realización de este ensayo se emplearon 800.000 células por cada condición presente en nuestro diseño experimental. De este modo, se sembraron 50.000 OPCs/pocillo, aislados a partir del cultivo glial mixto y se dejaron durante 2 DIV en medio Sato de proliferación. Tras este período de división se realizó el cambio a medio Sato de maduración, durante otros 2 DIV adicionales.

En este punto temporal, se procedió a la recreación de las condiciones habituales de excitotoxicidad mediante la sobreactivación de los receptores AMPA (CTZ 100 μ M, 5 min; AMPA 10 μ M, 30 min), en presencia o ausencia del activador (spermina) o del inhibidor (TBB) de la quinasa CK2 (caseína quinasa 2). Una vez concluido el estímulo, se realizó un cambio de medio a Sato fresco sin drogas, donde se dejaron las células durante otros 20 minutos, tras los que iniciamos la siguiente fase del protocolo (Fig.20).

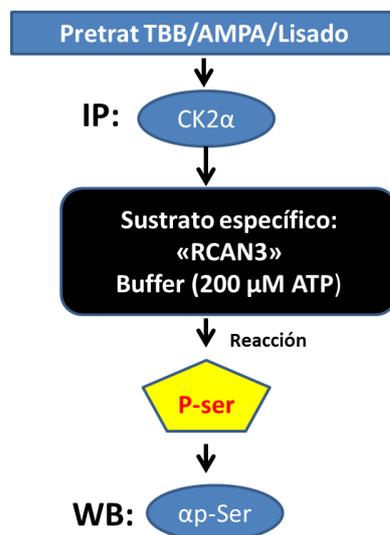


Figura 20. Principales etapas del ensayo quinasa *in vitro*.

Tras el citado período post-estímulo, las células se lavaron dos veces con PBS 1X, frío. A continuación se lisaron en 500 μ l de tampón de lisis por cada condición experimental (20 mM Tris pH 7.4, 137 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM NaF, 1 mM Pirofosfato de sodio, 100 μ M β -glicerofosfato, 10 μ g/mL aprotinina, 1 mM PMSF, 10% glicerol y 1% V/V de TritonX-100) (Anborgh *et al.*, 1999).

Se recogieron 80 μ l de los lisados y se añadieron 80 μ l de tampón de carga 2X (25 mM Tris-HCl pH 6.8; 20 % glicerol; 20 % β -mercaptoetanol; 8% SDS; 0.02 % azul de bromofenol). Esta parte de los extractos celulares, se consideró como lisado celular total y permitió, en fases posteriores, la comprobación de los niveles generales de la quinasa en nuestras células en las distintas condiciones experimentales.

El resto del lisado celular, se centrifugó durante 10 minutos a 4 °C y 13.500 r.p.m. y se recuperó el sobrenadante. Esta fase del lisado se puso en contacto con 5 µL de anticuerpo (anti-CK2α) y 50 µL de sepharosa unida a la proteína G Gamma Bind Plus (GE Healthcare) pre-lavada con el tampón de lisis. Todos estos elementos se incubaron juntos en una noria (en un eppendorf de 1.5 ml por cada condición experimental), durante 4 horas a 4 °C. Tras el período de incubación, se centrifugaron los lisados durante 1 minuto a 4.000 r.p.m y se descartó el sobrenadante. En el pellet obtenido, se encontraba la resina que portaba los inmunocomplejos de interés formados tras la incubación.

A continuación, se lavaron 3 veces los inmunocomplejos empleando el tampón de lisis frío, dos veces con el tampón de lavado frío (10 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM NaCl, 20 µg/mL aprotinina y 0,5% IGEPAL-360) y una vez con el tampón de reacción (20 mM Tris (pH7.4), 20 mM NaCl, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂ y 1 mM MnCl₂). Los inmunocomplejos ya lavados, fueron sometidos a la reacción central de los ensayos de fosforilación *in vitro* de las kinasas (I.V.K.), poniéndose en contacto con 40 µl del tampón de reacción en presencia de 20 µM ATP y 500 ng de GST-RCAN3 como sustrato exógeno durante 1h y a 30 °C. Finalmente, se añadieron 30 µl del tampón de carga 2X.

Las proteínas, tanto las correspondientes al lisado total como las sometidas al ensayo in vitro quinasa se separaron por electroforesis siguiendo el protocolo anteriormente descrito. Para la detección de las bandas inmunorreactivas, reflejo en este caso de actividad quinasa de CK2, se emplearon anticuerpos anti-fosfoserina. En los lisados celulares totales, se empleó el anticuerpo anti-CK2α para detectar la presencia de la quinasa en todas las condiciones experimentales.

11. Silenciamiento génico mediante sh-RNA

Esta técnica se ha empleado durante el estudio del papel de CK2 en nuestro modelo de excitotoxicidad. Por ello, el set de sh-RNAs comerciales empleado como base del silenciamiento está dirigido contra el gen CK2 de rata (Csnk2a1 SureSilencing shRNA Plasmid (KR43385); Qiagen). Este kit consta de cuatro “clones” o sh-RNAs distintos dirigidos contra el gen de interés, así como un sh-control negativo.

11.1. Transformación de bacterias

Como paso inicial, se añadieron 2 ng del ADN proporcionado para cada clon para el silenciamiento de CK2, así como del Sh-negativo, a 50 µl de bacterias E.coli (DH5α)/clon en tubos de polipropileno. La mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos, tras los cuales se expuso a una temperatura de 42 °C durante 20 segundos. Después del choque térmico, se incubaron de nuevo en hielo durante 2 minutos. Tras este segundo período a 4°C, se añadieron 950 µl de LB por cada condición y se incubó todo el conjunto a 37°C y en agitación durante una hora. En este punto, se dispone de 1 ml de medio LB con

bacterias (950 μ l de medio + 50 μ l de bacterias) por cada clon empleado, de los cuales 200 μ l se sembraron sobre placas LB agar con el antibiótico de resistencia del plásmido a expandir, en este caso ampicilina (100 μ g/ml) y se incubaron en la estufa a 37 °C durante 16-18 horas.

Durante la segunda jornada del presente protocolo, se procedió a “picar” una colonia aislada dentro del pool de colonias bacterianas que habían surgido. De esta forma, se dispuso la colonia de bacterias seleccionada en 3 mL de medio de cultivo LB en presencia de ampicilina (100 μ g/mL) durante 6-8 horas en agitación y a 37°C. Tras este intervalo, se cogieron 300 μ l de la suspensión bacteriana obtenida y se diluyeron en 200 ml de medio LB en presencia de ampicilina (100 μ g/mL). Este volumen, dispuesto en matraces, se incubó toda la noche en un agitador a 220 r.p.m. y a 37 °C. A la mañana siguiente, se concentraron las bacterias por centrifugación a 4000 r.p.m. durante 15 minutos y a 4 °C, descartándose el sobrenadante. A partir de este punto, se procedió a la purificación del plásmido de forma acorde a las instrucciones descritas en el kit comercial empleado a tal efecto (PureLink® HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit; Invitrogen).

11.2. Transfección y selección de las células correctamente transfectadas

Una vez aislados los OPCs a partir del cultivo glial mixto según el protocolo descrito en el apartado correspondiente, se procedió a la transfección de la suspensión oligodendroglial obtenida (1.500.000 células), empleando los plásmidos de silenciamiento ya purificados.

La mitad de las células (750.000 células), se transfectaron con el DNA correspondiente al Sh-CK2 (clon-1) dirigido a silenciar la proteína CK2. La otra mitad fueron expuestas al Sh-negativo que funcionará como control de transfección pero que carecerá de efecto sobre la expresión del gen responsable de CK2. Para el proceso de transfección, se ha empleado el kit Amaxa Rat Glial Cells Nucleofector Kit (Lonza) así como el electroporador de la misma casa comercial (Nucleofector®, Amaxa).

Una vez sometidos al proceso de electroporación, los OPCs se sembraron a una densidad aproximada de 100.000 células por pocillo y fueron incubados en medio Sato de maduración durante 2 DIV con el doble objetivo de: alcanzar un estadio óptimo del desarrollo a la par que estabilizar la población oligodendroglial tras los efectos nocivos derivados del propio proceso de transfección mediante electroporación.

El siguiente punto del protocolo consistió en el enriquecimiento de la población transfectada. Para ello, dado que los plásmidos insertados proporcionan resistencia frente a puomicina, se incubaron las células con 0.3 μ g/ml de dicho antibiótico durante 16-18 horas. A las 24 horas de haber retirado la puomicina, las células fueron sometidas al estímulo excitotóxico con AMPA (10 μ M; 30 min), recogiendo la proteína total 20 min tras la retirada del mismo. Finalmente, se analizó mediante western blot la eficiencia de la transfección, visualizando en este caso concreto los niveles de expresión

de CK2 tanto en las células transfectadas con el Sh-negativo como en las células transfectadas con el Sh-CK2 (clon-1). Además se analizó también en ambos casos el grado de fosforilación de JNK o IRE1 α pues constituyen las dianas propuestas para CK2 dentro del presente modelo de excitotoxicidad.

12. Análisis estadístico

Para determinar diferencias estadísticamente significativas entre células sometidas a distintos estímulos respecto a sus controles o entre diferentes tratamientos se hicieron al menos 3 experimentos independientes utilizando diferentes cultivos primarios o animales procedentes de distintos partos en el caso de los experimentos con los nervios ópticos exvivo. Cada condición experimental perteneciente a un mismo cultivo se evaluó por triplicado y los valores mostrados siempre representan la media \pm S.E.M de los distintos experimentos.

Las hipótesis planteadas fueron aceptadas o rechazadas tras un análisis estadístico de *t de Student*, mediante el cual obtenemos un valor de *p* asociado que nos indica la probabilidad de que las diferencias observadas entre los casos sean debidas al azar, considerando una diferencia estadísticamente significativa cuando $p < 0,05$.

Los programas utilizados para el análisis de los datos fueron: GraphPad Software Prism, versión 5.00 para Windows y Microsoft Office Excel 2007, versión para Windows.

Resultados

1. Caracterización de los cultivos de oligodendrocitos procedentes de cultivos gliales mixtos

En el presente estudio se han empleado cultivos primarios gliales mixtos obtenidos de cortezas cerebrales de ratas neonatales (P0-P2), a partir de los cuales se han aislado, con un elevado grado de pureza, las células de estirpe oligodendroglial. En el momento del aislamiento el término OPCs (oligodendrocyte precursors cells) designa a las células obtenidas, pues se trata de células inmaduras que poseen habilidades proliferativas. Así, su mantenimiento en un medio de cultivo definido, SATO (ver apartado Materiales y Métodos) suplementado con los factores de crecimiento mitogénicos PDGF-AA y bFGF permitió su proliferación hasta alcanzar la densidad de trabajo adecuada para cada paradigma experimental. A continuación, los OPCs fueron derivados hacia estadios de maduración más avanzados a través de su mantenimiento en medio SATO sin factores de crecimiento y suplementado con hormonas tiroideas T3/T4 y neurotrofinas CNTF/NT3. Es conocido que a lo largo de su maduración, las células oligodendrogliales atraviesan una serie de estadios intermedios, identificables mediante el uso de marcadores específicos del grado de diferenciación/maduración (Raff y cols., 1983; Kandel y cols., 2000, Stangel y Hartung, 2002). Teniendo esto en cuenta y con el fin de caracterizar nuestra preparación analizamos, mediante el uso de técnicas inmunocitoquímicas, tanto la pureza del cultivo tras 1 DIV (Fig. 21) como la expresión de los diferentes marcadores oligodendrogliales a lo largo de su establecimiento *in vitro* (Fig. 22 y 23). En cuanto a la pureza del cultivo, observamos que, un $95 \pm 0.2\%$ de las células aisladas del cultivo glial mixto fueron positivas para Olig-2 y un $92.5 \pm 0.5\%$ para PDGF-r, ambos marcadores específicos de la estirpe oligodendroglial. El otro componente, claramente minoritario, estaba representado por un $1,4 \pm 0.3\%$ de astrocitos (GFAP+) y un $2,4 \pm 0.5\%$ de células microgliales (Iba-1+).

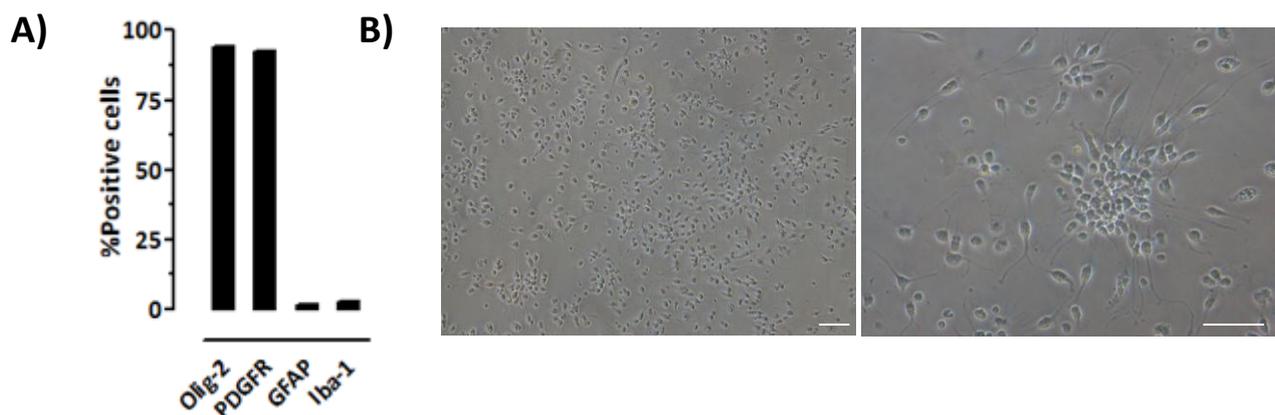


Figura 21. Análisis del grado de pureza del cultivo de células de oligodendrocitos aisladas a partir del cultivo glial mixto. A) Se aislaron los OPCs de los cultivos gliales mixtos (ver Mat y Mét) y mediante técnicas inmunocitoquímicas se tiñeron con los marcadores específicos para cada una de las tres poblaciones que potencialmente podían estar presentes: OPCs (PDGFR, Olig2), astrocitos (GFAP) y microglía (Iba-1). A posteriori se realizó el conteo celular mediante el programa Image J (4 cubres/cultivo; 15 campos/cubre;n=7). B) Detalle de un cultivo tipo de OPCs a las 4 horas post-siembra en Sato de proliferación, tras su aislamiento a partir del cultivo glial mixto de corteza de rata. Barra escala 40 μ M.

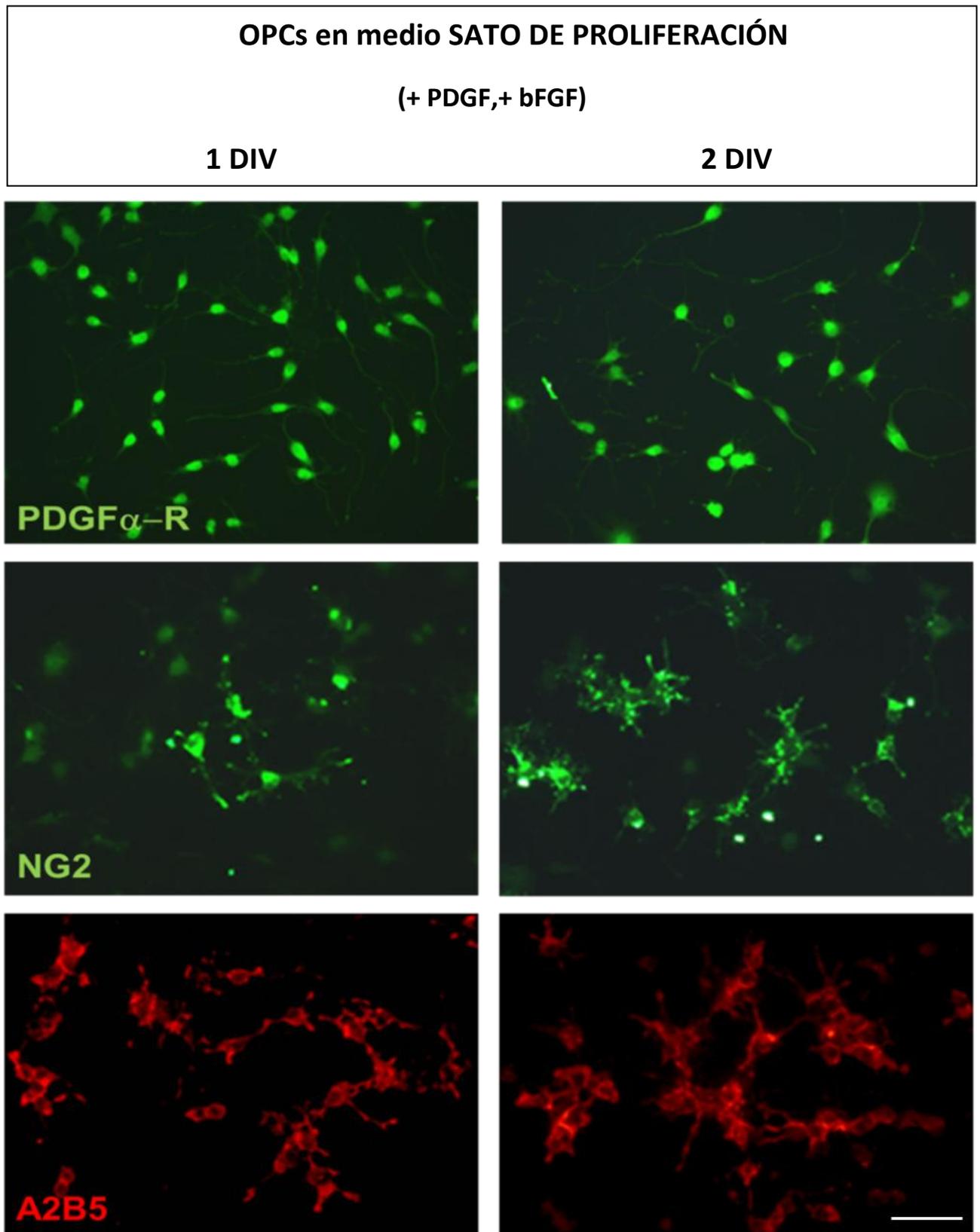


Figura 22. Expresión de marcadores oligodendrogiales asociados a estadios no maduros. Los OPCs se aislaron a partir de los cultivos gliales mixtos y se mantuvieron durante 1-2DIV en medio "Sato de proliferación". A continuación las células se fijaron y mediante técnicas inmunocitoquímicas se analizaron distintos marcadores específicos del estadio "célula progenitora de oligodendrocitos": PDGF α -R, NG2 y A2B5. Barra de escala 50 μ M.

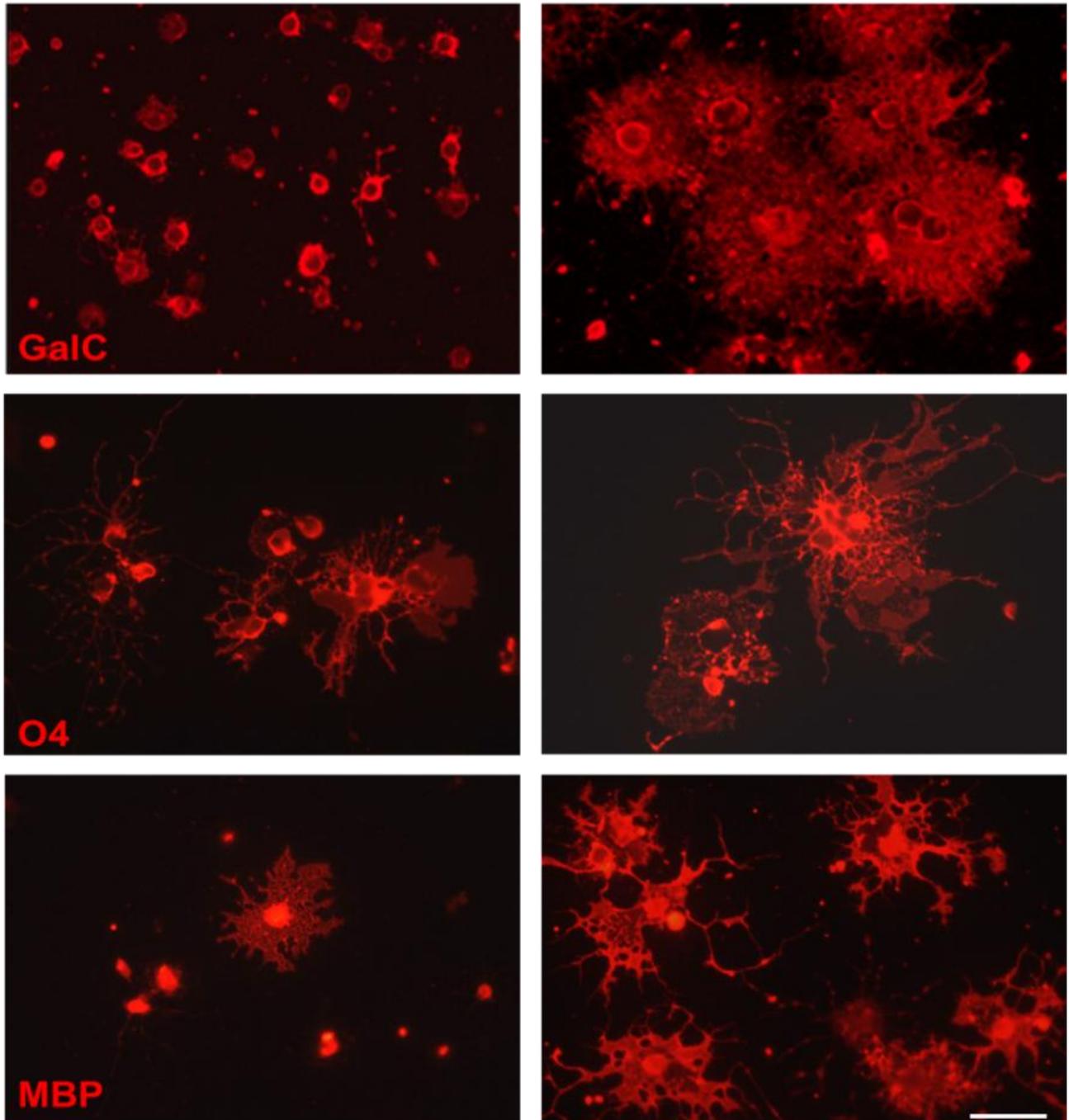
OPCs en medio SATO DE MADURACIÓN**(+ T3/T4; + CNTF/NT3)**

Figura 23. Expresión de marcadores oligodendrogliales característicos de estadios maduros. Los OPCs, aislados a partir de los cultivos gliales mixtos, se mantuvieron durante 1-2DIV en medio “Sato de diferenciación” antes de iniciar las técnicas inmunocitoquímicas. Se analizaron marcadores específicos del tránsito entre los estadios “pre-oligodendrocito” y “oligodendrocito maduro”: GalC, O4 y MBP. Barra de escala 50 μ M.

2. Mecanismos apoptóticos tempranos desencadenados por AMPA en oligodendrocitos

En trabajos previos, se ha establecido el marcado carácter apoptótico de la muerte celular oligodendroglial desencadenada bajo condiciones de excitotoxicidad glutamatérgica.

Existe una variedad de estudios acerca de los principales eventos participes en este tipo de muerte, como son la entrada masiva de Ca^{+2} , la inherente disfunción mitocondrial que finalmente acarreará la liberación de citocromo-c, así como la activación de las caspasas 8, 9 y 3 (Sánchez-Gómez y cols., 2003; Leuchtmann, 2003). Además, se ha determinado la implicación de la proteína pro-apoptótica Bax en los fenómenos que ocurren a nivel mitocondrial como parte central del proceso apoptótico desencadenado por el evento excitotóxico (Ness y cols, 2004; Sánchez-Gómez, 2011).

En el presente trabajo se han abordado algunas líneas de investigación surgidas a partir del contexto creado por, entre otros, los trabajos citados anteriormente. Así, aunque la participación de mecanismos concretos en este proceso de muerte excitotóxica es firme, nuestro objetivo fundamental ha sido llevar a cabo el análisis de diversas moléculas y vías de señalización celular que, a priori, se mostraban como potentes moduladores de estas señales de alteración oligodendroglial y cuyo equilibrio puede ser clave en el destino final de la célula.

2.1 La caspasa-8 es un elemento clave en las etapas iniciales del proceso apoptótico

Durante las fases tempranas de la apoptosis, las caspasas iniciadoras como la 8 o la 9 se activan y catalizan la maduración proteolítica de las caspasas efectoras (3,6, y 7). Además de una posible función directa sobre las caspasas efectoras, se ha sugerido la participación de la caspasa-8 en los procesos que provocan la activación de la proteína Bid, miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2. Esta proteína es parte de la ruta apoptótica intrínseca, pues contribuye a las alteraciones mitocondriales que en ésta ocurren.

Si bien se ha sugerido ya la participación de la caspasa-8 en la muerte apoptótica por excitotoxicidad de oligodendrocitos obtenidos de nervio óptico de rata (Sánchez-Gómez y cols., 2003, 2011), quisimos comprobar su implicación en el daño ocasionado por AMPA en oligodendrocitos procedentes de cultivos mixtos gliales y analizar la posible interacción con su diana, Bid. Para ello, preincubamos las células con el inhibidor farmacológico específico para la caspasa-8 (Ac-IETD-CHO; 100 μ M, 30 min), antes de someterlas a nuestro estímulo excitotóxico habitual con AMPA (10 μ M, 30min) y la viabilidad celular fue cuantificada 24 horas después. En estas condiciones, pudimos observar que la inhibición de la caspasa-8 producía el efecto protector descrito previamente y que la muerte desencadenada por la estimulación moderada de los receptores AMPA (17.12 ± 2.89 ; n=3) disminuía de manera significativa en presencia del inhibidor de esta caspasa (8.92 ± 1.46 ; n=3; $p < 0.05$)

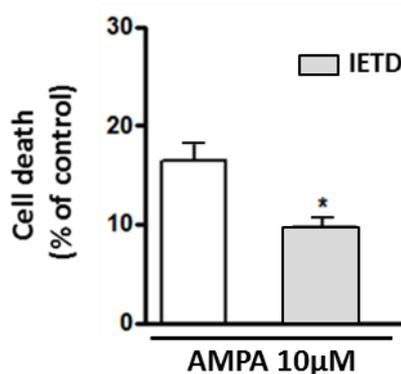


Figura 24. La inhibición de la caspasa-8 reduce la muerte excitotóxica provocada por la activación de los receptores AMPA en cultivos de oligodendrocitos corticales. Los oligodendrocitos fueron preincubados durante 30 min con IETD (100 µM) antes de ser expuestos a AMPA (10 µM; 30 min). Para determinar la viabilidad celular se empleó la sonda calcein-AM, 24 horas después (n=3). Los datos representan las medias \pm SEM (*p<0.05 comparado con las células tratadas únicamente con agonista).

A continuación, nos dispusimos a analizar el comportamiento de esta molécula, caspasa-8, así como el de su diana molecular más inmediata, BID, durante el proceso excitotóxico en oligodendrocitos. En este sentido, se ha descrito ampliamente la implicación de la caspasa-8 como uno de los posibles mecanismos de activación de Bid (Bossy-wetzels y Green., 1999; Slee y cols., 1999; Yin., 2006), ya que contribuye a la aparición de su forma truncada y activa, t-Bid. Esta forma activa, se transloca del citoplasma a la membrana mitocondrial externa pudiendo contribuir, entre otros, a la oligomerización e inserción de Bax en la membrana mitocondrial. Sus acciones redundan, por tanto, en la potenciación de las alteraciones ocasionadas por el estímulo apoptótico principalmente a nivel mitocondrial (Lowell y cols., 2008).

Teniendo esto en cuenta analizamos, mediante Western blot, el nivel de expresión tanto de la caspasa-8 como de BID tras la activación de los receptores AMPA en ausencia/presencia del inhibidor IETD. Como se muestra en la figura 25, pudimos observar que, en respuesta al estímulo con 10 µM de AMPA durante 30 min, el nivel de expresión de la pro-caspasa 8 (zimógeno, no activo) experimentaba una disminución a los respecto a los niveles control, tanto a los 10 min como a los 30 min post-estímulo, ($61,62 \pm 11,24\%$ y $46,36 \pm 7,42\%$, respectivamente). De la misma manera, la proteína BID total (no activa) también disminuía a los 30 min después del estímulo con AMPA ($62,69 \pm 4,96\%$, respecto al 100% control). Esta reducción en la expresión de las proteínas totales, no activas, indicaba un incremento en la presencia de las proteínas activas correspondientes, que surgen como consecuencia de la proteólisis de las primeras. Sin embargo, cuando las células fueron pretratadas con el inhibidor IETD (100 µM, 30 min), esta disminución en el nivel de expresión proteica, tanto de la caspasa-8 como de Bid total no pudo ser observada (Fig. 25).

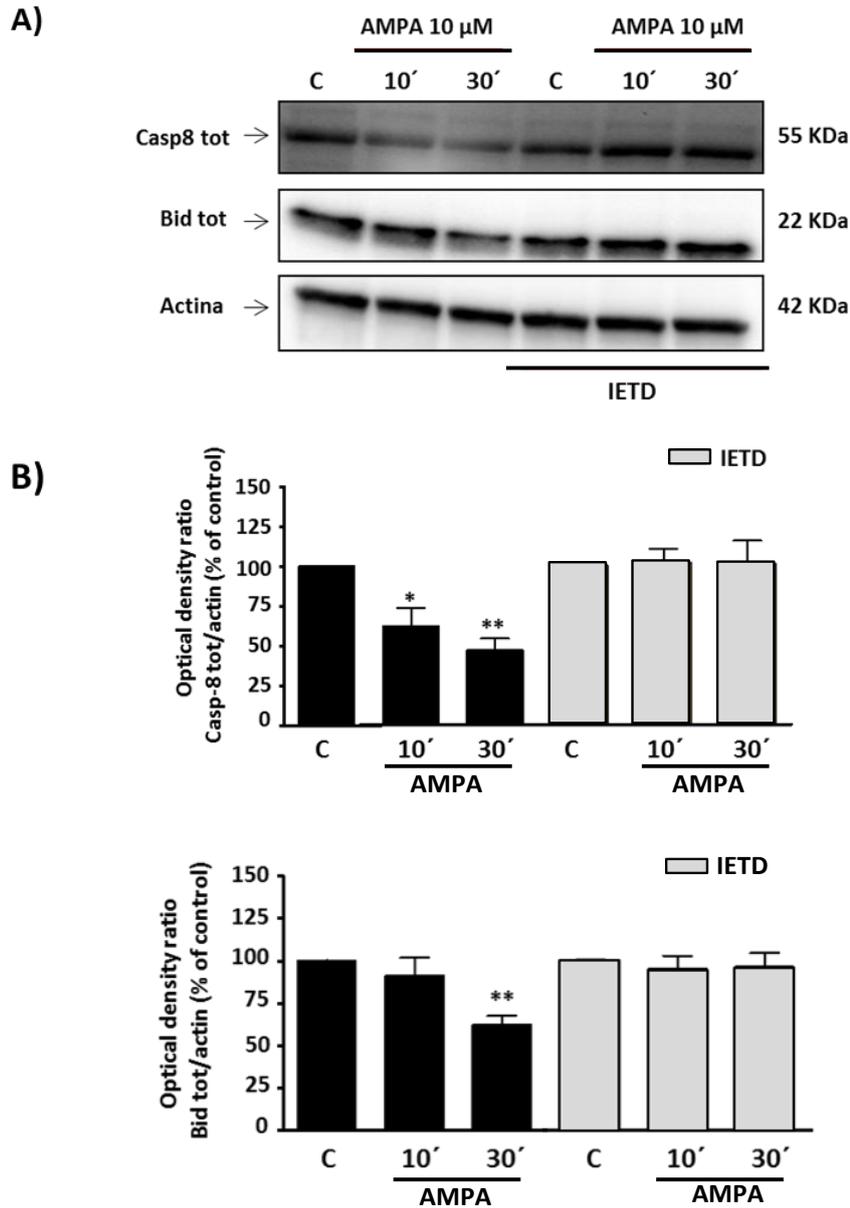


Figura 25. El inhibidor de la caspasa-8, IETD, reduce tanto la pérdida de la forma total de la caspasa-8 como la de su diana molecular, BID. Los oligodendrocitos fueron preincubados durante 30 min con IETD (100 μ M) antes de ser estimulados con AMPA (10 μ M, 30 min) en ausencia o presencia de IETD. A) La proteína total fue recogida 10 y 30 min después del estímulo con AMPA y se analizaron los niveles de expresión de la caspasa-8 total y Bid total mediante western blot. B) Los histogramas representan los valores de densidad óptica de la caspasa-8 total y BID total normalizados frente a actina. Los datos representan las medias \pm SEM. (n=3) *p<0.05; **p<0.01 comparado con la situación control.

2.2. La activación de los receptores AMPA en oligodendrocitos ocasiona la pérdida del elemento represor de caspasas, c-FLIP

En base a lo mostrado en el apartado anterior, se planteó la posible implicación de c-FLIP, “molécula represora de caspasas”, en el mecanismo de muerte ocasionado por AMPA en oligodendrocitos, sobre todo teniendo en cuenta que trabajos previos han descrito la influencia represora de esta molécula en el supuesto de activación de la caspasa-8 (Kataoka y cols., 2005). En primer término, se analizó la presencia de c-FLIP en los cultivos de oligodendrocitos objetos de este estudio durante los distintos días de su mantenimiento *in vitro*, para lo cual se llevaron a cabo tinciones inmunofluorescentes utilizando el anticuerpo específico anti-c-FLIP L/S. Como se muestra en la figura 26 los oligodendrocitos expresan c-FLIP desde su primer día *in vitro* y su presencia no se reduce a lo largo de los días analizados.

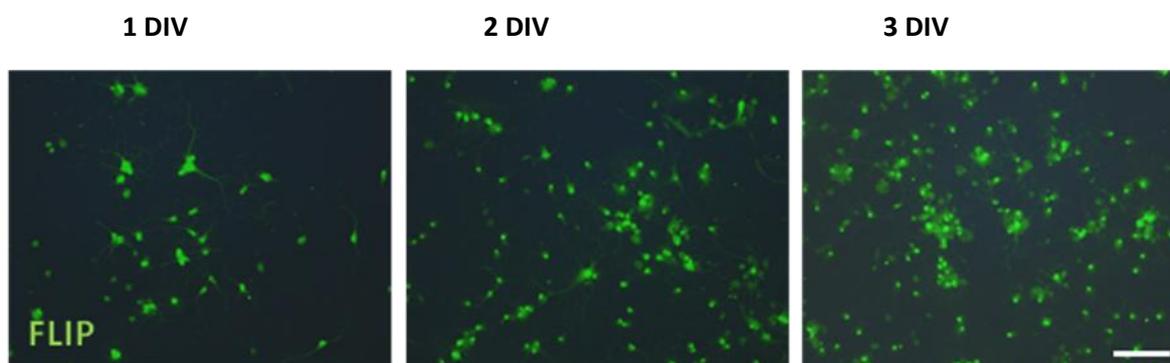


Figura 26. Expresión de c-FLIP en cultivos de células oligodendrogiales a lo largo de su mantenimiento *in vitro*. Los oligodendrocitos, derivados de OPCs, fueron mantenidos en medio Sato de maduración y fijados tras 1, 2 o 3 DIV. Las células fueron incubadas con el anticuerpo específico para c-FLIP y observadas al microscopio de fluorescencia. Los niveles de expresión de c-FLIP se mantuvieron constantes durante los distintos días analizados. Barra de escala: 50 μ M.

Una vez confirmada la presencia de c-FLIP en nuestros cultivos, nos dispusimos a analizar su posible participación en nuestro modelo de excitotoxicidad *in vitro*. Para ello, los cultivos de oligodendrocitos fueron estimulados con AMPA (10 μ M; 30 minutos) y la proteína total se recogió entre los 10 min y las 2 horas posteriores a la retirada del estímulo (Fig. 27). Mediante western blot y empleando el anticuerpo específico para c-FLIP L/S pudimos detectar una disminución temprana, progresiva y significativa en todos los tiempos analizados (10, 30, 60 y 120 minutos) en los niveles de dicha molécula anti-apoptótica ($58,74 \pm 10,90\%$; $40,20 \pm 9,35\%$; $34,23 \pm 9,12\%$ y $15,93 \pm 6,52\%$, respectivamente, comparado con la situación control 100%). Este resultado tiene implícita la pérdida de las acciones inhibitorias intrínsecas de c-FLIP, situación que estaría facilitando el progreso de las etapas iniciales de la cascada apoptótica.

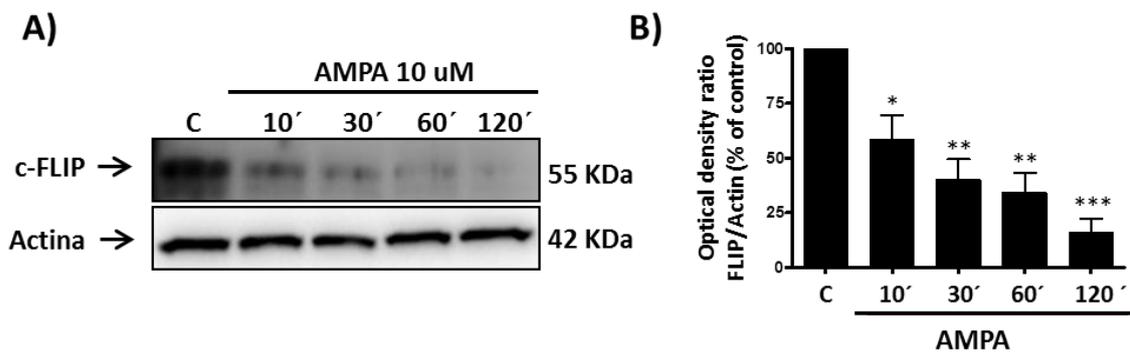


Figura 27. La excitotoxicidad mediada por AMPA induce una disminución temprana en los niveles de c-FLIP. Los oligodendrocitos fueron tratados con AMPA. A) La proteína total se recogió siguiendo un curso temporal que abarcaba desde los 10 minutos hasta las 2horas posteriores a la retirada del estímulo. A continuación se analizó mediante Western Blot la expresión de c-FLIP. Los datos representan las medias \pm S.E.M. de los valores de densidad óptica normalizados frente a la actina (n=3) * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001 comparado con la situación control

La confirmación de este hecho se puede observar en la figura 28 donde se muestran los patrones temporales de expresión tanto de c-FLIP como de la caspasa-8 en sus formas total y activa. Como se puede apreciar, el acontecimiento más inmediato tras el estímulo con AMPA es la pérdida de c-FLIP, que establece las condiciones propicias para la activación de la caspasa-8, reflejada en la bajada significativa de los niveles de la caspasa-8 total (55 KDa) y el incremento de su forma activa (18 KDa).

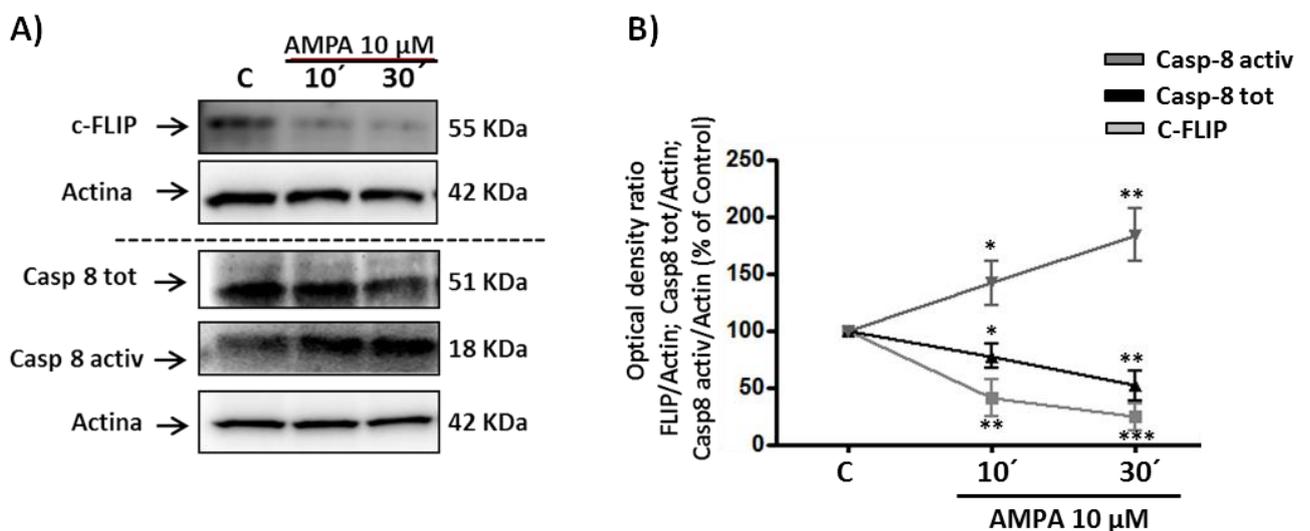


Figura 28. Patrón temporal de la activación de la caspasa-8. Los oligodendrocitos fueron tratados con AMPA. (10μM) durante 30 min. La proteína total se recogió a los 10 y 30 min tras la retirada del estímulo y mediante western blot se analizó la expresión de c-FLIP, caspasa-8 total y caspasa-8 activa. A) Wester blot representativo de la expresión de las diferentes proteínas analizadas. B) Perfil de expresión de la caspasa-8 activa, caspasa-8 total y c-FLIP a lo largo del tiempo post-estímulo, normalizado frente a la expresión de actina correspondiente. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 comparado con la situación control.

En conclusión, los resultados expuestos hasta el momento sugieren una activación temprana de la caspasa-8 posibilitada por la desaparición de su represor constitutivo, c-FLIP. La activación de esta caspasa es considerada el paso inicial de la vía extrínseca de la apoptosis pero, a su vez, es una pieza clave en la conexión con la vía intrínseca mitocondrial a través del proceso de activación de Bid. Teniendo esto en cuenta, decidimos analizar de manera más exhaustiva el papel de Bid en los mecanismos de muerte celular inducida por la activación de los receptores AMPA en oligodendrocitos.

2.3. El procesamiento de Bid participa en la muerte excitotóxica oligodendroglial mediada por AMPA

Como hemos mencionado anteriormente, distintos trabajos revelan la estrecha relación entre la caspasa-8 y el proceso de activación de Bid en ciertos contextos apoptóticos (Garibal y cols., 2010; Paintlia y cols, 2011; Kaufmann y cols. 2012). En nuestro modelo hemos mostrado cómo la inhibición farmacológica de la citada caspasa-8 evita la disminución en los niveles de la pro-caspasa-8 y de Bid total, hecho que indica la existencia de un vínculo entre ambas moléculas de forma acorde a la literatura previa (ver figura 25). La molécula Bid, proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2, interviene en la alteración de la membrana mitocondrial externa (OMM) a través de su inserción y su unión a Bax, otro miembro pro-apoptótico de la misma familia, lo que supone un evento crítico en los mecanismos de muerte por apoptosis (Li y cols., 1998; Lowell y cols., 2008; Grohm y cols, 2010; Shelton y col., 2009; Cabon y cols., 2012). Para analizar la implicación de Bid en nuestro modelo de excitotoxicidad usamos un inhibidor farmacológico que impide su activación, denominado BI6C9, cuyos efectos protectores han sido descritos previamente (Culmsee y cols, 2005; Köhler y cols, 2008). La inhibición de la activación de Bid mediante BI6C9, 50 μ M, que no mostró signos de toxicidad *per se*, redujo de manera significativa la muerte oligodendroglial provocada por la activación moderada de los receptores AMPA ($13.67 \pm 1.70\%$ frente a $7.58 \pm 1.36\%$; $n=3$; $p<0.05$; Fig. 29A). Además, como se puede observar en la figura 29B, la generación de ROS inducida por AMPA en oligodendrocitos ($146,3 \pm 13,08\%$) quedó inhibida completamente, hasta valores control, en presencia del inhibidor BI6C9 ($92,81 \pm 6,40\%$).

Por último, analizamos la alteración mitocondrial ocasionada por el agonista AMPA en ausencia y presencia del inhibidor BI6C9, a diferentes tiempos post-estímulo, mediante la sonda JC-1 (Fig 29C). Observamos que la pérdida progresiva del potencial de la membrana mitocondrial inducida por AMPA no tuvo lugar en presencia del inhibidor de Bid. Además, las diferencias entre las dos situaciones experimentales fueron estadísticamente significativas a partir de los 30 min y fueron aumentando de manera progresiva a lo largo de los tiempos analizados hasta los 120 min post-estímulo. Estos resultados sugieren una implicación de Bid en la disfunción mitocondrial y en la muerte celular ocasionada por la activación moderada de los receptores AMPA en oligodendrocitos.

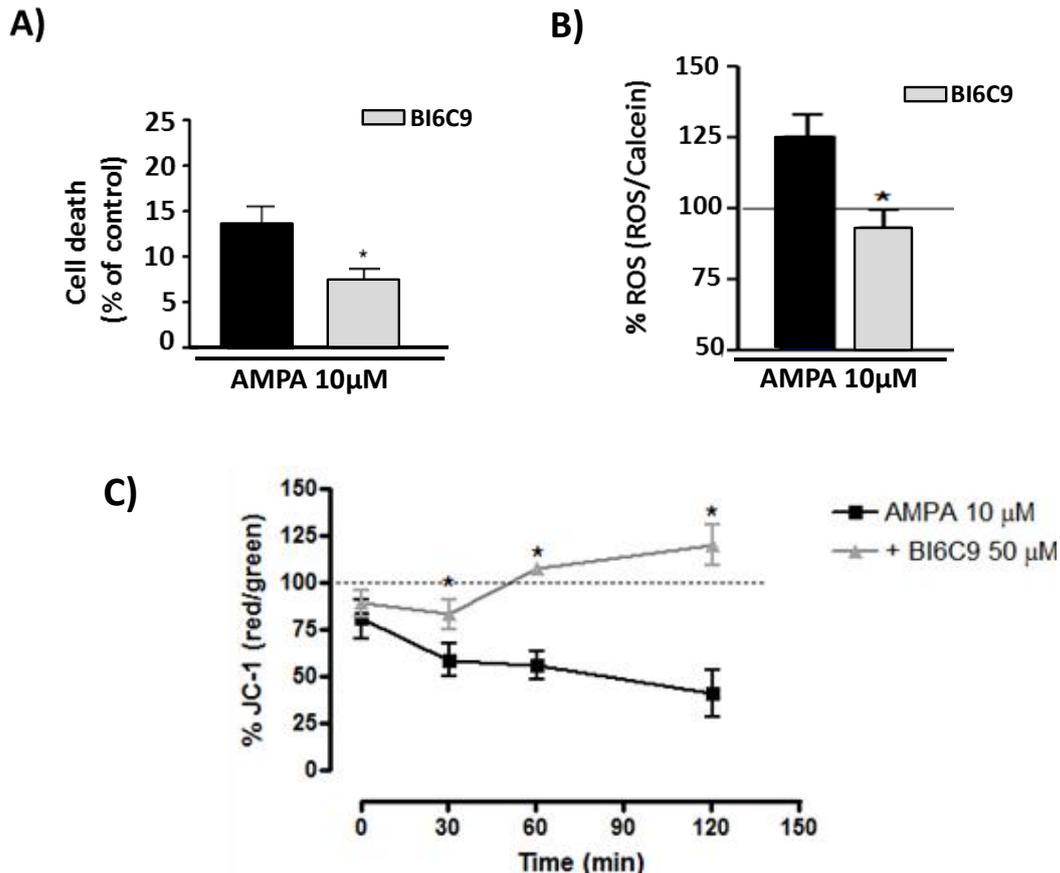


Figura 29 La inhibición de Bid, mediante BI6C9, reduce la muerte oligodendroglial y la alteración mitocondrial ocasionada por la activación de los receptores AMPA. Los oligodendrocitos fueron pre-incubados durante 30 min con BI6C9 (50 μ M) antes de su exposición a AMPA 10 μ M, 30 min. A) La determinación de la viabilidad celular se llevó a cabo 24 horas después mediante la sonda calcein-AM. Los datos representan las medias \pm S.E.M. (n=4). *p<0,05 comparado con las células tratadas únicamente con agonista. B) La generación de ROS se midió mediante la sonda DCFDA. Los valores de las células control, no tratadas, se consideraron como 100% de generación de ROS. Se representa la media \pm S.E.M (n=3). *p< 0,05 comparado con las células tratadas únicamente con AMPA. C) Tras el estímulo con AMPA se añadió la sonda JC-1 y se midió el potencial de la membrana mitocondrial cada 30 min. El tiempo 0 representa el primer tiempo de lectura tras la incubación con la sonda. El potencial de la membrana mitocondrial de las células no tratadas se consideró control (100%) en cada tiempo analizado, Se representa la media \pm S.E.M (n=3). *p< 0,05 comparado con las células tratadas únicamente con agonista.

Una vez establecido el efecto protector que la inhibición de Bid ejerce en la excitotoxicidad oligodendroglial, analizamos mediante western blot el estado de esta molécula en las diferentes situaciones. Para ello, los oligodendrocitos fueron expuestos a AMPA (10 μ M; 30 min) en ausencia o presencia del inhibidor BI6C9 y la proteína total fue recogida a las 2 y 4 horas tras la retirada del agonista. Como se muestra en la figura 30, el estímulo de los receptores AMPA provocó una disminución en la expresión de Bid total comparado con la situación control (69,20 \pm 8,26% y 65,60 \pm 5,54%, tras 2 y 4 horas respectivamente), fenómeno que no tuvo lugar en presencia del inhibidor BI6C9 (100,8 \pm 5,04% y 113,2 \pm 6,65%, para los dos tiempos analizados). Además, la aparición de la forma truncada, t-bid, pudo detectarse a las 2 horas (128,7 \pm 5,05%) y aumentó de manera evidente tras 4 horas post-estímulo (173,0 \pm 3,70%), siempre comparado con las células control no tratadas. Este incremento, sin embargo, no pudo

ser observado en presencia del inhibidor de Bid, BI6C9 ($104,9 \pm 5,03\%$ y $81,16 \pm 11,02\%$, respectivamente).

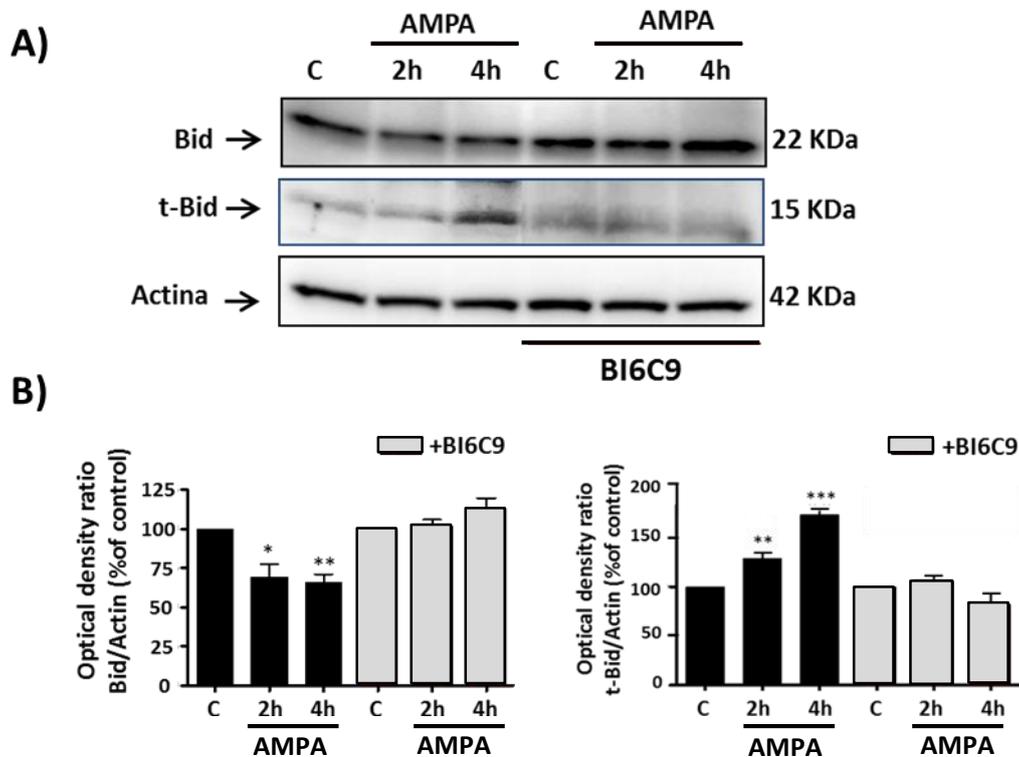


Figura 30. La presencia del inhibidor BI6C9 durante los estímulos excitotóxicos reduce la acumulación de la forma activa de Bid, t-Bid. Los oligodendrocitos fueron pre-incubados durante 30 min con BI6C9 (50 μ M) antes de su exposición a AMPA (10 μ M, 30 min) y la proteína total fue recogida a las 2 y 4 horas después del estímulo. A) Mediante western blot se analizaron los niveles de expresión de Bid total, Bid truncado (t-bid) y actina en las distintas situaciones. B) Cuantificación de la densidad óptica que pone de manifiesto la correlación entre la reducción en los niveles de Bid y el incremento en los niveles de t-Bid. Este mecanismo de activación de Bid es revertido en presencia de BI6C9. Los valores corresponden a la densidad óptica de Bid y t-Bid normalizada frente a la de actina, y representan la media \pm SEM (n=3) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparado con la situación control.

Ha sido descrito de manera extensa cómo el procesamiento de Bid por la caspasa-8 generando su forma activa o truncada, t-Bid, facilita su inserción en la membrana mitocondrial externa, contribuye a la liberación de citocromo-c desde la mitocondria al citosol y provoca la subsecuente activación de caspasas (Gogvadze y cols, 2006; Kantari y Walczack, 2011). En la figura anterior queda de manifiesto el incremento significativo de t-bid tras la activación de los receptores AMPA en oligodendrocitos. De acuerdo con esta información, pudimos observar mediante análisis de q-PCR que la expresión génica de Bid en oligodendrocitos no sufría cambios significativos en respuesta a AMPA (Fig. 31A), lo que sugiere que los efectos pro-apoptóticos mediados por Bid dependen no tanto del incremento en su expresión génica como de su procesamiento y tasa de conversión en t-bid, tal y como ha quedado de manifiesto mediante el análisis proteico por western blot mostrado en la figura anterior (Fig. 30). Además, la movilización de Bid hacia las inmediaciones mitocondriales supone una condición necesaria para su procesamiento,

inserción y finalmente acción sobre dicho orgánulo. Un indicio más acerca de la participación de Bid en los procesos apoptóticos mediados por AMPA en oligodendrocitos lo constituye el hecho de que, tras el estímulo excitotóxico, la molécula PACS-2 manifiesta cambios en su distribución intracelular. Esta proteína ha sido identificada como un elemento partícipe en eventos apoptóticos, y particularmente en aquellos que implican activación de Bid, debido a que posibilita su movilización hacia el entorno mitocondrial facilitando su procesamiento final (Simmen y cols, 2005; Brasacchio y cols, 2014). Para comprobar si AMPA ejercía algún cambio en los niveles de expresión de PACS-2 en oligodendrocitos, en primer lugar analizamos mediante q-PCR su expresión génica y, como se observa en la figura 31B, no pudimos determinar cambios significativos en los dos tiempos analizados. Sin embargo, y mediante inmunocitoquímica, pudimos detectar tanto un incremento en los niveles de expresión proteica como una clara redistribución de esta proteína tras el estímulo moderado de los receptores AMPA en oligodendrocitos (10 μ M; 30 min). Así, la figura 31C muestra un aumento de la presencia de PACS-2 en espacios citoplasmáticos asociados a mitocondrias, identificadas por el marcador mitocondrial COX-IV (índice de correlación de Pearson de 0,78). De forma complementaria hemos podido determinar la colocalización de PACS2 y Bid (índice de correlación de Pearson de 0,81), a nivel mitocondrial, durante las etapas iniciales del mecanismo apoptótico (figura 32).

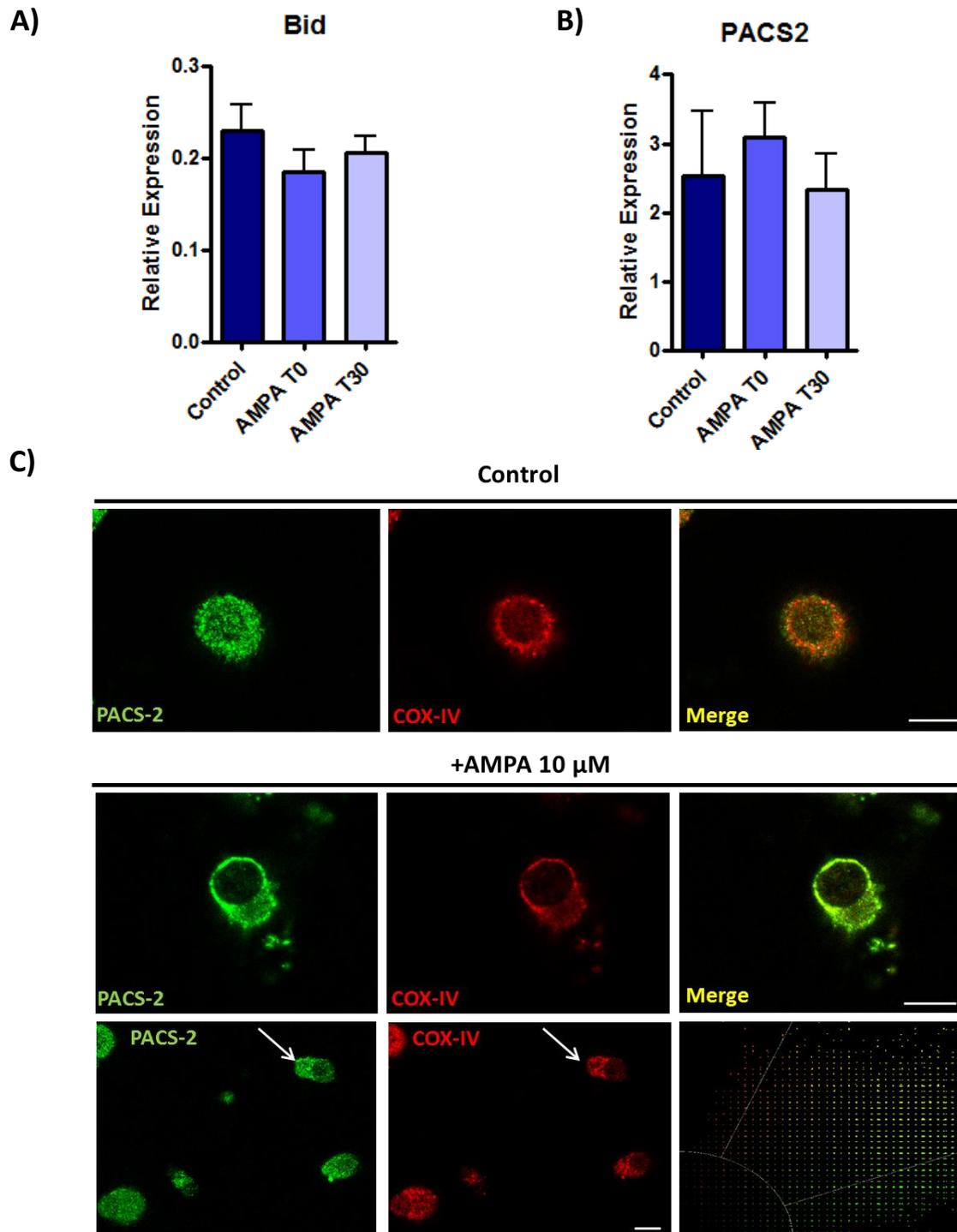


Figura 31. Análisis de la expresión de Bid y PACS2 tras la estimulación de los receptores AMPA de oligodendrocitos. A) y B) Los niveles de expresión génica de Bid y PACS2 fueron analizados mediante q-PCR en cultivos de oligodendrocitos expuestos a AMPA (10 μ M) durante 30 min. El procesamiento para la obtención del RNA se inició tras la retirada del estímulo (T0) y 30 min después (T30), siguiendo el protocolo descrito en el apartado Materiales y Métodos. Los valores obtenidos fueron normalizados con un factor dependiente de tres genes constitutivos y el software GeNorm. Los datos expresados corresponden a las medias \pm SEM ($n=3$). C) La estimulación de los receptores AMPA en oligodendrocitos provoca la movilización de PACS-2 al entorno mitocondrial (flechas). Los oligodendrocitos fueron expuestos a AMPA (10 μ M) durante 30 min, se fijaron 30 min después y fueron procesados mediante doble inmunofluorescencia para la detección de la molécula PACS-2 (verde) y COX-IV (rojo; marcador mitocondrial). Barra de escala: 10 μ M.

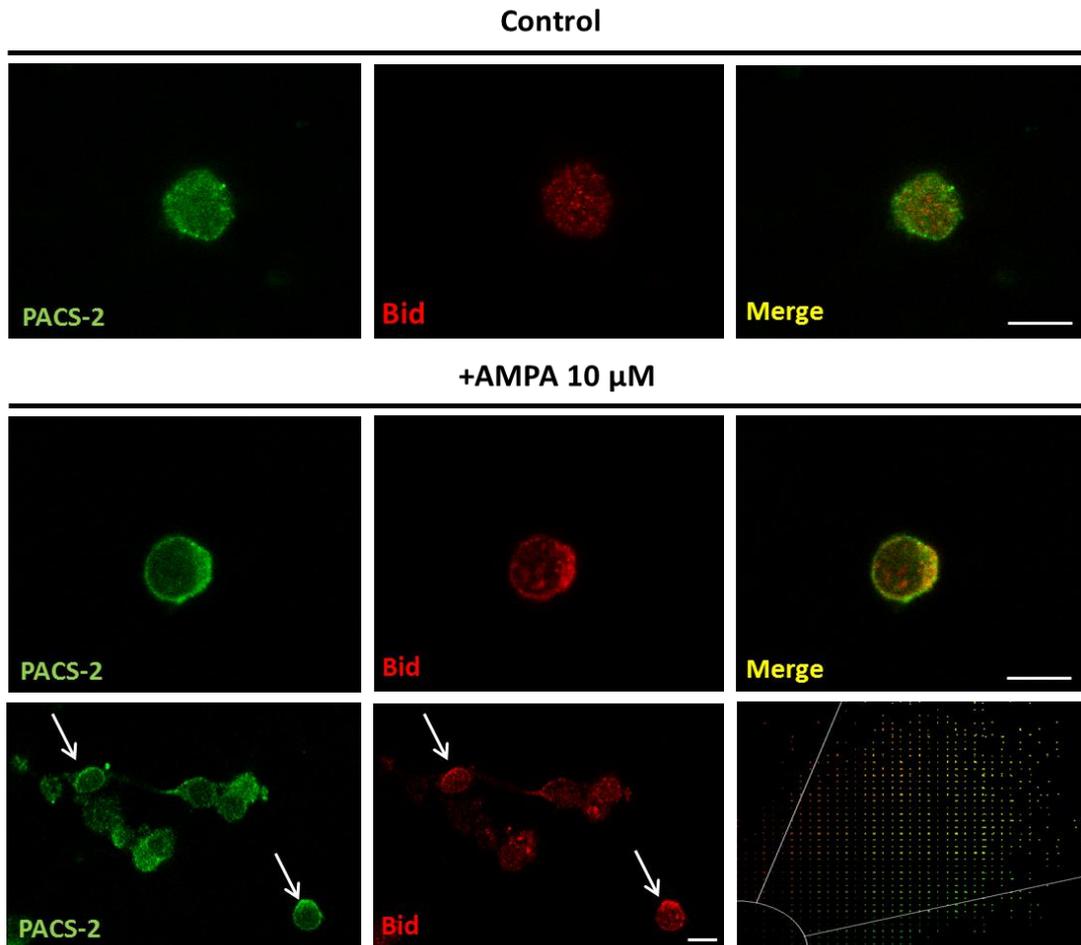


Figura 32. Análisis de la expresión de PACS2 y Bid tras la estimulación de los receptores AMPA de oligodendrocitos. La estimulación de los receptores AMPA en oligodendrocitos provoca la movilización de PACS-2 y Bid al entorno mitocondrial (flechas). Los oligodendrocitos fueron expuestos a AMPA (10 μ M) durante 30 min, se fijaron 30 min después y fueron procesados mediante doble inmunofluorescencia para la detección de la molécula PACS-2 (verde) y Bid (rojo). En el panel inferior derecho, se muestra el diagrama que recoge la colocalización de PACS2 y Bid a nivel mitocondrial, tras la estimulación moderada de los receptores AMPA de oligodendrocitos. Barras de escala: 10 μ M.

Finalmente, y con el objetivo de confirmar el efecto oligoprotector de la inhibición de Bid en un modelo de mayor complejidad, sometimos a los nervios ópticos *ex vivo*, aislados de ratón, a estímulos excitotóxicos en ausencia o presencia de BI6C9. Este modelo experimental ha sido utilizado en varias ocasiones a lo largo del presente trabajo con el objetivo de confirmar la participación de vías y/o moléculas de señalización en el proceso apoptótico que nos ocupa. Para ello se emplearon ratones transgénicos *PLP-DsRed*, caracterizados por la presencia del reportero fluorescente Ds-Red bajo el control de la proteína promotora lipídica específica glial (PLP), modelo que posibilita la identificación específica de las células oligodendrogliales bajo un microscopio de fluorescencia.

En estos experimentos se trabajó con la estructura íntegra del nervio óptico, únicamente aislado y liberado de las meninges que lo recubren. La activación de los receptores AMPA se llevó a cabo en medio artificial aCSF saturado en oxígeno, que proporciona las condiciones adecuadas para la disolución del agonista glutamatérgico (AMPA 100 μ M; 2 horas) y del inhibidor BI6C9 (100 μ M). Una vez concluido el estímulo excitotóxico, en presencia o ausencia del inhibidor, se determinó la liberación de LDH durante los 90 min inmediatamente posteriores, con lecturas cada 30 minutos, como método complementario al posterior análisis histológico de los distintos nervios ópticos. En la figura 33 se muestra cómo el incremento en la liberación de LDH observado ya a los 30 minutos y que alcanza su pico máximo entre los 60 y 90 minutos posteriores a la retirada del estímulo excitotóxico se ve limitado de forma significativa por la presencia del BI6C9 en todos los tiempos analizados, de forma especialmente notable en los intervalos de máxima liberación de LDH.

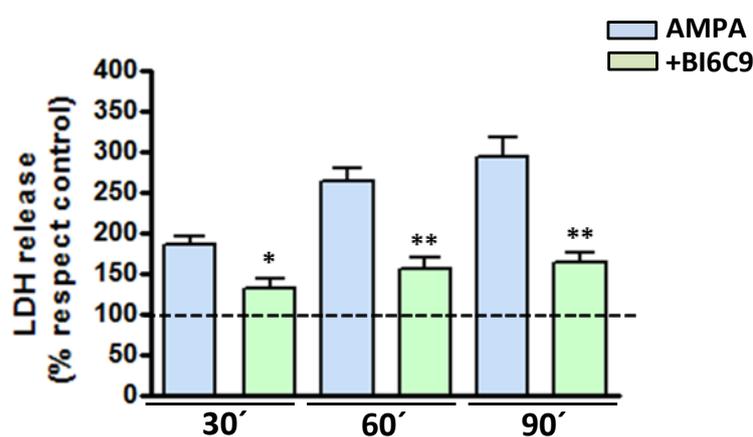


Figura 33. La inhibición de Bid, mediante BI6C9, reduce la liberación de LDH por parte de los nervios ópticos de ratones PLP-DsRed inducida por la estimulación de los receptores AMPA. Los nervios ópticos, una vez aislados, fueron pre-incubados en medio aCSF en ausencia o presencia de BI6C9 (100 μ M) durante 1 hora y posteriormente estimulados con AMPA (100 μ M; 2 horas) previa adición de CTZ (100 μ M; 15 min). El incremento en la liberación de LDH ocasionado por la estimulación de los receptores AMPA y observado a los distintos tiempos analizados (30, 60 y 90 min) disminuyó de forma significativa en presencia de BI6C9. Los datos se muestran como medias \pm SEM (n=3). *p<0.05, **p<0.01 comparado con los nervios ópticos tratados únicamente con agonista.

Una vez concluidos los 90 min post-estímulo, los nervios ópticos fueron fijados con paraformaldehído y montados directamente sobre el portaobjetos para su observación y análisis bajo microscopía confocal. En la figura 34 se muestran imágenes representativas de los nervios ópticos analizados en situación control y tras la activación de los receptores AMPA en ausencia o presencia de BI6C9, así como la cuantificación de la intensidad de la fluorescencia en cada caso. Tras el análisis estadístico del área ocupada por la fluorescencia en todos los planos (z-stack) y a lo largo de toda su longitud, pudo observarse cómo la activación de los receptores de AMPA provoca una pérdida significativa del número de oligodendrocitos que es atenuada en presencia del inhibidor de Bid, BI6C9.

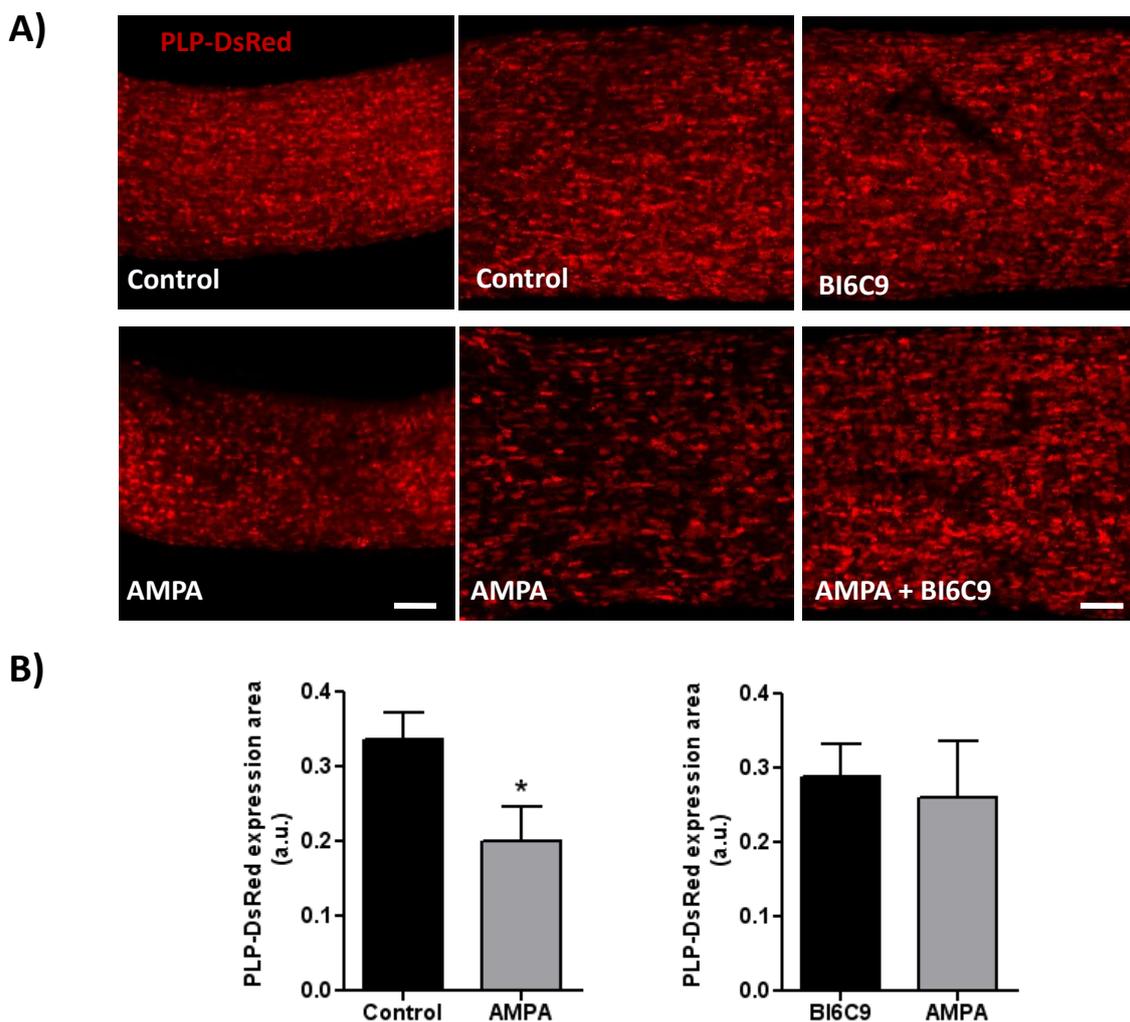


Figura 34. La inhibición de Bid atenúa el daño oligodendroglial mediado por la activación de los receptores AMPA en nervios ópticos aislados de ratones PLP-Ds Red. Los nervios ópticos, una vez aislados, fueron pre-incubados en medio aCSF en ausencia o presencia de BI6C9 (100 μ M) durante 1 hora y posteriormente estimulados con AMPA (100 μ M; 2 horas) previa adición de CTZ (100 μ M; 15 min). A) Imágenes representativas de los nervios ópticos de ratones PLP-Ds Red en las diferentes situaciones experimentales. B) Cuantificación de la señal fluorescente total de los diferentes z-stacks obtenidos de los nervios ópticos aislados. La pérdida significativa de oligodendrocitos (intensidad roja) provocada por la activación de los receptores AMPA, fue revertida en presencia de BI6C9. Los datos se muestran como medias \pm SEM, (n=3). *p<0.05 comparado con los nervios control. Barras de escala: 100 μ M (panel izdo) 200 μ M (panel dcho).

3. Papel del factor de transcripción p53 en el daño provocado por AMPA en oligodendrocitos

3.1. La activación de los receptores AMPA provoca la activación de p53

El factor de transcripción p53 resulta fundamental a la hora de activar respuestas celulares ante una gran variedad de estímulos tóxicos (Giaccia y Kastan, 1998; Vousden y Prives, 2009; Farnebo y cols, 2010). En situaciones que comprometen la integridad y funcionamiento celular, p53 no permanece ajeno y en una de sus vertientes de actuación, sufre modificaciones post-traduccionales que posibilitan su estabilización y acumulación a nivel nuclear. A este nivel, la mayoría de acciones de p53 conducen a la parada del ciclo celular así como a la inducción de vías de muerte mediante la potenciación de la expresión de genes apoptóticos (Yu y Zhang, 2005; Kuribayashi, 2008). Sin embargo, más recientemente se han sugerido otras funciones de p53 implicadas en el desarrollo de programas de muerte celular pero en este caso independientes de su actividad transcripcional (Vaseba y cols, 2009; Nieminen y cols, 2013). Esta vía alternativa de acción, en muchas ocasiones complementaria a la anterior, requiere la acumulación de p53 en el citosol y/o en la mitocondria, así como su posible interacción con moléculas de la familia Bcl-2 (Moll y cols., 2005; Liu y cols., 2008). Teniendo esto en cuenta, nos planteamos evaluar la participación de p53 en el programa apoptótico acaecido en oligodendrocitos tras la activación de los receptores AMPA y para ello, empleamos dos inhibidores farmacológicos que actúan de manera diferencial sobre las dos vías de acción descritas para p53. Así, analizamos el efecto de pifitrin- α , un contrastado inhibidor de la actividad de p53 como factor de transcripción (Culmsee y cols., 2001; Walton y cols., 2005; Li y cols., 2008). Además atendiendo a la acción mitocondrial de p53, hemos empleado la pifitrin- μ , pequeña molécula que inhibe directamente la unión de p53 a la mitocondria y a las proteínas Bcl-2 y Bcl-xL, con una contrastada acción antiapoptótica y neuroprotectora (Strom y cols., 2006; Hagn y cols., 2010; Nijboer y cols., 2011) y cuyo efecto sobre p53 podría manifestarse también mediante una reducción en los niveles de p53 total (Solyakov y cols., 2009).

Los cultivos de oligodendrocitos fueron pre-incubados durante una hora con sendos inhibidores de p53 y sometidos a la activación habitual de los receptores AMPA (AMPA 10 μ M, 30 min). Bajo estas circunstancias se realizaron ensayos de viabilidad y se analizaron parámetros del daño mitocondrial como la disminución del potencial de membrana mitocondrial o la producción de especies reactivas de oxígeno. Así mismo, se analizó la expresión de p53 y PUMA mediante la técnica de western blot y se determinó mediante inmunocitoquímica la localización celular de p53 durante el proceso apoptótico desencadenado por el estímulo excitotóxico.

En primer término, los ensayos de toxicidad en los que se sometía a estudio la capacidad de ambos inhibidores de p53 a la hora de incrementar la viabilidad oligodendroglial frente al estímulo moderado de los receptores AMPA revelaron como la inhibición de p53 a ambos niveles reproducía el efecto protector descrito previamente. En este sentido, la muerte desencadenada por la estimulación moderada de los

receptores AMPA ($20,72 \pm 2,10\%$; $n=6$) disminuía de manera significativa en presencia pifithrina- α ($20\mu\text{M}$) ($9,84 \pm 1,18\%$; $n=6$; $p<0,01$), así como también en presencia de la pifithrina- μ ($1\mu\text{M}$) ($11,0 \pm 1,80\%$; $n=3$; $p<0,05$). Este papel protector que, a nivel de toxicidad, ofrecía la aplicación de pifithrin- α o de la pifithrin- μ , se vio extendido al análisis de los parámetros de daño a nivel mitocondrial ocasionado por la estimulación moderada de los receptores AMPA. En la figura 35B, se aprecia como el incremento en la producción de ROS inducido por la estimulación de los receptores AMPA en oligodendrocitos ($164,2 \pm 20,75\%$) quedó inhibido completamente tanto en presencia de la pifithrina- α ($77,24 \pm 14,48\%$) como de la pifithrina- μ ($100,4 \pm 7,81\%$).

Por último, se analizó la caída del potencial de membrana mitocondrial ocasionada por el agonista AMPA en ausencia o presencia de la pifithrin- α ($20\mu\text{M}$) o de la pifithrina- μ ($1\mu\text{M}$) a diferentes tiempos post-estímulo, mediante la sonda JC-1 (Fig 35C y 35D, respectivamente). Ambos compuestos, limitan la pérdida progresiva del potencial de la membrana mitocondrial inducida por AMPA: En el caso de la pifithrin- α , las diferencias entre las dos situaciones experimentales fueron estadísticamente significativas a partir de los 90 min y fueron aumentando de manera progresiva a lo largo de los tiempos analizados hasta los 120 min post-estímulo. Por su parte, la pifithrin- μ comienza a mostrar una inversión de la caída del potencial de membrana mitocondrial a partir de los 60 minutos post-estímulo que alcanza la significancia a los 120 minutos post-estímulo.

En conjunto, estos datos, evidencian la dualidad de acción núcleo/mitocondria de p53 en los mecanismos apoptóticos subyacentes a los procesos de muerte oligodendroglial ocasionados por la estimulación moderada de los receptores AMPA en nuestro modelo de excitotoxicidad.

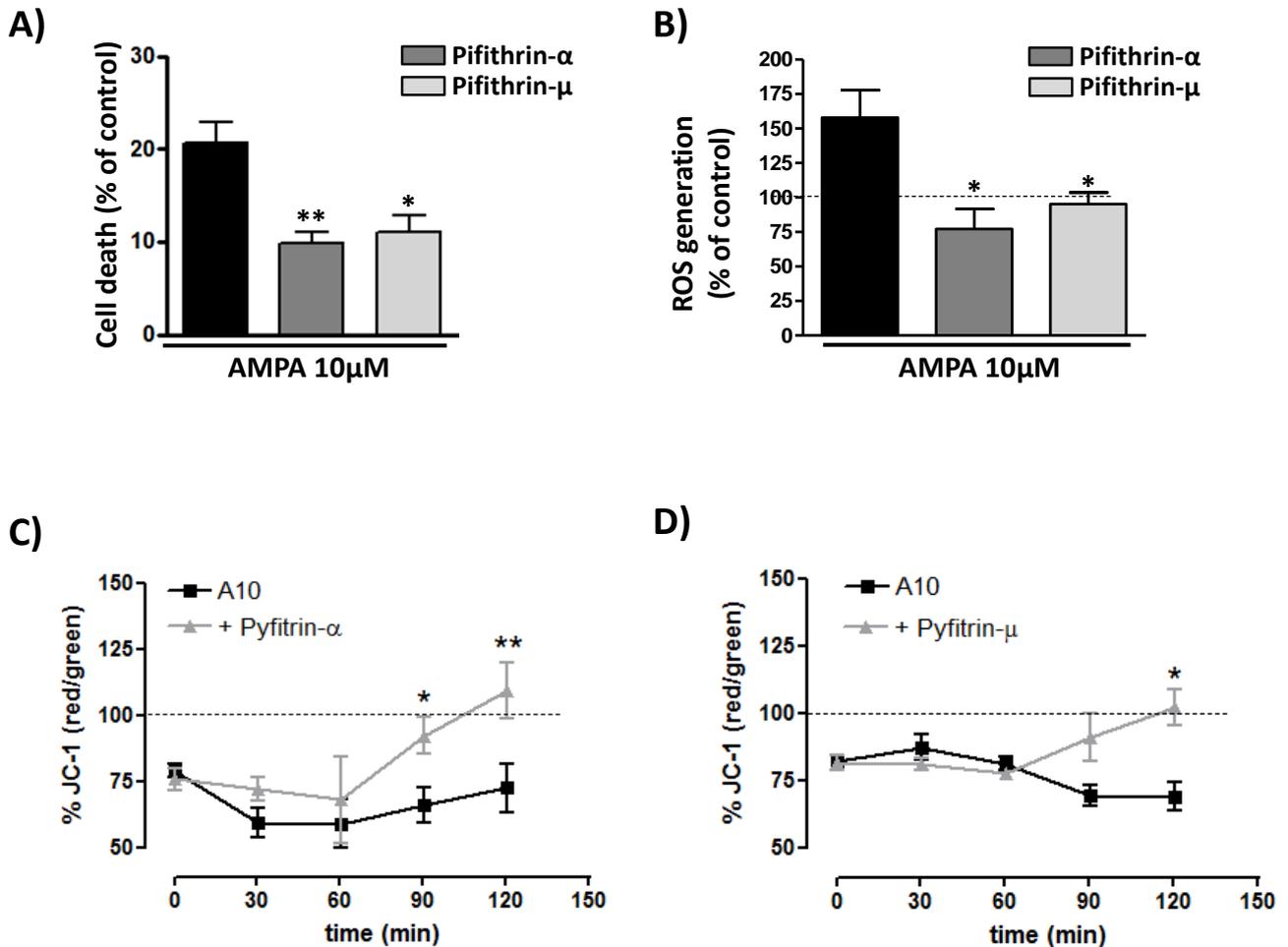


Figura 35. La inhibición de p53 a nivel transcripcional (pifithrin- α) o a nivel mitocondrial (pifithrin- μ) reduce la muerte oligodendroglial así como la alteración mitocondrial subyacente a la activación de los receptores AMPA. Los oligodendrocitos fueron preincubados con pifithrin- α (20 μ M) o pifithrin- μ (1 μ M) durante una hora. A continuación, se estimularon las células con AMPA (10 μ M) durante 30 min en presencia o ausencia de sendos inhibidores. A) La determinación de la viabilidad celular (24 horas después), se llevó a cabo mediante la sonda calcein-AM. Los datos representan las medias \pm S.E.M. (n=3) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con las células tratadas únicamente con agonista. B) La generación de ROS se cuantificó a través de la sonda DCFDA. Los valores de las células control, no tratadas, se consideraron un 100 % de generación de ROS. Se representa la media \pm S.E.M (n=3). * $p < 0,05$ comparado con las células tratadas únicamente con AMPA. C) y D) Tras el estímulo con AMPA, se añadió la sonda JC-1 y se midió el potencial de la membrana mitocondrial cada 30 min. El potencial de la membrana mitocondrial de las células no tratadas se consideró control (100%). Se representa la media \pm S.E.M (n=3). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparado con las células tratadas únicamente con agonista.

En vista de los anteriores resultados, se valoró la posibilidad de que el estímulo excitotóxico modificase los niveles de expresión de p53, hecho que queda reflejado en las imágenes de la figura 36, en las que se aprecia de forma general un incremento en los niveles de p53 en oligodendrocitos tras el estímulo de sus receptores AMPA (10 μ M, 30 min). Este incremento podría ser reflejo de un aumento de la estabilidad de p53 que a su vez, como ha sido descrito por otros autores, podría estar asociado a la potenciación de su papel como factor de transcripción (Allende-Vega y cols, 2012; Loughery y Meek, 2013).

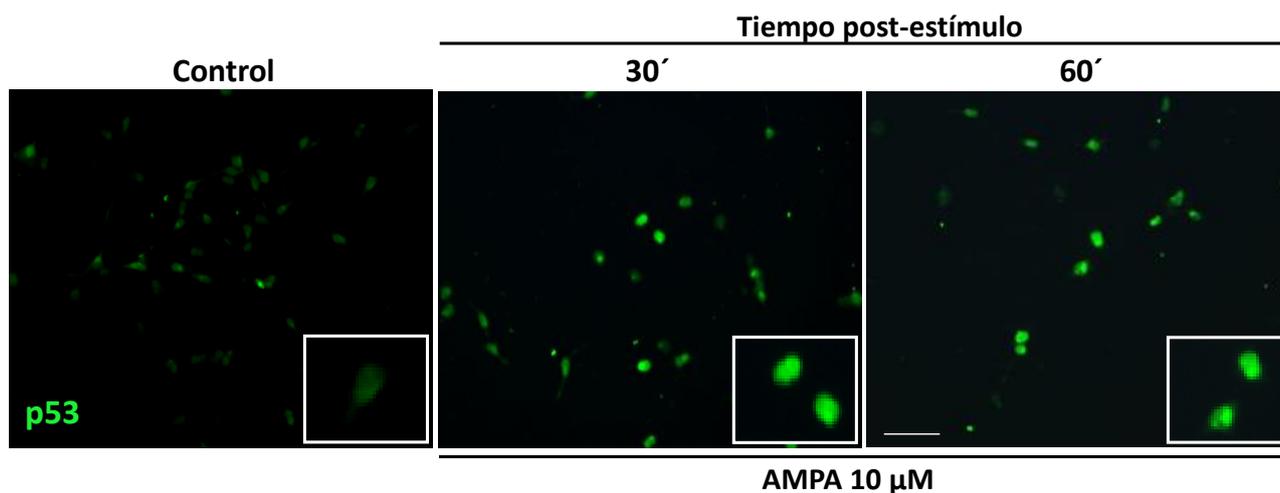


Figura 36. La activación de los receptores AMPA incrementa los niveles de expresión del factor de transcripción p53. Los oligodendrocitos fueron estimulados con AMPA (10 μ M) durante 30 min, fijados a distintos tiempos (60 y 180 min) tras la retirada del mismo y procesados para la detección de p53 mediante técnicas inmunocitoquímicas (ver Mat. y Mét). Barra de escala: 50 μ M.

Profundizando más acerca de la posible actividad transcripcional de p53 en nuestro contexto apoptótico, analizamos mediante qPCR la expresión génica de moléculas que tuvieran una clara interacción con el sistema p53 (Fig. 37). En condiciones normales, MDM2 es un represor de p53 cuya función es mantener controlados y reducidos los niveles de p53, entre otros mecanismos promoviendo su degradación (Shi y Wu, 2012). Sin embargo, en condiciones de estrés celular, la interacción p53-MDM2 se ve interrumpida. Este hecho conduce al incremento y estabilización de p53 y por ende posibilita, como hemos mencionado anteriormente, su acción a nivel transcripcional así como, en nuestro caso, la ejecución de mecanismos apoptóticos. Sin embargo y para evitar una activación en exceso, tanto p53 como MDM2 participan de un *bucle de retroalimentación negativa*, donde el propio p53 regula la expresión del gen responsable de MDM2 de tal forma que, en condiciones de activación transcripcional de p53 se observa un notable incremento en la expresión de su principal regulador negativo, MDM2 (Bose y cols, 2007; Hu y cols, 2012). Como se muestra en la figura 37A, la activación de los receptores AMPA en oligodendrocitos provoca un incremento sostenido y creciente en los niveles de mRNA de MDM2, observado en el tiempo 0 tras el estímulo y significativo estadísticamente 30 min después. Este resultado viene a confirmar la activación transcripcional de p53 pues, como hemos dicho, el incremento en los niveles de mRNA de MDM2 es un fenómeno p53 dependiente que se produce una vez ha tenido lugar la activación transcripcional de p53. Por otro lado, uno de los genes que constituyen una diana directa de la actividad transcripcional de p53 es el responsable de la proteína PUMA, miembro proapoptótico del grupo de proteínas “sólo BH3” dentro de la familia Bcl-2. Mediante análisis de qPCR también observamos que la activación de los receptores AMPA en oligodendrocitos provoca un incremento significativo en sus niveles de expresión (Fig. 37B), tal y como ha sido ampliamente documentada por otros autores (Yu y cols, 2003; Antony y cols, 2012), en diversos contextos apoptóticos p53 dependientes.

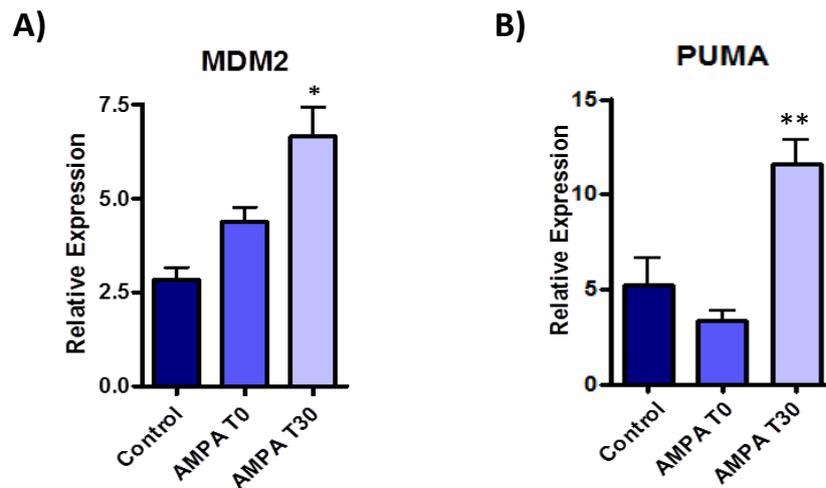


Figura 37. AMPA incrementa los niveles de expresión génica de MDM-2 y PUMA. Los niveles de expresión de MDM2 y PUMA han sido analizados mediante qPCR en cultivos de oligodendrocitos obtenidos a partir de cultivos gliales mixtos. Los oligodendrocitos fueron expuestos al AMPA (10 μ M, 30 minutos). A continuación a los 10 y a los 30 minutos, tras la retirada del estímulo excitotóxico, se recogieron los extractos totales y se sometieron al protocolo descrito para q-PCR (ver Mat. y Mét.). Los valores obtenidos fueron normalizados con un factor dependiente de tres genes constitutivos y el software GeNorm (ver Mat. y Mét.). Los datos se expresan como medias \pm SEM (n=3). *p<0.05, **p<0.01 comparado con las células control.

Continuando el análisis de p53 como factor de transcripción en nuestro modelo de excitotoxicidad, planteamos el siguiente paradigma en el que se analizan mediante western blot los niveles de expresión de p53 y de PUMA tras la estimulación de los receptores AMPA oligodendrogiales en presencia o ausencia de pifithrin- μ pues, si bien este compuesto inhibe las funciones mitocondriales de p53 también puede afectar a las funciones transcripcionales, revelándose en ciertos estudios como superior frente a la pifithrin- α (He y cols, 2012). A este respecto, los incrementos significativos en los niveles de p53, observados a los 60 minutos post-estímulo ($180,3 \pm 11,55\%$) y PUMA ($159,7 \pm 13,48\%$) con respecto al 100% del control, fueron atenuados en presencia de la pifithrin- μ (1 μ M) tanto en el caso de p53 ($111,5 \pm 4,44\%$) como en el caso de PUMA ($124,7 \pm 14,17\%$) (Fig. 38).

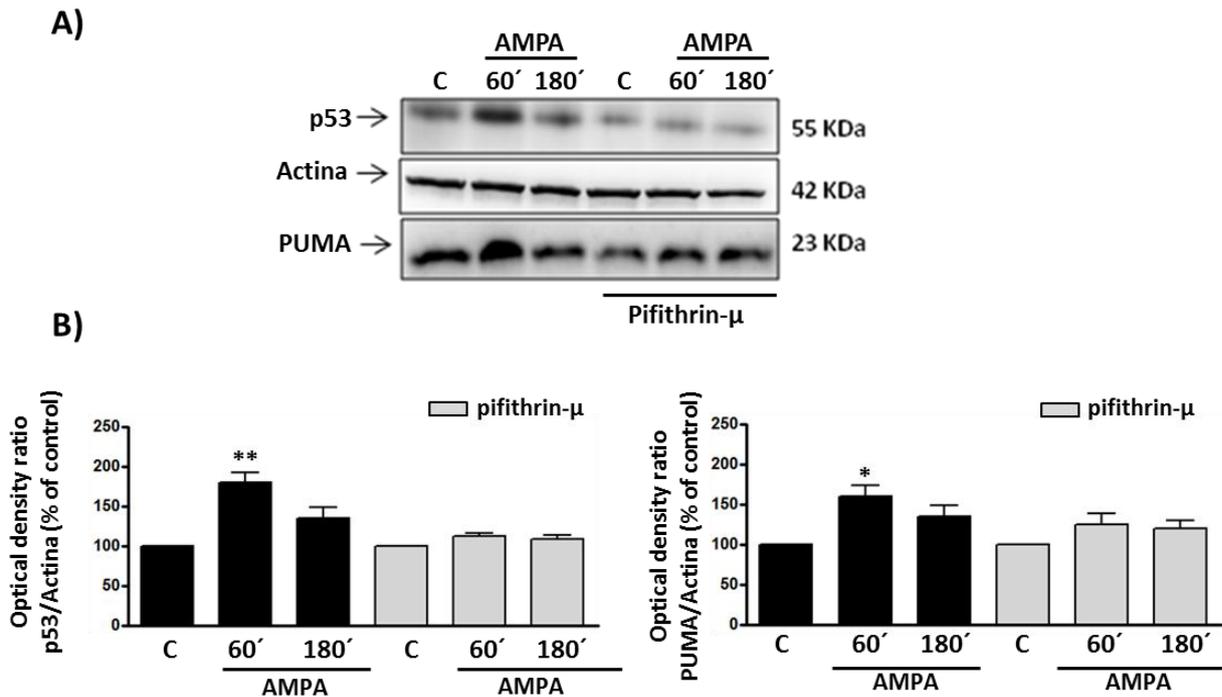


Figura 38. La presencia del inhibidor pifithrin- μ durante los estímulos excitotóxicos reduce la acumulación de p53 y de la diana de este, PUMA. Los oligodendrocitos fueron pre-incubados durante 60 min con pifithrin- μ (1 μ M) antes de su exposición a AMPA (10 μ M, 30 min) y la proteína total fue recogida 1 y 3 horas después de la retirada del estímulo. A) Mediante western blot se analizaron los niveles de expresión de p53 total, PUMA y actina en las distintas situaciones. B) Cuantificación de la densidad óptica que pone de manifiesto el incremento en los niveles de activación de p53 corroborados por el incremento observado en los niveles de expresión de su diana, PUMA. Este mecanismo de activación es revertido en presencia de pifithrin- μ . Los valores corresponden a la densidad óptica de p53 total y PUMA normalizados frente a la de actina, y representan la media \pm SEM (n=3) *p<0.05, **p<0.01, comparado con la situación control.

3.2. La fosforilación de p53 es un mecanismo inductor de su activación

Los mayores niveles proteicos de p53 observados en nuestro modelo de excitotoxicidad, al igual que en variadas situaciones de estrés celular corresponden a condiciones de mayor estabilidad. Como hemos dejado patente, MDM2 juega un papel determinante en la regulación de la estabilidad de p53: MDM2 interacciona con el extremo N-terminal de p53 y esta interacción puede inhibir la actividad transcripcional de p53. La interacción de p53 representa un mecanismo de autoregulación negativa que modula la estabilidad y actividad de p53. Además, MDM2 en su papel como E3-ligasa promueve la ubiquitinización y degradación de p53. Modificaciones post-transcripcionales tanto a nivel del propio p53 como de MDM2 tales como fosforilaciones, acetilaciones y sumoilaciones pueden modular su interacción y por tanto influenciar la estabilidad y actividad de p53 (Kruse y Gu, 2009; Dai y Gu, 2010). Partiendo de esta base, en el presente trabajo de investigación nos centraremos exclusivamente en las fosforilaciones de p53 y concretamente en la fosforilación del residuo Ser15, pues esta ha sido relacionada con la localización

mitocondrial de p53 y su interacción pro-apoptótica con las moléculas de la familia Bcl-2 (Park y cols, 2005; Nieminen y cols, 2013; Wang y cols, 2015).

Para analizar la presencia de la fosforilación de p53 en la Ser15 bajo nuestros estímulos excitotóxicos, y debido a la dificultad para observarla directamente por las técnicas habituales de western blot, llevamos a cabo ensayos de inmunoprecipitación (Fig. 39). La proteína p53 total se pudo inmunoprecipitar mediante la unión de las bolas de agarosa con un anticuerpo anti-p53 total, aplicando el protocolo descrito en Materiales y Métodos. A continuación, y mediante western blot y el uso de un anticuerpo específico (anti-p-p53(Ser15)), se puso de manifiesto la presencia de la fracción p53 fosforilada en el residuo Ser15, en oligodendrocitos control y tratados con AMPA 10 μ M durante 30 min. Como se puede observar en la figura 39 existe un incremento en la fosforilación de p53 en la Ser15 especialmente notable a los 30 y 60 min tras haber retirado el estímulo con AMPA.

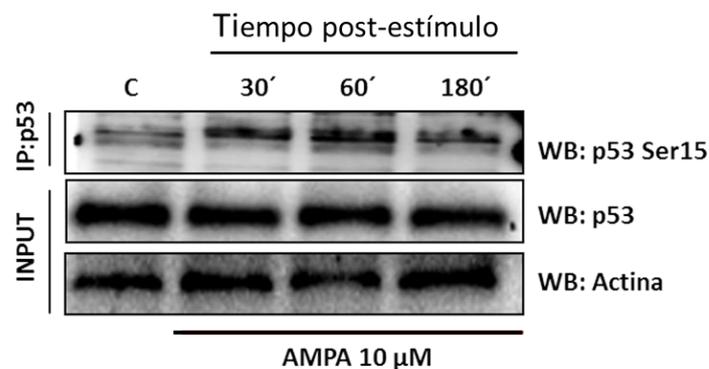


Figura 39. Incremento de la fosforilación de p53 en el residuo Ser15 tras el estímulo moderado de los receptores AMPA en oligodendrocitos. Los oligodendrocitos fueron estimulados con AMPA (10 μ M) durante 30 min. La proteína total fue recogida a varios tiempos tras la retirada del estímulo (30, 60 y 180 min) y se aplicó el protocolo descrito para la técnica de inmunoprecipitación (ver Mat y Mét), empleando un anticuerpo anti-p53 total. La presencia de p53-Ser15 se puso de manifiesto mediante western blot utilizando un anticuerpo específico. Se muestran los niveles de p53 total y actina en los extractos celulares totales correspondiente a cada situación.

Este resultado se ve corroborado por los obtenidos mediante técnicas inmunocitoquímicas. Las imágenes de la figura 40 muestran cómo, tras el estímulo con AMPA (10 μ M; 30 min), se produce un incremento en el nivel de expresión de p-p53 (Ser15) y, lo que es más importante, una modificación en su localización intracelular, pasando a ocupar espacios relacionados con el entorno mitocondrial, tal y como se desprende de la mayor colocalización con el marcador mitocondrial COX-IV. Además, dado que ciertos estudios también han descrito la presencia de p-p53(Ser 15) a nivel nuclear (Li y cols, 2010; Jin y cols, 2013), hemos corroborado la relación entre la fosforilación de p53 en la Ser15 y una localización predominantemente mitocondrial y no nuclear en nuestro modelo de excitotoxicidad: A través de técnicas inmunocitoquímicas en las que, empleando el Hoesch como marcador nuclear, se ha observado la ausencia de p-p53 (Ser15) en el núcleo de los oligodendrocitos tras la estimulación de los receptores

AMPA (Fig.41). El conjunto de los resultados obtenidos hasta el momento a nivel de la fosforilación de p53 (Ser15), parecen revelar una conexión entre el incremento en dicha fosforilación y las actividades que, a nivel mitocondrial, parece jugar p53 en los mecanismos apoptóticos mediados por la activación de los receptores AMPA oligodendrogiales.

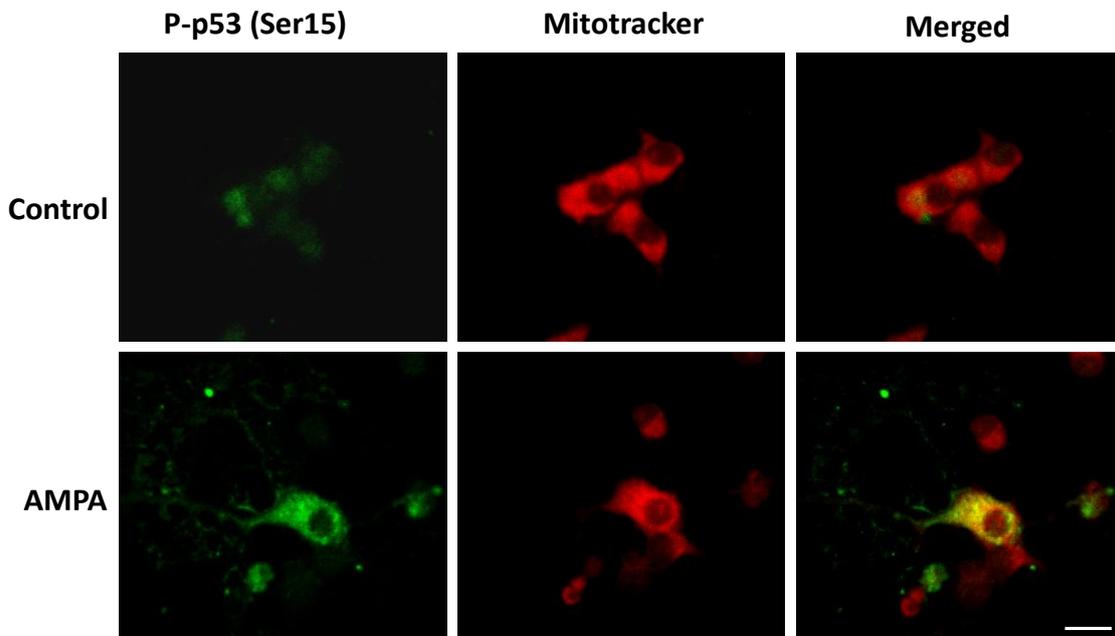


Figura 40. La activación de los receptores AMPA incrementa la fosforilación de p53 en el residuo Ser15 y su paso a la mitocondria. Los oligodendrocitos fueron estimulados con AMPA (10 μ M) durante 30 min, fijados y teñidos con el anticuerpo específico para la fosforilación de p53 en el residuo Ser15. Además se realizó el marcaje de las mitocondrias con Mitotracker. El estímulo excitotóxico provocó la redistribución a nivel mitocondrial del p53 portador de la fosforilación en Ser15. Barra de escala: 10 μ M.

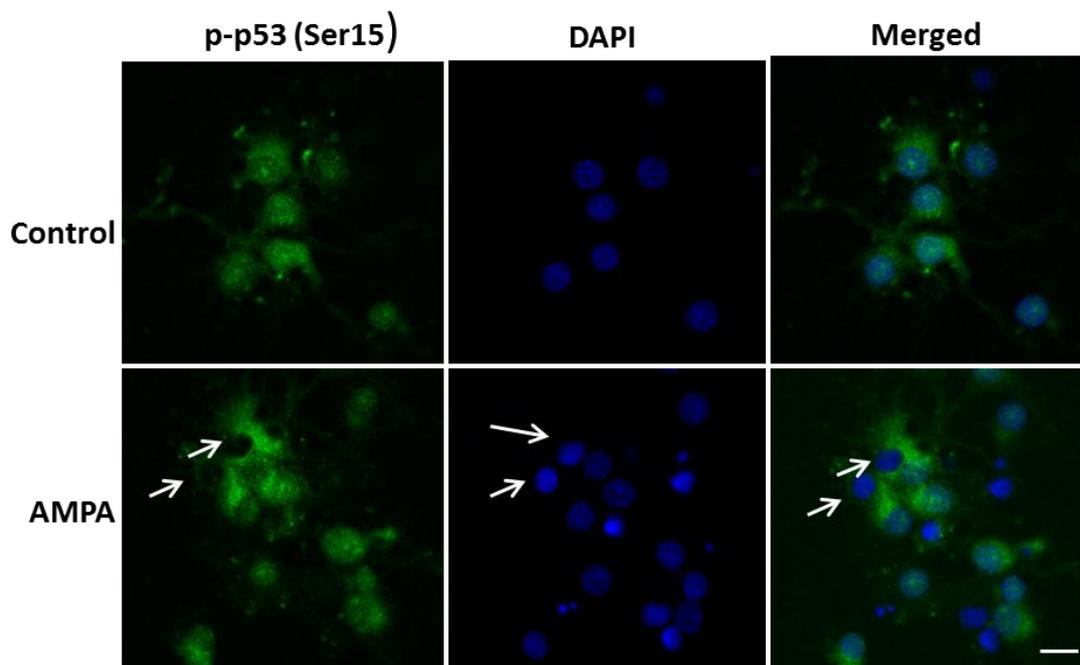


Figura 41. La activación de los receptores AMPA incrementa la fosforilación de p53 en el residuo Ser15 y su ausencia en el núcleo de los oligodendrocitos. Los oligodendrocitos fueron estimulados con AMPA (10 μ M) durante 30 min, fijados y teñidos con el anticuerpo específico para la fosforilación de p53 en el residuo Ser15. Además se realizó el marcaje de los núcleos celulares con DAPI. El estímulo excitotóxico provocó la redistribución de p53 portador de la fosforilación en Ser15, manteniéndose ausente en el entorno nuclear. Barra de escala: 10 μ M.

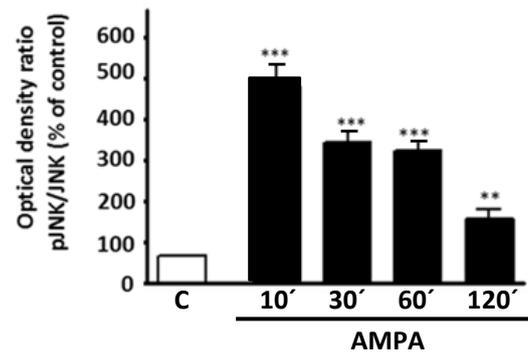
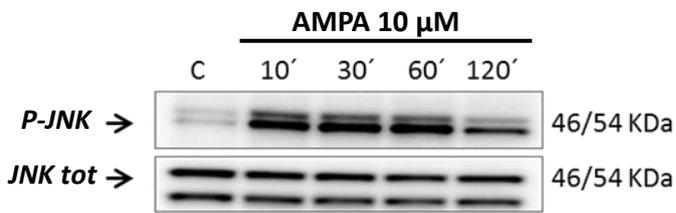
3.3. Implicación de las quinasas JNK y p38 en la señalización inducida por AMPA y en

la activación de p53

En la literatura se ha descrito la existencia de una conexión robusta entre la vía de las MAPKs, con JNK y p38 como principales representantes pro-apoptóticos, y los procesos de activación de p53. Así, tras la exposición a un evento tóxico, estas MAPKs pueden contribuir a la activación de p53, dando lugar a diversas respuestas celulares mediadas por éste (Wu y cols, 2004; Shi y cols, 2014).

Para analizar esta posible vía de señalización en nuestro modelo de excitotoxicidad oligodendroglial examinamos el grado de activación de JNK/SAPK y p38, moléculas cuya función pro-apoptótica prevalece sobre otro tipo de actividades intracelulares de las cuáles son partícipes (Harada y cols, 1999; Huh y cols, 2004). El análisis de la expresión de las formas fosforiladas y por ende activas de ambas moléculas (ver Fig 42A y 42B) reveló incrementos significativos a los 10, 30, 60 y 120 min tras la retirada del estímulo (AMPA 10 μ M; 30 min), tanto para p-JNK (505,33 \pm 28,15%; 352,37 \pm 20,6%; 331,96 \pm 17,35%, 166,94 \pm 17,25%, respectivamente) como para p-p38 (314,85 \pm 16,36%; 438,27 \pm 25,45%; 471,72 \pm 22,72; 310,36 \pm 27,27%, respectivamente), siempre comparando con células control no tratadas (100%).

A)



B)

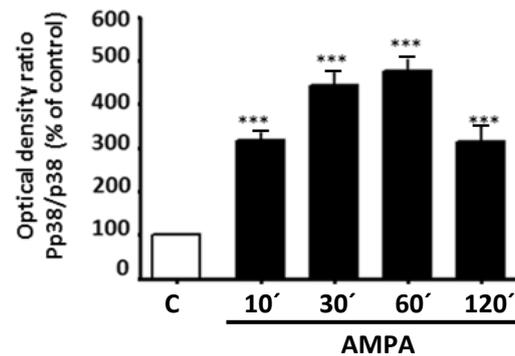
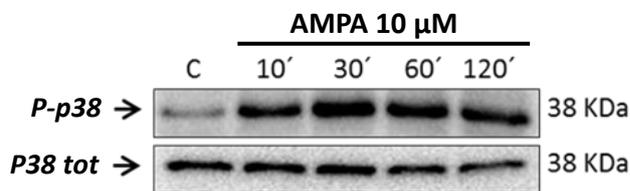


Figura 42. Incremento en los niveles fosforilados/activos de JNK y p38 tras el estímulo moderado de los receptores AMPA en oligodendrocitos. Los cultivos de oligodendrocitos fueron estimulados con AMPA (10 μ M) durante 30 min y la proteína total se recogió siguiendo un curso temporal que abarcaba desde los 10 min hasta las 2 horas inmediatamente posteriores a la retirada del estímulo. A continuación se analizó mediante western blot la expresión de p-JNK (A) y p-p38 (B). Los datos representan las medias \pm S.E.M. de los valores de densidad óptica normalizados frente a JNK total (n=3) y frente a p38 total (n=3) respectivamente. **p<0.01; ***p<0.001 comparado con las células control (no tratadas con agonista).

Teniendo en cuenta estos elevados niveles de activación y basándonos en trabajos previos que establecen una clara relación entre las funciones pro-apoptóticas de estas quinasas y p53 (Choi y cols, 2011; Saha y cols, 2012), nos propusimos analizar de manera más exhaustiva su papel en el proceso de excitotoxicidad oligodendroglial. Para ello, y en primer lugar, utilizamos inhibidores específicos de JNK (SP600125, 1 μ M) y p38 (SB2035, 1 o 5 μ M) durante la aplicación del daño excitotóxico con AMPA y cuantificamos la muerte celular ocasionada en cada caso. Como se muestra en la figura 43 la inhibición específica de JNK aportó una reducción significativa del daño celular provocado por la activación de los receptores AMPA en oligodendrocitos ($2,61 \pm 2,15\%$ frente a $10,83 \pm 2,43\%$ ocasionado por el agonista), mientras que el inhibidor de p38 no mostró efecto protector a las dos concentraciones analizadas.

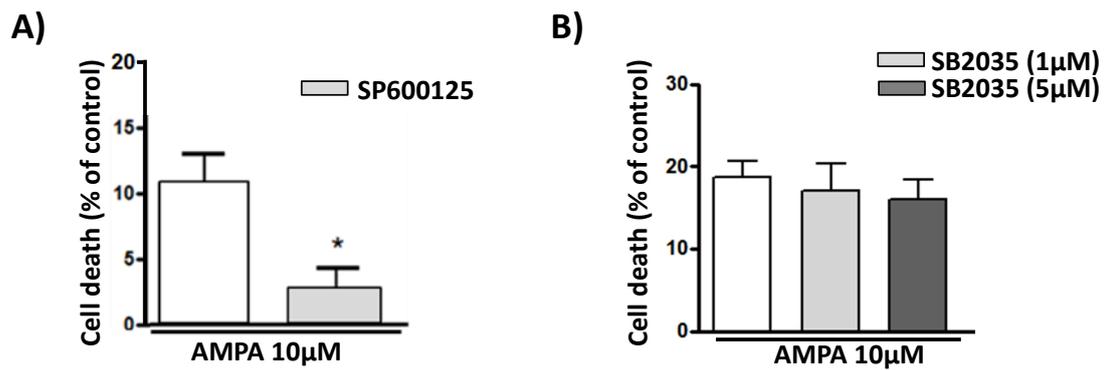


Figura 43. La inhibición de JNK mediante SP600125 reduce la muerte oligodendroglial ocasionada por la activación de los receptores AMPA en oligodendrocitos, mientras que la inhibición de p38 parece no afectar a la misma. Los oligodendrocitos fueron pre-incubados durante 1 hora con los inhibidores de las quinasas antes de su exposición a AMPA (10 μ M, 30 min). La determinación de la viabilidad celular se llevó a cabo 24 horas después mediante el uso de la sonda calcein-AM. Los datos representan las medias \pm SEM (n=3). *p<0.05, comparado con las células tratadas únicamente con agonista.

A continuación, y teniendo en cuenta la participación de JNK en el proceso de muerte oligodendroglial, analizamos mediante western blot el comportamiento de JNK y sus posibles moléculas diana, p53 y PUMA en oligodendrocitos tratados con AMPA en ausencia y/o presencia del inhibidor SP600125. En la figura 44 se muestra el importante incremento observado en los niveles de fosforilación de JNK ($248 \pm 15,87\%$ y $244,97 \pm 27,72\%$) a los 10 y 30 min tras la retirada del agonista (AMPA 10 μ M, 30 min), que no tuvo lugar en presencia del inhibidor SP600125 ($103,85 \pm 15,20\%$ y $111,03 \pm 12,49\%$ respectivamente). Además, el incremento en la expresión de p53 provocado por AMPA ($152,8 \pm 8,69\%$ y $138,1 \pm 9,61\%$ a los 10 y 30 min, respectivamente) fue totalmente inhibido en presencia de SP600125 ($96,10 \pm 7,44\%$ y $95,12 \pm 10,66\%$, respectivamente), comportamiento que también pudo otorgarse a la proteína diana de p53, PUMA ($180,3 \pm 27,88\%$ y $165,5 \pm 19,99\%$ en ausencia del inhibidor de JNK, frente a $102,6 \pm 8,69\%$ y $125,10 \pm 12,39\%$ en su presencia). Todos los valores fueron comparados con los obtenidos en situación control, células no tratadas con agonista, considerado como 100%.

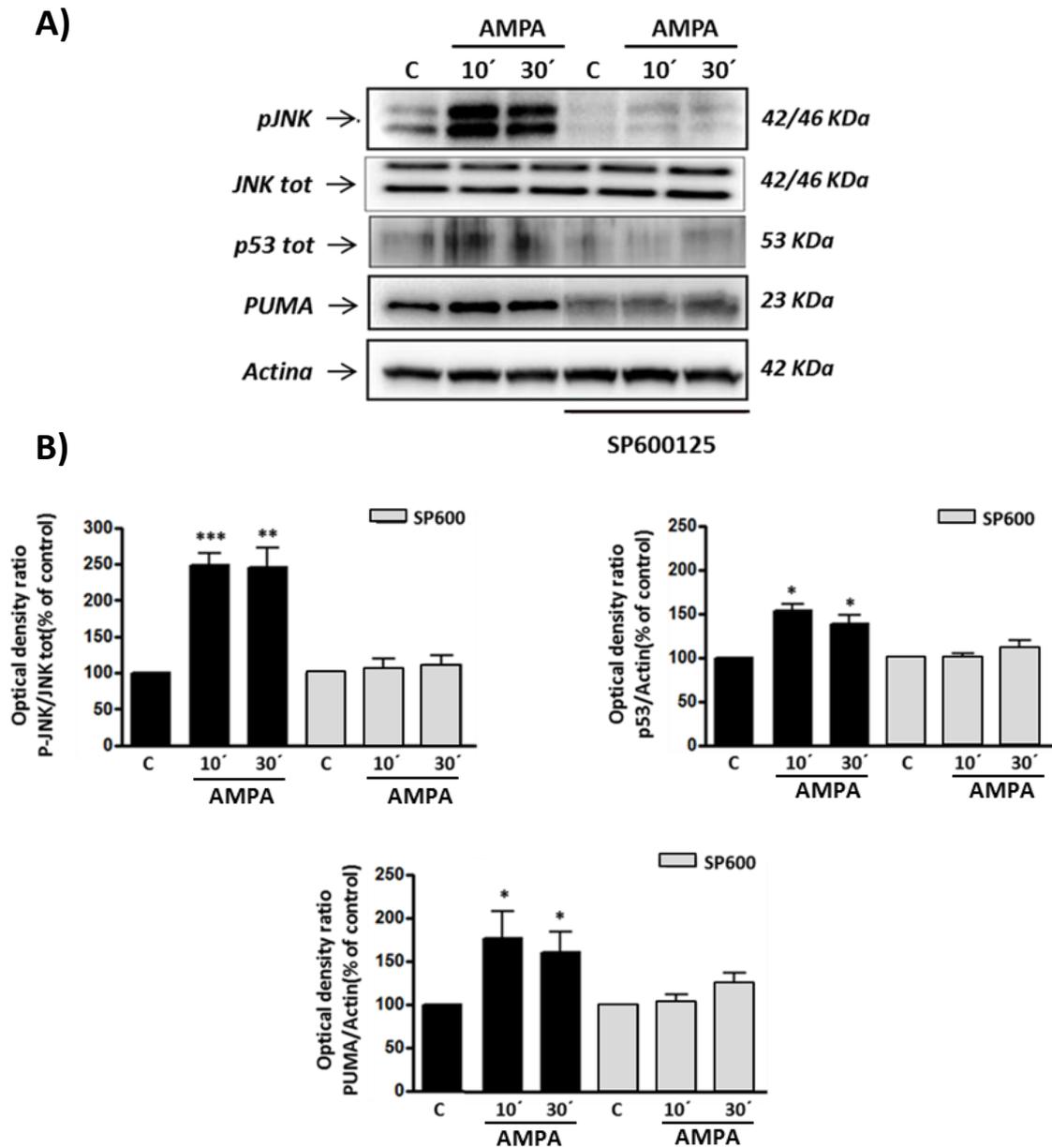


Figura 44. El inhibidor de JNK, SP600125, impide el incremento de p-JNK, p53 y PUMA tras la activación moderada de los receptores AMPA oligodendrogliales. Los oligodendrocitos fueron pre-incubados con SP600125 (1 μ M, 30 min) antes de su exposición a AMPA (10 μ M, 30 min) y la proteína total fue recogida a los 10 y 30 min después de la retirada del estímulo. A) Western blot representativo de la expresión de p-JNK, p53 total y PUMA, así como de JNK total y actina, en las distintas situaciones analizadas. B) Cuantificación de la densidad óptica donde se observa la capacidad de SP600125 para disminuir la fosforilación de JNK y el incremento de p53 y PUMA ocasionados por el estímulo excitotóxico. Los valores corresponden a la densidad óptica de p-JNK, p53 total y PUMA normalizados frente a la de JNK total o actina y representan la media \pm SEM (n=3) *p<0.05, **p<.01, ***p<0.001 comparado con la situación control (células no tratadas con agonista).

Además, mediante técnicas de inmunofluorescencia pudimos corroborar que los oligodendrocitos sometidos a AMPA (10 μ M, 30 min) experimentaban incrementos tanto en la expresión del factor de transcripción p53 (Fig. 45A) como en su fosforilación en el residuo Ser15, así como su colocalización en la mitocondria (Fig. 45B), fenómenos que no tuvieron lugar en presencia del inhibidor de JNK, SP600125 (1 μ M).

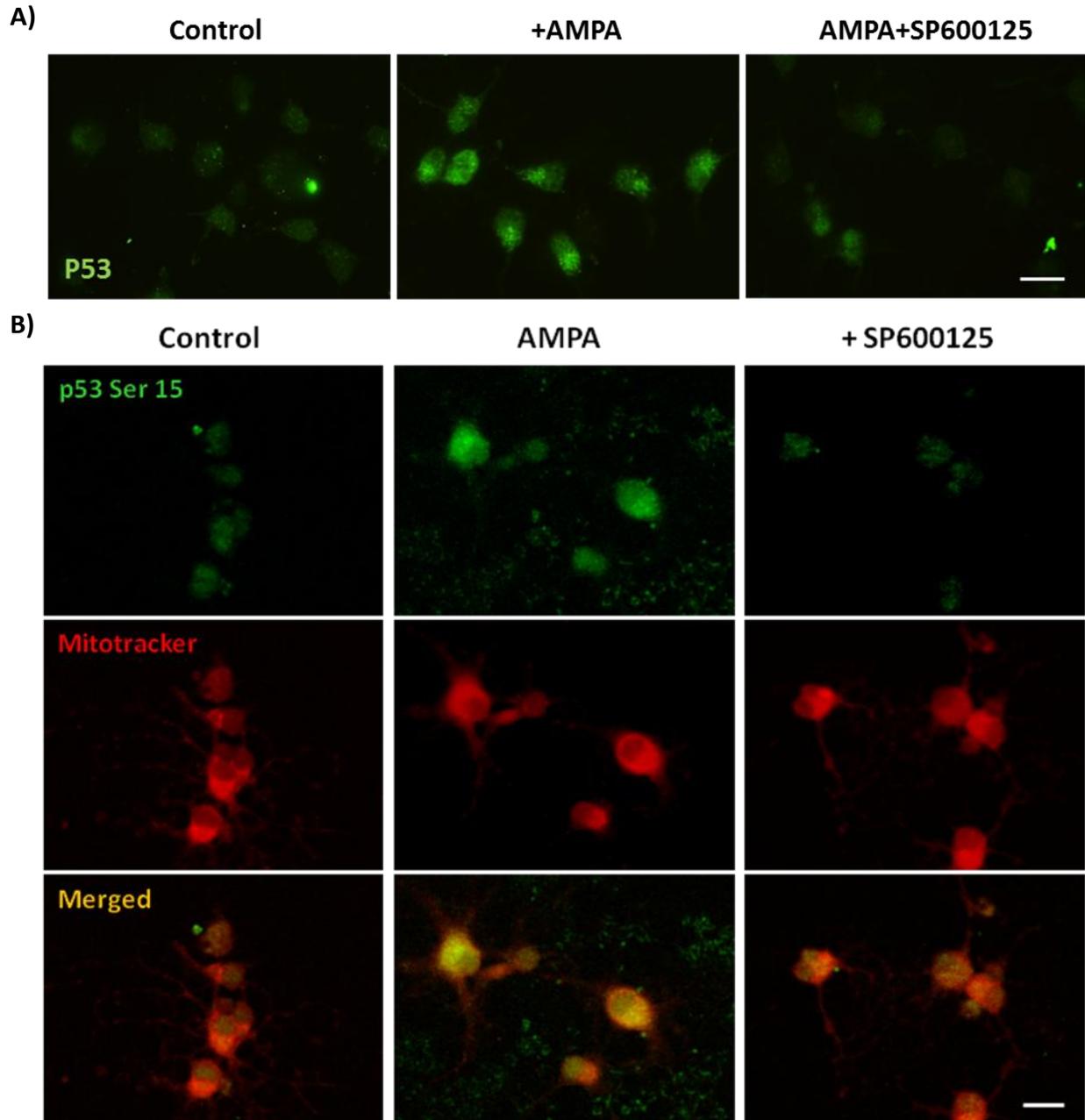


Figura 45. El inhibidor de JNK, SP600125, reduce el incremento de p53 total y su fosforilación/traslocación provocada por la activación moderada de los receptores AMPA en oligodendrocitos. Los oligodendrocitos fueron incubados con SP600125 (1 μ M; 30 min) antes de ser tratados con AMPA (10 μ M) durante 30 min, en ausencia o presencia del inhibidor. Las células fueron procesadas para inmunofluorescencia empleando anticuerpos específicos para p53 (A) y p-p53 Ser15 (B). La exposición a AMPA ocasiona un incremento, fosforilación y movilización de p53 hacia la mitocondria (marcada con Mitotracker en rojo) que es revertido en presencia del inhibidor de JNK, SP600125. Barras de escala: (A) 20 μ m; (B) 10 μ m.

3.4. La vía de señalización JNK/p38/p53 está regulada por la quinasa ASK-1

Una vez determinada la activación simultánea de JNK y p38 durante los procesos excitotóxicos mediados por AMPA y la relación de, al menos, JNK con la activación de p53, se planteó la posibilidad de analizar dicha vía desde etapas iniciales de su activación. Este aparente retroceso en la vía de señalización se realizó en base a trabajos previos en los que se propone a ASK-1 (MAP3K) como posible quinasa iniciadora de la vía de las MAPKs activadas por estrés y sobre la cual convergen multitud de señales apoptóticas. Estas señales son canalizadas a través de ASK-1 y encaminadas a la activación simultánea, y en ocasiones también independiente, de JNK y p38 (Tobiume y cols, 2001; Sarker y cols, 2003; Palit y cols, 2015; Watanabe y cols, 2015). Se conocen varios fenómenos de la señalización intracelular bajo condiciones de estrés capaces de inducir la activación de ASK-1. Entre los más destacados se puede citar la activación de la enzima CaMKII, calmodulina proteín quinasa activada por la entrada masiva de Ca^{+2} al interior celular (Liu y cols, 2013), el estrés reticular (Cai y cols, 2013) o el incremento en la producción de ROS (Soga y cols, 2012). La existencia de estos fenómenos está plenamente documentada dentro del marco apoptótico desencadenado por eventos excitotóxicos en oligodendrocitos y todos ellos pueden converger en algún momento en la activación de ASK-1.

Teniendo esto en cuenta, analizamos varios de estos reguladores de ASK-1 intentando obtener evidencias de la existencia de un entorno favorable para su activación. Como se muestra en la figura 46A, la inhibición de la CaMKII mediante su inhibidor farmacológico AIP (20 μ M), reduce de forma significativa la muerte oligodendroglial ocasionada por la activación de los receptores AMPA ($10,19 \pm 2,65\%$ frente a $24,19 \pm 2,74\%$) sugiriendo su papel como canalizador de la señal mediada por Ca^{+2} hacia la activación de ASK-1.

Por otro lado, analizamos la expresión de PRX-1, molécula integrante de las barreras celulares endógenas frente al estrés oxidativo (Tao y cols, 2014; Mei y cols, 2015). En concreto, existen trabajos que describen a PRX-1 como inhibidora de los mecanismos apoptóticos mediados por ASK-1 cuando éstos han sido desencadenados por un grado de estrés oxidativo que supera las capacidades de tamponamiento celular (Kin y cols, 2008; Zhang y cols, 2015).

Como se aprecia en la figura 46B, el estímulo con AMPA (10 μ M, 30 min) provoca una rápida y sostenida caída en los niveles de expresión de PRX-1 respecto a células control en todos los tiempos analizados ($57,38 \pm 6,13\%$; $62,13 \pm 7,63\%$; $60,45 \pm 4,97\%$ y $83,39 \pm 5,83\%$ a los 10, 30, 60 y 120 min tras la retirada de AMPA, respectivamente), lo que podría facilitar la activación sostenida de ASK-1 en esta situación.

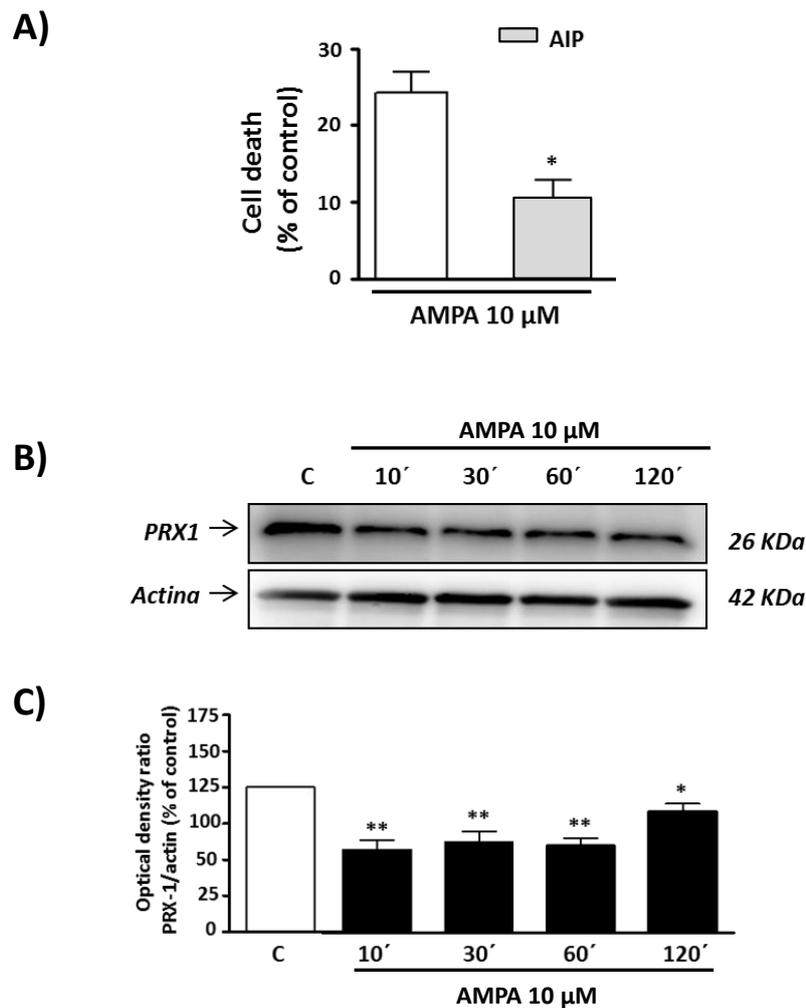


Figura 46. La estimulación moderada de los receptores AMPA genera un entorno favorable a la activación de ASK-1. A) La inhibición de CaMKII con AIP (20 μ M) incrementa la viabilidad oligodendroglial tras la estimulación moderada de los receptores AMPA (10 μ M, 30 min). La viabilidad fue cuantificada 24 h más tarde con calceín-AM. Los valores representan la media \pm S.E.M (n=3). * $p < 0,05$ comparado con las células tratadas únicamente con agonista. B y C) La activación de los receptores AMPA provoca una disminución temprana y sostenida en los niveles de PRX-1 en oligodendrocitos. Las células fueron tratadas con AMPA (10 μ M) durante 30 min y la proteína total fue recogida a diferentes tiempos tras la retirada del estímulo excitotóxico. Mediante western blot se analizaron los niveles de expresión de PRX-1 y actina en las distintas situaciones (B) y se cuantificó la densidad óptica de la señal (C). Los valores corresponden a la densidad óptica de PRX-1 normalizada frente a la de actina y representan la media \pm S.E.M. (n=3) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con la situación control (células no tratadas con agonista).

Debido a que estos fenómenos constituyen un contexto adecuado para la activación de ASK-1, abordamos la posible participación de esta quinasa en la excitotoxicidad inducida por AMPA. Para ello, utilizamos un contrastado inhibidor farmacológico específico para ASK-1, denominado NQDI (Nomura y cols, 2013; Song y cols, 2015) y gastrodina, compuesto citoprotector capaz de rescatar a las neuronas de la apoptosis mediada por glutamato a través de su capacidad para limitar la activación del eje CaMKII/ASK-1/p38/p-p53(Ser15) (Jiang y cols, 2014), así como promover la supervivencia celular ante variadas condiciones citotóxicas (Xu y cols, 2007; Kumar, 2013).

La muerte oligodendroglial generada por AMPA (10 μ M) durante 30 min disminuyó de manera significativa tanto en presencia de NQDI (17,97 \pm 1,82% frente a 4,66 \pm 1,27%) como de gastrodina (15,67 \pm 1,44% frente a 4,58 \pm 0,53%), resultado que constituyó un claro indicio acerca de la participación de ASK-1 en el eje de señalización apoptótica inducido por AMPA en oligodendrocitos (Fig. 47).

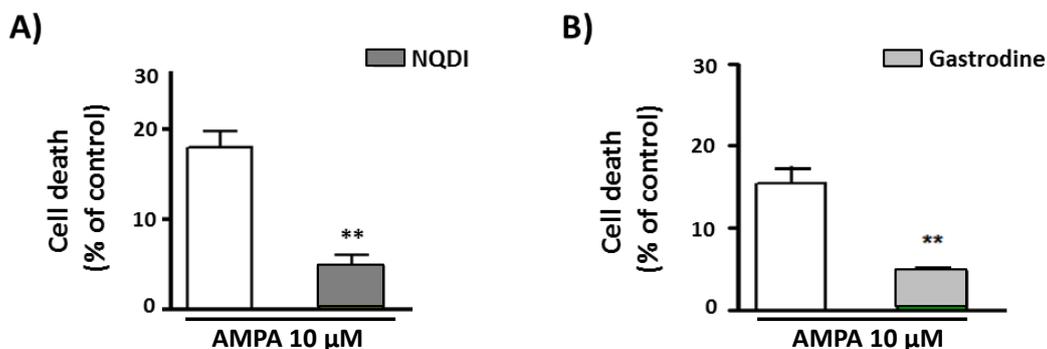


Figura 47. La inhibición de ASK-1 reduce la muerte oligodendroglial ocasionada por AMPA. Los oligodendrocitos fueron pre-incubados durante 1 hora con NQDI (5 μ M) (A) o gastrodina (10 μ M) antes de su exposición a AMPA (10 μ M, 30 min) en presencia o ausencia de dichas moléculas. La determinación de la viabilidad celular se llevó a cabo 24 horas después mediante la sonda calceín-AM. Los datos representan la media \pm S.E.M (n=4) **p< 0.01, comparado con las células tratadas únicamente con agonista.

A continuación, e intentando determinar los mecanismos moleculares que pudieran conformar la capacidad protectora de NQDI y gastrodina, analizamos mediante western blot el comportamiento de moléculas que podrían verse modificadas por la actuación de ASK-1 y cuya activación ya habíamos puesto de manifiesto anteriormente. Así, estudiamos JNK, su diana molecular c-Jun y p38 a los 10 y 30 min tras la retirada de AMPA, en ausencia y presencia de estas moléculas. El incremento en el grado de fosforilación de JNK (453,8 \pm 30,23% y 392,3 \pm 23,33%) y c-jun (449,7 \pm 36,90% y 378 \pm 36,90%) inducidos por AMPA (10 μ M, 30 min), disminuyeron significativamente en presencia de 5 μ M de NQDI (135,2 \pm 16,16%; 129,6 \pm 18,02% y 168,5 \pm 21,96%; 118,6 \pm 10,48%, respectivamente). Además, aunque de forma menos robusta, el incremento en la fosforilación de p38 tras la estimulación de los receptores AMPA oligodendrogliales (329,3 \pm 17,61% y 248,0 \pm 28,3) se vio afectado de manera significativa por la presencia de NQDI (234,4 \pm 25,98 y 150,9 \pm 15,2%) (Fig. 48).

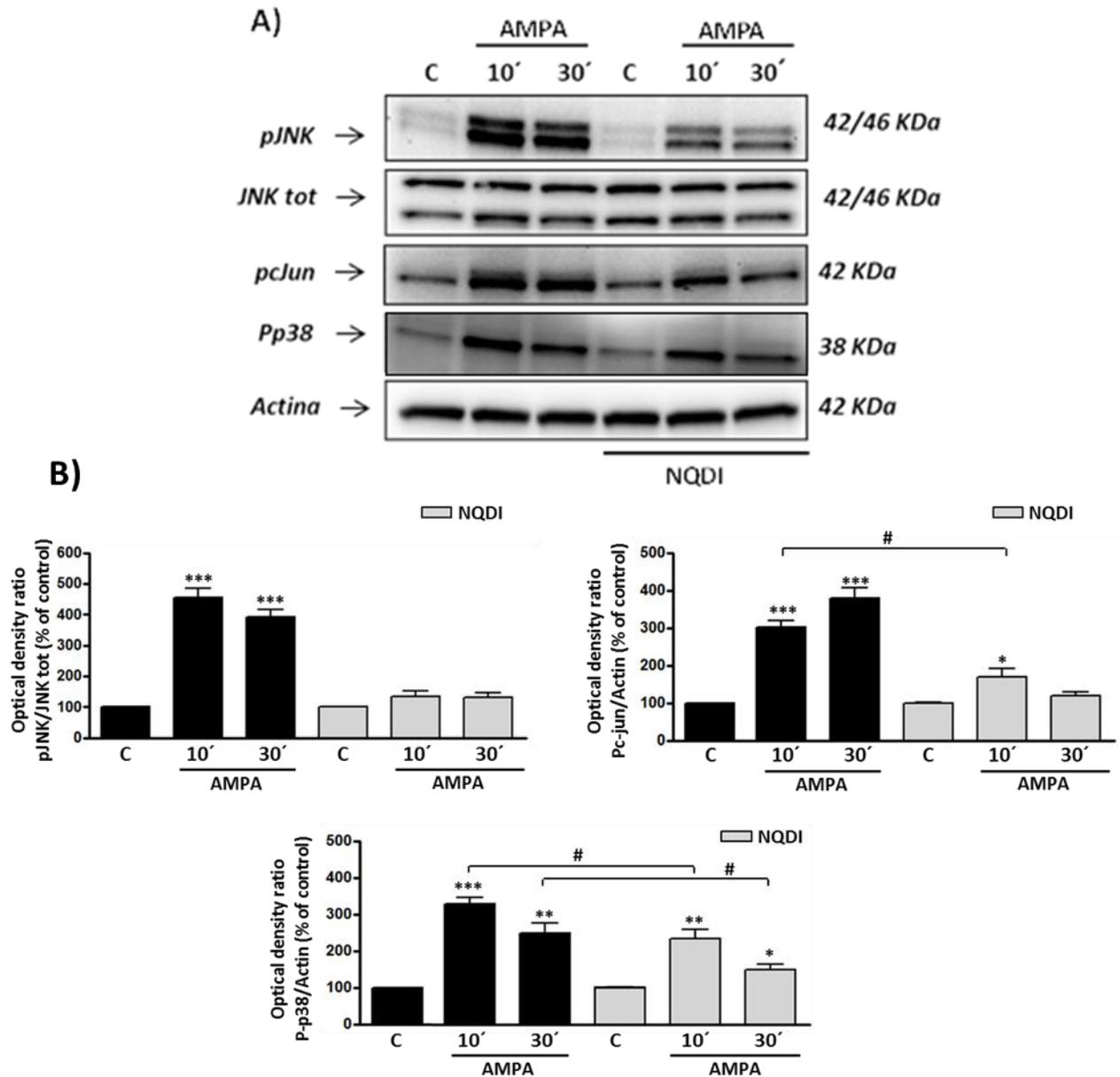


Figura 48. La inhibición de ASK-1 limita la fosforilación/activación de JNK, c-jun y p38. Los oligodendrocitos fueron pre-incubados durante 1 hora con NQDI (5 μ M) antes de su exposición a AMPA (10 μ M, 30 min) y la proteína total fue recogida a los 10 y 30 min después del estímulo. A) Mediante western blot se analizaron los niveles de expresión de p-JNK, p-c-jun y p-p38, así como de JNK total y actina en las distintas situaciones. B) Cuantificación de la densidad óptica que puso de manifiesto la capacidad de NQDI para limitar el incremento en la tasa de fosforilación/activación de las moléculas analizadas. Los valores corresponden a la densidad óptica de p-JNK, p-c-jun y p-p38 normalizados frente a la de JNK total o actina, y representan la media \pm SEM (n=3) *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 comparado con la situación control. # p<0.05 comparado con las células tratadas únicamente con agonista.

Hemos descrito cómo las MAPKs modulables por estrés se activan tras la sobreestimulación de los receptores AMPA en oligodendrocitos. Además, hemos determinado que se trata de un mecanismo apoptótico dependiente de ASK-1 donde ésta molécula podría actuar de conexión entre los eventos más tempranos que tienen lugar tras el estímulo excitotóxico y la consecuente activación de moléculas proapoptóticas como JNK, p38 o c-jun. Esta percepción se corroboró analizando el comportamiento de estas moléculas en presencia de gastrodina, incluyendo el análisis de p-p53 (Ser15), elemento final del eje de señalización propuesto en este trabajo.

Como se muestra en la figura 49, la presencia de 10 μ M de AMPA durante 30 min ocasionó un incremento significativo en los niveles de p-JNK ($443,2 \pm 38,71\%$ y $313,0 \pm 41,02\%$), p-p38 ($260,7 \pm 22,52\%$ y $273,3 \pm 26,03\%$) y p-p53(Ser 15)($350,7 \pm 27,29\%$ y $256 \pm 30,11\%$) comparados con el 100% de expresión atribuida a la situación control. Sin embargo, la presencia de gastrodina (10 μ M) limitó el grado de activación de JNK ($153,0 \pm 18,77\%$ y $132,8 \pm 9,86\%$), de p38 ($166,7 \pm 14,53\%$ y $169,3 \pm 17,79\%$) y de p-p53(Ser15) ($118,2 \pm 10,84\%$ y $115,6 \pm 16,72\%$) comparados con el 100% control. Estos resultados sugieren la activación secuencial del eje ASK-1/JNK/p38/p-p53(Ser 15) desencadenada por la sobreestimulación de los receptores AMPA en oligodendrocitos, que conducirá a la muerte celular por apoptosis. En este sentido, la modulación de la fosforilación de p53 a nivel del residuo Ser15 a través de JNK y/o p38, como paso esencial en la muerte apoptótica, se corresponde con lo descrito previamente en la literatura por otros autores (Gong y cols, 2010; Fausti y cols, 2013).

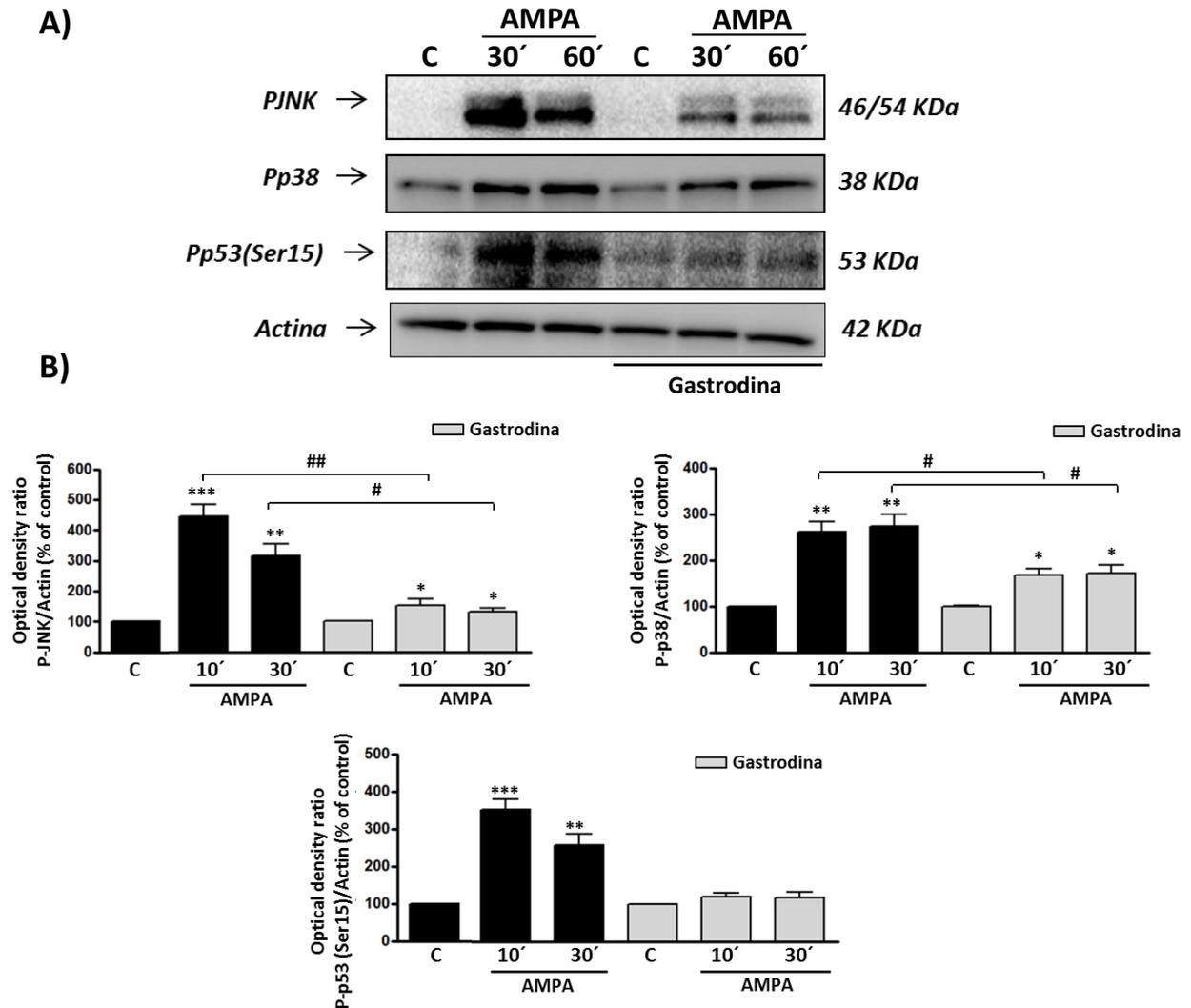


Figura 49. Gastrodina limita la fosforilación/activación de JNK y p38 así como la fosforilación de p53 en el residuo Ser15. Los oligodendrocitos fueron pre-incubados durante 1 hora con gastrodina (10 μ M) antes de su exposición a AMPA (10 μ M, 30 min) y la proteína total fue recogida a los 10 y 30 min después del estímulo. A) Mediante western blot se analizaron los niveles de expresión de p-JNK, p-p38, p-p53(Ser15) y actina en las distintas situaciones. B) Cuantificación de la densidad óptica que puso de manifiesto cómo gastrodina redujo el incremento en la tasa de fosforilación/activación de las moléculas analizadas. Los valores corresponden a la densidad óptica de p-JNK, p-p38 y p-p53(Ser15) normalizados frente a la de actina, y representan la media \pm SEM (n=3) * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 comparado con la situación control. # p <0.05, ## p <0.01 comparado con las células tratadas únicamente con agonista.

Por último, los experimentos realizados sobre nervios ópticos aislados de ratones PLP-DsRed confirmaron este efecto protector ejercido por la inhibición, total o parcial, de la vía de las MAPKs activadas por estrés (ASK-1/JNK/p38). Los nervios ópticos aislados fueron sometidos a los estímulos excitotóxicos descritos anteriormente, en ausencia o presencia del inhibidor de ASK-1 (NQDI; 25 μ M) o del inhibidor de JNK (SP600125; 20 μ M). La liberación de LDH se determinó durante los 90 min inmediatamente posteriores a la retirada del estímulo, con lecturas a intervalos de 30 min (Fig. 50), como

método complementario al posterior análisis histológico de los nervios ópticos. En la figura 50 se muestra el incremento observado en los niveles de LDH ya a los 30 min post-estímulo así como su aumento a los 60 y 90 min (250-300% respecto al 100% de los nervios ópticos control), liberación que se vio reducida de manera significativa en presencia tanto de NQDI como de SP600125.

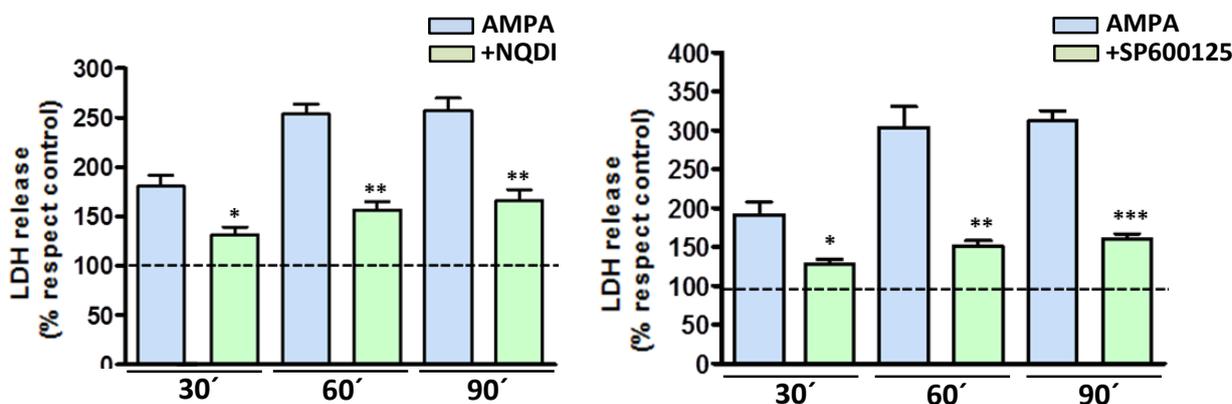


Figura 50. Liberación de LDH tras la activación de los receptores AMPA en nervios ópticos aislados de ratones PLP-Ds Red en ausencia o presencia de inhibidores de quinasas. Los nervios ópticos, una vez aislados, fueron pre-incubados en medio aCSF en ausencia o presencia de NQDI (25 μ M) o SP600125 (20 μ M) durante 1 hora y posteriormente estimulados con AMPA (100 μ M; 2 horas) previa adición de CTZ (100 μ M; 15 min). El incremento en la liberación de LDH ocasionado por la estimulación de los receptores AMPA y observado a los distintos tiempos analizados (30, 60 y 90 min) disminuyó de forma significativa tanto en presencia de NQDI como de SP600125. Los datos se muestran como medias \pm SEM (n=3). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 comparado con los nervios ópticos tratados únicamente con agonista.

Corroborando la menor liberación de LDH en presencia de ambos inhibidores, en la figura 51 se muestran imágenes representativas de los nervios ópticos utilizados, tanto en situación control como tras la activación de los receptores AMPA, en ausencia y en presencia de NQDI (25 μ M) o de SP600125 (20 μ M). La intensidad de la fluorescencia, asociada a los oligodendrocitos, se cuantificó en todos los planos de los z-stacks obtenidos mediante microscopía confocal, y a lo largo de toda la longitud de los nervios ópticos estudiados (Fig. 52). Así, pudimos observar cómo la activación de los receptores AMPA provocaba una pérdida significativa de la señal procedente de los oligodendrocitos que era atenuada en presencia tanto de NQDI como de SP600125.

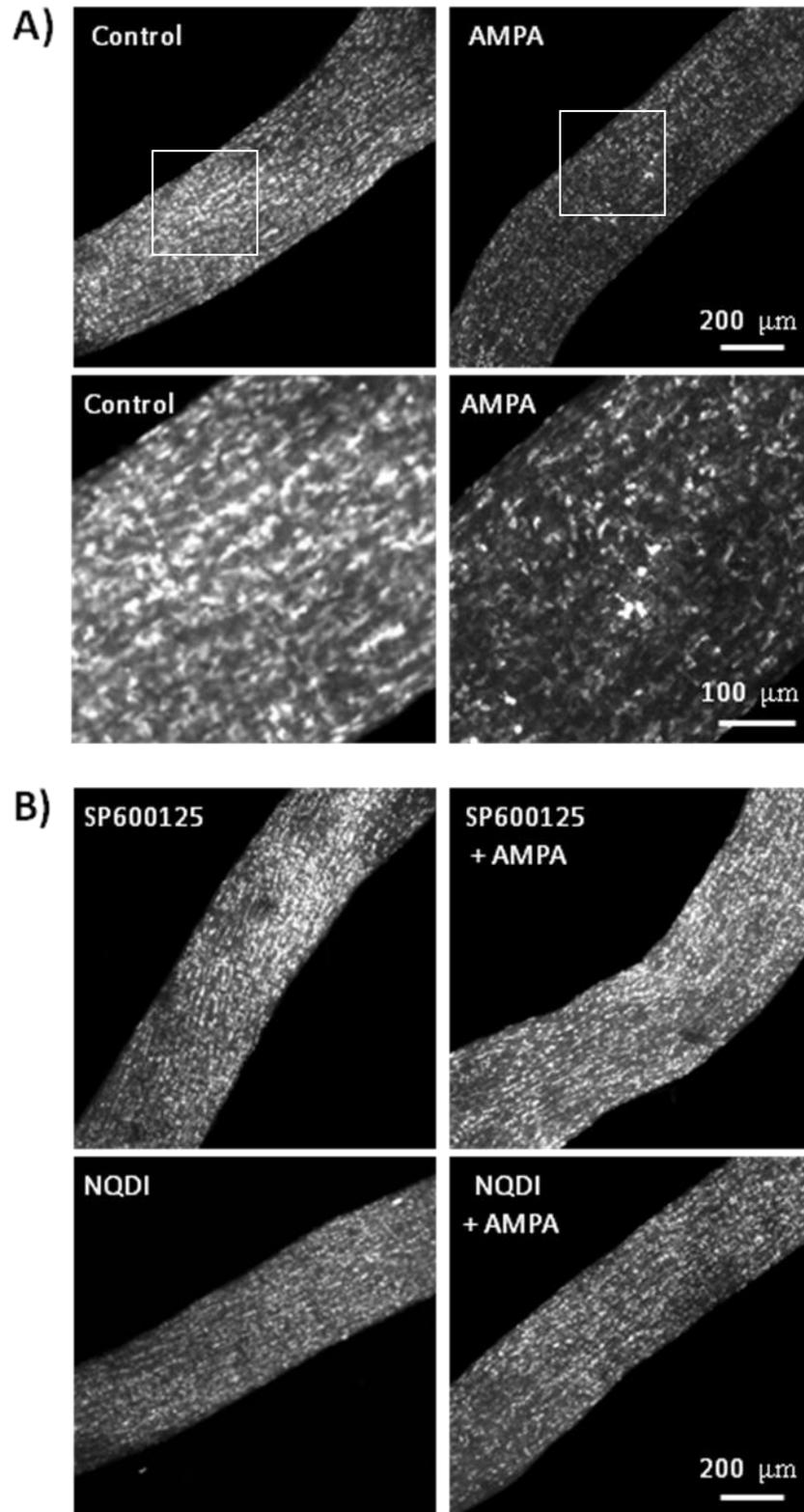


Figura 51. Imágenes representativas de los nervios ópticos aislados de ratones PLP-DsRed sometidos a diferentes tratamientos. Los nervios ópticos, una vez aislados, fueron pre-incubados en medio aCSF en ausencia o presencia de SP600125 (20 μM) o NQDI (25 μM) durante 1 hora y posteriormente estimulados con AMPA (100 μM; 2 horas) previa adición de CTZ (100 μM; 15 min). La pérdida de la señal fluorescente (oligodendrocitos) provocada por AMPA (A) no tuvo lugar en presencia de los inhibidores de JNK y de ASK-1 (B).

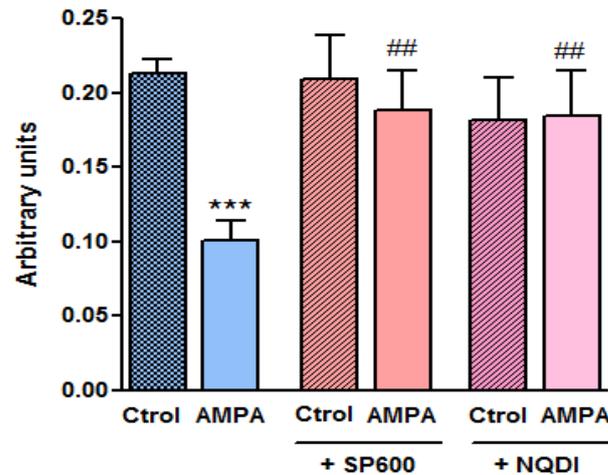


Figura 52. La inhibición de JNK o de ASK-1 atenúa el daño oligodendroglial mediado por la activación de los receptores AMPA en nervios ópticos aislados de ratones PLP-Ds Red. Cuantificación de la señal de fluorescencia total presente en los nervios ópticos aislados sometidos a los diferentes tratamientos. La pérdida significativa de oligodendrocitos (intensidad de fluorescencia) provocada por la activación de los receptores AMPA fue revertida en presencia de SP600125 y de NQDI. Los datos se muestran como medias \pm SEM, (n=3). ***p<0.001 comparado con las células control. ## p<0.01 comparado con los nervios ópticos tratados con agonista en ausencia de inhibidores.

Las evidencias obtenidas con los diferentes análisis realizados indican que tanto el factor de transcripción p53 como las MAPKs activadas por estrés parecen intervenir e incluso interrelacionarse durante la muerte oligodendroglial inducida por la estimulación de los receptores AMPA. Sin embargo, existen otros niveles de complejidad en la señalización apoptótica mediada por las MAPKs, en estrecha conexión con los datos expuestos hasta el momento, que se van a intentar descifrar en los siguientes apartados.

4. Estudio de la relevancia de CK2 en oligodendrocitos sometidos a estímulos excitotóxicos

4.1. La estimulación de los receptores AMPA ocasiona la activación de CK2 en oligodendrocitos y su participación en la muerte celular

La enzima Caseína Quinasa-2 (CK2) es una serina-treonina quinasa altamente conservada, de expresión ubicua, que fosforila una amplísima variedad de sustratos implicados en multitud de procesos celulares. Esta quinasa interviene en el mantenimiento de la viabilidad celular, hasta el punto de ser parte de la maquinaria intracelular desregulada durante la aparición de procesos tumorales (Di Maira y cols, 2005; Chakraborty y cols, 2011; Ortega y cols, 2014). A raíz de lo anterior, CK2 ha sido el objetivo de múltiples investigaciones en las que ha sido identificada como responsable de la viabilidad celular anormalmente elevada característica de las células cancerígenas (Dixit y cols, 2012; Qaiser y cols, 2014). En algunos casos, este efecto proliferativo ha venido determinado por su interacción molecular con proteínas de la familia Bcl-2, en concreto con Bid (Olsen y cols, 2006; Hellwig y cols, 2010).

Con el objetivo de determinar el grado de participación de CK2 en nuestro modelo de excitotoxicidad, desarrollamos ensayos de viabilidad en los que manipulamos la actividad de CK2 a través de distintos inhibidores farmacológicos (TBB, DRB y resofurin) y un activador (spermina). Contrariamente a lo esperado según la bibliografía, la inhibición de CK2 en oligodendrocitos, con los tres inhibidores utilizados, resultó en una protección significativa frente al daño excitotóxico mediado por AMPA (Fig. 53A), pasando de unos valores de muerte de $18.02 \pm 3.90\%$ a $7.95 \pm 4.06\%$ en presencia de TBB ($5 \mu\text{M}$), $6.28 \pm 3.39\%$ en presencia de DRB ($5 \mu\text{M}$) y $5.68 \pm 3.67\%$ en presencia de resofurina ($5 \mu\text{M}$), mientras que su activación específica con spermina ($10 \mu\text{M}$) potenciaba la muerte oligodendroglial hasta valores de $31.37 \pm 2.63\%$ (Fig. 53B). Además, el inhibidor TBB también redujo de forma significativa la generación de ROS ($138.75 \pm 4.38\%$ reducido a $103.72 \pm 8.11\%$ en presencia del TBB, con respecto al 100% atribuido a la situación control) y la caída en el potencial de la membrana mitocondrial ocasionados por AMPA, como se observa en las figuras 53C y D.

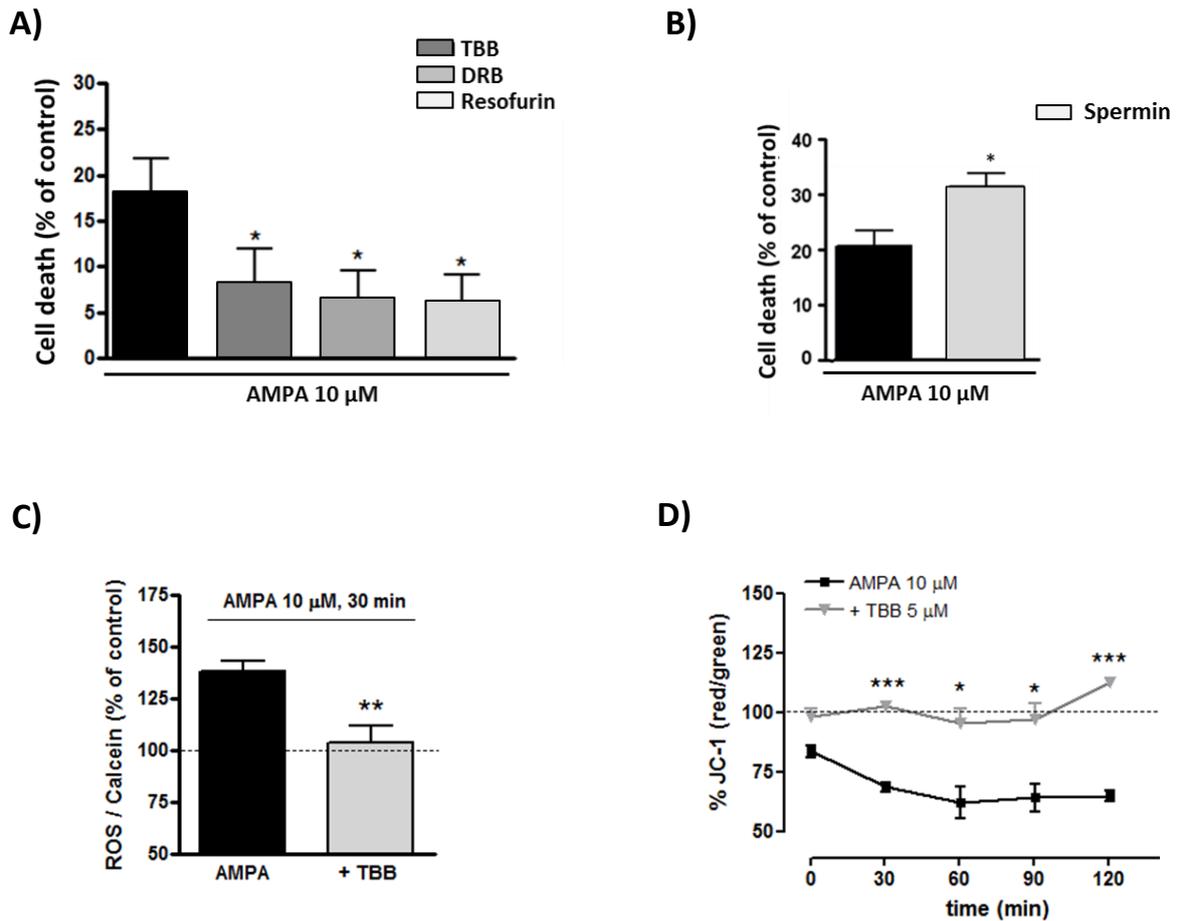


Figura 53. La modulación de CK2 modifica las respuestas oligodendroglial tras el estímulo moderado de los receptores AMPA. Los oligodendrocitos fueron pre-incubados durante 3 h con TBB, DRB, resofurina (5 μ M en todos los casos) o spermina (10 μ M) antes de su exposición a AMPA (10 μ M, 30 min). A) y B) La determinación de la viabilidad celular se llevó a cabo mediante la sonda calcein-AM, 24 h después del estímulo. La inhibición de CK2 disminuye de forma significativa el daño oligodendroglial provocado por AMPA mientras que su activación por spermina lo incrementa. C) La generación de ROS se cuantificó a través de la sonda DCFDA. Los valores de las células control, no tratadas, se consideraron un 100% de generación de ROS. El efecto provocado por AMPA no tiene lugar en presencia del inhibidor de CK2. D) Tras el estímulo con AMPA las células se incubaron con la sonda JC-1 durante 15 min y el potencial de la membrana mitocondrial se midió cada 30 min. El tiempo 0 representa el primer tiempo de lectura tras la incubación con la sonda. El potencial de la membrana mitocondrial de las células no tratadas se consideró control (100%) en cada tiempo analizado. En todos los casos se representa la media \pm S.E.M (n=3). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado con las células tratadas únicamente con agonista.

Estos datos apoyan la idea de que la sobrestimulación de los receptores AMPA oligodendrogiales ocasiona la activación de CK2 y ésta, probablemente, contribuye al avance de la señal apoptótica, en contraste a lo descrito en la mayoría de los trabajos publicados. Sin embargo, y apoyando nuestros resultados, pudimos encontrar la descripción de otra función de CK2, a favor de su participación en procesos de muerte celular que, si bien minoritaria, encajaba dentro de contextos apoptóticos en los que la activación de JNK jugaba un papel fundamental (Minn y cols, 2003; Hilgard y cols, 2004). De todas formas, y debido a lo inesperado de estos datos, decidimos analizar de manera concluyente si el estímulo de los receptores AMPA en oligodendrocitos provocaba o no la activación de CK2 y, para ello, desarrollamos un ensayo quinasa *in vitro* utilizando lisados celulares totales de oligodendrocitos sometidos a diferentes tratamientos.

Como se aprecia en la figura 54A, el estímulo con AMPA (10 μ M, 30 min) provocó la activación de CK2, cuya actividad se puso de manifiesto por la detección de fosforilaciones en Serina mediante un anticuerpo específico (anti-pSer). Dicha activación no tuvo lugar en presencia del inhibidor TBB (5 μ M) y fue magnificada por su activador spermina (10 μ M). Además, mediante q-PCR, pudimos determinar que este incremento en la activación de CK2 inducida por AMPA no estaba ligado a un aumento en los niveles de expresión de la quinasa, tanto de su subunidad α (catalítica), como de la subunidad β (reguladora) (Fig.54B).

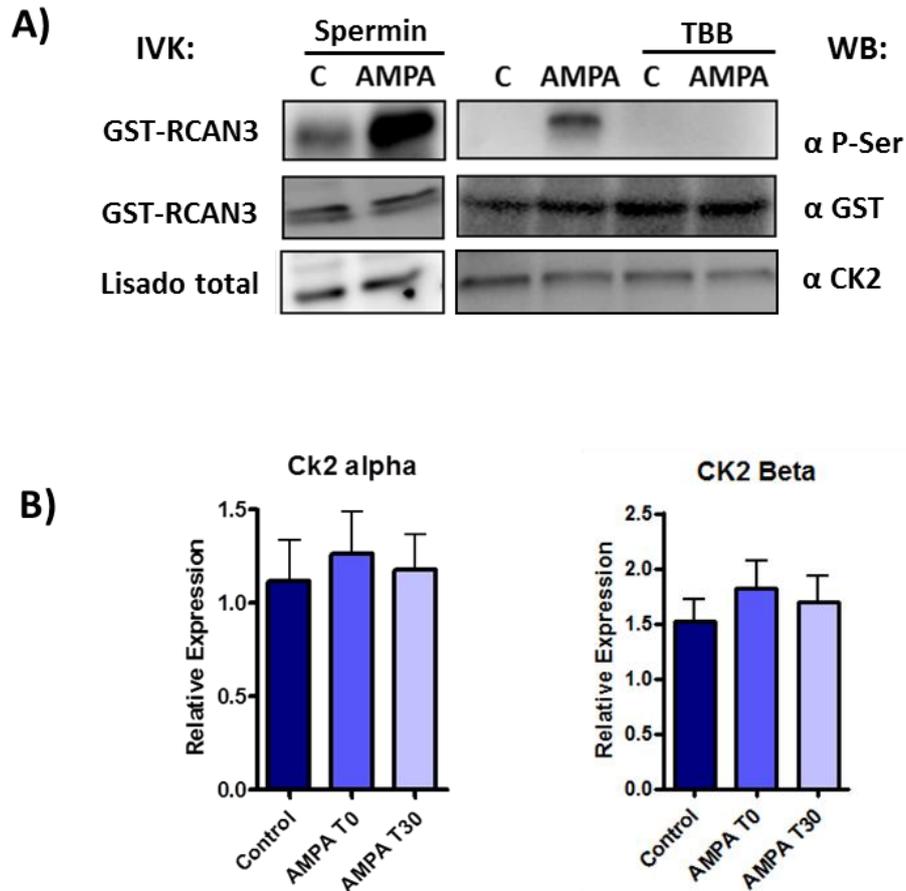


Figura 54. La estimulación de los receptores AMPA en oligodendrocitos ocasiona la activación de CK2 no vinculada a variaciones en sus niveles de expresión. Los oligodendrocitos fueron pre-incubados durante 1 h con spermina (10 μ M) o durante 3 h con TBB (5 μ M) antes de su exposición a AMPA (10 μ M, 30 min) y la proteína total fue recogida a los 20 min después del estímulo. A) Ensayo quinasa *in vitro* (IVK) dirigido a determinar la activación de CK2 inducida por AMPA, aplicando el protocolo descrito para esta técnica en Materiales y Métodos. La actividad quinasa se determinó mediante el anticuerpo anti-p-Ser y el control de carga de la proteína se detectó a través del anticuerpo anti-GST. Mediante el western blot anti-CK2 sobre los lisados celulares totales se puso de manifiesto la presencia de la quinasa en las diferentes situaciones experimentales. B) Análisis de los niveles de expresión de CK2 α y CK2 β analizados mediante qPCR en oligodendrocitos control y sometidos a AMPA 10 μ M durante 30 min. El procesamiento para la obtención del RNA se inició tras la retirada del estímulo (T0) y 30 min después (T30), siguiendo el protocolo descrito en el apartado Materiales y Métodos. Los valores obtenidos fueron normalizados con un factor dependiente de tres genes constitutivos y el software GeNorm. Los datos expresados corresponden a las medias \pm SEM (n=3).

Finalmente, y para comprobar la participación de CK2 en otro modelo experimental de muerte oligodendroglial, analizamos el efecto de su inhibición tras estímulos de excitotoxicidad sobre nervios ópticos aislados de ratones transgénicos *PLP-DsRed*. Para ello, se siguió el mismo procedimiento descrito en ocasiones anteriores utilizando, en este caso, TBB como inhibidor de CK2 a analizar. Como se muestra en la figura 55, la inhibición de CK2 redujo de forma significativa tanto la liberación de LDH como la pérdida de oligodendrocitos provocada por la exposición a AMPA.

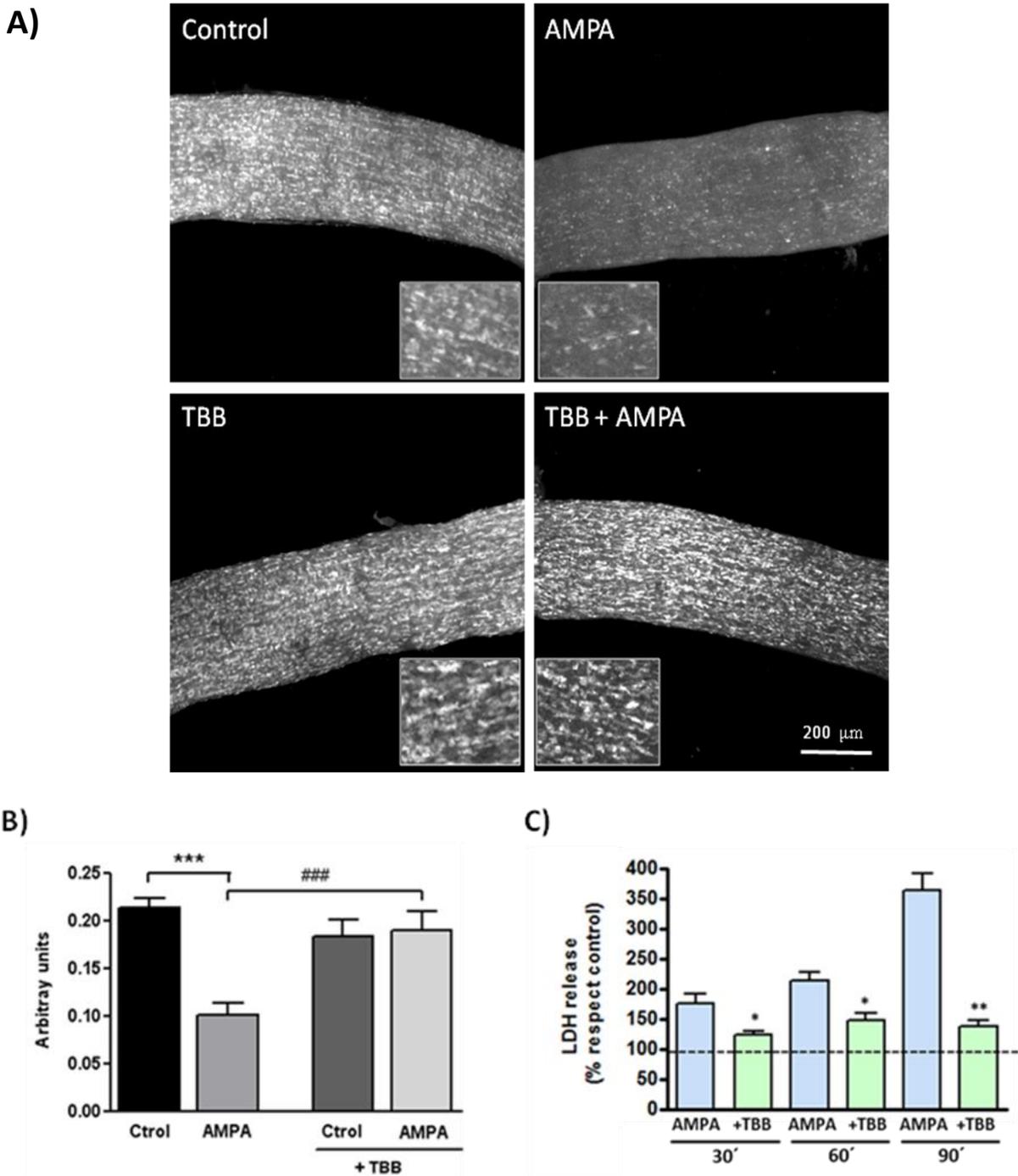


Figura 55. La inhibición de CK2 atenúa el daño excitotóxico causado por la estimulación de los receptores AMPA en nervios ópticos aislados de ratones PLP-Ds. Los nervios ópticos, una vez aislados, fueron pre-incubados en medio aCSF en ausencia o presencia de TBB (25 μ M) durante 1 hora y posteriormente estimulados con AMPA (100 μ M; 2 horas) previa adición de CTZ (100 μ M; 15 min). A) Imágenes representativas de los nervios ópticos de ratones transgénicos PLP-Ds Red sometidos a las condiciones descritas anteriormente. La pérdida de la señal fluorescente (oligodendrocitos) provocada por AMPA no tuvo lugar en presencia del inhibidor de CK2. Barra de escala, 200 μ m. B) Cuantificación de la señal de fluorescencia total presente en los nervios ópticos aislados sometidos a los diferentes tratamientos. El efecto mediado por la activación de los receptores AMPA fue revertida en presencia de TBB. Los datos se muestran como medias \pm SEM, (n=3). ***p<0.001 comparado con la situación control. ###p<0.001 comparado con los nervios ópticos tratados con agonista en ausencia de inhibidor. C) Análisis de la liberación de LDH tras la activación de los receptores AMPA en nervios ópticos aislados. El incremento en la liberación de LDH ocasionado por la estimulación de los receptores AMPA y observado a los distintos tiempos analizados (30, 60 y 90 min) disminuyó de forma significativa en presencia de TBB. Los datos se muestran como medias \pm SEM (n=3). *p<0.05, **p<0.01 comparado con los nervios ópticos tratados únicamente con agonista.

Los datos mostrados hasta el momento se pueden interpretar como indicios que apuntan en una misma dirección: la inhibición de CK2, a priori quinasa “pro-supervivencia” se revela, en oligodendrocitos y en nuestro modelo de excitotoxicidad, como un mecanismo de protección eficaz frente al daño mediado por la activación moderada de los receptores AMPA. Este hecho sólo podría ser explicado si la cascada de señalización desencadenada por AMPA tuviese una serie de características concretas que justificaran este efecto, en principio controvertido. Como ya hemos dicho, existe constancia de la implicación de CK2 en procesos apoptóticos en los que la activación de JNK es clave. Por ello, analizamos el posible vínculo entre CK2 y la activación de JNK en nuestro modelo.

4.2. Relación entre la quinasa CK2 y el eje JNK/p38/p53 tras estímulos excitotóxicos

Bajo el supuesto de la inhibición de CK2 mediante TBB (5 μ M) analizamos el grado de fosforilación/activación de JNK, así como de p38, en oligodendrocitos incubados con AMPA durante 30 min (Fig. 56). Así, mediante western blot pudimos observar cómo el incremento significativo y temprano (10 y 30 min post-estímulo) en los niveles de p-JNK ($403,2 \pm 29,68\%$ y $299,3 \pm 38,66\%$, respectivamente) inducido por la estimulación de los receptores AMPA disminuía drásticamente en presencia de TBB ($122,54 \pm 16,49\%$ y $116,73 \pm 8,50\%$, comparado con el 100% control). Del mismo modo, el incremento observado en p-p38 ($319,8 \pm 16,14\%$ y $388,3 \pm 19,43\%$) se reducía significativamente en presencia del inhibidor TBB ($176,1 \pm 25,31\%$ y $170,9 \pm 22,05\%$, respectivamente), si bien de forma no tan acusada como en el caso de p-JNK.

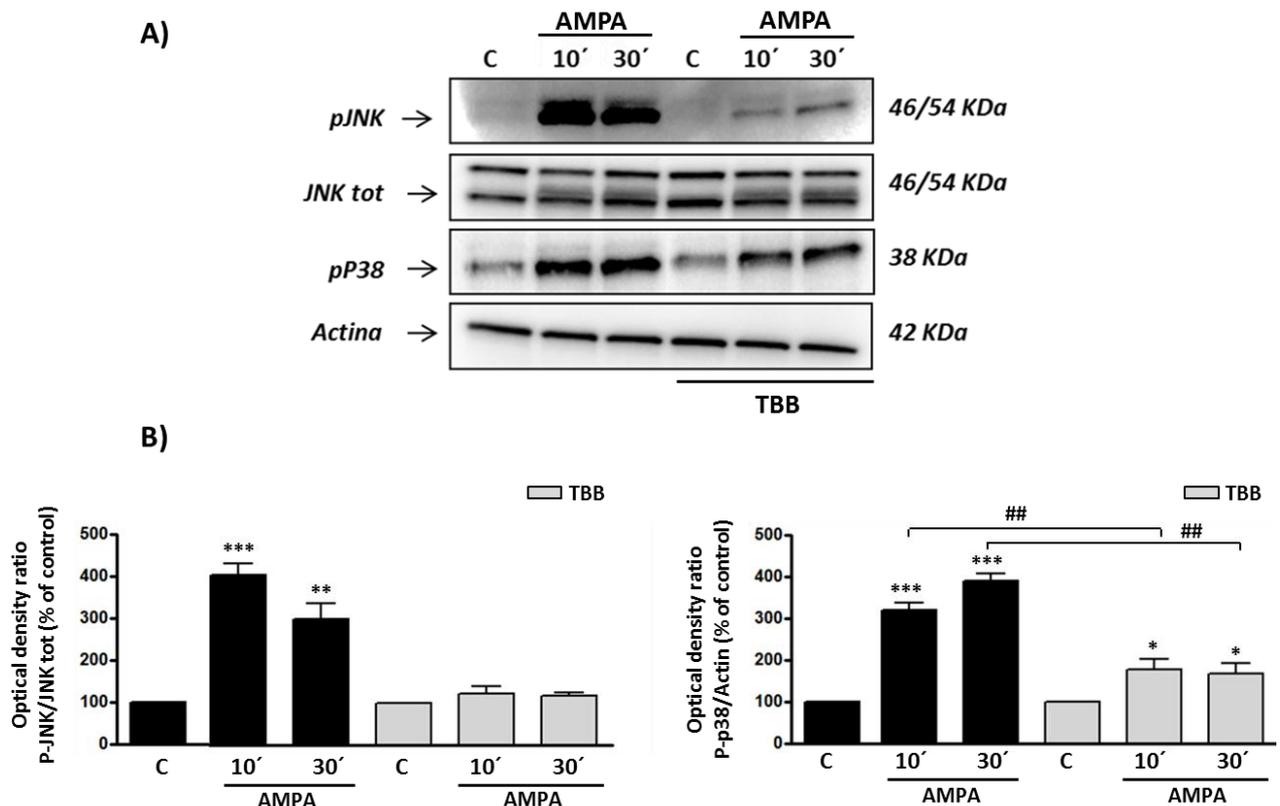


Figura 56. La inhibición de CK2 limita el grado de fosforilación/activación de JNK y p38 ocasionados por la estimulación de los receptores AMPA oligodendrogiales. Los oligodendrocitos fueron pre-incubados con TBB (5 μ M) durante 3 h previas al estímulo con AMPA (10 μ M; 30 min) y la proteína total fue recogida a los 10 y 30 min tras la retirada del estímulo excitotóxico. A) Western Blot donde se analizó la expresión de p-JNK, p-p38, JNK total y actina en las distintas situaciones. B) Cuantificación de la densidad óptica que puso de manifiesto el incremento en los niveles de p-JNK y p-p38 inducidos por la activación de los receptores AMPA en oligodendrocitos. Estos incrementos no tuvieron lugar en presencia del inhibidor de CK2, TBB. Los valores corresponden a la densidad óptica de p-JNK, p-p38 normalizados frente a JNK total o actina y representan las medias \pm S.E.M. (n=3); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; comparado con la situación control. ## $p < 0,01$ comparado con las células tratadas únicamente con agonista.

Además, y analizando p53 como otro de los componentes de la vía JNK/p38/p53, constatamos la existencia de un posible nexo entre CK2 y la función transcripcional de p53 activada por AMPA, en base a las imágenes que pudimos obtener mediante inmunofluorescencia. Como se muestra en la figura 57, el paso al núcleo de p53, que tiene lugar de manera temprana tras la exposición a AMPA, es revertido en presencia del inhibidor de CK2 (TBB; 5 μ M).

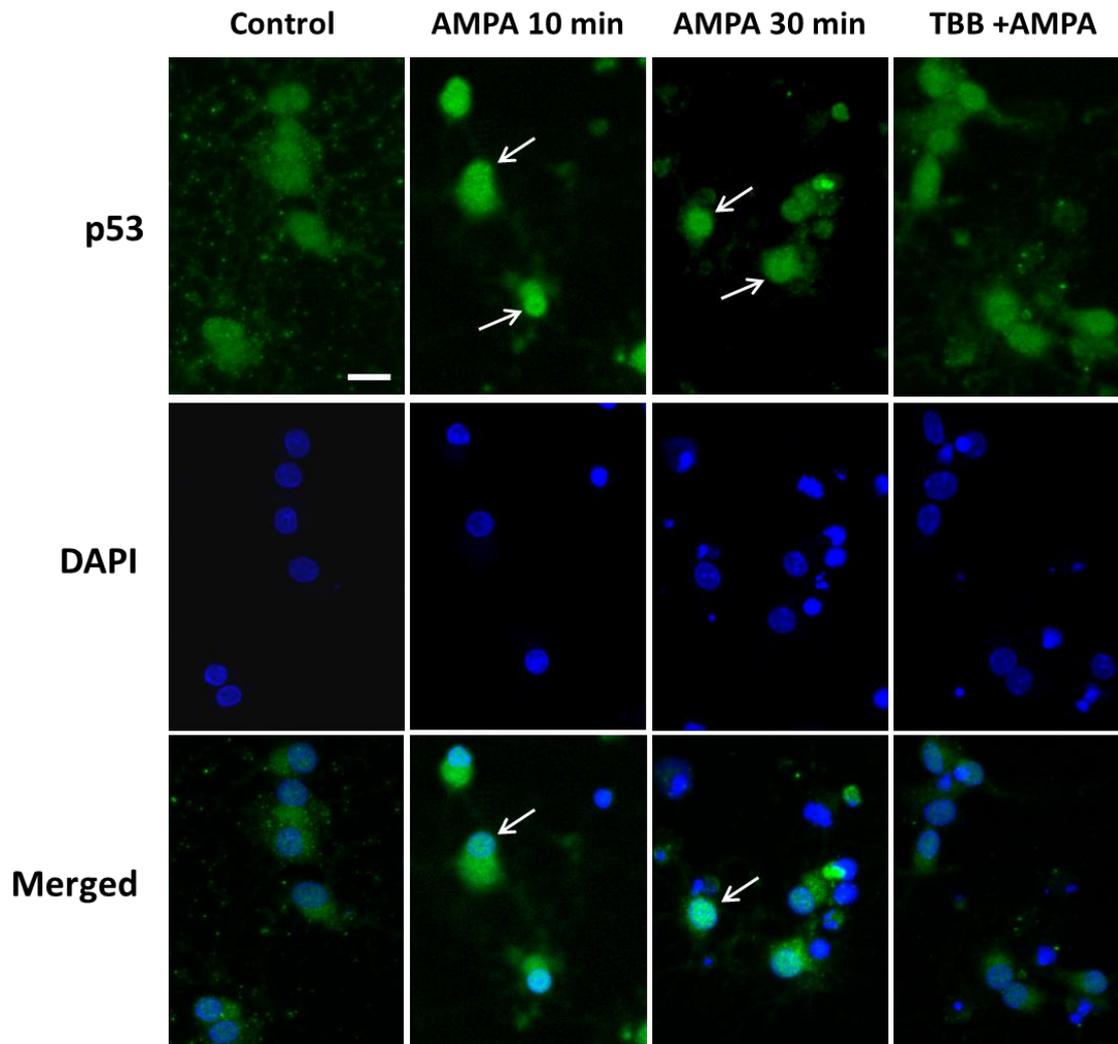


Figura 57. La localización de p53 en el entorno nuclear inducida por la estimulación de los receptores AMPA en oligodendrocitos, se reduce mediante la inhibición de CK2. Los oligodendrocitos fueron pre-incubados con TBB (5 μ M, 3 horas) antes de su exposición al AMPA (10 μ M, 30 minutos), en ausencia o presencia del citado inhibidor. Las células fueron fijadas a los 10 y a los 30 minutos tras la retirada del estímulo excitotóxico y a continuación procesadas para realizar la inmunofluorescencia, empleando el anticuerpo específico para p53 total (verde) y el Hoesch para teñir los núcleos. El tratamiento con AMPA, provocó incremento y movilización nuclear de p53, siendo revertido este fenómeno en presencia del TBB. Barra de escala 10 μ M.

Esta relación bien podría estar mediada por acción directa de CK2 sobre p53 a través de su fosforilación en el residuo Ser392 (Sayed y cols, 2001; Keller y Lu, 2002) o bien indirectamente a través de la influencia que, como hemos dejado patente, posee CK2 sobre JNK, a tenor de la importancia que éste último tiene en la regulación de la función transcripcional de p53.

Para determinar cuál podría ser la relación existente entre estas dos moléculas en nuestro modelo celular, desarrollamos ensayos en los que inmunoprecipitamos la proteína CK2 y, a continuación, mediante western blot pusimos de manifiesto la presencia de p53, tanto en oligodendrocitos control como tratados con AMPA 10 μ M durante 30 min (Fig. 58).

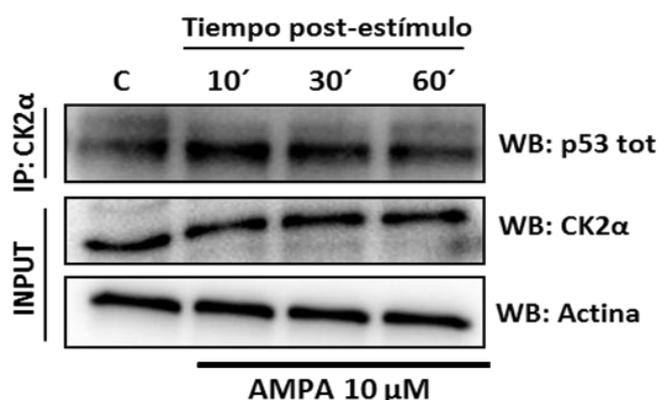


Figura 58. Interacción CK2-p53 tras la activación de los receptores AMPA en oligodendrocitos, detectada mediante inmunoprecipitación. Los oligodendrocitos fueron estimulados con AMPA (10 μ M, 30 min) y la proteína total fue recogida a varios tiempos tras la retirada del estímulo (10, 30 y 60 min). A continuación, se aplicó el protocolo descrito para la técnica de Inmunoprecipitación (ver Materiales y Métodos) empleando el anticuerpo anti-CK2 α unido a bolas de agarosa. Mediante western blot, se puso de manifiesto la señal de p53 inmunoprecipitado con CK2 (WB: p53 total), así como los niveles de CK2 α (WB: CK2 α) y actina en los extractos celulares totales correspondientes a cada situación experimental.

Los ensayos de inmunoprecipitación indicaron la posible existencia de una interacción molecular directa entre CK2 y p53, puesta de manifiesto de manera temprana durante las etapas iniciales de la señalización inducida por AMPA. Estos datos sugieren, junto a los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia, la participación de CK2 en los procesos moleculares que conllevan a la translocación nuclear de p53 en los oligodendrocitos sometidos a la activación de los receptores AMPA.

4.3. Participación de CK2 en la modulación del estrés de RE inducido por AMPA

El retículo endoplasmático (RE) se erige como uno de los orgánulos celulares más importantes a la hora de amortiguar y procesar el impacto citotóxico de un evento o agente estresante. El estrés del RE es un fenómeno característico de la excitotoxicidad glutamatérgica, tanto a nivel neuronal (Sokka y cols, 2007; Ruíz y cols, 2009) como oligodendroglial (Ruíz y cols, 2010), resultando en la activación del sistema UPR. A

su vez, se ha descrito la relación de CK2 con la modulación de UPR, entre otros modelos, en células oligodendrogliales sometidas a estrés reticular (Hosoi y cols, 2012).

En base a lo expuesto, intentamos determinar la posible participación de CK2 en la señalización intracelular mediada por el estrés del RE y, como paso inicial, determinamos mediante doble inmunofluorescencia la distribución subcelular de CK2 en oligodendrocitos, en concreto su posible localización en el retículo endoplasmático. Teñimos el RE con un anticuerpo anti-KDEL (marcador reticular) y pusimos de manifiesto la presencia de CK2 con un anticuerpo anti-CK2 α . Como se puede apreciar en las imágenes de la figura 59, la tinción de CK2 α coincide con el marcador reticular, lo que sugiere la existencia de CK2 en el retículo endoplasmático de los oligodendrocitos en cultivo.

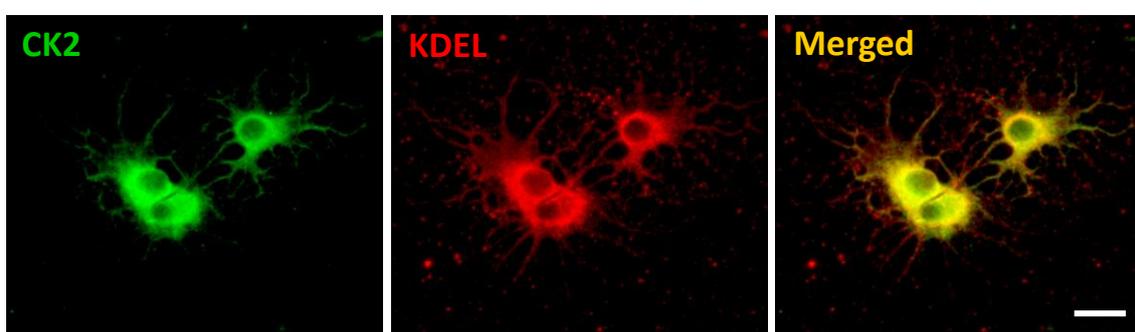


Figura 59. Presencia de CK2 en el retículo endoplasmático de los oligodendrocitos. Los oligodendrocitos tras 2 DIV, fueron procesados mediante doble inmunofluorescencia, para la detección de CK2 (verde) y KDEL (rojo; marcador de RE). El panel derecho muestra una imagen resultado de la convergencia de las señales obtenidas para CK2 y KDEL. Barra de escala: 10 μ M.

En trabajos previos se ha puesto de manifiesto la interacción de CK2 con el sistema UPR a través de las consecuencias que su inhibición posee sobre las moléculas integrantes del mismo, como eIF2 α e IRE1 α (Hosoi y cols, 2012; Manni y cols, 2012; Götz y cols, 2013; Intemann y cols, 2014)

Teniendo esto en cuenta, analizamos el comportamiento de estas moléculas integradas en vías que conforman el sistema UPR y que funcionan como sensores del estrés reticular, en oligodendrocitos sometidos a condiciones de excitotoxicidad en ausencia o presencia del inhibidor de CK2.

En primer lugar, pudimos detectar un incremento agudo (tiempo 0 tras la retirada del estímulo excitotóxico, T0) en los niveles de fosforilación de eIF2 tras el estímulo moderado de los receptores AMPA ($237.15 \pm 23,24$), potenciado de manera significativa por la inhibición de CK2 mediante TBB (5 μ M) ($425,6 \pm 33,99\%$). Esta potenciación fue temporal y disminuyó a las 24 h post-estímulo, a diferencia del incremento sostenido proporcionado por thapsigargina, inductor de estrés de RE empleado como control positivo ($394,3 \pm 39,97\%$) (Fig. 60). Sin embargo, no pudimos observar cambios en los niveles de expresión de las chaperonas GRP78 y GRP94 tras la estimulación de los receptores AMPA oligodendrogliales, ni en

ausencia ni en presencia del inhibidor de CK2, chaperonas que sí incrementaron significativamente durante el tratamiento con thapsigargina (Fig. 60).

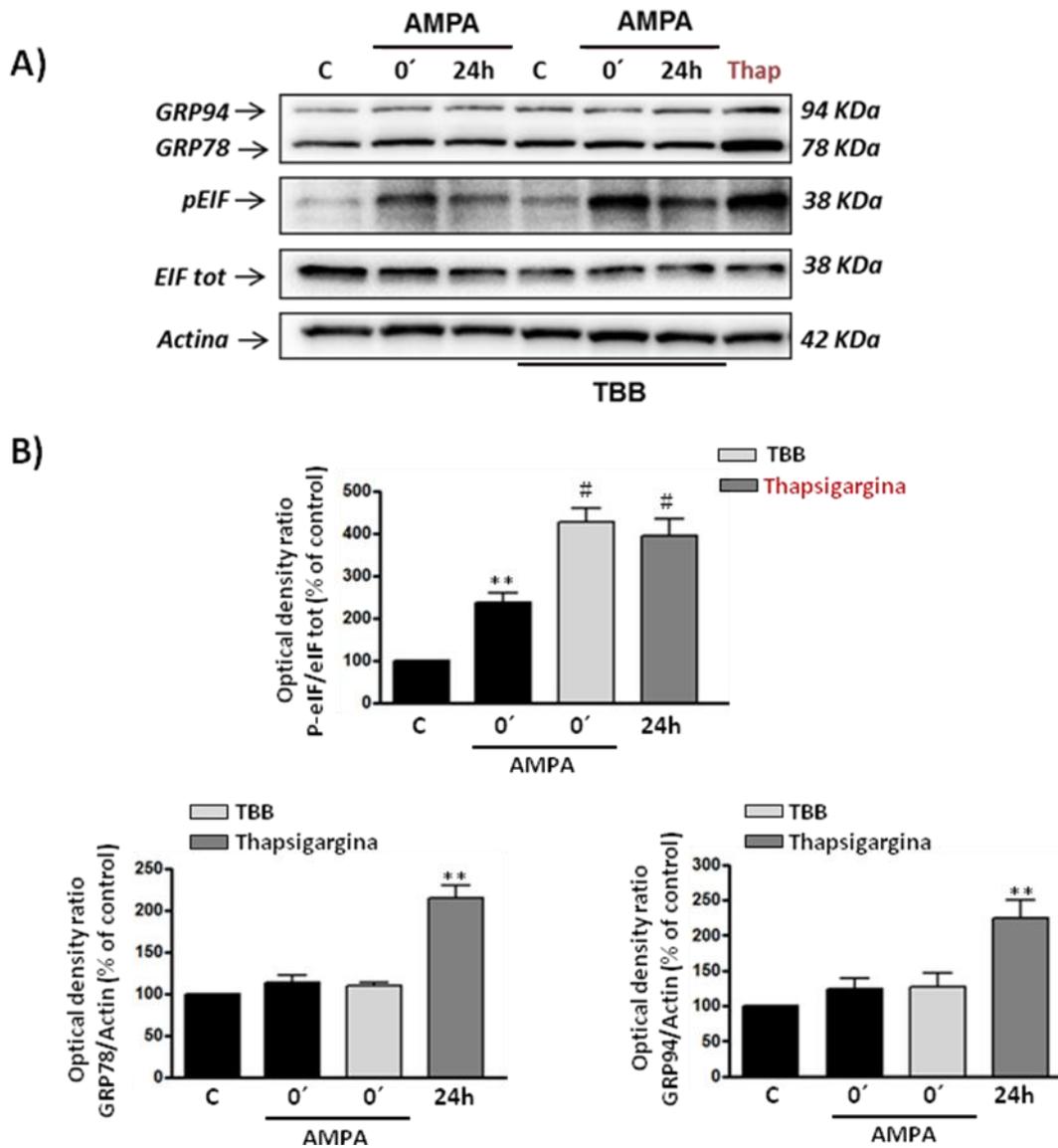


Figura 60. La inhibición de CK2 potencia de forma significativa la fosforilación de eIF2α causada por AMPA en oligodendrocitos pero no modifica los niveles de GRP78 y GRP94. Los oligodendrocitos fueron pre-incubados durante 3 h con TBB (5μM) o 24 h con thapsigargina (1μM) antes de su exposición a AMPA (10 μM, 30 min) y la proteína total fue recogida inmediatamente tras la retirada del estímulo (T0) o 24 h después. A) Mediante western blot se analizaron los niveles de expresión de GRP94, GRP78, p-eIF2α, eIF2α total y actina en las distintas situaciones. B) Cuantificación de la densidad óptica que pone de manifiesto el incremento temprano en los niveles de p-eIF2 (T0) tras la estimulación de los receptores AMPA, potenciado en presencia del inhibidor TBB. Los valores corresponden a la densidad óptica de p-eIF2α, GRP78 y GRP94 normalizados frente a eIF2α total o actina y representan las medias ± S.E.M. (n=3). **p<0.01 comparado con la situación control. # p<0.05 comparado con las células tratadas únicamente con agonista.

Este incremento en el nivel de fosforilación/activación de eIF2α por parte de TBB ofrece, como ya se ha mencionado, una interpretación ambigua, ya que podría constituir una potenciación de la respuesta de

defensa celular frente al evento citotóxico o, por el contrario, podría acabar fomentando el progreso de la cascada apoptótica.

Para discernir entre estos supuestos, nos basamos en trabajos previos en los que se describe la acción protectora de una molécula, salubrinal, inhibidor de la defosforilación de eIF2 α , que atenúa la muerte celular inducida por estrés reticular a través de un incremento en los niveles de p-eIF2 α (Boyce y cols, 2005; Sokka y cols, 2007; Liu y cols, 2012). El efecto protector de salubrinal sobre la muerte oligodendroglial inducida por AMPA había sido descrito por nuestro grupo, aunque sin determinar su posible relación con p-eIF2 α (Ruíz y cols, 2010) (Fig. 61A).

Por todo ello, analizamos mediante western blot si los cambios ejercidos por salubrinal sobre p-eIF2, en condiciones de excitotoxicidad glutamatérgica, se asemejan a los observados durante la inhibición de CK2. A este respecto, el incremento en los niveles de p-eIF2 α observados a los 10 y 30 min tras la estimulación de los receptores AMPA oligodendrogliales ($290,6 \pm 32,15\%$ y $255,2 \pm 25,72\%$, respectivamente) se vio potenciado en presencia de salubrinal ($10 \mu\text{M}$) ($613,4 \pm 56,88\%$ y $471,7 \pm 48,01\%$, respectivamente) (Fig.61 B y C).

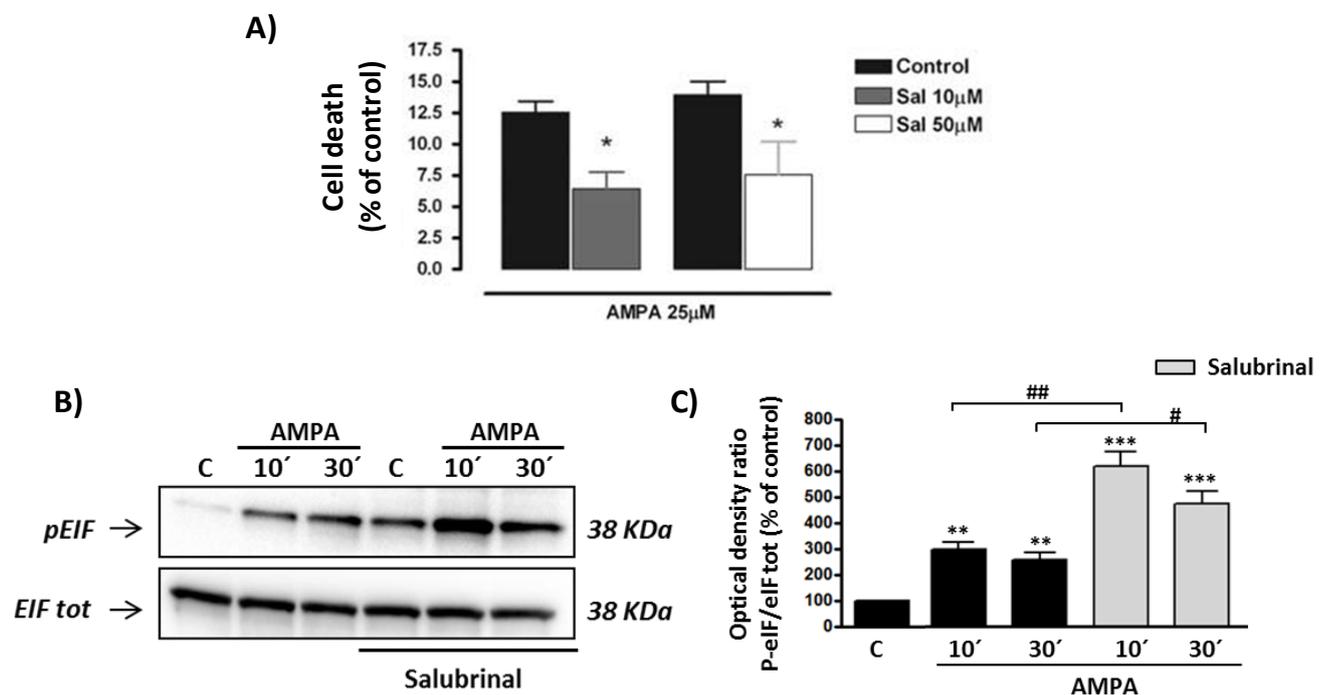


Figura 61. Salubrinal confiere protección a los oligodendrocitos tras excitotoxicidad y potencia la fosforilación/activación de eIF2 α . A) Ensayos de toxicidad con oligodendrocitos estimulados con AMPA en presencia o ausencia de salubrinal ($10 \mu\text{M}$ y $50 \mu\text{M}$) (datos cedidos por Ruiz y cols, 2010). B y C) Los oligodendrocitos fueron pre-incubados durante 30 min con salubrinal ($10 \mu\text{M}$), antes de su exposición a AMPA ($10 \mu\text{M}$, 30 min) y la proteína total fue recogida a los 10 y 30 min tras la retirada del estímulo. Mediante western blot se analizaron la expresión de p-eIF2 α y eIF2 α total en las distintas situaciones (B) y se cuantificó la densidad óptica resultante (C). El incremento significativo en los niveles de p-eIF2 α mediado por la activación de los receptores AMPA en oligodendrocitos se ve potenciado por la presencia de salubrinal. Los valores corresponden a la densidad óptica de p-eIF2 α normalizados frente a eIF2 α total y representan las medias \pm S.E.M. (n=3). **p<0.01, ***p<0.001 comparado con la situación control; #p<0.05, ##p<0.01 comparado con las células tratadas solo con agonista.

Estos resultados sugieren que la potenciación aguda y temporal del estado fosforilado de eIF2 α en oligodendrocitos sometidos a excitotoxicidad podría estar relacionada con una respuesta de defensa celular frente al estrés, más que representar un marcador de daño celular. Esta potenciación de p-eIF2 α podría ser uno de los mecanismos por los que TBB ejerce su capacidad protectora, del mismo modo que podría hacerlo salubrinal en estas mismas condiciones.

Por otro lado, analizamos el estado de otra molécula sensor de estrés reticular, IRE1 α , en oligodendrocitos expuestos a AMPA en ausencia o presencia del inhibidor de CK2. Como se aprecia en la figura 62, el estímulo con AMPA también ocasionó un incremento en los niveles de fosforilación de IRE1 α ($147,0 \pm 11,79\%$ y $151,3 \pm 13,26\%$, a los 10 y 30 min respectivamente), fenómeno que no tuvo lugar en presencia de TBB ($84,3 \pm 5,20\%$ y $58,4 \pm 17,24\%$, respectivamente).

Estos resultados están en concordancia con los descritos por otros autores en los que se indica cómo CK2 puede influir sobre la ruta IRE1 α /XBP-1, vinculada a procesos apoptóticos, de tal manera que su inhibición evita el incremento nocivo de esta vía, detectado en situaciones de estrés reticular (Hosoi y cols, 2012; Manni y cols, 2012).

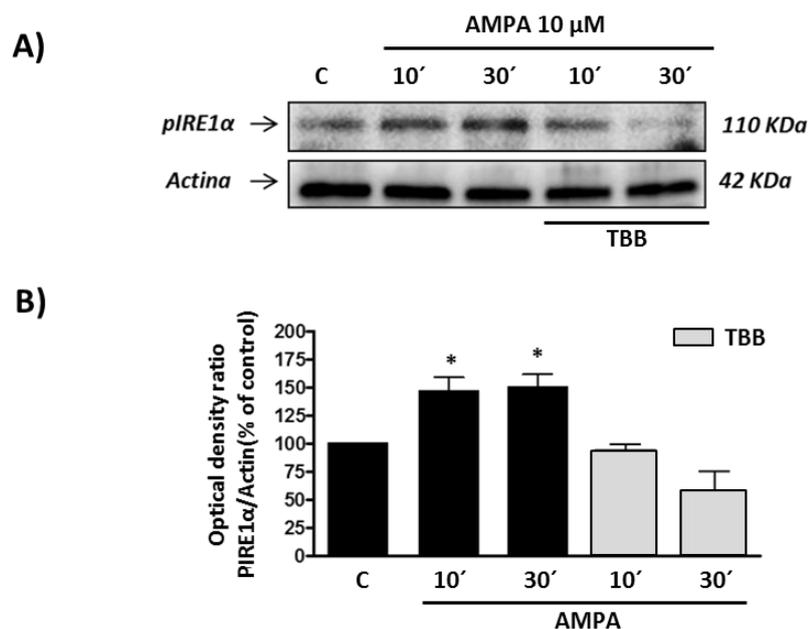


Figura 62. La inhibición farmacológica de CK2 revierte el incremento en los niveles de fosforilación de la molécula proapoptótica IRE1 α inducido por AMPA. Los oligodendrocitos fueron pre-incubados durante 3 horas con TBB (5 μ M) antes de su exposición a AMPA (10 μ M, 30 min) y la proteína total fue recogida a los 10 y 30 minutos tras la retirada del estímulo. A) Mediante Western Blot se analizaron los niveles de expresión de P-IRE1 α y actina en las distintas situaciones. B) Cuantificación de la densidad óptica que pone de manifiesto el incremento significativo en los niveles de P-IRE1 α . Este efecto, es revertido en presencia del TBB. Los valores corresponden a la densidad óptica de P-IRE1 α normalizada frente a actina y representan las medias \pm S.E.M. (n=3) * p <0.05, comparado con la situación control.

Las evidencias mostradas en este apartado indican que CK2 se revela como pieza importante en las vías señaladoras de muerte activadas por el estrés de RE. La inhibición de CK2 modifica la naturaleza de la UPR, incrementando los efectos positivos de ésta a través de eIF2 α y limitando los negativos al impedir la conexión IRE1 α /ASK-1/JNK/p38.

4.4. El silenciamiento génico de CK2 en oligodendrocitos reduce las señales de daño tras excitotoxicidad

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos mediante la inhibición farmacológica, abordamos también la supresión de CK2 en oligodendrocitos mediante silenciamiento génico. Para ello, empleamos una secuencia shRNA comercial anti-CK2 con resistencia integrada a puromicina. Los oligodendrocitos fueron aislados a partir del cultivo glial mixto y transfectados, como paso previo a su siembra, empleando para ello un electroporador (Nucleofector, Amaxa). De esta forma, se transfectaron dos millones de células de las cuales, la mitad incorporó el Sh-Scrambled que les otorgó resistencia frente a puromicina sin afectar la expresión de CK2. La mitad restante se transfectó con la secuencia Sh-CK2 que les otorgó resistencia frente a la puromicina a la par que limitó la expresión de CK2. Tras dos días post-transfección se agregó puromicina (0,3 μ g/ml) al medio durante 18 h con el fin de enriquecer la población transfectada y, 24 h después, se aplicó el paradigma experimental de excitotoxicidad sobre las dos poblaciones celulares.

En primer lugar corroboramos, mediante western blot, la disminución en la expresión de CK2 en las células que habían incorporado el sh-RNA dirigido contra CK2 ($66,6 \pm 7,01\%$) en comparación con el 100% de expresión atribuido a las células que habían incorporado el plásmido control (*sh-scrambled*) (Fig. 63A y B).

Una vez determinada la eficiencia del silenciamiento analizamos, bajo estas condiciones, el grado de activación de JNK. En este sentido, tras la estimulación de los receptores AMPA, se observó un incremento en los niveles de p-JNK ($173,6 \pm 15,79\%$, respecto al 100% atribuido al control) en los oligodendrocitos que habían incorporado el *sh-scrambled*. Por el contrario, no se observó dicho incremento en las células transfectadas con el sh-RNA dirigido contra CK2 ($92,34 \pm 3,59\%$, respecto a la situación control, no tratadas con AMPA) (Fig.63C y D).

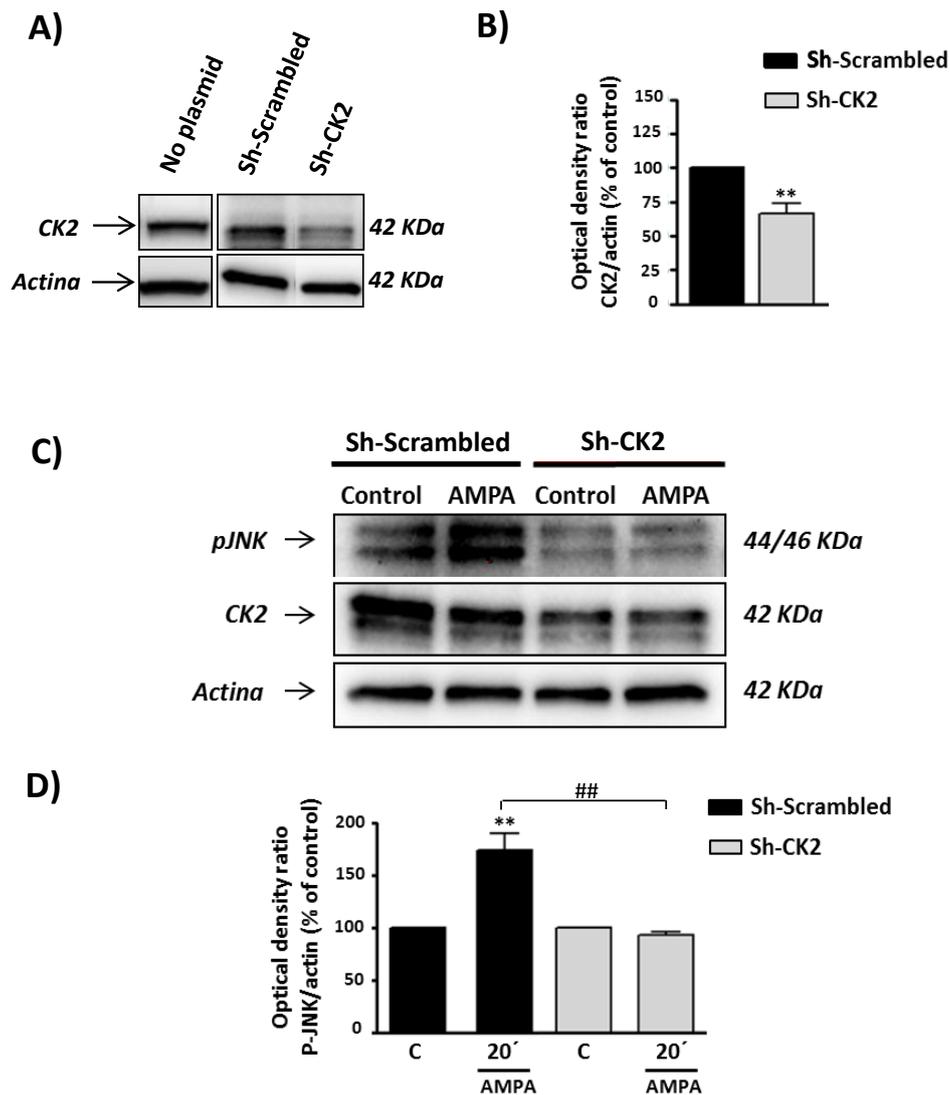


Figura 63. El silenciamiento génico de CK2 en oligodendrocitos evita la activación de JNK tras el estímulo con AMPA. Los oligodendrocitos fueron transfectados con sh-scrambled o sh-CK2 siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Tras dos días in vitro se seleccionaron las células de interés mediante la adición de puromicina (0.3 $\mu\text{g/ml}$; 18 horas). A las 24 h de haber retirado la puromicina, las células fueron sometidas al estímulo excitotóxico habitual (AMPA 10 μM , 30 min) y se recogieron los extractos celulares totales en el tiempo indicado. A) Análisis mediante western blot de la expresión de p-JNK, CK2 y actina, en las distintas situaciones. B) Cuantificación de la densidad óptica que pone de manifiesto el incremento de p-JNK inducido por AMPA en oligodendrocitos control (sh-scrambled) que no tiene lugar en los oligodendrocitos que habían incorporado el sh-CK2. Nótese la reducción en el nivel de expresión de CK2 en la población celular transfectada con el sh-CK2, comparada con la situación control (sh-scrambled). Los valores corresponden a la densidad óptica de p-JNK normalizados frente a la de actina, y representan la media \pm SEM (n=3). **p<0.01 comparado con células no tratadas con AMPA; ##p<0.01 comparado con células transfectadas con sh-scrambled y estimuladas con AMPA.

Por otro lado, analizamos el efecto de la inhibición génica de CK2 en relación a la activación de IRE1 α . A este nivel, el incremento observado en la fosforilación de IRE1 α ($138,66 \pm 5,89\%$) en las células transfectadas con el sh-*scrambled* y sometidas al estímulo con AMPA ($10\mu\text{M}$; 30 min), no pudo observarse en las células transfectadas con el Sh-CK2 ($103,12 \pm 2,27\%$) (Fig.64).

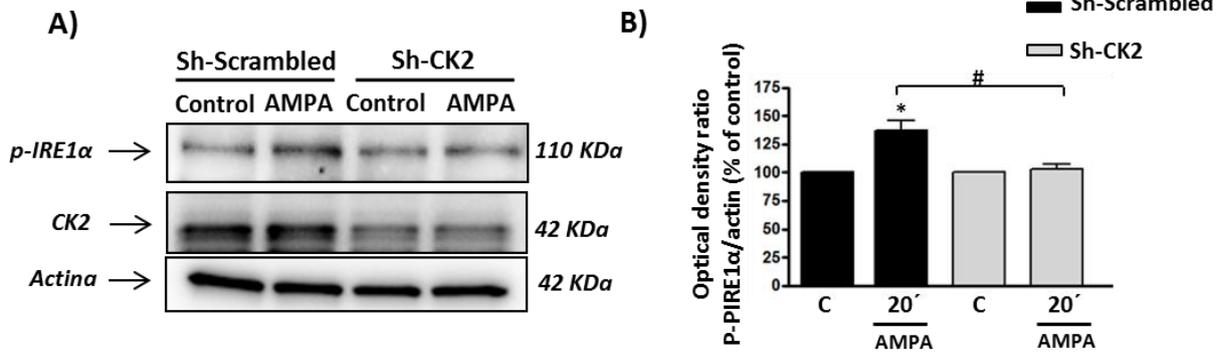


Figura 64. El silenciamiento génico de CK2 inhibe la fosforilación de IRE1 α inducida por AMPA en oligodendrocitos. Los oligodendrocitos fueron transfectados con el sh-*scrambled* o el sh-CK2, según el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Tras dos días in vitro se seleccionaron las células de interés mediante la adición de puromicina ($0.3 \mu\text{g/ml}$; 18 horas). A las 24 h de haber retirado la puromicina, se trataron los oligodendrocitos con AMPA ($10 \mu\text{M}$, 30 minutos) y la proteína total fue recogida 20 minutos después del estímulo. A) Mediante western blot se analizaron los niveles de expresión de p-IRE1 α , CK2 y actina en las distintas situaciones. B) Cuantificación de la densidad óptica que pone de manifiesto la correlación entre la reducción en los niveles basales de expresión de CK2 (oligodendrocitos transfectados con Sh-CK2) y la ausencia de activación/fosforilación de IRE1 α , que por el contrario si se observa en las células transfectadas con el sh-*scrambled* y tratadas con agonista. Los valores corresponden a la densidad óptica de p-IRE1 α normalizados frente a la de actina, y representan la media \pm SEM ($n=3$) * $p<0.05$ comparado con la situación control (sh-*Scrambled*) # $p<0.05$ comparado con las células transfectadas con sh-*scrambled* y estimuladas con AMPA.

Además, mediante ensayos de toxicidad aplicados sobre el mismo esquema experimental de transfección pudimos observar cómo, en las células transfectadas con la secuencia sh-*scrambled*, la muerte inducida por la estimulación de los receptores AMPA alcanzó valores de $16,63 \pm 2,77\%$, similares a los valores obtenidos habitualmente en oligodendrocitos no transfectados, mientras que en los oligodendrocitos que habían incorporado el sh-CK2 la muerte se redujo hasta un $2,26 \pm 1,78\%$ (Fig.65).

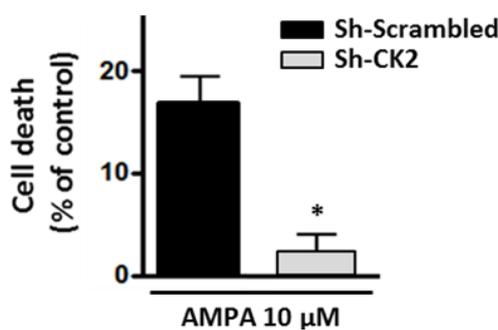


Figura 65. El silenciamiento génico de CK2 protege a los oligodendrocitos de la excitotoxicidad mediada por AMPA. Los oligodendrocitos fueron transfectados con sh-negativo y sh-CK2, según el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Tras dos días in vitro se seleccionaron las células de interés mediante la adición de puromicina (0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 18 horas). A las 24 h de haber retirado la puromicina, se trataron los oligodendrocitos con AMPA (10 μM , 30 minutos). La determinación de la viabilidad celular tuvo lugar 24 h después a través de la sonda calcein-AM. Los datos representan las medias \pm S.E.M (n=4). * $p < 0.05$ comparado con las células transfectadas con la secuencia sh-scrambled y tratadas con agonista.

Las evidencias obtenidas demuestran que el silenciamiento génico de CK2 atenúa la toxicidad oligodendroglial inducida por la estimulación moderada de los receptores AMPA. Esta protección celular podría estar basada en la ausencia de activación de JNK e IRE1 α cuando la expresión de CK2 es limitada, lo que sugiere una interacción molecular entre esta quinasa CK2 y estas moléculas inductoras de muerte.

5. Desregulación de la vía PTEN/AKT/mTOR en oligodendrocitos tras su exposición a AMPA

5.1. La activación de los receptores AMPA en oligodendrocitos altera la ruta de supervivencia mediada por AKT

Tras analizar las diferentes vías relacionadas con la muerte celular, a continuación nos propusimos analizar el estado de una vía asociada con procesos de supervivencia y proliferación, la vía PTEN/AKT/mTOR. En múltiples ocasiones, la activación de AKT evita que la célula sucumba ante señales citotóxicas mediante la fosforilación e inactivación de proteínas inducidas por estímulos de muerte (Datta y cols, 1997; Brunet y cols, 1999). Además, existen evidencias de que su actividad puede antagonizar directamente la vía SAPK/JNK mediante la fosforilación de alguno de sus componentes, entre los que cabe destacar ASK-1 (Kim y cols, 2001; Yuan y cols, 2003). Por todo ello, decidimos analizar el efecto que la activación de los receptores AMPA en oligodendrocitos provocaba sobre la vía PI3K/AKT, mediante el estudio de cambios en los niveles de fosforilación en la Ser 473. Como se muestra en la figura 66 el estímulo moderado de los receptores AMPA en oligodendrocitos, provocaba una rápida y sostenida defosforilación de AKT hasta 1 h después del estímulo, si bien los niveles comienzan a recuperarse a las 2 y

4 h tras el insulto ($11,9 \pm 3,84\%$; $17,7 \pm 5,05\%$; $20,01 \pm 8,56\%$; $76,53 \pm 2,52$; $81,15 \pm 17,51\%$, a los 10, 30, 60, 120 y 240 min, respectivamente).

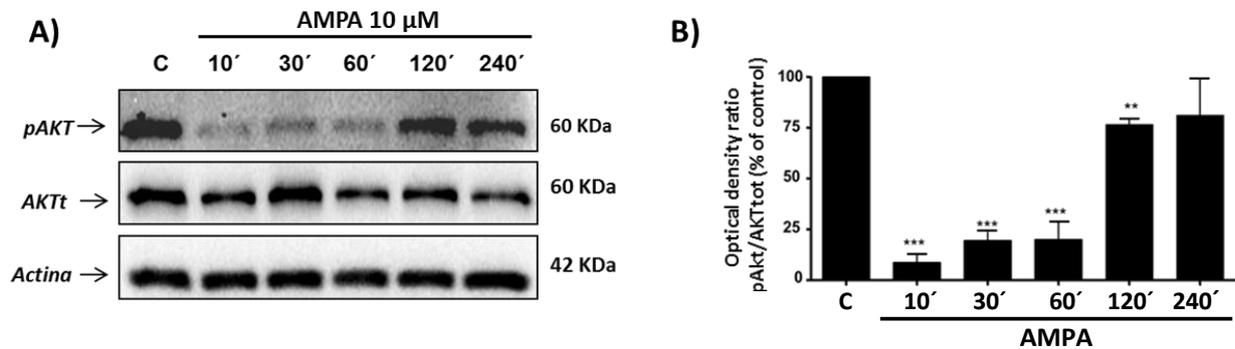


Figura 66. La activación de los receptores AMPA en oligodendrocitos provoca la caída en los niveles de activación de AKT. Los oligodendrocitos fueron tratados con AMPA (10 μ M, 30 min). La proteína total se recogió siguiendo un curso temporal que abarcó desde los 10 min hasta los 240 min posteriores a la retirada del estímulo. A) Mediante western blot se analizaron los niveles de expresión de p-AKT, AKT total y actina en las distintas situaciones. B) Cuantificación de la densidad óptica que pone de manifiesto la disminución marcada en los niveles de p-AKT tras la estimulación de los receptores AMPA en oligodendrocitos. Los valores corresponden a la densidad óptica de p-AKT normalizados frente a AKT total y representan las medias \pm S.E.M. (n=3) **p<0.01,***p<0.001 comparado con la situación control.

Esta pérdida de activación de la vía de supervivencia PI3K/AKT/mTOR, constituye el primer paso hacia la claudicación celular frente al estímulo excitotóxico debido a que la acción represora que esta vía ejerce sobre moléculas y vías de muerte se ve comprometida. Curiosamente, el curso temporal de represión de esta vía coincide con el período de máxima activación de la vía MAPKs (JNK y p38).

Intentando profundizar en este hecho, centramos nuestra atención en dos elementos clave en la regulación de esta vía de supervivencia: mTOR y PTEN. La primera es una quinasa cuya acción incrementa los niveles de fosforilación de AKT a nivel de la Ser473 y, por ende, promueve la activación de la vía PI3K/AKT, mientras la fosfatasa PTEN es considerada la principal ejecutora de la regulación negativa de esta misma vía. En base a estas afirmaciones, nuestro siguiente objetivo fue establecer el papel de mTOR y PTEN durante la desregulación de la vía PI3K/Akt inducida por la estimulación de los receptores AMPA oligodendrogiales.

En primer lugar, analizamos mediante western blot el estado de fosforilación de mTOR en la Ser2448, estado que se correlaciona de manera directa con su grado de activación. Tras diferentes análisis no pudimos observar variaciones significativas en los niveles de fosforilación/activación de mTOR en oligodendrocitos expuestos al agonista AMPA (Fig. 67).

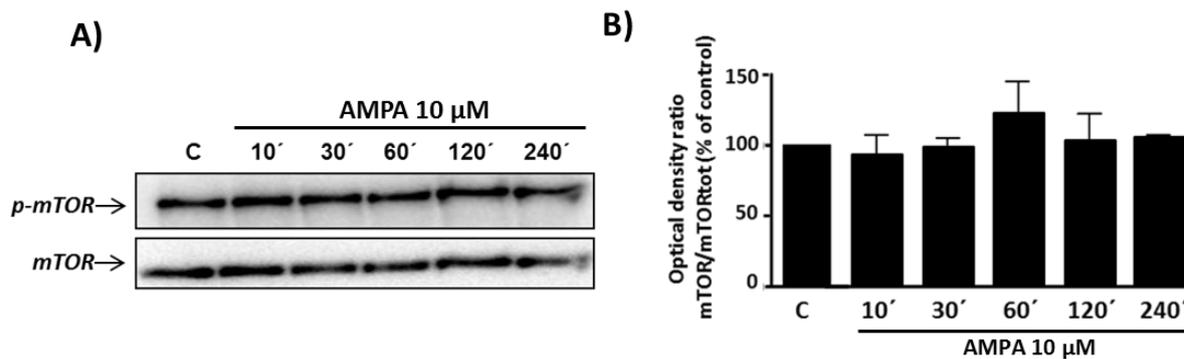


Figura 67. La excitotoxicidad mediada por AMPA no provoca variaciones en los niveles de fosforilación/activación de mTOR. Los oligodendrocitos fueron tratados con AMPA (10 μ M, 30 min) y la proteína total fue recogida a distintos tiempos, desde los 10 min hasta 240 min posteriores a la retirada del estímulo. A) Análisis de western blot mostrando los niveles de expresión de p-mTOR (Ser2448) y mTOR total en los distintos tiempos analizados. B) Cuantificación de la densidad óptica que indica la ausencia de cambios significativos en los niveles de p-mTOR tras la exposición a AMPA. Los valores corresponden a la densidad óptica de p-mTOR normalizados frente a m-TOR total y representan la medias \pm S.E.M. (n=3), comparado con la situación control.

5.2 PTEN es el principal regulador negativo de la vía de supervivencia PI3K/AKT en oligodendrocitos sometidos a excitotoxicidad

En relación a la fosfatasa PTEN, se empleó la molécula bisperoxovanadium (phen), como inhibidor farmacológico de esta enzima, compuesto cuyas propiedades han sido puestas de manifiesto en anteriores trabajos realizados en oligodendrocitos, entre otros tipos celulares (De Paula y cols, 2014). Inicialmente, se realizaron ensayos de toxicidad para analizar la posible protección derivada de mantener activa la vía PI3K/Akt a través de la inhibición farmacológica de PTEN (Fig. 68A). En estos ensayos se incluyó también wortmannina, inhibidor farmacológico de la activación de PI3K y, por tanto, de la vía PI3K/Akt en su conjunto. El inhibidor phen (2 μ M) ofreció una protección significativa ($2,51 \pm 2,38\%$) frente a la muerte generada por la activación moderada de los receptores AMPA oligodendrogiales ($12,97 \pm 1,98\%$). Además, pudimos inferir cómo la protección ejercida por este inhibidor tenía lugar a través de su interacción con la vía PI3K/Akt, ya que la incubación conjunta de los oligodendrocitos con phen y wortmannina anulaba el efecto del primero ($15,25 \pm 3,37\%$) (Fig. 68A).

A continuación, analizamos mediante western blot las consecuencias moleculares de la inhibición de PTEN, representadas de forma primaria por el estado de activación de Akt. Además, se tuvo presente que uno de los principales mecanismos de regulación de PTEN lo constituyen las fosforilaciones que sobre él ejercen multitud de moléculas y que modulan su estabilidad y actividad fosfatasa. En este sentido, para determinar los cambios en PTEN empleamos un anticuerpo específico para un *cluster* que abarca tres residuos (Ser380, Thr382 y Thr383), cuya fosforilación mantiene a PTEN en un estado estable e inactivo (Torres y cols, 2001; Nakahata y cols, 2014; Yang y cols, 2015).

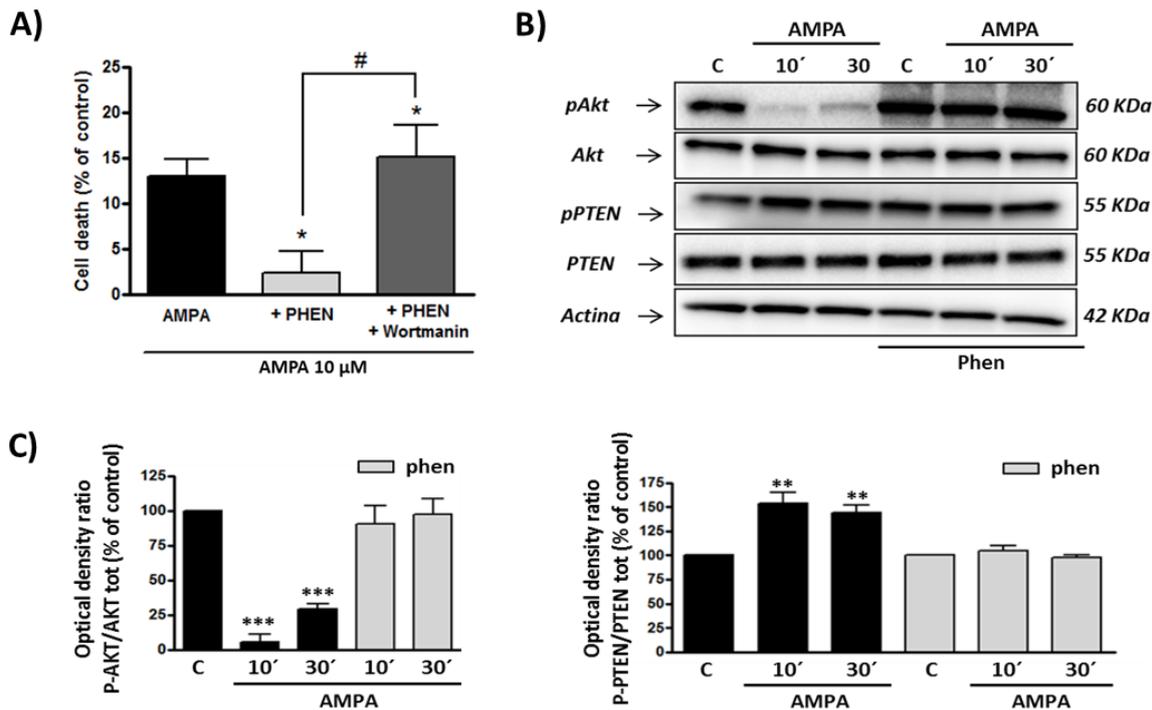


Figura 68. La inhibición de PTEN reduce la muerte excitotóxica provocada por AMPA en cultivos de oligodendrocitos a través de PI3K/AKT. A) Los oligodendrocitos fueron pre-incubados durante 30 min con phen (2 μM) o con phen (2 μM) y wortmanina (50 nM) antes de ser expuestos al AMPA (10 μM, 30 min). La determinación de la viabilidad celular tuvo lugar 24 h después a través de la sonda calcein-AM. B) Los oligodendrocitos fueron pre-incubados durante 30 min con phen (2 μM) antes de ser expuestos a AMPA (10 μM, 30 min) y los extractos celulares totales se recogieron a los 10 y 30 min tras la retirada del estímulo. Se analizó mediante western blot la expresión de p-Akt, Akt total, p-PTEN (Ser 380/Thr382/383), PTEN total y actina en las distintas situaciones. C) Cuantificación de la densidad óptica de los resultados de los western blots donde se observa la disminución de p-Akt inducida por AMPA y el incremento en los niveles de p-PTEN a los mismos tiempos analizados. La presencia de phen anula estos efectos. Los valores corresponden a la densidad óptica de p-Akt normalizados frente a la de Akt total y de p-PTEN frente a PTEN total, representando la media ± SEM (n=4). *p<0.05, **p<0.01 ***p<0.001 comparado con células control (no tratadas con agonista). #p<0.01 comparado con las células tratadas con agonista en presencia de phen.

La pre-incubación de los oligodendrocitos con phen (2 μM) incrementó, de forma basal, los niveles de p-Akt y por ende, de activación de la vía. En los oligodendrocitos no expuestos a phen, se detectó una bajada significativa de p-AKT a los 10 y 30 min tras la retirada del agonista AMPA (10 μM, 30 min) ($5,5 \pm 3,25\%$; $29,2 \pm 3,82\%$, respectivamente comparado con el 100% del control), efecto que quedó anulado en presencia de phen ($90,3 \pm 13,25\%$; $97,6 \pm 10,72\%$, respectivamente (Fig. 68 B y C).

En cuanto al estado de activación de PTEN, pudimos observar cómo el estímulo con AMPA produjo un incremento significativo, a los dos tiempos analizados, en los niveles de fosforilación del *cluster* Ser 380/Th382/383 ($154,1 \pm 10,97\%$ y $144,2 \pm 8,24\%$, respectivamente comparado con el 100% del control), situación que de nuevo no pudo ser observada en presencia del inhibidor phen ($104,4 \pm 5,19\%$ y $97,28 \pm 2,62\%$, respectivamente) (Fig. 68 B y C).

Por último, completamos el análisis observando la posible influencia que la inhibición de PTEN pudiese ejercer sobre moléculas implicadas en la señal apoptótica generada por la activación de los receptores

AMPA en oligodendrocitos. Analizamos la caspasa-8 como iniciadora del proceso y la proteína Bax como elemento clave en el proceso apoptótico final. Así, determinamos que los incrementos en la forma activa de la caspasa-8 ($149,5 \pm 17,23\%$ y $170,9 \pm 9,41\%$) y de Bax ($135,0 \pm 11,13\%$ y $160,2 \pm 8,31\%$) a los 10 y 30 min tras la retirada del AMPA no tuvieron lugar en presencia del inhibidor de PTEN ($86,8 \pm 11,85\%$ y $94,3 \pm 4,91\%$; $88,4 \pm 3,09\%$ y $80,1 \pm 10,41\%$, para caspasa-8 activa y Bax, respectivamente) (Fig. 69).

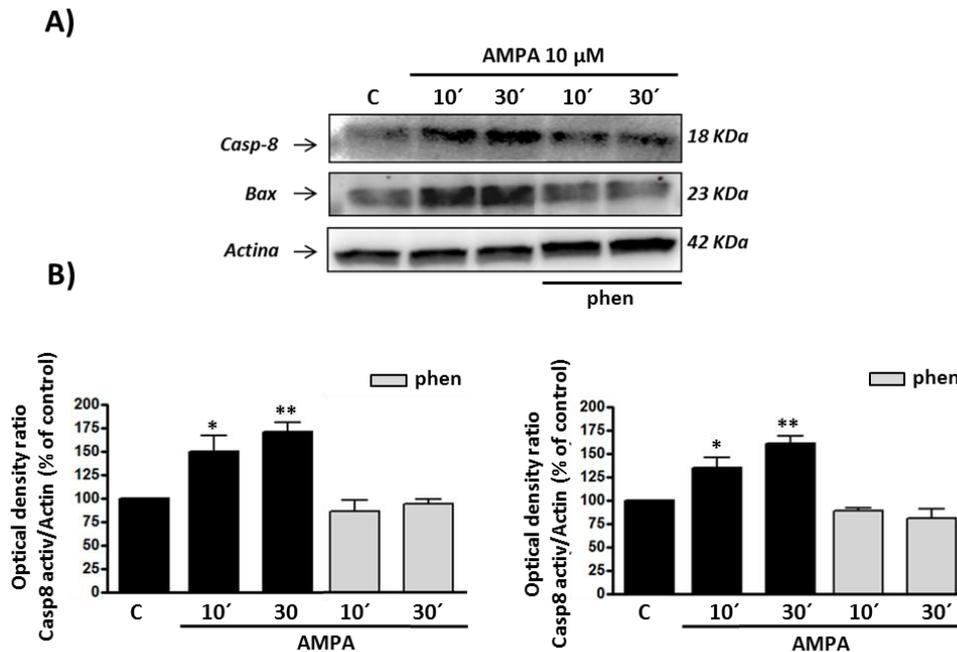


Figura 69. El inhibidor de PTEN evita la activación de las moléculas pro-apoptóticas caspasa-8 y Bax. Los oligodendrocitos fueron pre-incubados con phen (2 μM) durante 30 min previos a la incubación con AMPA (10 μM, 30 min) y la proteína total fue recogida a los 10 y 30 min después del estímulo. A) Mediante western blot se analizaron los niveles de expresión de la caspasa-8 activa, Bax activo y actina en las distintas situaciones. B) Cuantificación de la densidad óptica donde se observa el incremento en los niveles de caspasa-8 y Bax activos inducidos por AMPA y su ausencia en presencia del inhibidor de PTEN, siempre normalizados frente a actina. Los valores representan las medias \pm S.E.M. (n=3) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparado con las células control, no tratadas con agonista.

5.3. Análisis de la regulación de la actividad de PTEN mediante su fosforilación

Una vez determinada la participación de PTEN en los mecanismos responsables de la acusada inactivación de la vía PI3K/Akt en nuestro modelo experimental, así como la afectación de la fosforilación de PTEN en el *cluster* Ser380/Thr382/383, decidimos analizar la implicación de algunas de las quinasas descritas como capaces de modular la actividad de PTEN mediante distintas fosforilaciones, como ROCK, GSK3 β y CK2 (Al Kouri y cols, 2005; Maccario, 2007; Li y cols, 2005; Li y cols, 2014). Para dicho análisis se emplearon los compuestos Y27632 (5 μM o 10 μM), como inhibidor de ROCK, y AR-A014418 (5 μM), como inhibidor de GSK3 β . Como se muestra en la figura 70, y mediante ensayos de toxicidad, pudimos observar

que la inhibición de estas quinasas ROCK y GSK3 β , no modificaba de forma significativa la muerte oligodendroglial inducida por la activación moderada de los receptores AMPA.

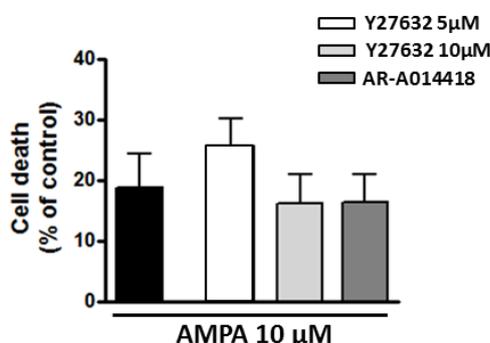


Figura 70. La inhibición de las quinasas ROCK o GSK3 mediante los compuestos Y27632 y AR-A014418, respectivamente, no modifica la toxicidad oligodendroglial inducida por AMPA. Los oligodendrocitos fueron pre-incubados durante 30 min con Y27632 (5 μ M o 10 μ M) o AR-A014418 (5 μ M). A continuación fueron expuestos a la señal excitotóxica mediante la activación moderada de los receptores AMPA (10 μ M, 30 min). La determinación de la viabilidad celular tuvo lugar 24 h después mediante la sonda calcein-AM. Los datos representan las medias \pm S.E.M. (n=4).

Habiendo descartado la participación de estas dos quinasas, retomamos el estudio de la afectación de PTEN mediante su fosforilación en el *cluster* Ser380/Thr382/383. Para ello, analizamos la implicación de CK2 en este proceso debido a que esta quinasa también había sido identificada como ejecutora de cambios en el estado de fosforilación de algunos residuos integrados y/o próximos a este *cluster* (Patsoukis y cols, 2013; Nahakata y cols, 2014).

Inicialmente, y mediante inmunofluorescencia, pudimos observar un notable incremento de los niveles de p-PTEN inducido por AMPA, que no se produjo en presencia de TBB, utilizando para ello el anticuerpo dirigido contra los residuos Ser380/Thr382/383 (Fig. 71A).

Por otro lado, mediante western blot, analizamos el grado de intervención de CK2 en la fosforilación de PTEN. Como se puede apreciar en la figura 71B y C, el incremento observado en los niveles de p-PTEN (Ser380/Thr382/383) a los 10 y 30 min tras la retirada de AMPA ($154,6 \pm 13,92\%$ y $134,2 \pm 8,32\%$, respectivamente), no se produjo en presencia de TBB ($91,9 \pm 12,98\%$ y $78,6 \pm 16,34\%$, respectivamente).

La disminución significativa en los niveles de p-Akt a los tiempos analizados en las células tratadas solo con AMPA ($33,8 \pm 11,68\%$ y $33,9 \pm 8,79\%$, respectivamente) no se dio en los oligodendrocitos tratados con TBB ($92,9 \pm 13,91\%$ y $87,5 \pm 14,62\%$, respectivamente) si bien la propia inhibición de CK2 provocó una disminución basal similar a la desencadenada por el AMPA (Fig. 71B y C).

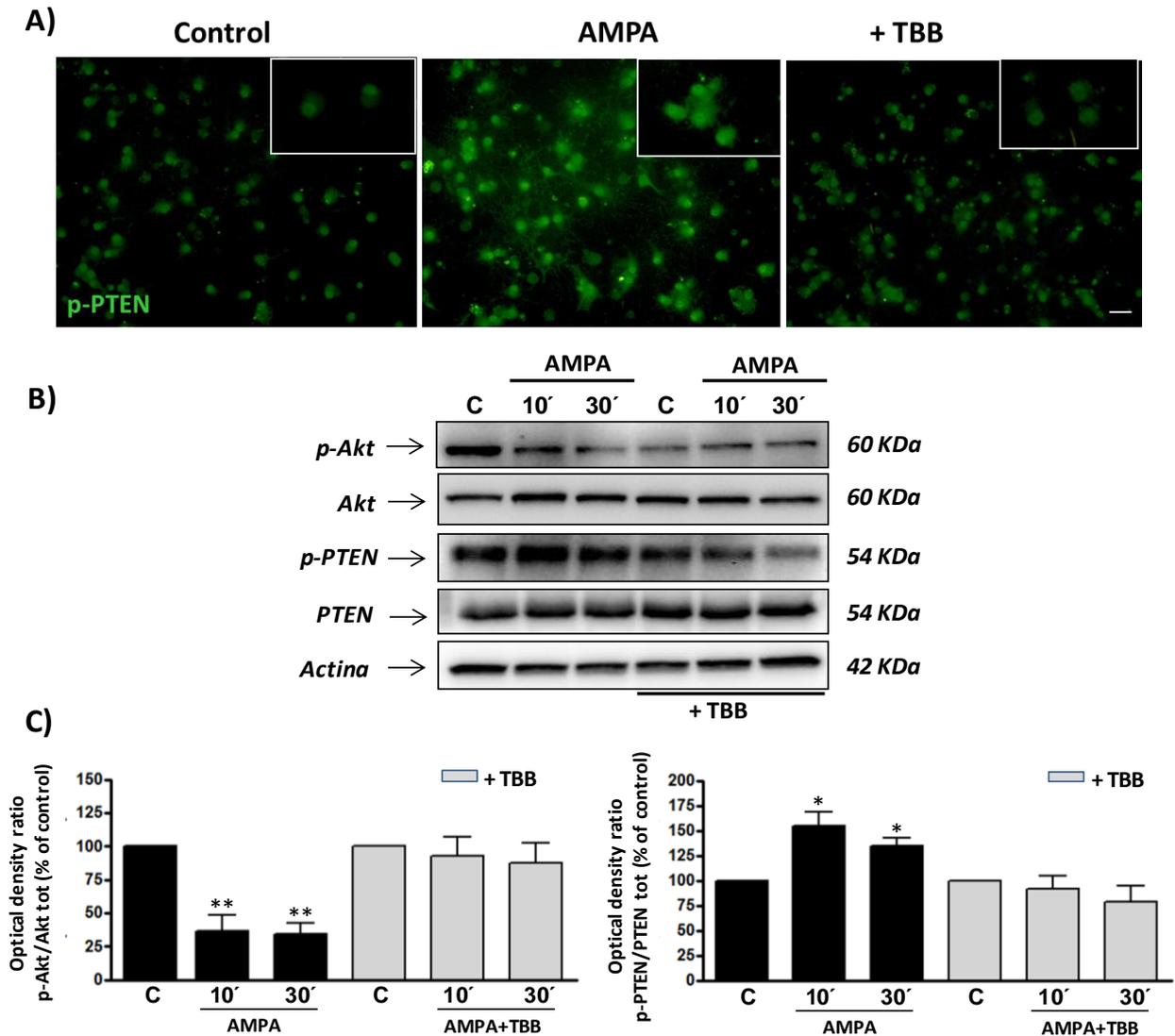


Figura 71. La estimulación de los receptores AMPA en oligodendrocitos provoca un incremento en los niveles de fosforilación de PTEN, disminuido en presencia del inhibidor de CK2. A) Los oligodendrocitos fueron preincubados con TBB (5 μ M, 3 h) antes de la exposición a AMPA (10 μ M, 30 min), se fijaron 10 min después y fueron analizados mediante inmunofluorescencia, para la detección de p-PTEN (Ser380/Thr382/Thr383). El tratamiento con AMPA provocó un incremento en la señal de p-PTEN, que fue revertido por la inhibición de CK2 mediante TBB. Barra de escala: 20 μ M. B) Las células fueron tratadas de la manera descrita y la proteína total fue recogida a los 10 y 30 min para su análisis por western blot para la detección de la expresión de p-Akt, Akt total, p-PTEN (Ser380/Thr382/383), PTEN total y actina en las distintas situaciones. C) Cuantificación de la densidad óptica que pone de manifiesto la disminución de p-Akt y el incremento de p-PTEN inducidos por AMPA, en ausencia o presencia de TBB. Los valores corresponden a la densidad óptica de p-Akt normalizada frente a Akt total, y p-PTEN normalizada frente a PTEN total y representan las medias \pm S.E.M. (n=3) *p<0.05, **p<0.01 comparado con las células control (no tratadas con agonista).

La fosforilación en el *clúster* Ser380/Thr382/383 se ha relacionado con estados inactivos de PTEN (Torres y Pulido, 2001; Nakahata y cols, 2014; Yang y cols, 2015). Debido a la existencia de cierta contradicción entre el grado de fosforilación de PTEN observado en este *cluster* y el de Akt, nos propusimos analizar la fosforilación de PTEN en Ser380, integrada dentro de este grupo de residuos y que,

de manera concreta, ha sido identificada como potenciadora directa de la actividad de PTEN (Okara y cols, 2006; Yim y cols, 2007).

Así, de acuerdo a lo esperado, mediante western blot observamos que la fosforilación de PTEN en Ser380 se incrementaba en oligodendrocitos expuestos a AMPA ($145,3 \pm 8,76\%$ y $153,7 \pm 11,29\%$, tras 10 y 30 min, respecto al 100 control). Este hecho fue inhibido en presencia de la molécula phen ($2 \mu\text{M}$), que incluso provocó una ausencia casi total de la fosforilación de PTEN en este residuo en los tiempos analizados ($12,1 \pm 4,03\%$ y $15,9 \pm 5,80\%$, respectivamente) (Fig. 72).

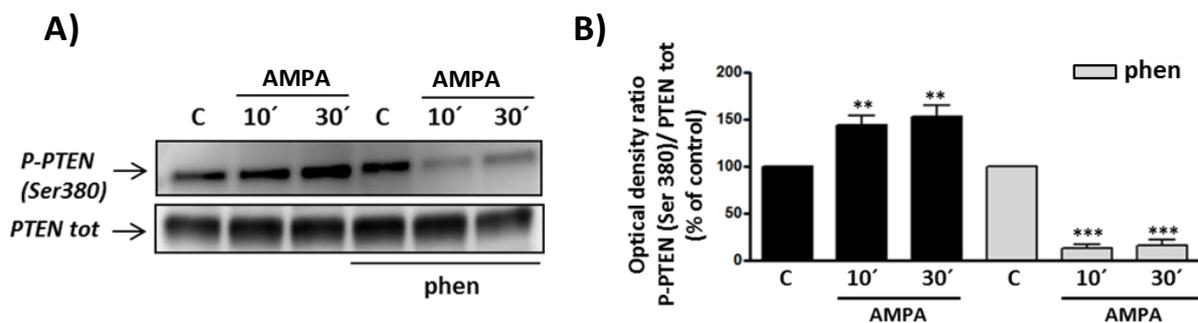


Figura 72. La presencia del inhibidor de PTEN durante los estímulos excitotóxicos reduce los niveles de p-PTEN en Ser380 inducida por la activación de los receptores AMPA en oligodendrocitos. Los oligodendrocitos fueron pre-incubados con phen ($2 \mu\text{M}$) durante 30 min antes de la exposición a AMPA ($10 \mu\text{M}$, 30 min) y la proteína total fue recogida después de 10 y 30 min. A) Mediante western blot se analizaron los niveles de expresión de p-PTEN (Ser380) y PTEN total en las distintas situaciones. B) Cuantificación de la densidad óptica que muestra el incremento en los niveles de p-PTEN (Ser380) tras la activación de los receptores AMPA oligodendrogliales y su inhibición en presencia de phen. Los valores corresponden a la densidad óptica de p-PTEN normalizados frente a PTEN total y representan las medias \pm S.E.M. ($n=3$) ** $p<0.01$ *** $p<0.001$ comparado con la situación control.

A tenor de los resultados obtenidos en este apartado podemos deducir que PTEN es la fosfatasa responsable de la caída en los niveles de activación de la vía PI3K/AKT provocada por la estimulación de los receptores AMPA en oligodendrocitos. Así mismo, CK2 parece modular de alguna manera la fosforilación de PTEN en al *cluster* Ser380/Thr382/383, a nivel basal, aunque no podemos determinar las consecuencias que este hecho ejerce sobre la viabilidad/muerte celular. Por otro lado, AMPA promueve de manera significativa la fosforilación de PTEN en el residuo Ser380, fosforilación descrita como potenciadora directa de la actividad fosfatasa de esta enzima.

6. Activación de las vías endógenas de supervivencia mediadas por PKC β durante el estímulo excitotóxico en oligodendrocitos

La alteración de la homeostasis celular ocasionada por el fenómeno excitotóxico tiene, como hemos visto a lo largo del presente trabajo, consecuencias diversas en la señalización celular activando moléculas y vías consideradas pro-apoptóticas a la par que provoca la represión de otras asociadas con la pro-supervivencia. De algún modo, por acción u omisión, la maquinaria celular parece sucumbir ante el impacto que supone la señal excitotóxica. Sin embargo, en esta última parte del trabajo, vamos a mostrar lo que consideramos reflejo de la batalla que la célula mantiene por su supervivencia. En este sentido, las vías de ERK y CREB parecen jugar un papel determinante como elementos contrarios a los efectos deletéreos de los insultos citotóxicos (Arany y cols, 2005; Park y cols, 2006). En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, ha quedado patente que la estimulación de los receptores glutamatérgicos en oligodendrocitos provoca una activación inmediata y transitoria de ERK, de clara naturaleza pro-supervivencia (Domercq y cols, 2011). En relación al elemento de respuesta a c-AMP, CREB, ha sido descrito su incremento en células gliales expuestas a neurotransmisores, como glutámico, ATP o adenosina, y su vinculación con mecanismos de defensa celular (Deng y cols., 2006; Carriba y cols. 2012). Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos propusimos analizar el efecto que la activación de los receptores AMPA provocaba sobre CREB, mediante el estudio de su nivel de fosforilación. Como se observa en la figura 73, se detectó un intenso y rápido incremento en la fosforilación de CREB, iniciada en tiempos tempranos (10 min post-estímulo) y que fue disminuyendo a lo largo del tiempo aunque sin perder su significancia durante las dos horas analizadas ($505,2 \pm 40,45\%$; $364,3 \pm 46,48\%$; $301,9 \pm 18,19$ y $178,7 \pm 23,84\%$, respectivamente, comparado con el 100% de la situación control) (Fig. 73).

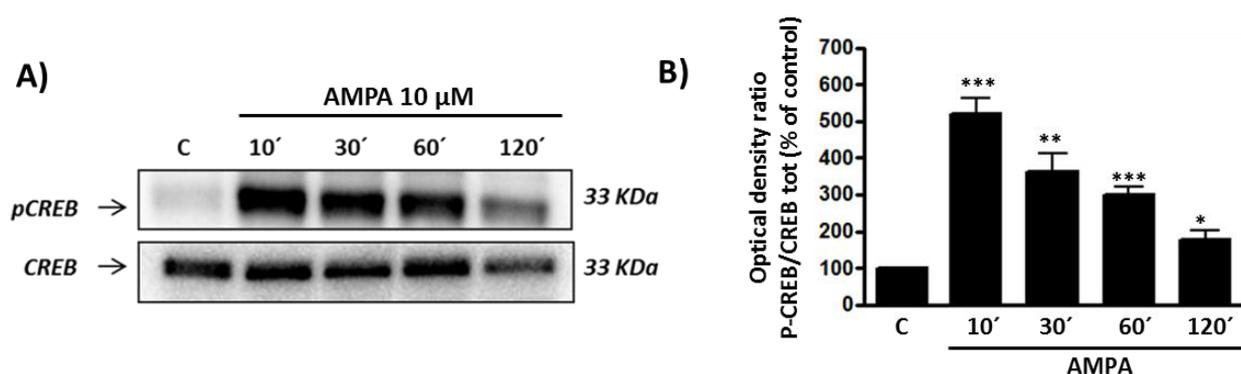


Figura 73. La excitotoxicidad mediada por AMPA induce la fosforilación de CREB de manera temprana e intensa. Los oligodendrocitos fueron tratados con AMPA (10 μ M, 30 min) y la proteína total se recogió siguiendo el curso temporal indicado. A) Mediante western blot se analizaron los niveles de expresión de p-CREB (Ser133) y CREB total, en las distintas situaciones. B) Cuantificación de la densidad óptica que pone de manifiesto el incremento en los niveles de p-CREB tras la activación de los receptores AMPA oligodendrogiales. Los valores corresponden a la densidad óptica de p-CREB normalizados frente a CREB total y representan las medias \pm S.E.M. (n=3) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparado con las células control (no tratadas con agonista).

Las PKCs son unas de las moléculas que pueden intervenir en la conexión entre los estímulos extracelulares y la activación del eje Raf/MEK/ERK (Chang y cols, 2003; McCubrey, 2007). Entre otras, se ha descrito a la isoforma- δ (PKC δ) como elemento partícipe del mecanismo de activación de ERK y/o CREB en determinados contextos (Basu y cols, 2005; Zhao y cols, 2007; Lomonaco, 2008) incluido el ámbito de la excitotoxicidad glutamatérgica (Choi y cols, 2006).

En base a esta idea, se planteó el estudio del posible papel que las PKCs pudiesen tener en la activación de ERK y/o CREB mediante ensayos de toxicidad en los que se emplearon los compuestos GF109203X (0.2 μ M y 2 μ M) como inhibidor general de las PKCs y Gö6976 (100nM) como inhibidor de las formas Ca⁺² dependientes. Con el objeto de inhibir de forma aislada a la isoforma δ , se utilizó el inhibidor Rotlerina (1 μ M).

Tanto la inhibición general de las PKCs mediante el compuesto GF109203X, como la inhibición de las formas Ca⁺² dependientes mediante el inhibidor Gö6976 no modificaron de forma significativa la toxicidad ejercida por el estímulo moderado de los receptores AMPA en oligodendrocitos. Sin embargo, la muerte oligodendroglial ocasionada por la estimulación de los receptores AMPA (17,65 \pm 4,07%) fue potenciada de forma significativa a través de la inhibición aislada de PKC δ (44,23 \pm 2,46%).

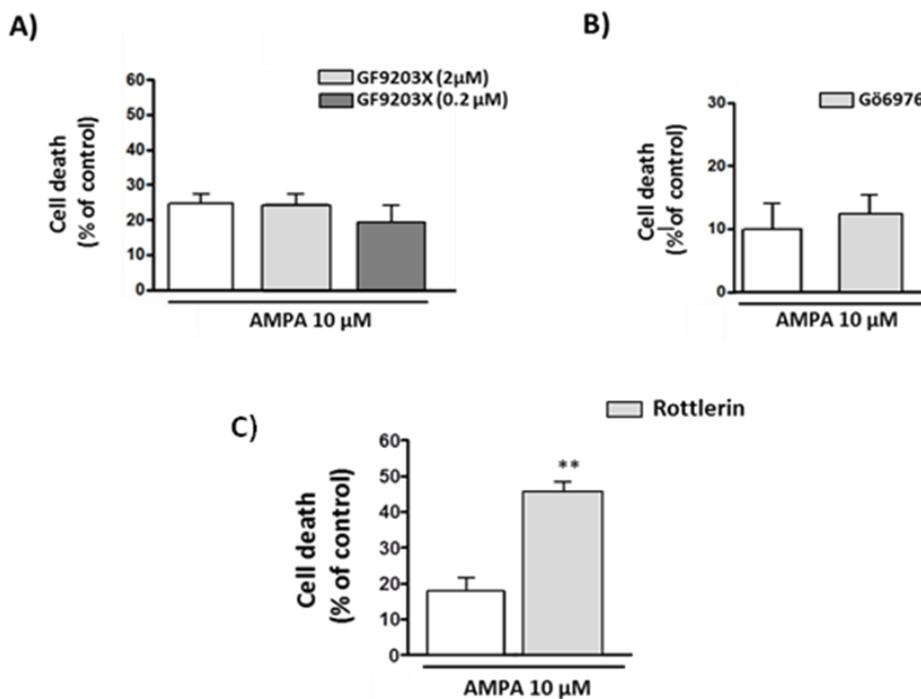


Figura 74. La inhibición general de las PKCs no modifica la toxicidad oligodendroglial mediada por activación de los receptores AMPA, si bien, la inhibición aislada de PKC δ la potencia. Los oligodendrocitos fueron pre-incubados durante 30 minutos con GF9203X (2 μ M o 0,2 μ M) o con Gö6976 (100 nM) o con Rotlerina (1 μ M). A continuación fueron expuestos al AMPA (10 μ M, 30 min). Para determinar la viabilidad celular se empleó la sonda Calcein-AM, 24 horas después (n=3). La inhibición general de las PKCs no altera la toxicidad mediada por AMPA, en oligodendrocitos. La inhibición de la isoforma δ , sin embargo, magnifica la muerte oligodendroglial tras exposición al AMPA. Los datos representan las medias \pm S.E.M. **p<0.01 comparado con las células tratadas únicamente con agonista.

A tenor del resultado obtenido mediante los ensayos de toxicidad, decidimos analizar mediante Western Blot las consecuencias moleculares de la inhibición farmacológica de PKC δ , haciendo hincapié en los posibles efectos sobre el grado de activación de ERK y CREB. De este modo, incubamos los oligodendrocitos en presencia o ausencia de Rottlerina (1 μ M) y aplicamos el estímulo habitual de AMPA (10 μ M, 30 minutos). Se extrajo la proteína total aplicando un curso temporal corto (10 y 30 min) que permitiese analizar cambios en el estado de fosforilación de ERK y CREB, reflejo de su activación. Esta aproximación nos permitió observar como el incremento en las fosforilaciones/activaciones de ERK ($660,2 \pm 42,8\%$; $500,5 \pm 33,5\%$, respectivamente comparado con el 100% de control) y CREB ($484 \pm 34,91\%$; $450 \pm 48,16\%$, respectivamente comparado con el 100% de control) inducidas por la aplicación del AMPA (10 μ M, 30 minutos) son atenuadas de forma significativa tanto para p-ERK ($145,8 \pm 11,63\%$; $139,3 \pm 13,04\%$, respectivamente comparado con el 100% de control) como para p-CREB ($169,1 \pm 15,84\%$; $167,7 \pm 9,69\%$) en presencia de Rottlerina (1 μ M) (fig.75).

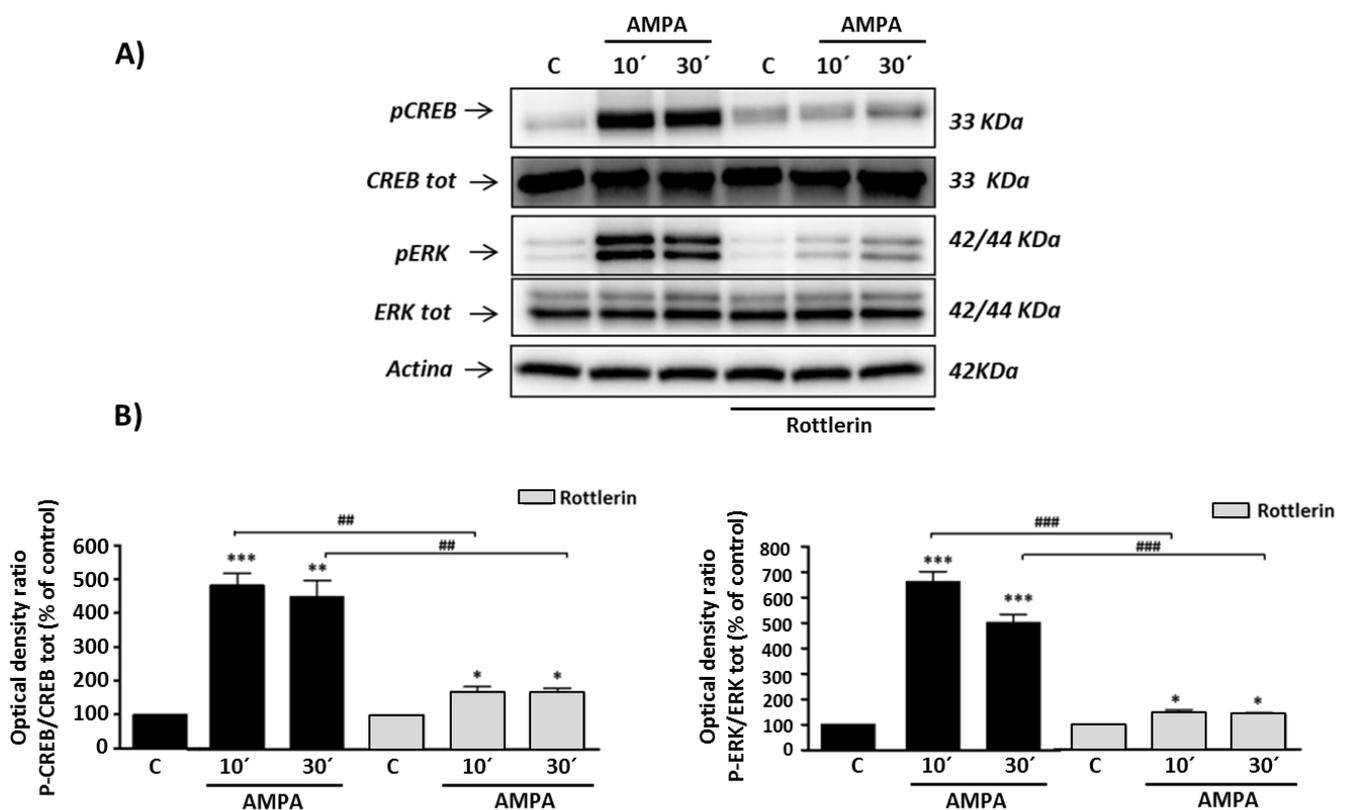


Figura 75. La inhibición de PKC δ con rottlerin evita la activación de CREB y ERK inducida por el estímulo excitotóxico con AMPA. Los oligodendrocitos fueron pre-incubados con Rottlerina (1 μ M) durante media hora antes de su exposición a AMPA (10 μ M, 30 min) y la proteína total fue recogida a los 10 y 30 minutos posteriores a la retirada del estímulo. A) Mediante western blot se analizaron los niveles de expresión de P-ERK, P-CREB, ERK total y actina en las distintas situaciones. B) Cuantificación de la densidad óptica que pone de manifiesto el incremento en los niveles de fosforilación de ERK y CREB mediados por la activación de los receptores AMPA oligodendrogliales. Este fenómeno no se produce en presencia de Rotlerina. Los valores corresponden a la densidad óptica de P-CREB y P-ERK normalizados frente a CREB total y ERK total, respectivamente y representan la media \pm S.E.M. (n=3) *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 comparado con la situación control. ## p<0.01; ###p<0.001 comparado con las células tratadas con agonista.

Una vez establecida la modulación de ERK y CREB de forma PKC δ dependiente, hemos querido determinar si esta era la principal base para la potenciación de la muerte cuando PKC δ es inhibida. En este sentido, se ha analizado la posible influencia que la inhibición de PKC δ pudiese ejercer sobre la expresión de PRX-1. Bajo ciertos contextos, algunas células incrementan la expresión de PRX-1 para intentar combatir el estrés oxidativo al que se ven sometidas. En diversos estudios se ha visto que la inhibición de PKC δ potencia la muerte celular y lo hace precisamente al impedir el incremento en los niveles de PRX-1 (Li y cols, 2002; Li y cols, 2004). Si bien es cierto que en nuestro caso los oligodendrocitos no responden al evento excitotóxico incrementando los niveles de Prx-1, sino que existe una bajada en los niveles de expresión de esta molécula, quisimos comprobar si la inhibición de PKC δ acentuaba este fenómeno y ello constituía parte de los eventos mediante los cuales potencia la muerte oligodendroglial excitotóxica. Sin embargo el análisis, mediante Western Blot, de la expresión de Prx-1 a los 10 y a los 30 minutos tras la retirada del estímulo excitotóxico, no ha revelado diferencias significativas entre la bajada en los niveles de expresión de Prx1 ocasionada por AMPA (10 μ M, 30 minutos) en esos puntos temporales en ausencia (78,51 \pm 4,59%; y 64,96 \pm 8,60%, respectivamente) o en presencia de Rotlerina (1 μ M) (79,27 \pm 4,41% y 76,34 \pm 5,93%, respectivamente). Es decir, la disminución en los niveles de Prx-1 mediada por AMPA, es independiente de PKC δ y por ende del estado de activación de ERK y de CREB.

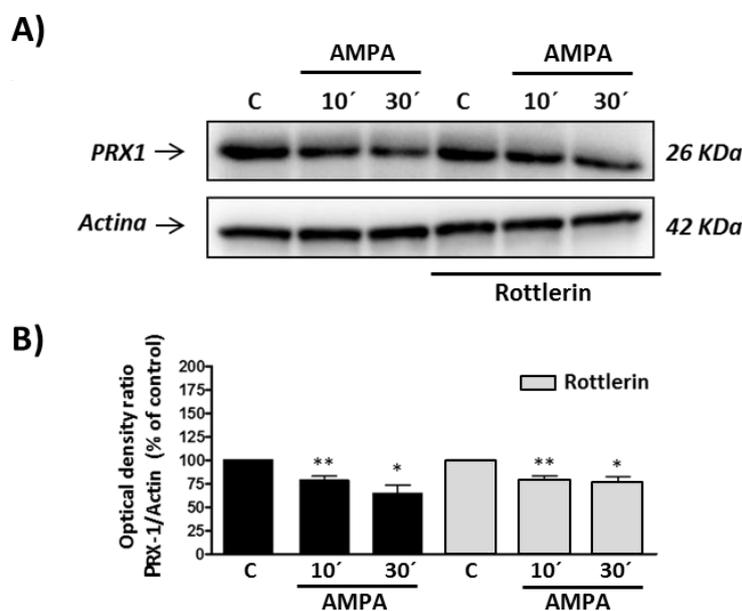


Figura 76. La disminución de los niveles de Prx-1 inducida por el estímulo excitotóxico, es independiente de PKC δ . Los oligodendrocitos fueron pre-incubados con Rotlerina (1 μ M) durante media hora antes de su exposición a AMPA (10 μ M, 30 min) y la proteína total fue recogida a los 10 y 30 minutos posteriores a la retirada del estímulo. A) Mediante western blot se analizaron los niveles de expresión de Prx-1 y actina en las distintas situaciones. B) Cuantificación de la densidad óptica que pone de manifiesto la disminución de los niveles de Prx-1 mediada por la activación de los receptores AMPA oligodendrogliales. Este fenómeno no se ve modificado en presencia de Rotlerina. Los valores corresponden a la densidad óptica de Prx-1 normalizados frente a la de actina y representan la media \pm S.E.M. (n=3) *p<0.05;**p<0.01 comparado con las células control (no tratadas con agonista).

Hasta el momento, hemos visto como la inhibición de PKC δ impide la activación de ERK y CREB y exacerba la muerte oligodendroglial acaecida tras la estimulación moderada de los receptores AMPA. A raíz de esta observación decidimos analizar si el mecanismo de muerte celular desencadenado es todavía manipulable dentro de los parámetros propios de los mecanismos apoptóticos. Dado que la ausencia de CREB potencia la muerte apoptótica Bax dependiente (Lonze y cols, 2002), consideramos una buena aproximación examinar si la ausencia de esta molécula pro-apoptótica compensaba la disminución de las acciones pro-supervivencia de ERK y CREB. Para esto, contamos con una cepa de ratones KO para Bax, molécula cuya participación durante la muerte apoptótica mediada por AMPA es fundamental (Sánchez-Gómez y cols, 2011). En los ensayos de toxicidad, la muerte ocasionada por la estimulación de los receptores AMPA de oligodendrocitos (Bax +/+) ($16,23 \pm 1,63\%$) fue incrementada de forma significativa en presencia de Rotlerina ($1\mu\text{M}$) ($36,63 \pm 6,02\%$) y reducida en los oligodendrocitos Bax-/- ($1,98 \pm 0,84\%$). Sin embargo la presencia de Rotlerina, incrementa la muerte mediada por AMPA aún en ausencia de Bax (Bax -/-) ($34,64 \pm 6,76\%$) de forma similar a lo observado en las células WT para Bax (Bax +/+) (Fig.77A). Este hecho implicaría que la muerte oligodendroglial causada por la estimulación de los receptores AMPA de oligodendrocitos en el contexto de inhibición de PKC δ es independiente de Bax.

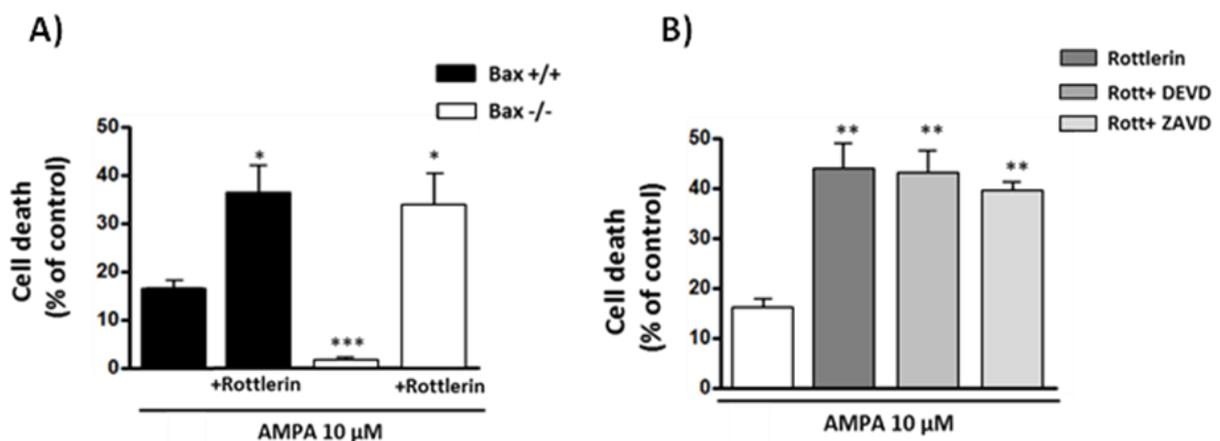


Figura 77. La ausencia de Bax o la inhibición de las caspasas no limitan la potenciación de la muerte oligodendroglial mediada por la estimulación de los receptores AMPA oligodendrogliales, en presencia de Rotlerina. A) Los oligodendrocitos procedentes de nervios ópticos de animales WT (Bax+/+) o KO (Bax-/-) para Bax, fueron empleados en los ensayos de toxicidad tras 2 días in vitro en Sato de maduración. Los oligodendrocitos fueron pre-incubados con Rotlerina ($1\mu\text{M}$; 30 min) antes de su exposición a AMPA ($10\mu\text{M}$, 30 min). La viabilidad celular se determinó mediante la sonda Calceín-AM, 24 horas después. La presencia de Rotlerina, provoca un incremento significativo de la muerte mediada por activación de los receptores AMPA, con independencia de la presencia o ausencia de Bax. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, comparado con las células tratadas únicamente con agonista (Bax +/+). B) Los oligodendrocitos fueron pre-incubados con los inhibidores de caspasas: DEVD ($100\mu\text{M}$) o ZAVD ($50\mu\text{M}$) durante 30 minutos antes de su exposición a AMPA ($10\mu\text{M}$, 30 min). La determinación de la viabilidad celular, se llevó a cabo 24 horas después mediante la sonda Calceína-AM. La inhibición de las caspasas, mediante DEVD ($100\mu\text{M}$) o ZAVD ($50\mu\text{M}$), no redujo la muerte oligodendroglial ocasionada por el AMPA en presencia de Rotlerina. ** $p < 0.01$, comparado con las células tratadas únicamente con agonista.

Además y con el objetivo de descartar definitivamente cualquier componente apoptótico en la muerte oligodendroglial excitotóxica en presencia de Rotlerina (1 μ M) comprobamos si la inhibición de las Caspasas es capaz de mitigar la potenciación de la muerte tras la estimulación de los receptores AMPA. Para construir este paradigma, pre-incubamos los oligodendrocitos con DEVD (100 μ M) (inhibidor de las caspasas 3 y 7), así con el inhibidor general, de amplio espectro, ZVAD-F (50 μ M). En este sentido, la muerte ocasionada por la aplicación del AMPA (10 μ M, 30 minutos) (16,74 \pm 2,37%) fue incrementada significativamente por la presencia de Rotlerina (1 μ M) (43,75 \pm 6,03%), independientemente de la presencia de DEVD (42,43 \pm 5,62%) o ZVAD-F (39,51 \pm 2,65%) (Fig.77B). También en esta ocasión, compuestos que en condiciones basales (PKC δ no inhibida) son capaces de reducir de forma notable la muerte oligodendroglial mediada por activación de los receptores AMPA (Sánchez-Gómez y cols, 2003), se muestran ineficaces a la hora de incrementar la viabilidad celular cuando las vías endógenas de supervivencia no han tamponado parcialmente parte del envite excitotóxico. De esta manera, la inhibición de PKC δ y por ende de la activación de ERK y CREB parece mimetizar situaciones desencadenadas por estímulos mayores de AMPA (100 μ M) que desencadenan muerte oligodendroglial de tipo necrótico, no manipulable mediante parámetros propios del mecanismo apoptótico (Sánchez-Gómez y cols, 2003).

En base a los resultados expuestos en el presente apartado, PKC δ parece estar implicada en la vía de señalización que conduce a la activación ERK y CREB. La activación de ambas moléculas tiene efectos claramente pro-supervivencia en el contexto de la excitotoxicidad oligodendroglial. La potenciación de la muerte excitotóxica observada cuando PKC δ permanece inhibida, desencadena un tipo de muerte no apoptótica, probablemente más próxima a parámetros necróticos.

Discusión

1. Antecedentes

El presente trabajo de investigación, se ha asentado sobre el concepto de excitotoxicidad glutamatérgica, como fenómeno partícipe e inherente a lesiones agudas o enfermedades neurodegenerativas crónicas que afectan as SNC (Choi, 1988; Lipton & Rosenberg, 1994; Lee et al. 1999). La alteración en la homeostasis del glutámico, potencialmente tóxica a nivel neuronal lo es también para las células gliales, tanto astrocitos (Haas & Erdo, 1991) como oligodendrocitos (Oka y cols, 1993).

Precisamente, la vulnerabilidad de las células de estirpe oligodendroglial frente a este tipo de contexto citotóxico ha constituido el objeto principal de nuestro estudio. Se han tenido presentes los antecedentes existentes, desde las primeras evidencias (Oka y cols, 1993), pasando por el asentamiento del concepto de excitotoxicidad oligodendroglial (Yoshioka y cols, 1995, 1996; Matute y cols, 1997; McDonald y cols, 1998), hasta llegar a la determinación de algunas de las características más notorias del ambiente intracelular generado bajo tales circunstancias.

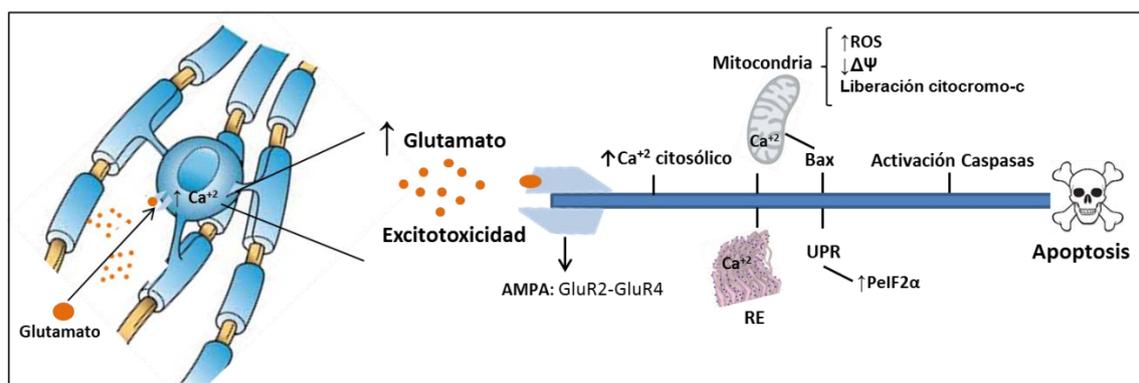


Figura 78. Principales características, previamente establecidas, del mecanismo apoptótico subyacente a la muerte excitotóxica mediada por la activación de los receptores AMPA oligodendrogliales. Alteraciones en la homeostasis del glutámico conducen a la sobreactivación de los receptores glutamatérgicos de oligodendrocitos (los receptores tipo AMPA y KA median los procesos de excitotoxicidad oligodendroglial). Una de las consecuencias más inmediatas es la disrupción del balance iónico intracelular, especialmente a nivel del Ca^{+2} , que incrementa de forma notoria sus niveles citosólicos. Las alteraciones en la homeostasis del Ca^{+2} son en gran medida responsables de la disfunción mitocondrial así como, junto con la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen reticular, del estrés de RE que conduce a la activación del mecanismo UPR. Las alteraciones mitocondriales constituyen un fenómeno central de la cascada apoptótica y se caracterizan, a grosso modo, por el incremento en la producción de ROS y por la caída del potencial de membrana mitocondrial. Dichos eventos conducen hacia el colapso funcional y estructural de la mitocondria, con la participación central de moléculas pro-apotóticas de la familia de proteínas Bcl-2 como Bax. Como consecuencia de la permeabilización de la membrana mitocondrial, se liberan proteínas desde el espacio intermembranal (IMS) que promueven la activación de las caspasas, moléculas clave en la ejecución del programa apoptótico.

Entre las principales características del mecanismo de excitotoxicidad glutamatérgica, la entrada masiva de iones Ca^{+2} a través de los receptores AMPA (Sánchez Gómez y Matute, 1999) que provoca, entre otros, afectación y participación central de orgánulos como la mitocondria (Sánchez-Gómez y cols, 2003) o el retículo endoplasmático (Ruiz y cols, 2011). Concretamente, la sobrecarga mitocondrial de iones Ca^{+2} se

ha vinculado con el alto grado de estrés oxidativo generado (Ibarretxe y cols, 2006), con la despolarización de la membrana mitocondrial y finalmente con la activación de caspasas y la muerte oligodendroglial de tipo apoptótico (Sánchez-Gómez, 2003).

A posteriori, se describieron con mayor detalle algunas de las moléculas integradas en la cascada de señalización apoptótica, previas a la activación de las caspasas efectoras: en este sentido, se puso de manifiesto el papel central que juega la molécula Bax (miembro pro-apoptótico de la familia de proteínas Bcl-2), durante los fenómenos que conducen a la alteración y disfuncionalidad mitocondrial tras la activación de los receptores AMPA, en oligodendrocitos (Sánchez y cols, 2011). En referencia al estrés de RE, observado en los contextos de excitotoxicidad glutamatérgica oligodendroglial, se ha constatado la activación del mecanismo UPR, a través de la vía PERK/eIF2 α (Ruíz y cols, 2011). Además, se determinó la contribución que la liberación del Ca⁺² residente en el RE ejerce sobre la afectación mitocondrial y la muerte oligodendroglial en su conjunto (Ruíz y cols, 2011) (Fig.78).

A pesar de los múltiples hallazgos acerca del mecanismo subyacente a la muerte oligodendroglial excitotóxica, la complejidad intrínseca de los procesos apoptóticos ofrece todavía un amplio margen de estudio a la hora de implicar moléculas y vías de señalización alternativas y complementarias en la regulación de los mismos.

2. Vía apoptótica extrínseca en la muerte excitotóxica oligodendroglial

La muerte oligodendroglial mediada por la activación moderada de los receptores AMPA se previene en presencia de inhibidores de la caspasa-3, se reduce en presencia de inhibidores de la caspasa-8 y se elimina totalmente a través de la presencia conjunta de inhibidores de la caspasa-9 y de la caspasa-8 (Sánchez-Gómez y cols, 2003).

Precisamente, la caspasa-8 es una de las moléculas con capacidad intrínseca para mediar el proceso de activación de Bid (Paintlia y cols, 2011; Kaufmann y cols. 2012) y establece junto a este un eje señalizador que conecta la vía apoptótica extrínseca, iniciada a nivel de los receptores de muerte, con los fenómenos de intracelulares propios de la vía intrínseca o mitocondrial (Jos y cols, 2009; Hao y Mak, 2010). A este respecto, las implicaciones concretas de la caspasa-8 como parte de la cascada de señalización apoptótica mediada por AMPA, permanecían inexploradas al inicio del este estudio.

Los datos obtenidos a este nivel, han permitido determinar la integración de la vía extrínseca como parte del mecanismo apoptótico general iniciado por la activación de los receptores AMPA oligodendrogliales. Así mismo, la disminución observada en los niveles proteicos de c-FLIP, de forma inmediata tras la retirada del estímulo excitotóxico, parece constituir uno de los pasos iniciales a este nivel. La pérdida de esta molécula se ha descrito como un fenómeno que incrementa la susceptibilidad celular frente al mecanismo apoptótico emergente, principalmente en relación a su componente

extrínseco (Yu y cols, 2011; Martín-Pérez y cols, 2012) y en base a la regulación negativa que c-FLIP ejerce sobre el proceso de activación de la caspasa-8 (Henrich y cols, 2015; Marini y cols, 2015).

Una vez se produce el desequilibrio en el ratio c-FLIP / caspasa-8 a favor de esta última, es posible su activación, iniciada a través de su reclutamiento en el DISC. En nuestro modelo de excitotoxicidad, parece darse dicha sucesión de acontecimientos, tal y como hemos dejado patente al mostrar una caída temprana en los niveles de c-FLIP acompañada de una disminución en los niveles de la pro-caspasa 8 (zimógeno, no activo) y la subsecuente aparición de la caspasa-8 activa.

La inhibición farmacológica de la caspasa-8 ha proporcionado protección frente al estímulo de los receptores AMPA oligodendrogiales, siendo visualizadas las consecuencias moleculares de dicha protección mediante western blot: ausencia de activación de la caspasa-8 correlacionada con ausencia de activación de su potencial diana molecular, Bid. Estos datos, corroboran lo observado en trabajos previos de nuestro laboratorio (Sánchez-Gómez, 2003), concretando además el papel de esta caspasa al vincularla con el proceso de activación de Bid. En este sentido, dichos hallazgos concuerdan con trabajos sobre mecanismos apoptóticos que implican participación de las vías extrínseca e intrínseca, en los que se describe una activación de Bid dependiente de la caspasa-8 (Gu y cols, 2005; Schug y cols, 2011).

Además, el incremento de la viabilidad oligodendroglial frente al daño infligido por las condiciones excitotóxicas, alcanzado a través de la inhibición farmacológica de la activación de Bid (que limita la acumulación de t-bid), sugiere un papel relevante para Bid/t-bid en dichas condiciones. Este papel es similar al observado en determinados contextos de excitotoxicidad glutamatérgica, si bien, a nivel neuronal (Tobaben y cols, 2011; Grohm y cols, 2012).

Con los resultados obtenidos en esta parte del trabajo, hemos confirmado la activación de Bid mediada por la caspasa-8 en nuestro modelo de excitotoxicidad así como el papel pro-activo que Bid/t-bid ejerce en el proceso apoptótico desencadenado por la activación de los receptores AMPA oligodendrogiales. Sin embargo, no hemos determinado la más que probable relación de Bid con el proceso de activación e inserción mitocondrial estable de Bax. De hecho, es altamente probable la existencia de una interacción entre Bid y Bax que redunde en la potenciación del componente intrínseco del mecanismo apoptótico bajo condiciones excitotóxicas, tal y como se ha descrito recientemente en un estudio sobre excitotoxicidad glutamatérgica realizado en oligodendrocitos (Simonishvili y cols, 2013).

Además, podrán explorarse también los puntos iniciales de la vía, entre ellos las causas o mecanismos que llevan a la regulación a la baja observada en los niveles de c-FLIP. En este sentido, es conocida la modulación de la formación del DISC a través de la actividad de PI3K (Varadhachary y cols, 1999) y consecuentemente de la vía PI3K/Akt sobre c-FLIP y la activación de la caspasa-8 (Suhara y cols, 2001; Uriarte y cols, 2005). Otra vía con potenciales influencias sobre la expresión de c-FLIP, es la vía SAPK/JNK, que puede fomentar la degradación de c-FLIP en el proteasoma (Chang y cols, 2006; Bagnoli y cols, 2010).

Por tanto, nuestros datos implican potencialmente a c-FLIP en el componente excitotóxico responsable de la muerte oligodendroglial en el marco de la MS. Además, un trabajo reciente, sitúa a c-FLIP como un factor crítico en la protección oligodendroglial frente al proceso inflamatorio en modelos de EAE (Tanner y cols, 2015). Teniendo esto en cuenta, c-FLIP podría suponer una diana terapéutica prometedora, de la cual explorar la totalidad de sus implicaciones en la afectación oligodendroglial asociada a la MS.

3. Factor de transcripción p53 en la apoptosis oligodendroglial por excitotoxicidad

El factor de transcripción p53 es una molécula con capacidad para regular múltiples respuestas celulares, entre las cuales, el programa apoptótico activado bajo situaciones de estrés (Zhang y cols, 2009; Loughery y Meek, 2013; Khoo y cols, 2014). Dadas las evidencias de la participación de p53 en los fenómenos de excitotoxicidad glutamatérgica a nivel neuronal (Lakkaraju y cols, 2001; Choi y cols, 2011; Shah y cols, 2014), se hizo patente la necesidad de explorar el papel de p53 dentro del marco de la excitotoxicidad glutamatérgica en oligodendrocitos.

Teniendo en cuenta las dos modalidades de acción de p53 como parte de las cascadas de señalización apoptótica (nuclear/transcripcional y mitocondrial), abordamos la implicación de p53 en nuestro paradigma experimental atendiendo a ambas vertientes de acción. Los inhibidores farmacológicos empleados para suprimir sendas modalidades de actuación incrementaron, en ambos casos, la viabilidad oligodendroglial tras la estimulación moderada de los receptores AMPA. Parece obvia pues, la implicación clave de p53 como parte del mecanismo apoptótico desencadenado en nuestro modelo de excitotoxicidad oligodendroglial.

Por un lado, hemos puesto de manifiesto el incremento en los niveles de p53, reflejo de una mayor estabilidad y cuyas consecuencias estriban, a nivel transcripcional, en mayores niveles proteicos de PUMA y de expresión de MDM2 tras la activación de los receptores AMPA oligodendrogliales. Dicha secuencia de activaciones ha sido descrita en contextos apoptóticos p53 dependientes (Pant y cols, 2013).

En estados celulares homeostáticos, el nivel basal de p53 se mantiene en un perfil bajo gracias a la acción de su principal regulador negativo, MDM2. Bajo condiciones de estrés celular, p53 es estabilizado, liberado de la represión y activado a nivel transcripcional y/o mitocondrial. Dicha activación, se produce a través de modificaciones post-transcripcionales llevadas a cabo sobre el propio p53 tales como fosforilación, ubiquitinación, acetilación, metilación, sumoilación y nedilación (Kruse y Wu, 2009). Se han descubierto numerosas enzimas que modifican la actividad/estabilidad de p53 incluyendo quinasas como ATM/ATR, Chk2 (Vousden y Prives, 2009), CK2 (Sayed y cols, 2001; Keller y cols, 2002) así como las MAPK activadas por estrés, p38 y JNK (Haigis y Sweet-Cordero, 2011). En nuestro estudio, nos hemos centrado en el posible papel de las MAPK activadas por estrés y en menor medida de CK2, determinando la implicación clara de, al menos JNK, en el mecanismo de activación de p53 tanto a nivel transcripcional como mitocondrial.

En referencia a la posible modulación de las acciones transcripcionales de p53 a través de JNK, varios trabajos confirman la existencia de dicha regulación dado que mediante Knockdown de JNK o, como en nuestro caso, a través de su inhibición farmacológica (SP600125) consiguen limitar procesos apoptóticos mediados por p53 (Sahay cols, 2012; Chen y cols, 2013). Esta observación ha sido reproducida en neuronas hipocampales expuestas a glutámico (Choi y cols, 2011). Explorar con mayor profundidad el vínculo entre JNK y p53 en nuestro modelo concreto de excitotoxicidad oligodendroglial, podría implicar análisis de fosforilaciones alternativas sobre p53 mediadas, entre otros, por JNK y vinculadas a incrementos en su actividad transcripcional, como la ejercida sobre la Ser 20 (Cheg y cols, 2003) o sobre la Thr 81 (Buschmann y cols, 2001; Topisirovic y cols, 2009).

Así mismo, dada la implicación de CK2 en la muerte excitotóxica oligodendroglial así como el hecho por el cual se ha descrito a esta quinasa, en complejo con el factor de cromatina FACT (hSPT16 y SSRP1), como molécula responsable de la fosforilación de p53 en el residuo Ser 392 (Keller y cols, 2001; Keller y Lu, 2002), se analizó someramente la posible relación entre CK2 y la activación de p53. El vínculo observado entre ambos tras la estimulación de los receptores AMPA, a través de la técnica de IP, así como la no activación de p53 (visualizada mediante inmunocitoquímica) en condiciones de inhibición farmacológica de CK2, hacen sospechar acerca del papel que la fosforilación Ser 392 pudiese tener en la activación transcripcional de p53. Dicha fosforilación modula la tasa de unión de p53 al DNA y consecuentemente su actividad transcripcional (Keller y cols, 2001; Sayed y cols, 2001; Keller y Lu, 2002). En todo caso, se requiere experimentación complementaria para determinar si los efectos de la inhibición de CK2 sobre la tasa de activación de p53 son directos (fosforilación de residuo Ser 392 de p53) o mediados a través de JNK, dada la relación de este último con CK2 y con la activación de p53, en nuestro modelo de excitotoxicidad glutamatérgica.

Por otro lado, las acciones mitocondriales de p53, descritas como un evento temprano que precede a los cambios en el potencial de membrana mitocondrial, a la liberación del citocromo-c y a la activación de la pro-caspasa 3 (Marchenko y cols, 2000) participan, como hemos mencionado, en la cascada apoptótica responsable de la muerte oligodendroglial. A este nivel, hemos observado un incremento en la fosforilación de p53 en el residuo Ser15 mediado por JNK y/o p38, caracterizado por una localización predominantemente mitocondrial, tras la estimulación de los receptores AMPA. Esta particularidad concuerda con lo expuesto en diversos estudios en los que, el aumento del contenido mitocondrial de p53 va acompañado de incrementos en la fosforilación del residuo Ser15 en las fracciones mitocondriales (Park y cols, 2005; Saleem y Hood, 2009; Saleem y Hood, 2013; Wang y cols, 2015). Una vez establecida la importancia de esta fosforilación concreta de p53, se requiere el planteamiento de experimentación adicional en la cual, probablemente mediante IP, se intente determinar el tipo de intervención que P-p53 (Ser15) desempeña a nivel mitocondrial. En este sentido, serían analizables sus posibles interacciones con moléculas antiapoptóticas como Bcl-xL o Bcl2 (interrumpiendo su acción anti-apoptótica) (Park y cols,

2005; Nieminen y cols, 2013) o pro-apoptóticas como Bak (Leu y cols, 2004; Pietsch y cols, 2008), teniendo en cuenta las posibles interrelaciones de p53 con Bax a nivel citoplasmático (Moll y cols, 2005; Wolf y cols, 2008) (ver fig.79).

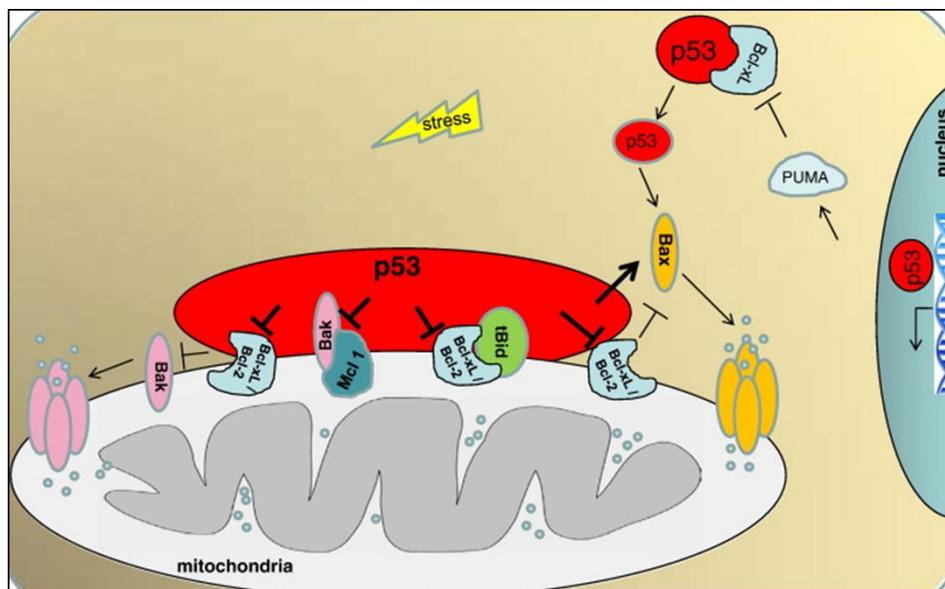


Figura 79. Posibles acciones de p53 a nivel mitocondrial. La translocación de p53 hacia la mitocondria, conduce a la interacción de este con miembros multidominio (anti y pro-apoptóticos) de la familia de proteínas Bcl-2, contribuyendo de forma global a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa. p53 interacciona con Bcl-xL y Bcl2 limitando sus acciones anti-apoptóticas sobre las moléculas pro-apoptóticas Bax y Bak. Además, la interacción de p53 con Bcl-xL podría liberar a t-bid de un supuesto complejo inhibitorio de este con Bcl-xL. Existe constancia de la interacción directa de p53 con Bak, a nivel mitocondrial, que conduce a la liberación de este del complejo que forma con Mcl-1. Además, p53 interacciona con Bax de forma rápida y transitoria de tal manera que estimula su oligomerización. Adicionalmente, en conexión con la función transcripcional de p53 representada por la transactivación de PUMA, este último libera a p53 de la acción represora de Bcl-xL, pudiendo así activar al Bax monomérico a nivel citosólico. Adaptado de Vaseba y Moll, 2009.

En su conjunto, los datos obtenidos otorgan a p53 una función relevante en la muerte oligodendroglial por excitotoxicidad. Estos hallazgos, relativos al mecanismo apoptótico básico desencadenado por el evento excitotóxico, encajan con las evidencias descritas en distintos trabajos que han puesto de manifiesto incrementos en los niveles de p53 y de sus genes diana en casos de pacientes con oligodendropatías que presentan infiltraciones microgliales y pérdida de remielinización (Kuhlmann y cols, 2002; Aboul-Enein y cols, 2003; Wosik y cols, 2003; Stadelmann y cols, 2005). Además, estudios realizados en oligodendrocitos humanos en cultivo, identifican a p53 como un efector apoptótico crítico (Ladiwala y cols, 1999; Wosik y cols, 2003). Así mismo, mediante la inhibición de p53 se ha podido reducir la activación microglial y la pérdida de mielina en el cuerpo calloso de ratones sometidos al modelo de demielinización de la cuprizona, a la par que se potenciaba la tasa de reparación por parte de los progenitores de oligodendrocitos residentes de la zona subventricular (Li y cols, 2008).

4. MAPKs activadas por estrés en el mecanismo apoptótico responsable de la muerte excitotóxica oligodendroglial

El análisis del papel de las MAPKs activadas por estrés (p38 y JNK) se ha realizado no sólo en base a su posible vínculo con p53, sino también debido al amplio abanico de trabajos sobre excitotoxicidad glutamatérgica en los que se describe la activación de JNK (Vieira y cols, 2010; Shah y cols, 2014) o p38 (Molz y cols, 2008; Rivera-Cervantes y cols, 2015). Además, existen referencias en la literatura acerca de la activación de ASK-1 (MAP3K), como paso previo a la activación de JNK y/o p38, en contextos de excitotoxicidad mediados por glutámico en neuronas (Guo cols, 2010; Jiang y cols, 2014).

Una vez determinada la activación simultánea de JNK y p38, en nuestro paradigma experimental y en íntima conexión con la participación apoptótica de p53, se determinó que la activación de ambas quinasas constituía un mecanismo ASK-1 dependiente. Esto es así dado que la inhibición farmacológica de este limitó de forma significativa la activación de JNK y p38.

En este punto recordar que son varios los mecanismos que pueden mediar la activación de ASK-1: estrés oxidativo (Matsuzawa y cols, 2005; Soga y cols, 2012), disrupción en la homeostasis del Ca^{+2} asociado a la activación de la Calmodulin quinasa 2 (CaMKII) (Brnjic y cols, 2010; Liu y cols, 2013) y estrés del retículo endoplasmático a través de la vía IRE1 α (Nishitoh y cols, 2002; Cai y cols, 2013).

En el presente trabajo de investigación hemos centrado la mayor parte de nuestros esfuerzos en el papel que el estrés de RE juega en la activación de ASK-1. Sin embargo, hemos dejado abiertas otras opciones, complementarias y no excluyentes, a través de la inhibición farmacológica de la CaMKII y el análisis de los niveles de expresión de Prx-1.

En referencia a la CaMKII, su inhibición incrementó la viabilidad oligodendroglial frente a las condiciones excitotóxicas mediadas por AMPA, en la misma línea de lo observado previamente en otros contextos de excitotoxicidad glutamatérgica neuronal (Ashpole y Hudmon 2011; Sha y cols, 2014). Además, en la literatura se ha asociado la activación de la CaMKII mediada por glutámico, con el mecanismo de activación de ASK-1 en células PC12 diferenciadas (*neuron like cells*) (Jiang y cols, 2014; Yu y cols, 2014). En nuestro caso, la protección obtenida en los ensayos de toxicidad a través de la inhibición de la CaMKII y de forma colateral a través del efecto de la Gastrodina, cuyo efecto inhibitorio sobre el eje de señalización CaMKII/ASK-1/p38 MAPK/p53 activado por Glutamato ha sido descrito previamente (Jiang y cols, 2014), suponen indicios acerca la participación de la CaMKII en el mecanismo de activación de ASK-1. Sin embargo, son necesarios experimentos adicionales en los que se analice el grado de activación de la CaMKII (visualizable a través de su estado de fosforilación) en correlación con el estado de fosforilación/activación de JNK y p38, para poder concluir de forma inequívoca la existencia de dicha relación.

Por otra banda, parece obvio que la regulación a la baja de los niveles Prx-1, enzima antioxidante ampliamente vinculada con ASK-1 (Kim y cols, 2008; He y cols, 2012; Zhang y cols, 2015) y potencialmente

vulnerable al estrés oxidativo generado por concentraciones excitotóxicas de glutamato (Léveillé y cols, 2009), podría facilitar la activación del eje ASK-1/JNK/p38. La disminución observada en los niveles proteicos de Prx-1 podría correlacionarse con una menor actividad antioxidante, de forma análoga a lo que ocurre con la actividad de otras enzimas como la catalasa y la superóxido-dismutasa en neuronas expuestas a glutamato (Campos-Esparza, 2009). Profundizar en el estudio del vínculo entre Prx-1 y ASK-1, podría implicar el análisis de la interacción molecular entre Prx-1 y ASK-1 (Kim y cols, 2008) tras la estimulación de los receptores AMPA oligodendrogliales.

El estrés de RE, cuya consecuencia inmediata radica en la activación del mecanismo UPR se ha revelado como otro fenómeno potencialmente vinculable a la activación pro-apoptótica de las MAPKs. Este mecanismo ha podido ser manipulable mediante la inhibición de CK2. Por lo novedoso y por el volumen de datos aportados acerca del papel de CK2 en el estrés de RE y en la activación del eje ASK1/JNK/p38 dedicaremos a la discusión de dichos resultados el siguiente subapartado.

4.1 Caseína Quinasa 2 como elemento modulador del estrés de RE y de la activación del eje ASK-1/JNK/p38

Los resultados obtenidos acerca de la posible participación de CK2 en el mecanismo apoptótico mediado por la activación de los receptores AMPA oligodendrogliales, se antojaron contrarios al papel general otorgado a dicha quinasa, mayoritariamente pro-supervivencia: la inhibición farmacológica o el silenciamiento génico de CK2 resultaron eficaces a la hora de mitigar los efectos deletéreos e inherentes al evento excitotóxico.

A través de la técnica del ensayo *in vitro* quinasa, se determinó un incremento en la actividad de cK2 tras el estímulo excitotóxico. Si bien se trata de una quinasa de expresión ubicua y activa de forma constitutiva, se tiene constancia de su sobre-activación y/o recolocalización celular en situaciones de estrés (Gerber y cols, 2000; Yamame y cols, 2005; Manni y cols, 2012), de forma coincidente (en lo referente a su sobre-activación) con lo observado en nuestro caso. A tenor de lo expuesto, la existencia de un par de trabajos en los cuales se propone un rol pro-apoptótico para CK2, estrechamente vinculado a la activación de JNK (Min y cols, 2003; Hilgard y cols, 2004), supuso un punto de inflexión a la hora de enfocar el análisis del efecto protector obtenido a través de la inhibición de CK2.

El análisis, mediante western blot, de las consecuencias moleculares de la inhibición o el silenciamiento de CK2 evidenció la ausencia de activación de JNK asociada a la limitación de la actividad de CK2. Además, la inhibición de CK2 también redujo el grado de activación de p38, hecho que sugiere un efecto curso arriba sobre el elemento común a ambas quinasas, ASK-1.

Asumiendo la visión mayoritaria de CK2 como molécula pro-supervivencia sería necesario un marco de señalización intracelular muy particular, en el cual la activación de CK2 derive en la acción pro-apoptótica de al menos, JNK. En este punto, el estrés de RE, propio de circunstancias citotóxicas y generado también

bajo condiciones de activación moderada de los receptores AMPA oligodendrogiales (Ruíz y cols, 2011) surgió como posible mecanismo candidato a la hora de explicar las acciones proapoptóticas de CK2, dependientes de la activación de JNK. Esta hipótesis se planteó en base a varios supuestos: CK2 posee capacidad como elemento regulador del mecanismo UPR (Götz y cols, 2013; Intemann y cols, 2014). Por otra banda, dicho mecanismo, a priori conjunto de vías pro-supervivencia puede acabar contribuyendo al avance del proceso apoptótico, entre otros, a través del establecimiento de una interconexión entre la vía de IRE1 α y ASK-1 (Urano y cols, 2000; Tabas y Ron, 2011; Kadowaki y Nishitoh, 2013).

Bajo este paradigma, la acción descrita para CK2 a nivel de la activación de eIF2 α sitúa su inhibición como fenómeno potenciador de la fosforilación/activación de eIF2 α (Ampofo y cols, 2013). Los resultados obtenidos en nuestro caso corroboran dicha afirmación, tanto en cuanto la inhibición de CK2 incrementó la fosforilación/activación basal de eIF2 α inducida por exposición de los oligodendrocitos al AMPA. En relación a este resultado, hemos obtenido efectos similares mediante el uso de Salubrinal, compuesto inhibidor de la defosforilación de eIF2 α , cuya acción protectora ha sido descrita en contextos citotóxicos que implican estrés de RE (Sokka y cols, 2007; Liu y cols, 2012), entre ellos el generado por la activación de los receptores AMPA oligodendrogiales (Ruíz y cols, 2010). En base a estos datos podemos presuponer que la mayor activación de la vía de PERK/eIF2 α , tiende a fomentar la supervivencia oligodendroglial y podría suponer parte del efecto protector alcanzado mediante la inhibición de CK2. Continuar profundizando en esta vía conllevará, entre otros, el análisis de los niveles de ATF4 como mediador de las acciones pro-supervivencia de la vía PERK/eIF2 α : induciendo genes implicados en metabolismo de amoniácidos, reacciones redox, respuesta ante el estrés y secreción de proteínas (Harding et al, 2003).

En relación a la vía IRE1 α /XBP1, que podría establecer el vínculo entre CK2 y la activación de las MAPKs, hemos puesto de manifiesto la fosforilación/activación temprana de IRE1 α tras la estimulación de los receptores AMPA de oligodendrocitos. Mediante la inhibición farmacológica de CK2 o a través de su silenciamiento génico, se limitó de forma clara la fosforilación/activación de IRE1 α mediada por AMPA, efecto que se corresponde con las acciones de CK2 descritas en la literatura en relación a IRE1 α (Hosoi y cols, 2012; Manni y cols, 2012). A su vez, este efecto podría correlacionarse con la ausencia de fosforilación/activación de JNK observada cuando CK2 permanece inhibida. La posible dependencia entre la activación de IRE1 α y JNK se apoyaría en multitud de trabajos en los que se pone de manifiesto la existencia del eje de señalización IRE1 α /TRAF2/ASK1 como conector del estrés de RE con la activación proapoptótica de JNK (Nishitoh y cols, 2002; Yang y cols, 2009; Cai y cols, 2013; Darling y Cook, 2014). Sin embargo, para confirmar con total rotundidad la existencia de la conexión CK2/IRE1 α /ASK-1 en nuestro modelo de excitotoxicidad, habrá de silenciarse la expresión de IRE1 α (Cai y cols, 2013) en nuestro paradigma y corroborar la no activación de JNK y p38 bajo este supuesto.

En todo caso, los efectos observados sobre el mecanismo UPR a través de la inhibición de CK2 en nuestro modelo de excitotoxicidad, coinciden en la forma con lo observado previamente en relación a los

efectos de CK2 sobre la vía UPR en células de mieloma (Manni y cols, 2012), si bien, difieren en el fondo: en nuestro paradigma, dicha modulación incrementa la supervivencia celular.

Por último, queremos plantear la hipótesis acerca de como CK2 llega a activarse en respuesta al estímulo excitotóxico. Dicha hipótesis implicaría a p38 dado que, si bien lo hemos situado curso abajo de CK2 y ASK-1, parece existir cierto componente de su activación independiente de ambas quinasas, pues la inhibición de estas afecta de forma menos acusada a p38 con respecto a JNK. Precisamente este hecho, nos lleva a especular acerca de la existencia de un mecanismo de activación complementario, responsable de parte de la señal apoptótica de p38 y cuyos resultados convergerían finalmente con los que implican a ASK-1 (Tsuchiya y cols, 2015). A este respecto, sería interesante analizar si esta fracción de p38 es responsable, a su vez, de la activación de CK2. Esta hipótesis se plantea también en base a que, aunque gran parte de las moléculas reguladoras de la actividad de CK2 no han sido identificadas o totalmente caracterizadas, si es conocida la activación de CK2 mediada por p38 en determinadas situaciones de estrés (Sayed y cols, 2000; Kato y cols, 2003; Scaglioni y cols, 2006).

En la figura 80, hemos plasmado los mecanismos de señalización propios de la vía UPR de los que, a tenor de los resultados obtenidos, CK2 parece ser partícipe y que, entre otros, podrían conectar el estrés de RE con la activación pro-apoptótica de JNK.

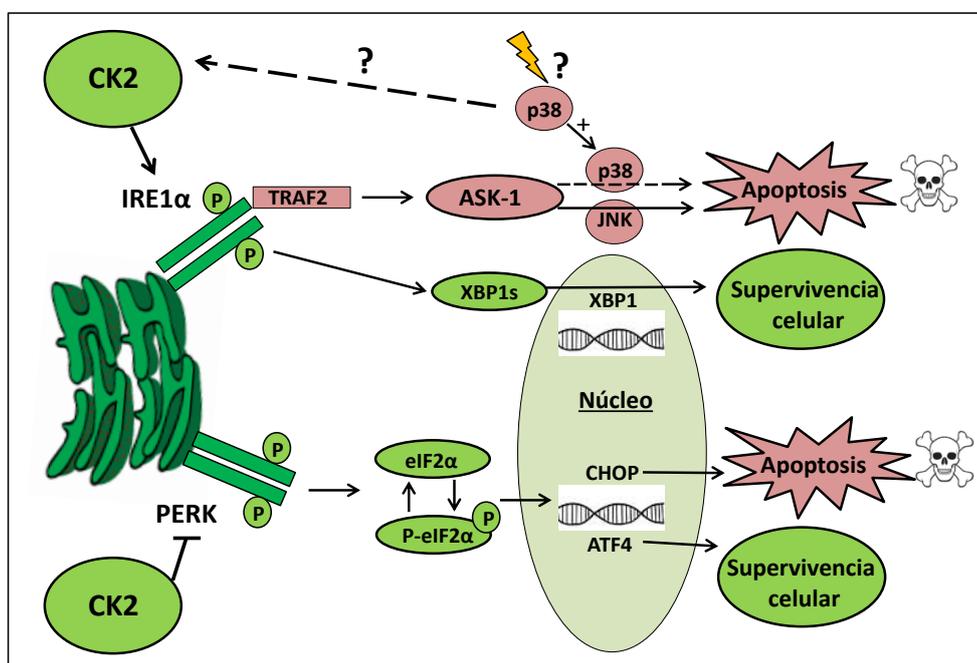


Figura 80. Modelo de acción propuesto para CK2 a nivel del mecanismo UPR, como parte de la señalización intracelular desencadenada por la estimulación de los receptores AMPA. La activación moderada de los receptores AMPA oligodendrogliales incrementa la actividad de CK2. A través de los datos obtenidos mediante la inhibición farmacológica y/o el silenciamiento génico de CK2 se ha establecido a CK2 como quinasa reguladora de la activación de IRE-1 α y de JNK. En base a los datos expuestos, se plantea la posible existencia de un vínculo entre la activación de CK2 y el eje IRE1 α /ASK-1/JNK/p38. Del mismo modo, CK2 parece limitar la activación de la vía de PERK/eIF2 α , pues su inhibición potencia la fosforilación/activación de eIF2 α mediada por AMPA. En este contexto, postulamos la hipótesis según la cual parte del p38, activado tras el estímulo excitotóxico, sería un posible candidato a la hora de mediar la activación de CK2, mimetizando lo descrito en otros contextos de estrés celular.

Nuestros datos, apoyan la idea de CK2 como pieza relevante del programa apoptótico responsable de la muerte oligodendroglial tras excitotoxicidad. Además, esta quinasa también había sido implicada en la regulación de la respuesta inflamatoria (Singh y Ramji, 2008). En este sentido, el compuesto diosgenina, precursor de las hormonas esteroideas con propiedades anti-inflamatorias, reduce los mediadores de la inflamación a través de un mecanismo que implica el bloqueo de la actividad de CK2 y una menor activación de JNK (Jung y cols, 2010). En el contexto concreto de la MS se ha determinado, en el modelo de EAE, que la ausencia de interacción entre CD5 (antígeno CD propio del sistema inmune) y CK2 conlleva un mayor grado de resistencia y protección en el modelo de EAE (Axtell y cols, 2006). Por ello, es necesario tener en cuenta estas evidencias que, junto con las proporcionadas en nuestro estudio, pueden suponer la base de la participación global de esta molécula en el marco de la MS.

Como conclusión general del presente apartado en su conjunto, presentamos en la figura 81 el esquema que aglutina los hallazgos obtenidos a nivel de la vía de las MAPKs activadas por estrés.

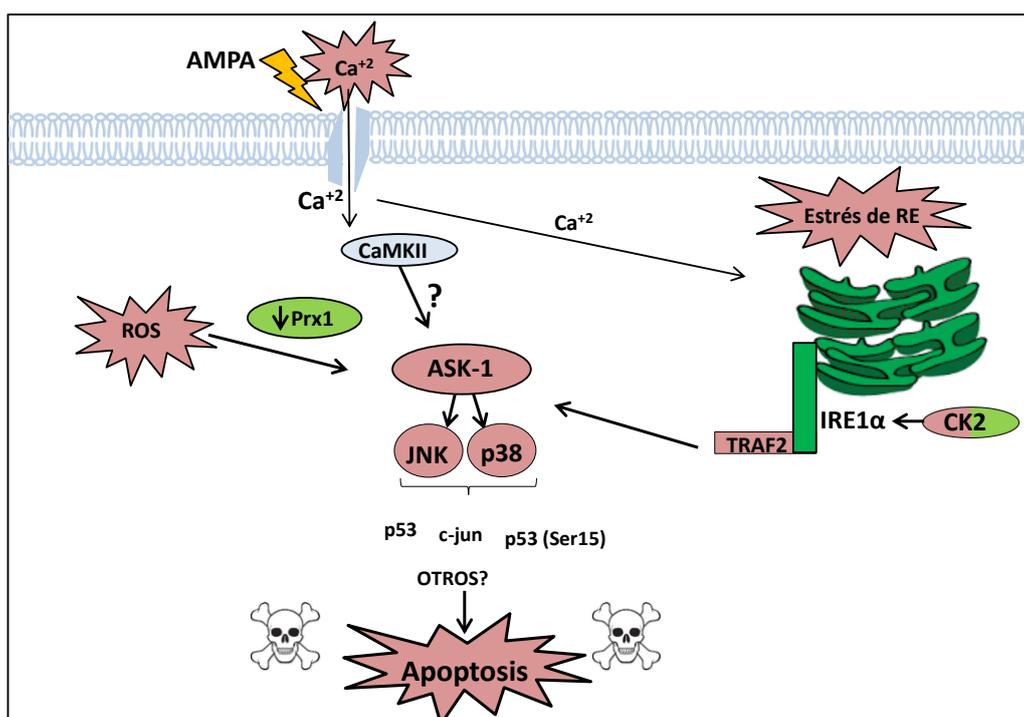


Figura 81. Modelo propuesto para la participación de las MAPKs activadas por estrés en la muerte oligodendroglial tras excitotoxicidad. Se ha confirmado la activación pro-apoptótica de la CaMKII así como una bajada en los niveles proteicos de Prx1 tras la estimulación de los receptores AMPA oligodendrogliales, que podrían suponer la conexión entre la señalización del Ca^{2+} y el estrés de RE con la activación de ASK-1, respectivamente. El estrés de RE, constituye la tercera vía con una contribución potencial a la activación de eje ASK-1/JNK/p38. A este nivel, hemos descrito la sobreactivación de CK2 tras la estimulación de los receptores AMPA oligodendrogliales. Dicha quinasa, potencia la activación de IRE1 α y JNK, pues su inhibición limita conjuntamente la activación de ambas moléculas observadas tras la aplicación de concentraciones excitotóxicas de AMPA. Finalmente, la activación de JNK media la activación apoptótica (nuclear y mitocondrial) del factor de transcripción p53.

Con independencia del evento/s que conduzca/n a la activación de ASK-1, la implicación de esta quinasa como parte de la cascada apoptótica mediada por la activación de los receptores AMPA, se sitúa en la línea de las evidencias descritas en estudios realizados in vivo. En este sentido, se tiene constancia de un fenotipo menos severo en el modelo de EAE en los animales deficientes para ASK-1 (KO) en comparación con los animales WT, efecto reproducido mediante la administración oral del compuesto MSC20329664A (inhibidor de ASK-1) que atenúa la severidad de la EAE en los ratones WT situándola en niveles similares a los observados en los animales KO para ASK-1 (Guo y cols, 2010). En todo caso, dicha protección ha sido vinculada con la reducción de la inflamación, dado que la vía ASK-1/p38 parece ser necesaria en la producción de chemoquinas por parte de los astrocitos (Guo y cols, 2010), moléculas inductoras de la migración de las células inflamatorias (linfocitos T y microglia) al SNC. Las alteraciones en la homeostasis del ácido glutámico, íntimamente asociadas al proceso inflamatorio, constituyen otro de los puntos clave dentro del modelo (Pitt y cols, 2000; Smith y cols, 2000) así como en la propia etiología de la esclerosis múltiple (Stover y cols, 1997; Sarchielli y cols, 2003), por lo que han de explorarse la totalidad de intervenciones de ASK-1 en modelos como la EAE.

5. Vía PI3K/Akt/mTOR en el daño oligodendroglial tras excitotoxicidad

El estudio de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR, dentro del marco apoptótico que nos ocupa, se ha abordado en gran medida dada la amplia variedad de moléculas regulables por dicha vía e implicadas en mecanismos apoptóticos (Hemming y Restuccia, 2012). Además, la vía PI3K/Akt se ha revelado fundamental para la supervivencia oligodendroglial frente a procesos apoptóticos generados por ausencia de factores tróficos (Molina-Holgado, 2002; Cui y cols, 2006), exposición a TNF α (Pang y cols, 2007), privación de oxígeno y glucosa (OGD) (Wang y cols, 2011) y finalmente también en los eventos excitotóxicos mediados por glutámico (Ness y cols, 2004).

El hallazgo inicial a este nivel, fue la marcada disminución de los niveles de fosforilación de Akt (Ser473), tras la estimulación de los receptores AMPA. Este hecho puede vincularse con la ausencia de activación de mTOR2, una de las quinasas que fosforilan a Akt en la Ser473 (Downling y cols, 2010; Vadlakonda y cols, 2013). En un trabajo previo, relativo a mecanismos inherentes a la toxicidad glutamatergica a nivel neuronal, se ha descrito la defosforilación de mTOR2 a nivel de la Ser2448, como uno de los mecanismos responsables de la pérdida de activación de la vía PI3K/Akt, tras la exposición al glutamato (Davila y cols, 2012). Sin embargo, en nuestro modelo de excitotoxicidad no se han observado modificaciones significativas en los niveles de fosforilación y por ende de activación de mTOR2 tras la estimulación de los receptores AMPA oligodendrogliales.

Por el contrario, PTEN, fosfatasa integrada en la vía PI3K/Akt y cuyo impacto en procesos de excitotoxicidad glutamatergica neuronal ha sido descrito (Gary y Mattson, 2002), se ha revelado fundamental para el avance del programa apoptótico mediado por la activación de los receptores AMPA

oligodendrogliales. Este hallazgo es similar al descrito en neuronas hipocampales expuestas a glutamato, en las cuales, modulando el grado de activación de Akt a través de PTEN se consigue reducir la vulnerabilidad de este tipo celular ante el evento excitotóxico (Gary y Mattson, 2002). En este sentido, hemos mostrado como el bisperoxovanadium (phen), inhibidor de PTEN empleado previamente en oligodendrocitos (De Paula y cols, 2014), incrementó la viabilidad oligodendroglial frente al estímulo excitotóxico. Dicha protección, se correlacionó con la capacidad del citado compuesto para impedir la pérdida de fosforilación de Akt tras la estimulación de los receptores AMPA. Visualizamos también, mediante western blot, como la inhibición de PTEN afecta al grado de activación de moléculas como la Caspasa-8 o Bax. A este nivel podrán investigarse, con mayor detalle, las implicaciones de la vía PI3K/Akt en el componente extrínseco del proceso apoptótico mediado por AMPA. La inhibición de la vía PI3K/Akt ha sido asociada con la activación de la caspasa-8, previa pérdida de c-FLIP (Suhara y cols, 2001; Uriarte y cols, 2005). Además, la acción apoptótica de moléculas como PACS-2, puede ser regulable mediante la fosforilación que sobre ella ejerce Akt (Aslan y cols, 2009). También la vía mitocondrial se ve afectada por la señalización Akt dependiente, entre otras, limitando la inserción mitocondrial de Bax (Ness y cols, 2004; Pang y cols, 2007). Por tanto, la participación de PTEN y de la vía PI3K/Akt en su conjunto en nuestro paradigma experimental, ofrecen todavía un amplio abanico de potenciales interacciones dentro del mecanismo apoptótico global.

Por otra banda, se quiso analizar el estado de fosforilación de PTEN a través del análisis del cluster Ser380/Thr382/383, cuya fosforilación se ha asociado a estados inactivos de PTEN (De Paula y cols, 2014; Nakahata y cols, 2014; Chia y cols, 2015; Yang y cols, 2015). Sin embargo, tras la estimulación de los receptores AMPA oligodendrogliales, esta fosforilación se incrementa a tiempos muy tempranos coincidiendo con la disminución en los niveles de Akt fosforilado. Este hecho, es difícilmente encajable con el papel propuesto en la literatura para la fosforilación de PTEN a nivel de este *cluster* concreto.

En nuestro intento por determinar la posible quinasa reguladora de la actividad de PTEN hemos descartado la participación de ROCK o GSK3, como quinasas potencialmente moduladoras de la actividad de PTEN (Maccario, 2007; Li y cols, 2014). Además, hemos determinado la influencia de CK2 en la fosforilación del cluster Ser380/Thr382/383, de forma acorde a lo descrito en la literatura (menor fosforilación del cluster asociada a menores niveles de Akt activo cuando CK2 es inhibida) (Patsoukis y cols, 2013; Lima-fernandes y cols, 2014), pero no interpretable como la quinasa responsable del incremento observado tras la estimulación de los receptores AMPA.

Por ello queremos dejar constancia de la existencia de una molécula denominada PICT-1 con capacidad para fosforilar a PTEN de forma aislada en el residuo Ser380 (Okara y cols, 2006; Yim y cols, 2007), pero con un matiz importante: las acciones de PICT-1 sobre PTEN, incrementan su actividad fosfatasa.

Mediante el análisis del grado de fosforilación de PTEN a nivel de la Ser 380, tras la estimulación de los receptores AMPA oligodendrogiales, hemos constatado un incremento marcado en esta fosforilación que desaparece totalmente en presencia del inhibidor de PTEN. El hecho por el cual dos fosforilaciones, con efectos potencialmente antagónicos sobre la actividad de PTEN, se comporten de forma aparentemente similar podría venir dada por la existencia del residuo Ser380 dentro del cluster reconocido por el anticuerpo anti P-PTEN Ser380/Thr382/Thr383, pudiendo ser reconocido de forma inespecífica por este. En todo caso, en el presente trabajo de investigación y debido a la escasez de herramientas farmacológicas no hemos podido analizar la posible participación de PICT-1 en el mecanismo de activación de PTEN tras la estimulación de los receptores AMPA oligodendrogiales. Por ello, queda pendiente de estudio la hipótesis según la cual PICT-1 sería la molécula que canalizaría los efectos inmediatos que, sobre la fosforilación/actividad de PTEN, pudiese generar el estrés celular mediado por la estimulación de los receptores AMPA oligodendrogiales.

PTEN ha sido propuesto como molécula clave en el acoplamiento entre la vía PI3K/Akt y la vía SAPK/JNK en modelos de isquemia (Zhang y cols, 2007). En esta situación, la afectación neuronal ha sido asociada con la disminución del grado de activación de Akt acompañada por el incremento en la tasa de fosforilación/activación de JNK (Zhang y cols, 2007). En este modelo, se han podido manipular ambas vías a través de la inhibición de PTEN, incrementando y disminuyendo los niveles de activación de Akt y JNK, respectivamente. En este sentido, son varios los mecanismos que pueden constituir un apoyo a este tipo de interacciones, entre los cuales: la inhibición directa de la vía de SAPK/JNK a través de fosforilaciones que Akt ejerce sobre MLK3, MKK4 y ASK-1 (Kim y cols, 2001; Park y cols, 2002; Barthwal y cols, 2003). Por ello, analizar la posible interdependencia de ambas vías en nuestro modelo de excitotoxicidad, sería uno de los posibles objetivos para ahondar en las implicaciones de las vías PI3K/Akt y SAPK/JNK en la muerte oligodendroglial excitotóxica.

La degeneración y muerte de neuronas motoras, en el marco de la esclerosis lateral amiotrófica, está mediado por la entrada masiva de Ca^{+2} a través de los receptores AMPA y ha sido relacionada, a su vez, con PTEN. En dicho contexto, el knockdown de PTEN presenta mayores niveles de Akt y BAD fosforilados (efecto protector a nivel de la señalización intracelular), pero también genera variaciones en la expresión de las subunidades de los receptores AMPA (efecto protector por la menor respuesta del receptor al estímulo excitotóxico) (Yang y cols, 2014). Dichas observaciones, abren la puerta a posibles implicaciones de PTEN en nuestro modelo de excitotoxicidad oligodendroglial, no exploradas hasta el momento.

En conclusión, la modulación puntual de la actividad PTEN podría constituir una estrategia adecuada a la hora de limitar la afectación oligodendroglial frente al evento excitotóxico, con potenciales implicaciones no analizadas hasta el momento. Sin embargo, dicha estrategia ha de extrapolarse y aplicarse de forma puntual, en paradigmas experimentales como la EAE, teniendo en cuenta que la

ausencia permanente de PTEN ha sido relacionada con efectos adversos en los oligodendrocitos y en la mielinización basal de los tractos axonales (Harrington, 2010).

6. Eje PKC δ /ERK/CREB como vía endógena de supervivencia frente a insultos excitotóxicos

En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio, se determinó la activación transitoria de ERK, tras la estimulación de los receptores AMPA oligodendrogiales y caracterizada por un marcado carácter antiapoptótico (Domerq y cols, 2011). Concretamente, se puso de manifiesto como el bloqueo de la activación de ERK potenciaba, entre otros: la sobrecarga mitocondrial de Ca⁺², la despolarización de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo-c. Además, se identificó a la fosfatasa Dusp6 como responsable de la transitoriedad de la activación de ERK. (Domerq y cols, 2011).

En el presente trabajo de investigación hemos corroborado la activación de ERK a la par que analizado el grado de fosforilación / activación de CREB pues constituye curso abajo y en múltiples ocasiones, uno de los mediadores de la actividad pro-supervivencia de ERK (Arany y cols, 2005; Park y Cho, 2006). En este sentido, el incremento observado en los niveles de fosforilación de CREB a nivel de la Ser 133, se correlaciona con el patrón temporal de activación de ERK.

En estudios previos se han descrito supuestos en los que la activación de CREB tras la estimulación de los receptores AMPA/KA neuronales es dependiente de ERK (Socodato y cols, 2009), así como acciones pro-supervivencia de CREB tras la activación de los receptores AMPA oligodendrogiales (Deng y cols, 2006). En base a estas afirmaciones, hemos intentado determinar la existencia de un mecanismo de activación común a ambas moléculas, curso arriba en la vía de señalización ERK/CREB.

A este nivel, el análisis del papel de las PKCs, se llevó a cabo dado su gran potencial a la hora de formar parte de la cascada de activación de ERK (Mendoza y cols, 2011; Kang, 2014). La inhibición general de las PKCs, no modificó la viabilidad oligodendroglial tras la estimulación moderada de los receptores AMPA. Sin embargo la inhibición de PKC δ a través de su inhibidor específico, Rottlerina, potenció la muerte oligodendroglial tras la activación de los receptores AMPA, reflejo su participación en algún tipo de señalización o mecanismo pro-supervivencia.

Teniendo en cuenta que ciertos trabajos han establecido una relación directa entre PKC δ y el proceso de activación de ERK y CREB en distintos contextos (Basu y cols, 2005; Zhao y cols, 2007), se analizaron mediante western blot las posibles consecuencias que la inhibición de PKC δ pudiese tener sobre estas moléculas. Los resultados obtenidos, dejan constancia de la relación directa entre PKC δ y el eje ERK/CREB: la inhibición de la PKC δ se asocia a la ausencia de activación de ERK y CREB. En base a los efectos pro-supervivencia descritos para ERK y CREB, en contextos de excitotoxicidad oligodendroglial, la ausencia de activación de ambas, encaja con el aumento de la citotoxicidad mediada por AMPA en presencia de Rotlerina.

El papel pro-supervivencia del posible eje PKC δ /ERK/CREB, es contrario al sugerido en un trabajo previo en el que se describe una activación de ERK dependiente de PKC δ en neuronas expuestas a Glutamato (Choi y cols, 2006), si bien lo es por la acción antagónica que curso abajo se sugiere para la activación sostenida de ERK en dicho contexto con respecto al generado en oligodendrocitos. Sin embargo, son múltiples los estudios que sugieren un papel pro-supervivencia para ERK en contextos de excitotoxicidad glutamatérgica a nivel neuronal, por ejemplo: en neuronas granulares del cerebelo (Ortega y cols, 2011), en neuronas hipocampales (Melo 2013) o en neuronas del núcleo supraquiásmico (Karmarkar y cols, 2011), entre otras. Se trata pues, de un mecanismo cuyos efectos están ligados a las condiciones del estímulo, al tipo celular y sobretodo al patrón temporal de activación de la vía.

Por otra banda la ausencia de Bax, mecanismo de protección eficaz a la hora de impedir la disfunción mitocondrial y por consiguiente la muerte oligodendroglial excitotóxica (Sánchez y cols, 2011), no ha tenido repercusión en la potenciación de la muerte mediada por la inhibición de PKC δ . Este dato sugiere una magnificación a nivel cuantitativo de la muerte oligodendroglial, acompañada de cambios en el tipo de mecanismo subyacente al daño. En esta misma línea la inhibición farmacológica de las caspasas, elementos centrales del mecanismo apoptótico generado por el fenómeno excitotóxico (Sánchez-Gómez, 2003), también fue estéril a la hora de mitigar los efectos de la inhibición de PKC δ , es decir, de la ausencia de activación de ERK y CREB.

Ambos hallazgos indican que mediante la inhibición de PKC δ y consecuentemente de la activación de ERK y CREB, el proceso apoptótico deriva hacia condiciones necróticas, menos manipulables. En este sentido, la inhibición de PKC δ mimetiza los efectos de la inhibición farmacológica de ERK, mediante el compuesto UO126 (Domercq y cols, 2011), que también potencia la muerte oligodendroglial mediada por AMPA. Este incremento de la toxicidad fue vinculada a un estímulo moderado de los receptores AMPA (AMPA 10 μ M) pero no tuvo lugar cuando el estímulo fue agudo (AMPA 100 μ M) (Domercq y cols, 2011), pues este último genera muerte oligodendroglial de tipo necrótico (Sánchez-Gómez y cols, 2003).

Finalmente, dado que en la literatura existen trabajos en los que se pone de manifiesto la afectación de Prx-1 en contextos de inhibición de PKC δ (Li y cols, 2002; Li y cols, 2004), se analizó la expresión de esta molécula cuando PKC δ se encontraba inhibida. El hecho de que no se hayan observado diferencias significativas en la bajada de los niveles de Prx-1 provocada por AMPA, con independencia del estado de PKC δ , parece indicar que la no activación de la vía ERK/CREB supone el principal mecanismo subyacente a la potenciación de la muerte oligodendroglial cuando PKC δ permanece inhibida.

Para cimentar completamente los hallazgos expuestos a nivel de la vía propuesta PKC δ /ERK/CREB sería necesario, corroborar los resultados obtenidos mediante silenciamiento génico de PKC δ .

8. Observaciones finales

La MS es una enfermedad inflamatoria desmielinizante y crónica que afecta al SNC, caracterizada por la infiltración encefálica de leucocitos y la aparición de placas multifocales de desmielinización. Aunque no se ha sido establecido de forma concluyente el origen etiológico de la MS, es altamente probable que no esté restringido a un sólo mecanismo subyacente. Precisamente en esta línea el abordaje terapéutico de esta enfermedad es complejo considerándose, de forma general, tres aproximaciones:

1. Limitar la respuesta inmune patológica.
2. Proteger al SNC del daño y la degeneración celular.
3. Reparar el daño existente a través de la potenciación del proceso de remielinización.

La mayoría de los tratamientos iniciales se basaban en terapias inmunomoduladoras, eficientes a la hora de limitar la gravedad y frecuencia de las recaídas pero ineficaces para impedir el avance y transición hacia la MS progresiva. Los tratamientos clásicos a este nivel, dirigidos a limitar la activación patológica de las células del sistema inmune, interferían con el correcto funcionamiento de la respuesta inmunitaria global, dejando tras de sí una serie de efectos adversos. Este tipo de aproximación ha ido refinándose, resultando en la aparición de nuevas moléculas como el fingolimod (Brinkmann y cols, 2010) o el natalizumab (Steinman, 2012) cuya acción es más restringida y específica, así como también a través de aproximaciones como la terapia celular (mediante la administración de células con antígenos de mielina acoplados) (Getts y 2013; Lutterotti y cols, 2013).

Así mismo, en el estudio de la protección oligodendroglial, muchas de las estrategias existentes frente a los procesos apoptóticos, fueron precisamente descubiertas gracias a sus propiedades inmunomoduladoras o neuroprotectoras en otros contextos. En el marco de la MS, se hace especialmente complejo determinar si los efectos beneficiosos de algunas moléculas como por ejemplo atorvastatina o monociclina surgen a raíz de sus propiedades inmunomoduladoras, por sus efectos neuroprotectores o por la conjunción de ambos, dado que inflamación y degeneración celular están íntimamente ligadas en dicho contexto.

Por todo ello, conocer con detalle no sólo el proceso de inflamación sino también los mecanismos implicados en el daño y muerte oligodendroglial, redundará en la aplicación de terapias combinadas (tratamientos inmunomoduladores y tratamientos neuroprotectores o antiapoptóticos) más específicos y eficaces. En esta línea, las potenciales contribuciones de moléculas como c-FLIP, CK2 o ASK-1 tanto en el proceso inflamatorio (Atxell y cols, 2006; Guo y cols, 2010; Tanner y cols, 2015) como en la excitotoxicidad oligodendroglial, podrían sentar las bases para tratamientos que puntualmente potencien (c-FLIP) o bloqueen (CK2, ASK-1) la totalidad de intervenciones de estas moléculas en el contexto general de la MS.

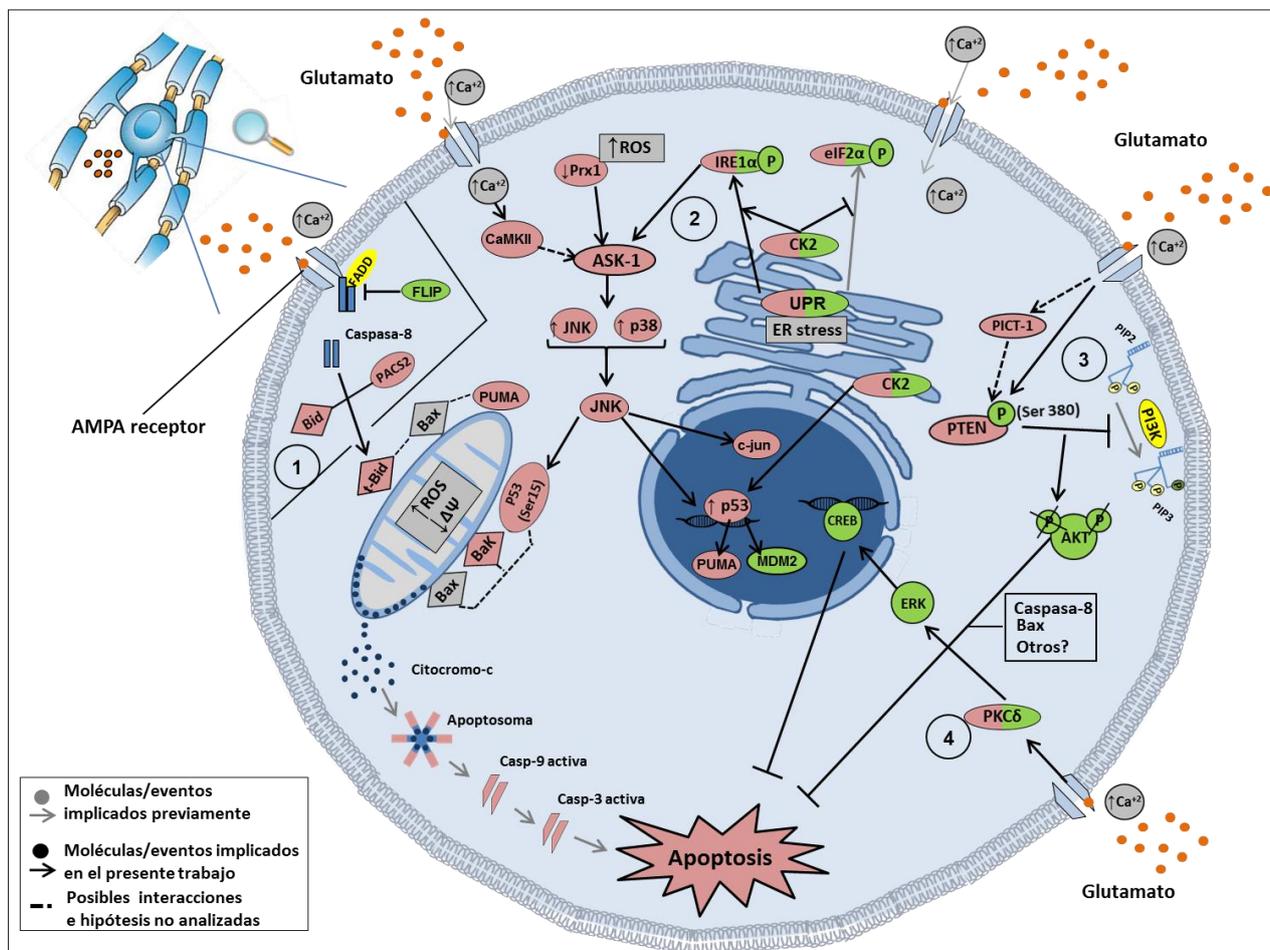


Figura 81. Principales mecanismos de señalización subyacentes a los procesos de excitotoxicidad glutamatérgica oligodendroglial. La activación moderada de los receptores AMPA de los oligodendrocitos genera un contexto apoptótico caracterizado por disrupción de la homostasis del Ca^{+2} , afectación mitocondrial y estrés de RE. En base a los datos pre-existentes, se ha podido complementar el esquema de señalización ya establecido. En este sentido, se ha confirmado la contribución de la vía apoptótica extrínseca a través de una serie de eventos que implican pérdida de c-FLIP, activación de la caspasa-8 y aparición de t-Bid. Por otro lado, dos de las vías de señalización propias de la UPR, iniciadas por la activación de IRE1 α y eIF2 α , son activadas durante este fenómeno excitotóxico y de manera novedosa hemos revelado cómo la quinasa CK2 actúa como elemento modulador de estas dos vías: por un lado, limita la activación/fosforilación de eIF2 α y, de manera contraria, fomenta la fosforilación de IRE1 α que, a su vez, contribuye de forma notable a la activación del eje pro-apoptótico ASK-1/JNK/p38. La activación de JNK y p38 se ha relacionado de forma directa con el incremento en los niveles de p53 -Ser15, posibilitando su interacción con la mitocondria, de la misma manera que JNK también puede mediar la activación de p53 a nivel transcripcional mediante su translocación al núcleo, evento también relacionado con la actividad de CK2. Por otra parte, la vía de supervivencia PI3K/Akt/mTOR se ve significativamente inhibida tras la activación de los receptores AMPA en oligodendrocitos, proceso claramente dependiente de la acción de la fosfatasa PTEN y sin la participación de la quinasa mTOR. Finalmente, se ha constatado la activación de la vía PKC δ /ERK/CREB como un mecanismo de defensa celular relevante a la hora de promover la supervivencia de parte de los oligodendrocitos sometidos al estrés excitotóxico. Esta vía, además, podría contribuir de manera notable a que el daño oligodendroglial desencadenado por la activación moderada de los receptores AMPA no desembogue en un proceso de muerte de carácter necrótico sino responda a un modelo apoptótico, bioquímicamente controlado y ejecutado a través de claves moleculares definidas

Conclusiones

1. La muerte excitotóxica causada por el AMPA en oligodendrocitos, implica mecanismos apoptóticos con participación no sólo de la vía intrínseca sino también de la vía extrínseca, caracterizada por la pérdida temprana de señal de c-FLIP y por la activación de Bid/t-Bid mediada por la acción de la Caspasa-8.
2. La señal excitotóxica modifica de forma marcada el ambiente intracelular, afectando al estado de las grandes vías de señalización como PI3K/AKT, MAPKs activadas por estrés (JNK y p38) o a la vía de ERK/CREB e implicando a moléculas clave como el gen supresor tumoral p53.
3. La vía ASK-1/JNK/p38 es activada de forma robusta en oligodendrocitos tras el estímulo con AMPA contribuyendo, entre otros, al mecanismo de activación transcripcional y mitocondrial de p53.
4. La estimulación de los receptores AMPA de oligodendrocitos potencia la actividad de la Caseína Kinasa II (CK2), enzima cuya inhibición incrementa la viabilidad oligodendroglial frente al estímulo excitotóxico.
5. La Caseína Kinasa II (CK2) se revela como probable nexo de unión entre la contribución pro-apoptótica de la UPR (estrés de RE), a través de la vía iniciada por IRE1 α y la activación del eje ASK1/JNK/p38.
6. La vía PI3K/AKT sufre una inhibición temprana, presumiblemente mediada por PTEN, tras la activación de los receptores AMPA oligodendrogliales. Esta reducción marcada en los niveles de activación de la vía proporciona las condiciones adecuadas para la activación de los pasos iniciales de la cascada apoptótica.
7. PKC- δ es responsable de la activación transitoria y pro-supervivencia de ERK y CREB tras la estimulación de los receptores AMPA de oligodendrocitos. La inhibición de la misma, potencia la muerte oligodendroglial que abandona parámetros apoptóticos para derivar en un mecanismo de carácter necrótico.

Bibliografía

Bibliografia

- Aboul-Enein,F., Rauschka,H., Kornek,B., Stadelmann,C., Steffel,A., Bruck,W., Lucchinetti,C., Schmidbauer,M., Jellinger,K., Lassmann,H. (2003). Preferential loss of myelin-associated glycoprotein reflects hypoxia-like white matter damage in stroke and inflammatory brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol.* 62, 25-33.
- Akhter,R., Sanphui,P., Biswas,S.C. (2014). The essential role of p53-ip-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and its regulation by FoxO3a transcription factor in β -amyloid-induced neuron death. *J Biol Chem.* 289, 1812-22.
- Alberdi,E., Sánchez-Gómez,M.V., Marino,A., Matute,C. (2002). Ca^{+2} influx through AMPA or kainate receptors alone is sufficient to initiate excitotoxicity in cultured oligodendrocytes. *Neurobiol Dis.* 9, 234-243.
- Alessi,D.R., James,S.R., Downes,C.P., Holmes,A.B., Gaffney,P.R., Reese,C.B., Cohen,P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol.* 7, 261-9.
- Al-Khouri,A.M., Ma,Y., Togo,S.H., Williams,S., Mustelin,T. (2005). Cooperative phosphorylation of the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue (PTEN) by casein kinases and glycogen synthase kinase 3beta. *J Biol Chem.* 280, 35195-202.
- Alvero,A.B., Montagna,M.K., Chen,R., Kim,K.H., Kyungin,K., Visintin,I., Fu,H.H., brown,D., Mor,G. (2009). NV-128, a novel isoflavone derivative induces caspase-independent cell death through the AKT/mammalian target of rapamycin pathway. *Cancer.* 115, 3204-16.
- Allende-Vega,N., Dayal,S., Agarwala,U., Sparks,A., Bourdon,J.C., Saville,M.K. (2013). p53 is activated in response to disruption of the pre-mRNA splicing machinery. *Oncogene.* 32, 1-14.
- Ampofo,E., Sokolowsky,T., Götz,C., Montenarh,M. (2013). Functional interaction of protein kinase CK2 and activating transcription factor 4 (ATF4), a key player in the cellular stress response. *Biochim Biophys Acta.* 1833, 439-51.
- Antony,M.L., Kim,S.H., Singh,S.V. (2012). Critical role of p53 upregulated modulator of apoptosis in benzyl isothiocyanate-induced apoptotic cell death. *PLoS One.* 7:e32267.
- Arany,I., Megyesi,J.K., Reusch,J.E., Safirstein,R.L. (2005). CREB mediates ERK-induced survival of mouse renal tubular cells after oxidant stress. *Kidney Int.* 68, 1573-82.
- Ashpole,N.M., Hudmon,A. (2011). Excitotoxic neuroprotection and vulnerability with CaMKII inhibition. *Mol Cell Neurosci.* 46, 720-30.
- Autret,A., Martin-Latil,S., Brisac,C., Mousson,L., Colbère-Garapin,F., Blondel,B. (2008). Early Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway Activation Limits Poliovirus-Induced JNK-Mediated Cell Death. *J Virol.* 82, 3796–3802.
- Axtell,R.C., Xu,L., Barnum,S.R., Raman,C. (2006). CD5-CK2 binding/activation-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: protection is associated with diminished populations of IL-17-expressing T cells in the central nervous system. *J Immunol.* 177, 8542-9.

Bibliografia

- Bagnoli,M., Canevari,S., Mezzanzanica,D. (2010). Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signalling: a key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 42, 210-3.
- Barkhatova,V.P., Zavalishin,I.A., Askarova,L.Sh., Shavratskii,V.Kh., Demina,E.G. (1998). Changes in neurotransmitters in multiple sclerosis. *Neurosci Behav Physiol.* 28, 341–344.
- Barthwal,M.K., Sathyanarayana,P., Kundu,C.N., Rana,B., Pradeep,A., Sharma,C., Woodgett,J.R., Rana,A. (2003). Negative regulation of mixed lineage kinase 3 by protein kinase B/AKT leads to cell survival. *J Biol Chem.* 278, 3897-902.
- Basu,A., Tu,H. (2005). Activation of ERK during DNA damage-induced apoptosis involves protein kinase Cdelta. *Biochem Biophys Res Commun.* 334, 1068-73.
- Basu,A., Pal,D. (2010). Two faces of protein kinase C δ : the contrasting roles of PKC δ in cell survival and cell death. *Scientific World Journal.* 10, 272-84.
- Baudot,A.D., Jeandel,P.Y., Mouska,X., Maurer,U., Tartare-Deckert,S., Raynaud,S.D., Cassuto,J..P, Ticchioni,M., Deckert,M. (2009). The tyrosine kinase Syk regulates the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells through PKCdelta and proteasome-dependent regulation of Mcl-1 expression. *Oncogene.* 28, 3261-73.
- Berggren,M., Sittadjody,S., Song,Z., Samira,J-L., Burd,R., Meuillet,E.J. (2009). Sodium Selenite Increases the Activity of the Tumor Suppressor Protein, PTEN in DU-145 Prostate Cancer Cells. *Nutr Cancer.* 61, 322–331.
- Bian,Y., Ye,M., Wang,C., Cheng,K., Song,C., Dong,M., Pan,Y., Qin,H., Zou,H. (2013). Global Screening of CK2 Kinase Substrates by an Integrated Phosphoproteomics Workflow. *Scientific Reports* 3, Article number: 3460.
- Bing,L., Wu,J., Zhang,J., Chen,Y., Hong,Z., Zu,H. (2015). DHT inhibits the A β 25-35-induced apoptosis by regulation of seladin-1, survivin, XIAP, bax, and bcl-xl expression through a rapid PI3-K/Akt signaling in C6 glial cell lines. *Neurochem Res.* 40, 41-8.
- Björkblom,B., Vainio,J.C., Hongisto,V., Herdegen,T., Courtney,M.J., Coffey,E.T. (2008). All JNKs can kill, but nuclear localization is critical for neuronal death. *J Biol Chem.* 283, 19704-13.
- Bode,A.M., Dong,Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 4, 793-805.
- Bose,I., Ghosh,B. (2007). The p53-MDM2 network: from oscillations to apoptosis. *J Biosci.* 32, 991-7.
- Bossy-Wetzels,E., Green,D.R. (1999). Caspases induce cytochrome c release from mitochondria by activating cytosolic factors. *J Biol Chem.* 274, 17484-90.
- Boyce,M., Bryant,K.F., Jousse,C., Long,K., Harding,H.P., Scheuner,D., Kaufman,R.J., Ma,D., Coen,D.M., Ron,D., Yuan,J. (2005). A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science.* 307, 935-9.
- Bozulic,L., Hemmings,B.A. (2009). PIKKing on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation. *Curr Opin Cell Biol.* 21, 256-61.

- Brasacchio,D.,Noori,T.,House,C.,Brennan,A.J.,Simpson,K.J.,Susanto,O.,Bird,P.I.,Johnstone,R.W., Trapani,J.A. (2014). A functional genomics screen identifies PCAF and ADA3 as regulators of human granzyme B-mediated apoptosis and Bid cleavage. *Cell Death Differ.* 21, 748–760.
- Brazil,D.P., Yang Z.Z., Hemmings,B.A. (2004). Advances in protein kinase B signaling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci.* 29, 233-42.
- Brinkmann,V., Billich,A., Baumruker,T., Heining,P., Schmouder,R., Francis,G., Aradhya,S., Burtin,P. (2010). Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov.* 9, 883-97.
- Brnjic,S., Olofsson,M.H., Havelka,A.M., Linder,S. (2010). Chemical biology suggests a role for calcium signaling in mediating sustained JNK activation during apoptosis. *Mol Biosyst.* 6, 767-74.
- Brooks,C.L., Gu,W. (2003). Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 15, 164-71.
- Brunet,A., Bonni,A., Zigmond,M.J., Lin,M.Z., Juo,P., Hu,L.S., Anderson,M.J., Arden,K.C., Blenis,J., Greenberg,M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell.* 96, 857-68.
- Buschmann,T., Potapova,O., Bar-Shira,A., Ivanov,V.N., Fuchs,S.Y., Henderson,S., Fried,V.A., Minamoto,T., Alarcon-Vargas,D., Pincus,M.R., Gaarde,W.A., Holbrook,N.J., Shiloh,Y., Ronai,Z. (2001). Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress. *Mol Cell Biol.* 21(8):2743-54.
- Cabon,L., Galán-Malo,P., Bouharrou,A., Delavallée,L., Brunelle-Navas,M.N., Lorenzo,H.K., Gross,A., Susin,S.A. (2012). BID regulates AIF-mediated caspase-independent necroptosis by promoting BAX activation. *Cell Death Differ.* 19, 245-56.
- Cai,B., Chang,S.H., Becker,E.B., Bonni,A., Xia,Z. (2006). p38 MAP kinase mediates apoptosis through phosphorylation of BimEL at Ser-65. *J Biol Chem.* 281, 25215-22.
- Cai,B., Xia,Z. (2008). p38 MAP kinase mediates arsenite-induced apoptosis through FOXO3a activation and induction of Bim transcription. *Apoptosis.* 13, 803-10.
- Cai,D.T., Jin,H., Xiong,Q.X., Liu,W.G., Gao,Z.G., Gu,G.X., Qiu,Y.H. (2013). ER stress and ASK1-JNK activation contribute to oridonin-induced apoptosis and growth inhibition in cultured human hepatoblastoma HuH-6 cells. *Cell Biochem.* 379, 161-9.
- Campos-Esparza,M.R., Sánchez-Gómez,M.V., Matute,C. (2009). Molecular mechanisms of neuroprotection by two natural antioxidant polyphenols. *Cell Calcium.* 45, 358-68.
- Capano,M., Crompton,M. (2006). Bax translocates to mitochondria of heart cells during simulated ischaemia: involvement of AMP-activated and p38 mitogen-activated protein kinases. *Biochem J.* 395, 57-64.
- Caravatta,L., Sancilio,S., Di Giacomo,V., Rana,R., Cataldi,A., Di Pietro,R. (2008). PI3-K/Akt-dependent activation of cAMP-response element-binding (CREB) protein in Jurkat T leukemia cells treated with TRAIL. *J Cell Physiol.* 214, 192-200.

- Carrara,M., Prischi,F., Maruf M.U. (2013). UPR Signal Activation by Luminal Sensor Domains. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 6454-6466.
- Carriba,P., Pardo,L., Parra-Damas,A., Lichtenstein,M.P., Saura,C.A., Pujol,A., Masgrau,R., Galea,E. (2012). ATP and noradrenaline activate CREB in astrocytes via noncanonical Ca(2+) and cyclic AMP independent pathways. *Glia.* 60, 1330-44.
- Carriedo,S.G., Sensi,S.L., Yin,H.Z., Weiss,J.H. (2000). AMPA exposures induce mitochondrial Ca⁺² overload and ROS generation in spinal motoneurons in vitro. *J Neurosci.* 20, 240-250.
- Carvour,M., Song,C., Kaul,S., Anantharam,V., Kanthasamy,A., Kanthasamy,A. (2008). Chronic low-dose oxidative stress induces caspase-3-dependent PKCdelta proteolytic activation and apoptosis in a cell culture model of dopaminergic neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci.* 1139, 197-205.
- Castrogiovanni,C., Vandaudenard,M., Waterschoot,B., De Backer,O., Dumont,P. (2015). Decrease of mitochondrial p53 during late apoptosis is linked to its dephosphorylation on serine 20. *Cancer Biol. Ther.* 16, 1296-1307.
- Chakraborty,A., Werner,J.K. Jr, Koldobskiy,M.A., Mustafa,A.K., Juluri,K.R., Pietropaoli,J., Snowman,A.M., Snyder,S.H. (2011). Casein kinase-2 mediates cell survival through phosphorylation and degradation of inositol hexakisphosphate kinase-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108, 2205-9.
- Chalhoub,N., Baker,S.J. (2009). PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer. *Annu Rev Pathol.* 4, 127–150.
- Chambard,J.C., Lefloch,R., Pouysségur,J., Lenormand,P. (2007). ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta.* 1773, 1299-310.
- Chandra,D., Choy,G., Deng,X., Bhatia,B., Daniel,P., Tang,D.G. (2004). Association of active caspase 8 with the mitochondrial membrane during apoptosis: potential roles in cleaving BAP31 and caspase 3 and mediating mitochondrion-endoplasmic reticulum cross talk in etoposide-induced cell death. *Moll Cell Biol.* 24, 6592-607.
- Chang,L., Karin,M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 410, 37-40.
- Chang,L., Kamata,H., Solinas,G., Luo,J.L., Maeda,L., Venuprasad,K. (2006). The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNFalpha-induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell,* 124, 601-613.
- Chantôme,A., Pance,A., Gauthier,N., Vandroux,D., Chenu,J., Solary,E., Jeannin,J-F., Reveneau,S. (2004). Casein Kinase II-mediated Phosphorylation of NF-κB p65 Subunit Enhances Inducible Nitric-oxide Synthase Gene Transcription in Vivo. *J Bio Chem.* 279, 23953-23960.
- Chen,C.C., Jeon,S.M., Bhaskar,P.T., Nogueira,V., Sundararajan,D., Tonic,I., Park,Y., Hay,N. (2010). FoxOs inhibit mTORC1 and activate Akt by inducing the expression of Sestrin3 and Rictor. *Dev Cell.* 18, 592-604.
- Chen,C.Y., Chen,K.C., Yang,T.Y., Liu,H.C., Hsu,S.L. (2013). Gallic Acid Induces a Reactive Oxygen Species- Provoked c-Jun NH2-Terminal Kinase-Dependent Apoptosis in Lung Fibroblasts. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013:613950.

Bibliografia

- Chen,W., Li,X., Jia,L.Q., Wang,J., Zhang,L., Hou,D., Wang,J., Ren,L. (2013). Neuroprotective activities of catalpol against CaMKII-dependent apoptosis induced by LPS in PC12 cells. *Br J Pharmacol.* 169, 1140-52.
- Chen,Y., Balasubramaniyan,V., Peng,J., Hurlock,E.C., Tallquist,M., Li,J., Lu,Q.R. (2007). Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells. *Nature Protoc.* 2, 1044-1051.
- Chia,Y.C., Catimel,B., Lio,D.S., Ang,C.S., Peng,B., Wu,H., Zhu,H.J., Cheng,H.C. (2015). The C-terminal tail inhibitory phosphorylation sites of PTEN regulate its intrinsic catalytic activity and the kinetics of its binding to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Arch Biochem Biophys.* 587, 48-60.
- Chipuk,J.E., Bouchier-Hayes,L., Kuwana,T., Newmeyer,D.D., Green,D.R. (2005). PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science.* 309, 1732-5.
- Chipuk,J.E., Green,D.R. (2006). Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ.*13, 994–1002.
- Choi,B.H., Hur,E.M., Lee,J.H., Jun,D.J., Kim,K.T. (2006). Protein kinase Cdelta-mediated proteasomal degradation of MAP kinase phosphatase-1 contributes to glutamate-induced neuronal cell death. *J Cell Sci.* 119, 1329-40.
- Choi,D.W. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* 1, 623-634.
- Choi,H.J., Kang,K.S., Fukui,M., Zhu,B.T. (2011). Critical role of the JNK-p53-GADD45 α apoptotic cascade in mediating oxidative cytotoxicity in hippocampal neurons. *Br J Pharmacol.* 162, 175–192.
- Choi,W. (1995). Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci.* 18, 58-60.
- Coelho,D.S., Domingos,P.M. (2014). Physiological roles of regulated Ire1 dependent decay. *Front Genet.* 5, 76.
- Cordier,F., Chaffotte,A., Terrien,E., Préhaud,C., Theillet,F.X., Delepierre,M., Lafon,M., Buc,H., Wolff,N. (2012). Ordered phosphorylation events in two independent cascades of the PTEN C-tail revealed by NMR. *J Am Chem Soc.* 134, 20533-43.
- Cui,Q.L., Fogle,E., Almazan,G. (2006). Muscarinic acetylcholine receptors mediate oligodendrocyte progenitor survival through Src-like tyrosine kinases and PI3K/Akt pathways. *Neurochem Int.* 48, 383-93.
- Culmsee,C., Zhu,X., Yu,Q.S., Chan,S.L., Camandola,S., Guo,Z., Greig,N.H., Mattson,M.P. (2001). A synthetic inhibitor of p53 protects neurons against death induced by ischemic and excitotoxic insults, and amyloid beta-peptide. *J Neurochem.* 77, 220-8.
- Culmsee,C., Zhu,C., Landshamer,S., Becattini,B., Wagner,E., Pellecchia,M., Blomgren,K., Plesnila,N. (2005). Apoptosis-inducing factor triggered by poly(ADP-ribose) polymerase and Bid mediates neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *J Neurosci.* 25, 10262-72.
- Cull-Candy,S.G., and Leszkiewicz, D.N. (2004). Role of distinct NMDA receptor subtypes and central synapses. *Sci. STKE.* 2004, re16.

- Cullen,S.P., Martin,S.J. (2009). Caspase activation pathways: some recent progress. *Cell Death Differ.* 16, 935–938.
- Czabotar,P.E., Lessene,G., Strasser,A., Adams,J.M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15(1):49-63.
- Dai,C., Gu,W. (2010). p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends Mol Med.* 16, 528-36.
- Darling,N.J., Cook,S.J. (2014). The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress. *BBA-MOL CELL RES.* 1843, 2150–2163.
- Datta,S.R., Dudek,H., Tao,X., Masters,S., Fu,H., Gotoh,Y., Greenberg,M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell.* 91, 231-41.
- Davila,D., Connolly,N.M.C., Bonner,H., Weisová,P., Dussmann,H., Concannon,G.C., Huber,H.J., Prehn,J.H.M. (2012). Two-step activation of FOXO3 by AMPK generates a coherent feed-forward loop determining excitotoxic cell fate. *Cell Death Differ.* 19, 1677–1688.
- Davis,A.T., Wang,H., Zhang,P., Ahmed,K. (2002). Heat shock mediated modulation of protein kinase CK2 in the nuclear matrix. *J Cell Biochem.* 85, 583–591.
- Davis,R.J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell.* 103, 239-52.
- D'Costa,A.M., Denning,M.F. (2005). A caspase-resistant mutant of PKC-delta protects keratinocytes from UV-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 12, 224-32.
- D'Costa,A.M., Robinson,J.K., Maududi,T., Chaturvedi,V., Nickoloff,B.J., Denning,M.F. (2006). The proapoptotic tumor suppressor protein kinase C-delta is lost in human squamous cell carcinomas. *Oncogene.* 25, 378-86.
- Delgado-Esteban,M., Martin-Zanca,D., Andres-Martin,L., Almeida,A., Bolaños,J.P. (2007). Inhibition of PTEN by peroxynitrite activates the phosphoinositide-3-kinase/Akt neuroprotective signaling pathway. *J Neurochem.* 102, 194-205.
- Deng,W., Neve,R.L., Rosenberg,P.A., Volpe,J.J., Jensen,F.E. (2006). Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor subunit composition and cAMP-response element-binding protein regulate oligodendrocyte excitotoxicity. *J Biol Chem.* 281, 36004-11.
- Deng,Y., Ren,X., Yang,L., Lin,Y., Wu,X. (2003). A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis. *Cell.* 115, 61-70.
- De Paula,M.L., Cui,Q.L., Hossain,S., Antel,J., Almazan,G. (2014). The PTEN inhibitor bisperoxovanadium enhances myelination by amplifying IGF-1 signaling in rat and human oligodendrocyte progenitors. *Glia.* 62, 64-77.
- Dhanasekaram,D.N., Reddy,E.P. (2008). JNK signaling in apoptosis. *Oncogene.* 27, 6245–6251.
- Di Maira,G., Salvi,M., Arrigoni,G., Marin,O., Sarno,S., Brustolon,F., Pinna,L.A., Ruzzene,M. (2005). Protein kinase CK2 phosphorylates and upregulates Akt/PKB. *Cell Death Differ.* 12, 668-77.

Bibliografia

- Di Maira,G., Brustolon,F., Pinna,L.A., Ruzzene,M. (2009). Dephosphorylation and inactivation of Akt/PKB is counteracted by protein kinase CK2 in HEK 293T cells. *Cell Mol Life Sci.* 66, 3363-73.
- Dingledine,R., Borges,K., Bowie,D., Traynelis, S.F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev.* 51, 7-61.
- Dixit,D., Sharma,V., Ghosh,S., Mehta,V.S., Sen,E. (2012). Inhibition of Casein kinase-2 induces p53-dependent cell cycle arrest and sensitizes glioblastoma cells to tumor necrosis factor (TNF α)-induced apoptosis through SIRT1 inhibition. *Cell Death Dis.* 3:e271.
- Domercq,M., Matute,C. (1999) Expression of glutamate transporters in the adult bovine corpus callosum. *Brain Res Mol Brain Res.* 67, 296-302.
- Domercq,M., Alberdi,E., Sánchez-Gómez,M.V., Ariz,U., Pérez-Samartín,A., Matute,C. (2011). Dual-specific phosphatase-6 (Dusp6) and ERK mediate AMPA receptor-induced oligodendrocyte death. *J Biol Chem.* 286, 11825-36.
- Dominguez,I., Sonenshein,G.E., Seldin,D.C. (2009). CK2 and its role in Wnt and NF- κ B signaling: Linking development and cancer. *Cell Mol Life Sci.* 66, 1850–1857.
- Donovan,N., Becker,E.B., Konishi,Y., Bonni,A. (2002). JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery. *J Biol Chem.* 277, 40944-9.
- Dowling,R.J., Topisirovic,I., Fonseca,B.D., Sonenberg,N. (2009). Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors. *Biochim Biophys Acta.* 1804, 433-9.
- Duchen,M.R. (2000). Mitochondria and calcium: from cell signaling to cell death. *J Physiol.* 529 Pt 1, 57-68.
- Eichhorn,P.J., Creighton,M.P., Bernards,R. (2009). Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1795, 1-15.
- Engelman,J.A., Luo,J., Cantley,L.C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet.* 7, 606-19.
- Fan,Y., Li,J., Zhang,Y.Q., Jiang,L.H., Zhang,Y.N., Yan,C.Q. (2014). Protein kinase C delta mediated cytotoxicity of 6-Hydroxydopamine via sustained extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in PC12 cells. *Neurol Res.* 36, 53-64.
- Farnebo,M., Bykov,V.J., Wiman,K.G. (2010). The p53 tumor suppressor: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 396, 85-9.
- Fausti,F., Di Agostino,S., Cioce,M., Bielli,P., Sette,C., Pandolfi,P.P., Oren,M., Sudol,M., Strano,S., Blandino,G. (2013). ATM kinase enables the functional axis of YAP, PML and p53 to ameliorate loss of Werner protein-mediated oncogenic senescence. *Cell Death Differ.* 20, 1498–1509.
- Fletcher,E.J., Martin,D., Aram,J.A., Lodge,D., Honore,T. (1988). Quinoxalinediones selectively block quisqualate and kainate receptors and synaptic events in rat neocortex and hippocampus and frog spinal cord in vitro. *Br. J Pharmacol.* 95, 585-597.

Bibliografia

- Follis,A.V., Chipuk,J.E., Fisher,J.C., Yun,M.K., Grace,C.R., Nourse,A., Baran,K., Ou,L., Min,L., White,S.W., Green,D.R., Kriwacki,R.W. (2013). PUMA binding induces partial unfolding within BCL-xL to disrupt p53 binding and promote apoptosis. *Nat Chem Biol.* 9, 163-8.
- Fruman,D.A., Rommel,C. (2014). PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 13, 140-56.
- Galluzzi,L., Morselli,E., Kepp,O., Tajeddine,N., Kroemer,G. (2008). Targeting p53 to mitochondria for cancer therapy. *Cell Cycle.* 7, 1949-55.
- Galluzzi,L., Blomgren,K., Kroemer,G. (2009). Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nat Rev Neurosci.* 10, 481-94.
- Garibal,J., Hollville,E., Renouf,B., Tétaud,C., Wiels,J. (2010). Caspase-8-mediated cleavage of Bid and protein phosphatase 2A-mediated activation of Bax are necessary for Verotoxin-1-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma cells. *Cell Signal.* 22, 467-75.
- Gary,D.S., Mattson,M.P. (2002). PTEN regulates Akt kinase activity in hippocampal neurons and increases their sensitivity to glutamate and apoptosis. *Neuromolecular Med.* 2, 261-9.
- Geraldes,P., Hiraoka-Yamamoto,J., Matsumoto,M., Clermont,A., Leitges,M., Marette,A., Aiello,L.P., Kern,T.S., King,G.L. (2009). Activation of PKC-delta and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy. *Nat Med.* 15, 1298-306.
- Gerber,D.A., Souquere-Besse,S., Puvion,F., Dubois,M-F., Bensaude,O., Cochet,C. (2000). Heat-induced Relocalization of Protein Kinase CK2. *J Biol Chem.* 275, 23919-23926.
- Getts,D.R., Martin,A.J., Mccarthy,D.P., Terry,R.L., Hunter,Z.N., Yap,W.T., Getts,M.T., Pleiss,M., Luo,X., King,N.J., Shea,L.D., Miller,S.D. (2013). Microparticles bearing encephalitogenic peptides induce T-cell tolerance and ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Biotechnol.* 31:565.
- Giaccia,A.J., Kastan,M.B. (1998). The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev.* 12, 2973-83.
- Gogvadze,V., Orrenius,S., Zhivotovsky,B. (2006). Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 1757, 639-47.
- Gomel,R., Xiang,C., Finniss,S., Lee,H.K., Lu,W., Okhrimenko,H., Brodie,C. (2007). The localization of protein kinase Cdelta in different subcellular sites affects its proapoptotic and antiapoptotic functions and the activation of distinct downstream signaling pathways. *Mol Cancer Res.* 5, 627-39.
- Gong,X., Liu,A., Ming,X., Deng,P., Jiang,Y. (2010). UV-induced interaction between p38 MAPK and p53 serves as a molecular switch in determining cell fate. *FEBS Lett.* 584, 4711-6.
- Götz,C., Montenarh,M. (2013). Protein kinase CK2 in the ER stress response. *Advances in Biological Chemistry.* 3, 1-5.
- Griner,E.M., Kazanietz,M.G. (2007). Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat Rev Cancer.* 7, 281-94.

- Grohm,J., Plesnila,N., Culmsee,C. (2010). Bid mediates fission, membrane permeabilization and perinuclear accumulation of mitochondria as a prerequisite for oxidative neuronal cell death. *Brain Behav Immun.* 24, 831-8.
- Grohm,J., Kim, S-W., Mamrak,U., Tobaben,S., Cassidy-Stone,A., Nunnari,J., Plesnila,N., Culmsee,C. (2012). Inhibition of Drp1 provides neuroprotection in vitro and in vivo. *Cell Death Differ.* 19, 1446–1458.
- Groom, A.J., Smith,T., Turski,L. (2003). Multiple sclerosis and glutamate. *Ann NY Acad Sci.* 993, 229–275.
- Gu,Q., Wang,J.D., Xia,H.H., Lin,M.C., He,H., Zou,B., Tu,S.P., Yang,Y., Liu,X.G., Lam,S.K., Wong,W.M., Chan,A.O., Yuen,M.F., Kung,H.F., Wong,B.C. (2005). Activation of the caspase-8/Bid and Bax pathways in aspirin-induced apoptosis in gastric cancer. *Carcinogenesis.* 26, 541-6.
- Gu,Z.T., Li,L., WU,F., Zhao,P., Yang,H., Liu,Y.S., Geng,Y., Zhao,M., Su.L. (2015). Heat stress induced apoptosis is triggered by transcription-independent p53, Ca²⁺ dyshomeostasis and the subsequent Bax mitochondrial translocation. *Scientific reports.* 5, art.number:11497.
- Guo,X., Harada,C., Namekata,K., Matsuzawa,A., Camps,M., Ji,H., Swinnen,D., Jorand-Lebrun,c., Muzerelle,M., Vitte,P-A., Rückle,t., Kimura,A., Kohyama,K., Matsumoto,Y., Ichijo,H., Harada1,T. (2010). Regulation of the severity of neuroinflammation and demyelination by TLR-ASK1-p38 pathway. *EMBO Mol Med.* 2, 504–515.
- Haas,J., Erdo,S.L. (1991). Quisqualate-induced excitotoxic death of glial cells: transient vulnerability of cultured astrocytes. *Glia.* 4, 111–114.
- Hagn,F., Klein,C., Demmer,O., Marchenko,N., Vaseva,A., Moll,U.M., Kessler,H. (2010). BclxL changes conformation upon binding to wild-type but not mutant p53 DNA binding domain. *J Biol Chem.* 285, 3439-50.
- Haigis,K.M., Sweet-Cordero,A. (2011). New insights into oncogenic stress. *Nat Genet.* 43, 177-8.
- Hajnoczky,G., Davies,E., Madesh,M. (2003). Calcium signalling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 304, 45-454.
- Hanif,I.M., Shazib,M.A., Ahmad,K.A., Pervaiz,S. (2010). Casein Kinase II: an attractive target for anti-cancer drug design. *Int J Biochem Cell Biol.* 42, 1602-5.
- Hao,Z., Mak,T.W. (2010). Type I and type II pathways of Fas-mediated apoptosis are differentially controlled by XIAP. *J Mol Cell Biol.* 2, 63-4.
- Harada,J., Sugimoto,M. (1999). An inhibitor of p38 and JNK MAP kinases prevents activation of caspase and apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Jpn J Pharmacol.* 79, 369-78.
- Harding,HP., Zhang,Y., Zeng,H., Novoa,I., Lu,P.D., Calton,M., Sadri,N., Yun,C., Popko,B., Paules,R., Stojdl,D.F., Bell,J.C., Hettmann,T., Leiden,J.M., Ron,D. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell.* 11, 619-33.
- Harper,N., Hughes,M.A., Farrow,S.N., Cohen,G.M., MacFarlane,M. (2003). Protein kinase C modulates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by targeting the apical events of death receptor signaling. *J Biol Chem.* 278, 44338-47.

Bibliografía

- Harrington,E.P., Zhao,C., Fancy,S.P., Kaing,S., Franklin,R.J., Rowitch,D.H. (2010). Oligodendrocyte PTEN is required for myelin and axonal integrity, not remyelination. *Ann Neurol.* 68, 703-16.
- Hattori,K., Naguro,I., Runchel,C., Ichijo,H. (2009). The roles of ASK family proteins in stress responses and diseases. *Cell Commun Signal.* 7:9
- Hayakawa,R., Hayakawa,T., Takeda,K., Ichijo,H. (2012). Therapeutic targets in the ASK1-dependent stress signaling pathways. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 88, 434–453.
- He,J., Qi,Z., Su,Y., He,Q., Liu,J., Yu,L., Al-Attas,O.S., Hussain,T., De Rosas,E.T., Ji,L., Ding,S. (2012). Pifithrin- μ increases mitochondrial COX biogenesis and MnSOD activity in skeletal muscle of middle-aged mice. *Mitochondrion.* 12, 630-9.
- He,T., Banach-Latapy,A., Vernis,L., Dardalhon,M., Chanet,R., Huang,M. (2012). Peroxiredoxin 1 knockdown potentiates β -lapachone cytotoxicity through modulation of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase signals. *Carcinogenesis.* 0, 1-10.
- Hellwig,C.T., Ludwig-Galezowska,A.H., Concannon,C.G., Litchfield,D.W., Prehn,J.H., Rehm,M. (2010). Activity of protein kinase CK2 uncouples Bid cleavage from caspase-8 activation. *J Cell Sci.* 123, 1401-6.
- Hemmings,B.A., Restuccia,D.F. (2012). PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4:a011189.
- Henrich,C.J., Brooks,A.D., Erickson,K.L., Thomas,C.L., Bokesch,H.R., Tewary,P., Thompson,C.R., Pompei,R.J., Gustafson,K.R., McMahon,J.B., Sayers,T.J. (2015). Withanolide E sensitizes renal carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by increasing cFLIP degradation. *Cell Death Dis.* 6:e1666.
- Hernández-Maqueda,J.G., Luna-Ulloa,L.B., Santoyo-Ramos,P., Castañeda-Patlán,M.C., Robles-Flores,M. (2013). Protein kinase C delta negatively modulates canonical Wnt pathway and cell proliferation in colon tumor cell lines. *PLoS One.* 8:e58540.
- Hilgard, P., Czaja, M.J., Gerken,G., Stockert,R.J. (2004). Proapoptotic function of protein kinase CK2 α is mediated by a JNK signaling cascade. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 287, 192-201.
- Hosoi,T., Korematsu,K., Horie,N., Suezawa,T., Okuma,Y., Nomura,Y., Ozawa,K. (2012). Inhibition of casein kinase 2 modulates XBP1-GRP78 arm of unfolded protein responses in cultured glial cells. *PLoS One.* 7:e40144.
- Hu,W., Feng,Z., Levine,A.J. (2012). The Regulation of Multiple p53 Stress Responses is Mediated through MDM2. *Genes Cancer.* 3, 199-208.
- Huang,J., Yan,J., Zhang,J., Zhu,S., Wang,Y., Shi,T., Zhu,C., Chen,C., Liu,X., Cheng,J., Mustelin,T., Feng,G.S., Chen,G., Yu,J. (2012). SUMO1 modification of PTEN regulates tumorigenesis by controlling its association with the plasma membrane. *Nat Commun.* 3:911.
- Huh,J.E., Kang,K.S., Chae,C., Kim,H.M., Ahn,K.S., Kim,S.H. (2004). Roles of p38 and JNK mitogen-activated protein kinase pathways during cantharidin-induced apoptosis in U937 cells. *Biochem Pharmacol.* 67, 1811-8.

Bibliografia

- Ibarretxe,G., Sánchez-Gómez,M.V., Campos-Esparza,M.R., Alberdi,E., Matute,C. (2006). Differential oxidative stress in oligodendrocytes and neurons after excitotoxic insults and protection by natural polyphenols. *Glia*. 53, 201-211.
- Ichijo,H., Nishida,E., Irie,K., ten Dijke,P., Saitoh,M., Moriguchi,T., Takagi,M., Matsumoto,K., Miyazono,K., Gotoh,Y. (1997). Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*. 275,90-4.
- Intemann,J., Saidu,N.E., Schwind,L., Montenarh,M. (2014). ER stress signaling in ARPE-19 cells after inhibition of protein kinase CK2 by CX-4945. *Cell Signal*. 26, 1567-75.
- Jäger,R., Bertrand, M.J., Gorman,A.M., Vandenabeele,P., Samali,A. (2012). The unfolded protein response at the crossroads of cellular life and death during endoplasmic reticulum stress. *Biol Cell*. 104, 259-70.
- Jeong,J., Dasgupta,A., Jung,K.J., Um,J.H., Burke,A., Park,H.U., Brady,J.N. (2008). PI3K/AKT inhibition induces caspase-dependent apoptosis in HTLV-1-transformed cells. *Virology*. 370, 264-72.
- Jerde,T.J. (2015). Phosphatase and Tensin Homologue: Novel Regulation by Developmental Signaling. *J Signal Transduct*. Vol. 2015 Art. ID 282567, 13 pages.
- Jiang,G., Wu,H., Hu,Y., Li,J., Li,Q. (2014). Gastrodin inhibits glutamate-induced apoptosis of PC12 cells via inhibition of CaMKII/ASK-1/p38 MAPK/p53 signaling cascade. *Cell Mol Neurobiol*. 34, 591-602.
- Jin,L., Li,C., Xu,Y., Wang,L., Liu,J., Wang,D., Hong,C., Jiang,Z., Ma,Y., Chen,Q., Yu,F. (2013). Epigallocatechin gallate promotes p53 accumulation and activity via the inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination in human lung cancer cells. *Oncol Rep*. 29, 1983-90.
- Johnson,G.L. Nakamura,K. (2007). The c-Jun Kinase/Stress-activated Pathway: Regulation, Function and Role in Human Disease. *Biochim Biophys Acta*. 1773, 1341–1348.
- Jost,P.J., Grabow,S., Gray,D., McKenzie,M.D., Nachbur,U., Huang,D.C., Bouillet,P., Thomas,H.E., Borner,C., Silke,J., Strasser,A., Kaufmann,T. (2009). XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature*. 460, 1035-9.
- Jung,D.H., Park,H.J., Byun,H.E., Park,Y.M., Kim,T.W., Kim,B.O., Um,S.H., Pyo,S. (2010). Diosgenin inhibits macrophage-derived inflammatory mediators through downregulation of CK2, JNK, NF-kappaB and AP-1 activation. *Int Immunopharmacol*. 10, 1047-54.
- Jurewicz,A., Matysiak,M., Andrzejak,S., Selmaj,K. (2006). TRAIL-induced death of human adult oligodendrocytes is mediated by JNK pathway. *Glia*. 53, 158-66.
- Kadowaki,H., Nishitoh,H. (2013). Signaling Pathways from the Endoplasmic Reticulum and Their Roles in Disease. *Genes (Basel)*. 4, 306–333.
- Kandel,E.R., Schwartz,J.H., Jessel,T.M. (2000). Principles of Neural Science. Ed: McGraw-Hill Companies Inc. London.
- Kang,J-H. (2014). Protein Kinase C (PKC) Isozymes and Cancer. *New Journal of Science*. Vol 2014. Art. ID 231418, 36 pages.

Bibliografia

- Kang,N.I., Yoon,H.Y., Kim,H.A., Kim,K.J., Han,M.K., Lee,Y.R., Hwang,P.H., Soh,B.Y., Shin,S.J., Im,S.Y., Lee,H.K. (2011). Protein kinase CK2/PTEN pathway plays a key role in platelet-activating factor-mediated murine anaphylactic shock. *J Immunol.* 186, 6625-32.
- Kantari,C., Walczak,H. (2011). Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1813, 558-63.
- Kanwar,J.R., Kanwar,R.K., Krissansen,G.W. (2004). Simultaneous neuroprotection and blockade of inflammation reverses autoimmune encephalomyelitis. *Brain.* 127, 1313–1331.
- Káradóttir,R., Cavelier,P., Bergersen,L., Atwel,D. (2005). NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischemia. *Nature.* 438, 1162-1166.
- Karmarkar,S.W., Bottum,K.M., Krager,S.L., Tischkau,S.A. (2011). ERK/MAPK Is Essential for Endogenous Neuroprotection in SCN2.2 Cells *PLoS One.* 6:e23493.
- Kataoka,T. (2005). The caspase-8 modulator c-FLIP. *Crit Rev Immunol.* 2005. 25, 31-58.
- Kato,T. Jr, Delhase,M., Hoffmann,A., Karin,M. (2003). CK2 Is a C-Terminal I κ B Kinase Responsible for NF- κ B Activation during the UV Response. *Mol Cell.* 12, 829-39.
- Kaufmann,T., Strasser,A., Jost,P.J. (2012). Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death Differ.* 19, 42-50.
- Keller,D.M., Zeng,X., Wang,Y., Zhang,Q.H., Kapoor,M., Shu,H., Goodman,R., Lozano,G., Zhao,Y., Lu,H. (2001). A DNA damage-induced p53 serine 392 kinase complex contains CK2, hSpt16, and SSRP1. *Mol Cell.* 7, 283-92.
- Keller,D.M., Lu,H. (2002). p53 serine 392 phosphorylation increases after UV through induction of the assembly of the CK2.hSPT16.SSRP1 complex. *J Biol Chem.* 277, 50206-13.
- Khoo,K.H., Verma,C.S., Lane,D.P. (2014). Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy. *Nat Rev Drug Discov.* 13, 217-36.
- Kim,A.H., Khursigara,G., Sun,X., Franke,T.F., Chao,M.V. (2001). Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol.* 21, 893-901.
- Kim,B.J., Ryu,S.W., Song,B.J. (2006). JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J Biol Chem.* 281, 21256-65.
- Kim,H., Tu, H.C., Takeuchi,O., Jeffers,J.R., Zambetti,G.P., Hsieh,J.J., Cheng,E.H. (2009). Stepwise activation of Bax and Bak by t-bid, BIM and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol Cell.* 36, 487-99.
- Kim,S.Y., Kim,T.J., Lee,K.Y. (2008). A novel function of peroxiredoxin 1 (Prx-1) in apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-mediated signaling pathway. *FEBS Lett.* 582, 1913-8.
- Kim,Y.H., Kim,Y.S., Park,C.H., Chung,I.Y., Yoo,J.M., Kim,J.G., Lee,B.J., Kang,S.S., Cho,G.J., Choi,W.S. (2008). Protein kinase C-delta mediates neuronal apoptosis in the retinas of diabetic rats via the Akt signaling pathway. *Diabetes.* 57, 2181-90.

Bibliografia

Köhler,B., Anguissola,S., Concannon,C.G., Rehm,M., Kögel,D., Prehn,J.H. (2008). Bid participates in genotoxic drug-induced apoptosis of HeLa cells and is essential for death receptor ligands' apoptotic and synergistic effects. *PLoS One*. 3:e2844.

Kruse,J.P., Gu,W.(2009). Modes of p53 Regulation. *Cell*. 137, 609–622.

Kuhlmann,T., Glas,M., zum Bruch,C., Mueller,W., Weber,A., Zipp,F., Bruck,W. (2002). Investigation of bax, bcl-2, bcl-x and p53 gene polymorphisms in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 129, 154-160.

Kumar,H., Kim,I.S., More,S.V., Kim,B.W., Bahk,Y.Y., Choi,D.K. (2013). Gastrodin protects apoptotic dopaminergic neurons in a toxin-induced Parkinson's disease model. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013:514095.

Kuribayashi,K., El-Deiry,W.S. (2008). Regulation of programmed cell death by the p53 pathway. *Adv Exp Med Biol*. 615, 201-21.

Ladiwala,U., Li,H., Antel,J.P., Nalbantoglu,J. (1999). P53 induction by tumour necrosis factor-alpha and involvement of p53 in cell death of human oligodendrocytes. *J Neurochem*. 73, 605-611.

Lakkaraju,A., Dubinsky,J.M., Low,W.C, Rahman,Y.E. (2001). Neurons are protected from excitotoxic death by p53 antisense oligonucleotides delivered in anionic liposomes. *J Biol Chem*. 276, 32000-7.

Larroque-Cardoso,P., Swiader,A., Ingueneau,C., Nègre-Salvayre,A., Elbaz,M., Reyland,M.E., Salvayre,R., Vindis,C. (2013). Role of protein kinase C δ in ER stress and apoptosis induced by oxidized LDL in human vascular smooth muscle cells. *Cell Death Dis*. 4:e520.

Lasfer,M., Davenne,L., Vadrot,N., Alexia,C., Sadjji-Ouatas,Z., Bringuier,A.F., Feldmann,G., Pessayre,D., Reyl-Desmars,F. (2006). Protein kinase PKC delta and c-Abl are required for mitochondrial apoptosis induction by genotoxic stress in the absence of p53, p73 and Fas receptor. *FEBS Lett*. 580, 2547-52.

Lee,J.M., Zipfel,G.J., Choi,D.W. (1999). The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature*. 399, 7–14.

Lee,S.J., Kim,D.C., Choi,B.H., Ha,H., Kim,K.T. (2006). Regulation of p53 by activated protein kinase C-delta during nitric oxide-induced dopaminergic cell death. *J Biol Chem*. 281, 2215-24.

Lei,K., Davis,R.J. (2003). JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100, 2432-7.

Letai,A. (2005). Pharmacological manipulation of Bcl-2 family members to control cell death. *J Clin Invest*. 115, 2648–2655.

Leu,J.I., Dumont,P., Hafey,M., Murphy,M.E., George,D.L. (2004). Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol*. 6, 443-50.

Leuchtmann,E.A., Ratner,A.E., Vijitruth,R., Qu,Y., McDonald,J.W. (2003). AMPA receptors are the major mediators of excitotoxic death in mature oligodendrocytes. *Neurobiol Dis*. 14, 336-48.

Léveillé,F., Soriano,F.X., Papadia,S., Hardingham,G.E. (2009). Excitotoxic insults lead to peroxiredoxin hyperoxidation. *Oxid Med Cell Longev*. 2, 110–113.

Bibliografia

- Li,B., Ishii,T., Tan,C.P., Soh,J.W., Goff,S.P. (2002). Pathways of induction of peroxiredoxin I expression in osteoblasts: roles of p38 mitogen-activated protein kinase and protein kinase C. *J Biol Chem.* 277, 12418-22.
- Li,B., Wang,X., Rasheed,N., Hu,Y., Boast,S., Ishii,T., Nakayama,K., Nakayama,K.I., Goff,S.P. (2004). Distinct roles of c-Abl and Atm in oxidative stress response are mediated by protein kinase C δ . *Genes Dev.* 18, 1824–1837.
- Li,D., Qu,Y., Mao,M., Zhang,X., Li,J., Ferriero,D., Mu,D. (2009). Involvement of the PTEN-AKT-FOXO3a pathway in neuronal apoptosis in developing rat brain after hypoxia-ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 29, 1903-13.
- Li,G., Liu,L., Shan,C., Cheng,Q., Budhraj,A., Zhou,T., Cui,H., Gao,N. (2014). RhoA/ROCK/PTEN signaling is involved in AT-101-mediated apoptosis in human leukemia cells in vitro and in vivo. *Cell Death Dis.* 5:e998.
- Li,H., Zhu,H., Xu,C.J., Yuan,J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 94, 491-501.
- Li,J., Ghiani,C.A., Kim,J.Y., Liu,A., Sandoval,J., DeVellis,J., Casaccia-Bonnel,P. (2008). Inhibition of p53 transcriptional activity: a potential target for future development of therapeutic strategies for primary demyelination. *J Neurosci.* 28, 6118-27.
- Li,L., Sampat,K., Hu,N., Zakari,J., Yuspa,S.H. (2006). Protein kinase C negatively regulates Akt activity and modifies UVC-induced apoptosis in mouse keratinocytes. *J Biol Chem.* 281, 3237-43.
- Li,M., Fang,X., Baker,DJ., Guo,L., Gao,X., Wei,Z., Han,S., van Deursen,JM., Zhanga,P. (2010). The ATM–p53 pathway suppresses aneuploidy-induced tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 14188–14193.
- Li,S., Mealing,G.A., Morley,P., Stys,P.K. (1999). Novel injury mechanism in anoxia and trauma of spinal cord white matter: glutamate release via reverse Na⁺-dependent glutamate transport. *J Neurosci.* 19:RC16.
- Li,S. and Stys,PK. (2000) Mechanisms of ionotropic glutamate receptor mediated excitotoxicity in isolated spinal cord white matter. *J Neurosci.* 20, 1190-1198.
- Li,Z., Dong,X., Wang,Z., Liu,W., Deng,N., Ding,Y., Tang,L., Hla,T., Zeng,R., Li,L., Wu,D. (2005). Regulation of PTEN by Rho small GTPases. *Nat Cell Biol.* 7, 399-404.
- Liang,W.Z., Chou,C.T., Hsu,S.S., Liao,W.C., Shieh,P., Kuo,D.H., Tseng,H.W., Kuo,C.C., Jan,C.R. (2014). The involvement of mitochondrial apoptotic pathway in eugenol-induced cell death in human glioblastoma cells. *Toxicol Lett.* 232, 122-132.
- Liao,Y., Hung,M-C. (2010). Physiological regulation of Akt activity and stability. *Am J Transl Res.* 2, 19–42.
- Lima-Fernandes,E., Misticone,S., Boullaran,C., Paradis,J.S., Enslin,H., Roux,P.P., Bouvier,M., Baillie,G.S., Marullo,S., Scott,M.G.H. (2014). A biosensor to monitor dynamic regulation and function of tumour suppressor PTEN in living cells. *Nat Commun.* 5, Article number: 4431.

Bibliografia

- Lin,P.Y., Lee,J.W., Liao,M.H., Hsu,H.Y., Chiu,S.J., Liu,H.J., Shih,W.L. (2009). Modulation of p53 by mitogen-activated protein kinase pathways and protein kinase C delta during avian reovirus S1133-induced apoptosis. *Virology*. 385, 323-34.
- Lipton,S.A., and Rosenberg, P.A. (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J Med*. 330, 613-622.
- Litchfield,D.W. (2003). Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J*. 369, 1-15.
- Liu,C-L., Li,X., Hu,G-L., Li,R-J., He,Y-Y., Zhong,W., Li,S., He,K-L., Wang,L-L. (2012). Salubrinal protects against tunicamycin and hypoxia induced cardiomyocyte apoptosis via the PERK-eIF2 α signaling pathway. *J Geriatr Cardiol*. 9, 258–268.
- Liu,G., Zhao,J., Chang,Z., Guo,G. (2013). CaMKII activates ASK1 to induce apoptosis of spinal astrocytes under oxygen-glucose deprivation. *Cell Mol Neurobiol*. 33, 543-9.
- Liu,H., Giasson,B.I., Mushynski,W.E., Almazan,G. (2002). AMPA receptor-mediated toxicity in oligodendrocyte progenitors involves free radical generation and activation of JNK, calpain and caspase 3. *Journal of Neurochemistry*. 82, 398–409.
- Liu,J., Lin,A. (2005). Role of JNK activation in apoptosis: A double-edged sword. *Cell Research*. 15, 36–42.
- Liu,W., Gu,J., Qi,J., Zeng,X-N., Ji,J., Chen,Z-Z., Sun,X-L. (2015). Lentinan exerts synergistic apoptotic effects with paclitaxel in A549 cells via activating ROS-TXNIP-NLRP3 inflammasome. *J Cell Mol Med*. 19, 1949–1955.
- Lomonaco,S.L., Kahana,S., Blass,M., Brody,Y., Okhrimenko,H., Xiang,C., Finniss,S., Blumberg,P.M., Lee,H.K., Brodie,C. (2008). Phosphorylation of protein kinase Cdelta on distinct tyrosine residues induces sustained activation of Erk1/2 via down-regulation of MKP-1: role in the apoptotic effect of etoposide. *J Biol Chem*. 283, 17731-9.
- Lonze,B.E., Gint,D.D. (2002). Function and Regulation of CREB Family Transcription Factors in the Nervous System. *Neuron*. 35, 605–623.
- Loughery,J., Meek,D. (2013). Switching on p53: an essential role for protein phosphorylation?. *BioDiscovery*.
- Lowell,J.F., Billen,L.P., Bindner,S., Shamas-Din,A., Fradin,C., Leber,B., Andrews,D.W. (2008). Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell*. 135, 1074-84.
- Lu,S., Lu,C., Han,Q., Li,J., Du,Z., Liao,L., Zhao,R.C. (2011). Adipose-derived mesenchymal stem cells protect PC12 cells from glutamate excitotoxicity-induced apoptosis by upregulation of XIAP through PI3-K/Akt activation. *Toxicology*. 279, 189-95.
- Lu,Z., Xu,S. (2006). ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life*. 58, 621-31.
- Lucas,D.R., and Newhouse,J.P (1957). The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA. Arch Ophthalmol*. 58, 193-201.

Bibliografia

- Lutterotti,A., Yousef,S., Sputtek,A., Stürner,K.H., Stellmann,J.P., Breiden,P., Reinhardt,S., Schulze,C., Bester,M., Heesen,C., Schippling,S., Miller,S.D., Sospedra,M., Martin,R. (2013). Antigen-specific tolerance by autologous myelin peptide-coupled cells: a phase 1 trial in multiple sclerosis. *Sci Transl Med.* 5:188ra75.
- Maccario,H., Perera,N.M., Davidson,L., Downes,C.P., Leslie,N.R. (2007). PTEN is destabilized by phosphorylation on Thr366. *Biochem J.* 405, 439-44.
- Manni,S., Brancalion,A., Tubi,L.Q., Colpo,A., Pavan,L., Cabrelle,A., Ave,E., Zaffino,F., Di Maira,G., Ruzzene,M., Adami,F., Zambello,R., Pitari,M.R., Tassone,P., Pinna,L.A., Gurrieri,C., Semenzato,G., Piazza,F. (2012). Protein kinase CK2 protects multiple myeloma cells from ER stress-induced apoptosis and from the cytotoxic effect of HSP90 inhibition through regulation of the unfolded pro-te-in response. *Clin Cancer Res.* 18, 1888-1900.
- Manning,B.D., Cantley,L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 129, 1261-74.
- Marchenko,N.D., Zaika,A., Moll,U.M. (2000). Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem.* 275, 16202-12.
- Marchenko,N.D., Moll,U.M. (2014). Mitochondrial death functions of p53. *Mol Cell Oncol.* 1: e955995.
- Marciniak,S.J., Ron,D. (2006). Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol. Rev.* 86, 1133-1149.
- Marini,E.S., Giampietri,C., Petrungaro,S., Conti,S., Filippini,A., Scorrano,L., Ziparo,E. (2015). The endogenous caspase-8 inhibitor c-FLIPL regulates ER morphology and crosstalk with mitochondria. *Cell Death Differ.* 22, 1131-43.
- Markou,T., Dowling,A.A., Kelly,T., Lazou,A. (2009). Regulation of Bcl-2 phosphorylation in response to oxidative stress in cardiac myocytes. *Free Radic Res.* 43, 809-16.
- Martín-Pérez,R., Niwa,M., López-Rivas,A. (2012). ER stress sensitizes cells to TRAIL through down-regulation of FLIP and Mcl-1 and PERK-dependent up-regulation of TRAIL-R2. *Apoptosis.* 17, 349-63.
- Martínez-Hoyer,S., Aranguren-Ibáñez,A., García-García,J., Serrano-Candelas,E., Vilardell,J., Nunes,V., Aguado,F., Oliva,B., Itarte,E., Pérez-Riba,M. (2013). Protein kinase CK2-dependent phosphorylation of the human Regulators of Calcineurin reveals a novel mechanism regulating the calcineurin-NFATc signaling pathway. *Biochim Biophys Acta.* 1833, 2311-21.
- Martini,M., De Santis,M.C., Braccini,L., Gulluni,F., Hirsch,E. (2014). PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Ann Med.* 46, 372-83.
- Martins,L.R., Lúcio,P., Silva,M.C., Anderes,K.L., Gameiro,P., Silva,M.G., Barata,J.T. (2010). Targeting CK2 overexpression and hyperactivation as a novel therapeutic tool in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 116, 2724-31.
- Matsuzawa,A., Saegusa,K., Noguchi,T., Sadamitsu,C., Nishitoh,H., Nagai,S., Koyasu,S., Matsumoto,K., Takeda,K., Ichijo,H. (2005). ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat Immunol.* 6, 587-92.

Bibliografía

- Matute,C., Sánchez Gómez,M.V., Martínez-Millan,L., and Miledi,R. (1997). Glutamate receptor-mediated toxicity in optic nerve oligodendrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8830-8835.
- Matute,C. (1998). Properties of acute and chronic kainite excitotoxic damage to the optic nerve. *Proc. Natl. acad. Sci. USA*. 95, 10229-10234.
- Matute,C., Alberdi,E., Domercq,M., Pérez-Cerdá,F., Pérez-Samartín,A., Sánchez-Gómez,M.V. (2001). The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases. *Trends Neurosci.* 24, 224-230.
- Matute,C., Domercq,M., Sánchez-Gómez,M.V. (2006). Glutamate-mediated glial injury: mechanisms and clinical importance. *Glia.* 53, 212-224.
- Mauro,L.V., Grossoni,V.C., Urtreger,A.J., Yang,C., Colombo,L.L., Morandi,A., Pallotta,M.G., Kazanietz,M.G., Bal de Kier Joffé,E.D., Puricelli,L.L. (2010). PKC Delta (PKCdelta) promotes tumoral progression of human ductal pancreatic cancer. *Pancreas.* 39:e31-41.
- Mayer, M.L. (2005). Glutamate receptor ion channels. *Curr Opin Neurobiol.* 3, 282-288.
- McCarthy,K.D., de Vellis,J. (1980). Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol.* 85, 890-902.
- McDonald,J.W., Althomsons,S.P., Hyrc,K.L., Choi,D.W., Goldberg,M.P. (1998). Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated excitotoxicity. *Nat Med.* 4, 291-7.
- Meggio,F., Pinna,L.A. (2003). One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J.* 17, 349-68.
- Mei,W., Peng,Z., Lu,M., Liu,C., Deng,Z., Xiao,Y., Liu,J., He,Y., Yuan,Q., Yuan,X., Tang,D., Yang,H., Tao,L. (2015). Peroxiredoxin 1 inhibits the oxidative stress induced apoptosis in renal tubulointerstitial fibrosis. *Nephrology (Carlton).* 20, 832-42.
- Melo,C.V., Okumoto,S., Gomes,J.R., Baptista,M.S., Bahr,B.A., Frommer,W.B., Duarte,C.B. (2013). Spatiotemporal resolution of BDNF neuroprotection against glutamate excitotoxicity in cultured hippocampal neurons. *Neuroscience.* 237, 66-86.
- Mendoza,M-V., Emrah Er,E., Blenis,J. (2011). The Ras-ERK and PI3K-mTOR Pathways: Cross-talk and Compensation. *Trends Biochem Sci.* 36, 320–328.
- Merksamer,P.I., Feroz R.P. (2010). The UPR and cell fate at a glance. *J Cell Sci.* 123, 1003–1006.
- Michaelis,E.K. (1998). Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog. Neurobiol.* 54, 369-415.
- Micu,I., Jiang,Q., Coderre,E., Ridsale,A., Zhang,L., Woulfe,J., Yin,X., Trapp,B.D., McRory,J.E., Rehak,R., Zamponi,G.H., Wang,W., Stys,P.K. (2006). NMDA receptors mediate calcium accumulation in myelin during chemical ischemia. *Nature.* 439, 988-992.
- Mihara,M., Erster,S., Zaika,A., Petrenko,O., Chittenden,T., Pancoska,P., Moll,U.M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell.* 11, 577-90.

Bibliografia

- Milella, M., Falcone, I., Conciatori, F., Cesta Incani, U., Del Curatolo, A., Inzerilli, N., Nuzzo, C.M., Vaccaro, V., Vari, S., Cognetti, F., Ciuffreda, L. (2015). PTEN: Multiple Functions in Human Malignant Tumors. *Front Oncol.* 5:24.
- Min, Y.K., Park, J.H., Chong, S.A., Kim, Y.S., Ahn, Y.S., Seo, J.T., Bae, Y.S., Chung, K.C. (2003). Pyrrolidine dithiocarbamate-induced neuronal cell death is mediated by Akt, casein kinase 2, c-Jun N-terminal kinase, and I κ B kinase in embryonic hippocampal progenitor cells. *J Neurosci Res.* 71, 689-700.
- Molina-Holgado, E., Vela, J.M., Arévalo-Martín, A., Almazán, G., Molina-Holgado, F., Borrell, J., Guaza, C. (2002). Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J Neurosci.* 22, 9742-53.
- Moll, U.M., Petrenko, O. (2003). The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res.* 1, 1001-8.
- Moll, U.M., Wolff, S., Speidel, D., Deppert, W. (2005). Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol.* 17, 631-6.
- Moll, U.M., Marchenko, N., Zhang, X.K. (2006). p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction. *Oncogene.* 25, 4725-43.
- Molz, S., Decker, H., Dal-Cim, T., Cremonez, C., Cordova, F.M., Leal, R.B., Tasca, C.I. (2008). Glutamate-induced toxicity in hippocampal slices involves apoptotic features and p38 MAPK signaling. *Neurochem Res.* 33, 27-36.
- Muscella, A., Urso, L., Calabriso, N., Vetrugno, C., Rochira, A., Storelli, C., Marsigliante, S. (2009). Anti-apoptotic effects of protein kinase C-delta and c-fos in cisplatin-treated thyroid cells. *Br J Pharmacol.* 156, 751-63.
- Nadeau, P.J., Charette, S.J., Toledano, M.B., Landry, J. Disulfide Bond-mediated Multimerization of Ask1 and Its Reduction by Thioredoxin-1 Regulate H₂O₂-induced c-Jun NH₂-terminal Kinase Activation and Apoptosis. *Mol Biol Cell.* 18, 3903–3913.
- Nag, S., Qin, J., Srivenugopal, K.S., Wang, M.H., Zhang, R. (2013). The MDM2-p53 pathway revisited. *J Biomed Res.* 27, 254–271.
- Nag, S., Zhang, X., Srivenugopal, K.S., Wang, M.H., Wang, W., Zhang, R. (2014). Targeting MDM2-p53 interaction for cancer therapy: are we there yet?. *Curr Med Chem.* 21, 553-74.
- Nakahata, S., Ichikawa, T., Maneesaay, P., Saito, Y., Nagai, K., Tamura, T., Manachai, N., Yamakawa, N., Hamasaki, M., Kitabayashi, I., Arai, Y., Kanai, Y., Taki, T., Abe, T., Kiyonari, H., Shimoda, K., Ohshima, K., Horii A., Shima, H., Taniwaki, M., Yamaguchi, R., Morishita, K. (2014). Loss of NDRG2 expression activates PI3K-AKT signalling via PTEN phosphorylation in ATLL and other cancers. *Nat Commun.* 5:3393.
- Ness, J.K., Scaduto, R.C. Jr, Wood, T.L. (2004). IGF-I prevents glutamate-mediated bax translocation and cytochrome C release in O4+ oligodendrocyte progenitors. *Glia.* 46, 183-94.
- Niemi, N.M., MacKeigan, J.P. (2013). Mitochondrial phosphorylation in apoptosis: flipping the death switch. *Antioxid Redox Signal.* 19, 572-82.

Bibliografia

- Nieminen,A.I., Eskelinen,V.M., Haikala,H.M., Tervonen,T.A., Yan,Y, Partanen,J.I., Klefström,J. (2013). Myc-induced AMPK-phospho p53 pathway activates Bak to sensitize mitochondrial apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:e1839-48.
- Nijboer,C., Heijnen,C.J., van der Kooij,M.A., Zijlstra,J., van Velthoven,C.T., Culmsee,C., van Bel,F., Hagberg,H., Kavelaars,A. (2011). Targeting the p53 pathway to protect the neonatal ischemic brain. *Ann Neurol*. 70, 255-64.
- Nishitoh,H., Matsuzawa,A., Tobiume,K., Saegusa,K., Takeda,K., Inoue,K., Hori,S., Kakizuka,A., Ichijo,H. (2002). ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev*. 16, 1345-55.
- Nishiyama,A., Masutani,H., Nakamura,H., Nishinaka,Y., Yodoi,J. (2001). Redox regulation by thioredoxin and thioredoxin-binding proteins. *IUBMB Life*. 52, 29-33.
- Noda,M., Nakanishi,H., Akaike,N. (1999). Glutamate release from microglia via glutamate transporter is enhanced by amyloidbeta peptide. *Neuroscience*. 92, 1465–1474.
- Noguchi,T., Takeda,K., Matsuzawa,A., Saegusa,K., Nakano,H., Gohda,J., Inoue,J., Ichijo,H. (2005). Recruitment of tumor necrosis factor receptor-associated factor family proteins to apoptosis signal-regulating kinase 1 signalosome is essential for oxidative stress-induced cell death. *J Biol Chem*. 280, 37033-40.
- Nomura,K., Lee,M., Banks,C., Lee,G., Morris,B.J. (2013). An ASK1-p38 signalling pathway mediates hydrogen peroxide-induced toxicity in NG108-15 neuronal cells. *Neurosci Lett*. 549, 163-7.
- Odriozola,L., Singh,G., Hoang,T., Chan,A.M. (2007). Regulation of PTEN activity by its carboxyl-terminal autoinhibitory domain. *J Biol Chem*. 282, 23306-15.
- Oka,A., Belliveau,M.J., Rosenberg,P.A., Volpe,J.J. (1993). Vulnerability of oligodendroglia to glutamate: pharmacology, mechanisms, and prevention. *J Neurosci*. 13, 1441-53.
- Okahara,F., Itoh,K., Nakagawara,A., Murakami,M., Kanaho,Y., Maehama,T. (2006). Critical role of PICT-1, a tumor suppressor candidate, in phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate signals and tumorigenic transformation. *Mol Biol Cell*. 17, 4888-95.
- Okumura,K., Mendoza,M., Bachoo,R.M., DePinho,R.A., Cavenee,W.K., Furnari,F.B. (2006). PCAF modulates PTEN activity. *J Biol Chem*. 281, 26562-8.
- Ola,M.S., Nawaz,M., Ahsan,H. (2011). Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem*. 351, 41-58.
- Olney,J.W., and Sharpe,L.G. (1969). Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science* 166, 386-388.
- Olsen,.B.B., Petersen,J., Issinger,O.G. (2006). BID, an interaction partner of protein kinase CK2alpha. *Biol Chem*. 387, 441-9.
- Olsten,M.E., Litchfield,D.W. (2004). Order or chaos? An evaluation of the regulation of protein kinase CK2. *Biochem Cell Biol*. 82, 681-93.

Bibliografía

- Olsten,M.E., Weber,J.E., Litchfield,D.W. (2005). CK2 interacting proteins: emerging paradigms for CK2 regulation?. *Mol Cell Biochem.* 274, 115-24.
- Ortega,C.E, Seidner,Y., Dominguez,I. (2014). Mining CK2 in Cancer. *PLoS One.* 26:e115609.
- Ortega,F., Pérez-Sen,R., Delicado,E.G., Teresa,M-P.M. (2011). ERK1/2 activation is involved in the neuroprotective action of P2Y13 and P2X7 receptors against glutamate excitotoxicity in cerebellar granule neurons. *Neuropharmacol.* 61, 1210–1221.
- Owens,T.W., Valentijn,A.J., Upton,J-P., Keeble,J., Zhang,L., Lindsay,J., Zouq,N.K., Gilmore,A.P. (2009). Apoptosis commitment and activation of mitochondrial Bax during anoikis is regulated by p38MAPK. *Cell Death Differ.* 16, 1551–1562.
- Paintlia,M.K., Paintlia,A.S., Singh,A.K., Singh,I. (2011). Synergistic activity of interleukin-17 and tumor necrosis factor- α enhances oxidative stress-mediated oligodendrocyte apoptosis. *J Neurochem.* 116, 508-21.
- Palit,S., Kar,S., Sharma,G., Das,P.K. (2015). Hesperetin Induces Apoptosis in Breast Carcinoma by Triggering Accumulation of ROS and Activation of ASK1/JNK Pathway. *J Cell Physiol.* 230, 1729-39.
- Pang,Y., Zheng,B., Fan,L.W., Rhodes,P.G., Cai,Z. (2007). IGF-1 protects oligodendrocyte progenitors against TNF α -induced damage by activation of PI3K/Akt and interruption of the mitochondrial apoptotic pathway. *Glia.* 55, 1099-107.
- Pant,V., Xiong,S., Jackson,J.G., Post,S.M., Abbas,H.A., Quintás-Cardama,A., Hamir,A.N., Lozano,G. (2013). The p53-Mdm2 feedback loop protects against DNA damage by inhibiting p53 activity but is dispensable for p53 stability, development, and longevity. *Genes Dev.* 27, 1857-67.
- Park,B.S., Song,Y.S., Yee,S.B., Lee,B.G., Seo,S.Y., Park,Y.C., Kim,J.M., Kim,H.M., Yoo,Y.H. (2005). Phosphoser 15-p53 translocates into mitochondria and interacts with Bcl-2 and Bcl-xL in eugenol-induced apoptosis. *Apoptosis.* 10, 193-200.
- Park,E.M., Cho,S. (2006). Enhanced ERK dependent CREB activation reduces apoptosis in staurosporine-treated human neuroblastoma SK-N-BE(2)C cells. *Neurosci Lett.* 402, 190-4.
- Park,H.S., Kim,M.S., Huh,S.H., Park,J., Chung,J., Kang,S.S., Choi,E.J. (2002). Akt (protein kinase B) negatively regulates SEK1 by means of protein phosphorylation. *J Biol Chem.* 277, 2573-8.
- Park,J.H., Jin,C.Y., Lee,B.K., Kim,G.Y., Choi,Y.H., Yeong,Y.K. (2009). Naringenin induces apoptosis through downregulation of AKT and caspase-3 activation in human leukemia THP-1 cells. *Food Chem Toxicol.* 46,3684-90.
- Partin,K.M., Patneau,D.K., Winters,C.A., Mayer,M.L., Buonanno,A. (1993). Selective modulation of desensitization at AMPA versus kainite receptors by cyclothiazide and concavalin A. *Neuron.* 11, 1069-1082.
- Parrish,A.B., Freel,C.D., Kornbluth,S. (2013). Cellular Mechanisms Controlling Caspase Activation and Function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 5
- Patsoukis,N., Li,L., Sari,L., Petkova,V., Boussiotis,V.A. (2013). PD-1 Increases PTEN Phosphatase Activity While Decreasing PTEN Protein Stability by Inhibiting Casein Kinase 2. *Mol Cell Biol.* 33, 3091–3098.

Bibliografia

- Perfettini,J-C., Castedo,M., Nardacci,R., Ciccocanti,F., Boya,P., Roumier,T., Larochette,N., Piacentini,M., Kroemer,G. (2005). Essential role of p53 phosphorylation by p38 MAPK in apoptosis induction by the HIV-1 envelope. *J Exp Med.* 201, 279–289.
- Persaud,S.D., Hoang,V., Huang,J., Basu,A. (2005). Involvement of proteolytic activation of PKCdelta in cisplatin-induced apoptosis in human small cell lung cancer H69 cells. *Int J Oncol.* 27, 149-54.
- Petersen,O.H., Petersen,C.C., Kasai,H. (1994). Calcium and hormone action. *Annu. Rev. Physiol.* 56, 297-319.
- Pietsch,E.C., Perchiniak,E., Canutescu,A.A., Wang,G., Dunbrack,R.L., Murphy,M.E. (2008). Oligomerization of BAK by p53 utilizes conserved residues of the p53 DNA binding domain. *J Biol Chem.* 283, 21294-304.
- Pitt,D., Werner,O., Raine,C.S. (2000). Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat Med.* 6, 67-70.
- Pitt,D., Nagelmeier,I.E., Wilson,H.C., Raine,C.S. (2003). Glutamate uptake by oligodendrocytes: implications for excitotoxicity in multiple sclerosis. *Neurology.* 61, 1113–1120.
- Poli,A., Mongiorgi,S., Cocco,L., Follo,M.Y. (2014). Protein kinase C involvement in cell cycle modulation. *Biochem Soc Trans.* 42, 1471-6.
- Ponce, D.P., Yefi,R., Cabello,P., Maturana,J.L., Niechi,I., Silva,E., Galindo,M., Antonelli,M., Marcelain,K., Armisen,R., Tapia,J.C. (2011) CK2 functionally interacts with AKT/PKB to promote the β -catenin-dependent expression of survivin and enhance cell survival. *Mol Cell Biochem.* 356, 127-32.
- Porras,A., Zuluaga,S., Black,E., Valladares,A., Alvarez, A.M., Ambrosino,C., Benito,M., Nebreda,A.R. (2004). p38 α Mitogen-activated Protein Kinase Sensitizes Cells to Apoptosis Induced by Different Stimuli. *Mol Biol Cell.* 15, 922–933.
- Prasad,S., Madan,E., Nigam,N., Roy,P., George,J., Shukla,Y. (2009). Induction of apoptosis by lupeol in human epidermoid carcinoma A431 cells through regulation of mitochondrial, Akt/PKB and NFkappaB signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* 8, 1632-9.
- Qaiser,F., Trembley,J.H.,Kren,B.T., Wu,J-J., Naveed,A.K., Ahmed,K. (2014). Protein Kinase CK2 Inhibition Induces Cell Death via Early Impact on Mitochondrial Function. *J Cell Biochem.* 115, 2103–2115.
- Qi,X., Mochly-Rosen,D. (2008). The PKCdelta -Abl complex communicates ER stress to the mitochondria - an essential step in subsequent apoptosis. *J Cell Sci.* 121, 804-13.
- Raff,M.C., Miller,R.H., Noble,M. (1983). A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature.* 303, 390-6.
- Rahdar,M., Inoue,T., Meyer,T., Zhang,J., Vazquez,F., Devreotes,P.N. (2009). A phosphorylation-dependent intramolecular interaction regulates the membrane association and activity of the tumor suppressor PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 480-5.
- Ren,D., Tu,H.C., Kim,H., Wang,G.X., Bean,G.R., Takeuchi,O., Jeffers,J.R., Zambetti,G.P., Hsieh,J.J., Cheng,E.H. (2010). BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program. *Science.* 330, 1390-3.

- Reyland, M.E. (2007). Protein kinase C δ and apoptosis. *Biochem Soc Trans.* 35, 1001-4.
- Reyland, M.E. (2009). Protein kinase C isoforms: Multi-functional regulators of cell life and death. (2009). *Front Biosci (Landmark Ed).* 14, 2386-99.
- Rivera-Cervantes, M.C., Castañeda-Arellano, R., Castro-Torres, R.D., Gudiño-Cabrera, G., Feria y Velasco, A.I., Camins, A., Beas-Zárate, C. (2015). P38 MAPK inhibition protects against glutamate neurotoxicity and modifies NMDA and AMPA receptor subunit expression. *J Mol Neurosci.* 55, 596-608.
- Rizzuto, R., Marchi, S., Bonora, M., Aguiari, P., Bononi, A., De, S.D., Giorgi, C., Leo, S., Rimessi, A., Siviero, R., Zecchini, E., Pinton, P. (2009). Ca²⁺ transfer from ER to mitochondria: When, how and why. *Biochim. Biophys. Acta.*
- Rosin, C., Bates, T.E., Skaper, S.D. (2004). Excitatory amino acid induced oligodendrocyte cell death in vitro: receptor-dependent and -independent mechanisms. *J Neurochem.* 90, 1173-85.
- Ruiz, A., Matute, C., Alberdi, E. (2009). Endoplasmic reticulum Ca(2+) release through ryanodine and IP(3) receptors contributes to neuronal excitotoxicity. *Cell Calcium.* 46, 273-81.
- Ruiz, A., Matute, C., Alberdi, E. (2010). Intracellular Ca²⁺ release through ryanodine receptors contributes to AMPA receptor-mediated mitochondrial dysfunction and ER stress in oligodendrocytes. *Cell Death Dis.* 1:e54.
- Rutkowski, D.T., Kaufman, R.J. (2004). A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol.* 14, 20-8.
- Ruzzene, M., Pinna, L.A. (2010). Addiction to protein kinase CK2: a common denominator of diverse cancer cells?. *Biochim Biophys Acta.* 1804, 499-504.
- Rybin, V.O., Guo, J., Sabri, A., Elouardighi, H., Schaefer, E., Steinberg, S.F. (2004). Stimulus-specific differences in protein kinase C delta localization and activation mechanisms in cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 279, 19350-61.
- Safa, A.R. (2012). c-FLIP, a master anti-apoptotic regulator. *Exp Oncol.* 34, 176-84.
- Saha, M.N., Jiang, H., Yang, Y., Zhu, X., Wang, X., Schimmer, A.D., Qiu, L., Chang, H. (2012). Targeting p53 via JNK pathway: a novel role of RITA for apoptotic signaling in multiple myeloma. *PLoS One.* 7:e30215.
- Sakamaki, K., Iwabuchi, N., Iwata, H., Imada, K., Takagi, C., Chiba, K., Shukunamif, C., Tomiid, K., Ueno, N. (2015). Conservation of structure and function in vertebrate c-FLIP proteins despite rapid evolutionary change. *Biochem Biophys Res.* 3, 175-189.
- Saleem, A., Adhikari, P.J., Hood, D.A. (2009). Role of p53 in mitochondrial biogenesis and apoptosis in skeletal muscle. *Physiological Genomics.* 37, 58-66.
- Saleem, A., Hood, D.A. (2013). Acute exercise induces tumour suppressor protein p53 translocation to the mitochondria and promotes a p53-Tfam-mitochondrial DNA complex in skeletal muscle. *Physiol.* 591, 3625-3636.
- Salter, M.G., Fern, R. (2005). NMDA receptors are expressed in developing oligodendrocyte processes and mediate injury. *Nature.* 438, 1167-1171.

- Salvi,M., Sarno,S., Cesaro,L., Nakamura,H., Pinna,L.A. (2009). Extraordinary pleiotropy of protein kinase CK2 revealed by weblogo phosphoproteome analysis. *Biochim Biophys Acta.* 1793, 847-59.
- Sánchez-Gómez,M.V., and Matute,C. (1999). AMPA and kainate receptors each mediate excitotoxicity in oligodendroglial cultures. *Neurobiol. Dis.* 6, 475-485.
- Sánchez-Gómez,M.V., Alberdi,E., Ibarretxe,G., Torre,I., Matute,C. (2003). Caspase-dependent and caspase-independent oligodendrocyte death mediated by AMPA and kainate receptors. *J Neurosci.* 23, 9519-9528.
- Sánchez-Gómez,M.V., Alberdi,E., Pérez-Navarro,E., Alberch,J., Matute,C. (2011). Bax and Calpain Mediate Excitotoxic Oligodendrocyte Death Induced by Activation of Both AMPA and Kainate Receptors. *J Neurosci.* 31, 2996-3006.
- Sarbassov,D.D., Ali,S.M., Kim,D.H., Guertin,D.A., Latek,R.R., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., Sabatini,D.M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol.* 14, 1296-302.
- Sarker,K.P., Biswas,K.K., Yamakuchi,M., Lee,K.Y., Hahiguchi,T., Kracht,M., Kitajima,I., Maruyama,I. (2003). ASK1-p38 MAPK/JNK signaling cascade mediates anandamide-induced PC12 cell death. *J Neurochem.* 85, 50-61.
- Sayed,M., Kim,S.O., Salh,B.S., Issinger,O.G., Pelech,S.L. (2000). Stress-induced activation of protein kinase CK2 by direct interaction with p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 275, 16569-73.
- Sayed,M., Pelech,S., Wong,C., Marotta,A., Salh,B. (2001). Protein kinase CK2 is involved in G2 arrest and apoptosis following spindle damage in epithelial cells. *Oncogene.* 20, 6994-7005.
- Scaglioni,P.P., Yung,T.M., Cai,L.F., Erdjument-Bromage,H., Kaufman,A.J., Singh,B., Teruya-Feldstein,J., Tempst,P., Pandolfi,P.P. (2006). A CK2-dependent mechanism for degradation of the PML tumor suppressor. *Cell.* 126, 269-83.
- Schug,Z.T., Gonzalez,F., Houtkooper,R.H., Vaz,F.M., Gottlieb,E. (2011). BID is cleaved by caspase-8 within a native complex on the mitochondrial membrane. *Cell Death Differ.* 18, 538-48.
- Schuler,M., Green,D.R. (2005). Transcription, apoptosis and p53: catch-22. *Trends Genet.* 21, 182-7.
- Shah,S.A., Lee,H.Y., Bressan,R.A., Yun,D.J., Kim,M.O. (2014). Novel osmotin attenuates glutamate-induced synaptic dysfunction and neurodegeneration via the JNK/PI3K/Akt pathway in postnatal rat brain. *Cell Death Dis.* 5:e1026.
- Shamas-Din,A., Brahmabhatt,H., Leber,B., Andrews,D.W. (2011). BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 1813, 508-20.
- Sheardown,M.J., Nielsen,E.O., Hansen,A.J., Jacobsen,P., Honore,T. (1990). 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)quinoxaline: a neuroprotectant for cerebral ischemia. *Science.* 247, 571-574.

Bibliografia

- Shelton,S.N., Shawgo,M.E., Robertson,J.D. (2009). Cleavage of Bid by executioner caspases mediates feed forward amplification of mitochondrial outer membrane permeabilization during genotoxic stress-induced apoptosis in Jurkat cells. *J Biol Chem.* 284, 11247-55.
- Shi,D., Gu,W. (2012). Dual Roles of MDM2 in the Regulation of p53. Ubiquitination Dependent and Ubiquitination Independent Mechanisms of MDM2 Repression of p53 Activity. *Genes Cancer.* 3, 240–248.
- Shi,Y., Nikulenkov,F., Zawacka-Pankau,J., Li,H., Gabdoulline,R., Xu,J., Eriksson,S., Hedström,E., Issaeva,N., Kel,A., Arnér,E.S.J., Selivanova,G. (2014). ROS-dependent activation of JNK converts p53 into an efficient inhibitor of oncogenes leading to robust apoptosis. *Cell Death Differ.* 21, 612–623.
- Silva,A., Yunes,J.A., Cardoso,B.A., Martins,L.R., Jotta,P.Y., Abecasis,M., Nowill,A.E., Leslie,N.R., Cardoso,A.A., Barata,J.T. (2008). PTEN posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability. *J Clin Invest.* 118, 3762-74.
- Simmen,T., Aslan,J.E., Blagoveshchenskaya,A.D., Thomas,L., Wan,L., Xiang,Y., Feliciangeli,S.F., Hung,C.H., Crump,C.M., Thomas,G. (2005). PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis. *EMBO J.* 24, 717-29.
- Simonishvili,S., Jain,M.R., Li,H., Levison,S.W., Wood,T.L. (2013). Identification of Bax-interacting proteins in oligodendrocyte progenitors during glutamate excitotoxicity and perinatal hypoxia–ischemia. *ASN Neuro.* 5(5): e00131.
- Singh,N.N., Ramji,D.P. (2008). Protein kinase CK2, an important regulator of the inflammatory response? *J Mol Med (Berl).* 86, 887-97.
- Sitailo,L.A., Tibudan,S.S., Denning,M.F. (2006). The protein kinase C delta catalytic fragment targets Mcl-1 for degradation to trigger apoptosis. *J Biol Chem.* 281, 29703-10.
- Slee,E.A., Adrain,C., Martin,S.J. (1999). Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ.* 6, 1067-74.
- Smith,T., Groom,A., Zhu,B., Tursky,L. (2000) Autoimmune encephalomyelitis ameliorated by AMPA antagonists. *Nat Med.* 6, 62-66.
- Socodato,R.E., Magalhaes,C.R., paes-de-Carvalho,R. (2009). Glutamate and nitric oxide modulate ERK and CREB phosphorylation in the avian retina: evidence for direct signaling from neurons to Müller glial cells. *J Neurochem.* 108, 417-29.
- Soga,M., Matsuzawa,A., Ichijo,H. (2012). Oxidative Stress-Induced Diseases via the ASK1 Signaling Pathway. *International Journal of Cell Biology.* Volume 2012, Article ID 439587, 5 pages.
- Sokka,A.L., Putkonen,N., Mudo,G., Pryazhnikov,E., Reijonen,S., Khiroug,L., Belluardo,N., Lindholm,D., Korhonen,L. (2007). Endoplasmic reticulum stress inhibition protects against excitotoxic neuronal injury in the rat brain. *J Neurosci.* 27, 01-8.
- Solyakov,L., Sayan,E., Riley,J., Pointon,A., Tobin,A.B. (2009). Regulation of p53 expression, phosphorylation and subcellular localization by a G-protein-coupled receptor. *Oncogene.* 28, 3619-30.

- Son,Y., Cheong,Y., Kim,N., Chung,H., Kang,D.G., Pae,H. (2011).Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways?. *Journal of Signal Transduction*. Volume 2011, Article ID 792639, 6 pages.
- Song,J., Cheon,S.Y., Lee,W.T., Park,K.A., Lee,J.E. (2015). The effect of ASK1 on vascular permeability and edema formation in cerebral ischemia. *Brain Res*. 1595, 143-55.
- Sot,B., Freund,S.M., Fersht,A.R. (2007). Comparative biophysical characterization of p53 with the pro-apoptotic BAK and the anti-apoptotic BCL-xL. *J Biol Chem*. 282, 29193-200.
- Srinivasan,R., Sailasuta,N., Hurd,R., Nelson,S., Pelletier,D. (2005). Evidence of elevated glutamate in multiple sclerosis using magnetic resonance spectroscopy at 3 T. *Brain*. 128, 1016–1025.
- Stadelmann,C., Ludwin,S., Tabira,T., Guseo,A., Lucchinetti,C.F., Leel-Ossy,L., Ordinario,A.T., Bruck,W., Lassmann,H. (2005). Tissue preconditioning may explain concentric lesions in Balo’s type of multiple sclerosis. *Brain*. 128, 979-987.
- Stangel,M., Hartung,H.P. (2002). Remyelinating strategies for the treatment of multiple sclerosis. *Prog Neurobiol*. 68, 61-76.
- Stariha,R.L., Kim,S.U. (2001). Mitogen-activated protein kinase signalling in oligodendrocytes: a comparison of primary cultures and CG-4. *Int J Dev Neurosci*. 19, 427-37.
- Steelman,L.S., Chappell,W.H., Abrams,S.L., Kempf,R.C., Long,J., Laidler,P., Mijatovic,S., Maksimovic-Ivanic,D., Stivala,F., Mazzarino,M.C., Donia,M., Fagone,P., Malaponte,G., Nicoletti,F., Libra,M., Milella,M., Tafuri,A., Bonati,A., Bäsecke,J., Cocco,L., Evangelisti,C., Martelli,A.M., Montalto,G., Cervello,M., McCubrey,J.A. (2011). Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY)*. 3, 192-222.
- Steinberg,S.F. (2008). Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev*. 88, 1341-78.
- Steinman L. (2012). The discovery of natalizumab, a potent therapeutic for multiple sclerosis. *J Cell Biol*. 199, 413-6.
- Stover,J.F., Pleines,U.E., Morganti-Kossmann,M.C., Kossmann,T., Lowitzsch,K., Kempfsky,O.S. (1997). Neurotransmitters in cerebrospinal fluid reflect pathological activity. *Eur J Clin Invest*. 27, 1038–1043.
- Strom,E., Sathe,S., Komarov,P.G., Chernova,O.B., Pavlovskaya,I., Shyshynova,I., Borykh,D.A., Burdelya,L.G., Macklis,R.M., Skaliter,R., Komarova,E.A., Gudkov,A.V. (2006). Small-molecule inhibitor of p53 binding to mitochondria protects mice from gamma radiation. *Nat Chem Biol*. 2(9):474-9.
- Suhara,T., Mano,T., Oliveira,B.E., Walsh,K. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling controls endothelial cell sensitivity to Fas-mediated apoptosis via regulation of FLICE-inhibitory protein (FLIP). *Circ Res*. 89, 13-9.
- Sun,F., Kanthasamy,A., Song,C., Yang,Y., Anantharam,V., Kanthasamy,A.G. (2008). Proteasome inhibitor-induced apoptosis is mediated by positive feedback amplification of PKCdelta proteolytic activation and mitochondrial translocation. *J Cell Mol Med*. 12, 2467-81.

- Tabas,I., Ron,D. (2011). Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol.* 13, 184-90
- Tait,S.W., Green,D.R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11, 621-32.
- Takeda,K., Matsuzawa,A., Nishitoh,H., Ichijo,H. (2003). Roles of MAPKKK ASK1 in stress-induced cell death. *Cell Struct Funct.* 28, 23-9.
- Tanner,D.C., Campbell,A., O'Banion,K.M., Noble,M., Mayer-Pröschel,M. (2015). cFLIP is critical for oligodendrocyte protection from inflammation. *Cell Death Differ.* 22, 1489-1501.
- Tao,R.R., Wang,H., Hong,L.J., Huang,J.Y., Lu,Y.M., Liao,M.H., Ye,W.F., Lu,N.N., Zhu,D.Y., Huang,Q., Fukunaga,K., Lou,Y.J., Shoji,I., Wilcox,C.S., Lai,E.Y., Han,F. (2014). Nitrosative stress induces peroxiredoxin 1 ubiquitination during ischemic insult via E6AP activation in endothelial cells both in vitro and in vivo. *Antioxid Redox Signal.* 21, 1-16.
- Tobaben,S., Grohm,J., Seiler,A., Conrad,M., Plesnila,N., Culmsee,C. (2011). Bid-mediated mitochondrial damage is a key mechanism in glutamate-induced oxidative stress and AIF-dependent cell death in immortalized HT-22 hippocampal neurons. *Cell Death Differ.* 18, 282–292.
- Tobiume,K., Matsuzawa,A., Takahashi,T., Nishitoh,H., Morita,K., Takeda,K., Minowa,O., Miyazono,K., Noda,T., Ichijo,H. (2001). ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep.* 2, 222-8.
- Tobiume,K., Saitoh,M., Ichijo,H. (2002). Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by the stress-induced activating phosphorylation of pre-formed oligomer. *J Cell Physiol.* 191, 95-104.
- Tohmonda,T., Yoda,M., Iwawaki,T., Matsumoto,M., Nakamura,M., Mikoshiba,K., Toyama,Y., Horiuchi,K. (2015). IRE1 α /XBP1-mediated branch of the unfolded protein response regulates osteoclastogenesis. *J Clin Invest.* 125, 3269-3279.
- Topisirovic,I., Gutierrez,G.J., Chen,M., Appella,E., Borde,K.L., Ronai,Z.A. (2009). Control of p53 multimerization by Ubc13 is JNK-regulated. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 12676-81.
- Torcia,M., De Chiara,G., Nencioni,L., Ammendola,S., Labardi,D., Lucibello,M., Rosini,P., Marlier,L.N., Bonini,P., Dello Sbarba,P., Palamara,A.T., Zambrano,N., Russo,T., Garaci,E., Cozzolino,F. (2001). Nerve growth factor inhibits apoptosis in memory B lymphocytes via inactivation of p38 MAPK, prevention of Bcl-2 phosphorylation, and cytochrome c release. *J Biol Chem.* 276, 39027-36.
- Torres,J., Pulido,R. (2001). The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *J Biol Chem.* 276, 993-8.
- Tourian L.Jr., Zhao,H., Srikant,C.B. (2004). p38 α , but not p38 β , inhibits the phosphorylation and presence of c-FLIPS in DISC to potentiate Fas-mediated caspase-8 activation and type I apoptotic signaling. *J Cell Sci.* 117, 6459-71.

Bibliografia

- Tournier,C., Hess,P., Yang,D.D., Xu,J., Turner,T.K., Nimnual,A., Bar-Sagi,D., Jones,S.N., Flavell,R.A., Davis,R.J. (2000). Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science*. 288, 870-4.
- Trembley,J.H., Wang,G., Unger,G., Slaton,J., Ahmed,K. (2009). Protein kinase CK2 in health and disease: CK2: a key player in cancer biology. *Cell Mol Life Sci*. 66, 1858-67.
- Tsuchiya,A., Kaku,Y., Nakano,T., Nishizaki,T. (2015). Diarachidonoylphosphoethanolamine induces apoptosis of malignant pleural mesothelioma cells through a Trx/ASK1/p38 MAPK pathway. *J Pharmacol Sci*. 129, 160-8.
- Turjanski,A.G., Vaqué,J.P., Gutkind,J.S. (2007). MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene*. 26, 3240-53.
- Urano,F., Wang,X., Bertolotti,A., Zhang,Y., Chung,P., Harding,H.P., Ron,D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*. 287, 664-6.
- Uriarte,S.M., Joshi-Barve,S., Song,Z., Sahoo,R., Gobejishvili,L., Jala,V.R., Haribabu,B., McClain,C., Barve,S. (2005). Akt inhibition upregulates FasL, downregulates c-FLIPs and induces caspase-8-dependent cell death in Jurkat T lymphocytes. *Cell Death Differ*. 12, 233-42.
- Vadlakonda,L., Dash,A., Pasupuleti,M., Anil Kumar,K., Reddanna,P. (2013). The Paradox of Akt-mTOR Interactions. *Front Oncol*. 3:165.
- Vallejo-Illarramendi,A., Domercq,M., Pérez-Cerdá,F., Ravid,R., Matute,C. (2006). Increased expression and function of glutamate transporters in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis*. 21, 154–164.
- Varadhachary,A.S., Peter,M.E., Perdow,S.N., Krammer,P.H., Salgame,P. (1999). Selective Up-Regulation of Phosphatidylinositol 3'-Kinase Activity in Th2 Cells Inhibits Caspase-8 Cleavage at the Death-Inducing Complex: A Mechanism for Th2 Resistance from Fas-Mediated Apoptosis. *J Immunology*. 163, 4772-4779.
- Vaseva,A.V., Moll,U.M. (2009). The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta*. 1787, 414-20.
- Vauzour,D., Vafeiadou,K., Rice-Evans,C., Williams,R.J., Spencer,J.P. (2007). Activation of pro-survival Akt and ERK1/2 signalling pathways underlie the anti-apoptotic effects of flavanones in cortical neurons. *J Neurochem*. 103, 1355-67.
- Verkhraatsky,A. (2005). Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiol. Rev* 85, 201-279.
- Vieira,M., Fernandes,J., Burgeiro,A., Thomas,G.M., Haganir, R.L., Duarte,C.B., Carvalho,A.L., Santosa, A.E. (2010). Excitotoxicity through Ca²⁺-permeable AMPA receptors requires Ca²⁺-dependent JNK activation. *Neurobiol Dis*. 40, 645–655.
- Vilk,G., Weber,J.E., Turowec,J.P., Duncan,J.S., Wu,C., Derksen,D.R., Zien,P., Sarno,S., Donella-Deana,A., Lajoie,G., Pinna,L.A., Li,S.S., Litchfield,D.W. (2008). Protein kinase CK2 catalyzes tyrosine phosphorylation in mammalian cells. *Cell Signal*. 20, 1942-51.

Bibliografia

- Vogel,A., Aslan,J.E., Willenbring,H., Klein,C., Finegold,M., Mount,H., Thomas,G., Grompe,M. (2006). Sustained Phosphorylation of Bid Is a Marker for Resistance to Fas-Induced Apoptosis During Chronic Liver Diseases. *Gastroenterology*. 130, 104–119.
- Volterra,A., Trotti,D., Tromba,C., Floridi,S., Racagni,G. (1994). Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *J Neurosci*. 14, 2924–2932.
- Vousden,H., Prives,C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*. 137, 413–431.
- Walter,P., Ron,D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 334, 1081-1086.
- Walton,M.I., Wilson,S.C., Hardcastle,I.R., Mirza,A.R., Workman,P. (2005). An evaluation of the ability of pifithrin-alpha and -beta to inhibit p53 function in two wild-type p53 human tumor cell lines. *Mol Cancer Ther*. 4, 1369-77.
- Wang G, Ahmad KA, Ahmed K. (2006). Role of CK2 in regulation of TRAIL induced apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Res*. 66, 2242–2249.
- Wang,J., Guo,W., Zhou,H., Luo,N., Nie,C., Zhao,X., Yuan,Z., Liu,X., Wei,Y. (2015). Mitochondrial p53 phosphorylation induces Bak-mediated and caspase-independent cell death. *Oncotarget*. 6, 17192-205.
- Wang,M., Kaufman,R.J. (2014). The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat Rev Cancer*. 14, 581-597.
- Wang,Q., Wang,X., Evers,B.M. (2003). Induction of cIAP-2 in human colon cancer cells through PKC delta/NF-kappa B. *J Biol Chem*. 278, 51091-9.
- Wang,Q., Wang,X., Zhou,Y., Evers,B.M. (2006). PKCdelta-mediated regulation of FLIP expression in human colon cancer cells. *Int J Cancer*. 118, 326-34.
- Wang,X., Trotman,L.C., Koppie,T., Alimonti,A., Chen,Z., Gao,Z., Wang,J., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., Cordon-Cardo,C., Pandolfi,P.P., Jiang,X. (2007). NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN. *Cell*. 128, 129-39.
- Wang,X., Jiang,X. (2008). Post-translational regulation of PTEN. *Oncogene*. 27, 5454–5463.
- Wang,X.Q., Yao,R.Q., Liu,X., Huang,J.J., Qi,D.S., Yang,L.H. (2011). Quercetin protects oligodendrocyte precursor cells from oxygen/glucose deprivation injury in vitro via the activation of the PI3K/Akt signaling pathway. *Brain Res Bull*. 86, 277-84.
- Wang,X.T., Pei,D., Xu,J. Guan,Q., Sun,Y., Liu,X., Zhang,G. (2007). Opposing effects of Bad phosphorylation at two distinct sites by Akt1 and JNK1/2 on ischemic brain injury. *Cell Signal*. 19, 1844–1856.
- Ward,M.W., Rego,A.C., Frenguelli,B.G., Nicholls,D.G. (2000). Mitochondrial membrane potential and glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci*. 20, 7208-7219.
- Weiss,J.H., Sensi,S.L. (1999). Ca²⁺-Zn²⁺ permeable AMPA or kainate receptors: possible key factors in selective neurodegeneration. *Trends Neurosci*. 23, 365-371.

Bibliografia

- Wie,S.M., Adwan,T.S., DeGregori,J., Anderson,S.M., Reyland,M.E. (2014). Inhibiting tyrosine phosphorylation of protein kinase C δ (PKC δ) protects the salivary gland from radiation damage. *J Biol Chem.* 289, 10900-8
- Woehlbier,U., Hetz,C. (2011). Modulating stress responses by the UPRosome: a matter of life and death. *Trends Biochem Sci.* 36, 329-37.
- Wolff,S., Erster,S., Palacios,G., Moll,U.M. (2008). p53's mitochondrial translocation and MOMP action is independent of Puma and Bax and severely disrupts mitochondrial membrane integrity. *Cell Res.* 18, 733-44.
- Worby,C.A., Dixon,J.E. (2014). PTEN. *Annu Rev Biochem.* 83:641-69.
- Wosik,K., Antel,J., Kuhlmann,T., Bruck,W., Massie,B., Nalbantoglu,J. (2003). Oligodendrocyte injury in multiple sclerosis: a role for p53. *J Neurochem.* 85, 635-644.
- Wu,G.S. (2004). The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* 3, 156-61.
- Wu,J., Kaufman,R.J. (2006). From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death Differ.* 13, 374-84.
- Xi,Y., Chen,Y. (2015). Oncogenic and Therapeutic Targeting of PTEN Loss in Bone Malignancies. *J Cell Biochem.* 116, 1837-47.
- Xia,S., Forman,L.W., Faller,D.V. (2007). Protein kinase C delta is required for survival of cells expressing activated p21RAS. *J Biol Chem.* 282, 13199-210.
- Xu,X., Lu,Y., Bie,X. (2007). Protective effects of gastrodin on hypoxia-induced toxicity in primary cultures of rat cortical neurons. *Planta Med.* 73, 650-4
- Yamane,K., Kinsella,T.J. (2005). CK2 inhibits apoptosis and changes its cellular localization following ionizing radiation. *Cancer Res.* 65, 4362-7.
- Yang,W., Tiffany-Castiglioni,E., Koh,H.C., Son,I.H. (2009). Paraquat activates the IRE1/ASK1/JNK cascade associated with apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicol Lett.* 191, 203-10.
- Yang,Z., Xie,C., Xu,W., Liu,G., Cao,X., Li,W., Chen,J., Zhu,Y., Luo,S., Luo,Z., Lu,N. (2015). Phosphorylation and inactivation of PTEN at residues Ser380/Thr382/383 induced by *Helicobacter pylori* promotes gastric epithelial cell survival through PI3K/Akt pathway. *Oncotarget.* 6, 31916-26.
- Yim,E.K., Peng,G., Dai,H., Hu,R., Li,K., Lu,Y., Mills,G.B., Meric-Bernstam,F., Hennessy,B.T., Craven,R.J., Lin,S.Y. (2009). Rak functions as a tumor suppressor by regulating PTEN protein stability and function. *Cancer Cell.* 15, 304-14.
- Yim,J.H., Kim,Y.J., Ko,J.H., Cho,Y.E., Kim,S.M., Kim,J.y., Lee,S., Park,J.H. (2007). The putative tumor suppressor gene GLTSCR2 induces PTEN-modulated cell death. *Cell Death Differ.* 14, 1872-9.
- Yin,X.M. (2006). Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene.* 369, 7-19.

Bibliografia

- Yip,P.Y. (2015). Phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin (PI3K-Akt-mTOR) signaling pathway in non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* 4, 165–176.
- Yoshida,K., Yamaguchi,T., Shinagawa,H., Taira,N., Nakayama,K.I., Miki,Y. (2006). Protein kinase C delta activates topoisomerase IIalpha to induce apoptotic cell death in response to DNA damage. *Mol Cell Biol.* 26, 3414-31.
- Yoshioka,A., Hardy,M., Younkin,D.P., Grinspan,J.B., Stern,J.L., Pleasure,D.(1995). Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) receptors mediate excitotoxicity in the oligodendroglial lineage. *Neurochem.* 64, 2442-8.
- Yoshioka,A., Bacskai,B., Pleasure,D. (1996). Pathophysiology of oligodendroglial excitotoxicity. *J Neurosci Res.* 46, 427-37.
- Yu,J., Wang,Z., Kinzler,K.W., Vogelstein,B., Zhang,L. (2003). PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 1931-6.
- Yu,J., Zhang,L. (2005). The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Commun.* 331, 851-8.
- Yu,L., Wang,N., Zhang,Y., Wang,Y., Li,J., Wu,Q., Liu,Y. (2014). Neuroprotective effect of muscone on glutamate-induced apoptosis in PC12 cells via antioxidant and Ca(2+) antagonism. *Neurochem Int.* 70, 10-21.
- Yu,Z., Wang,R., Xu,L., Xie,S., Dong,J., Jing,Y. (2011). β -Elemene piperazine derivatives induce apoptosis in human leukemia cells through downregulation of c-FLIP and generation of ROS. *PLoS One.* 6:e15843.
- Yuan,Z.Q., Feldman,R.I., Sussman,G.E., Coppola,D., Nicosia,S.V., Cheng,J.Q. (2003). AKT2 inhibition of cisplatin-induced JNK/p38 and Bax activation by phosphorylation of ASK1: implication of AKT2 in chemoresistance. *J Biol Chem.* 278, 23432-40.
- Zarubin,T., Han,J. (2005). Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Research.* 15, 11-18.
- Zhang,L., Zhao,H., Zhang,X., Chen,L., Zhao,X., Bai,X., Zhang,J. (2013). Nobiletin protects against cerebral ischemia via activating the p-Akt, p-CREB, BDNF and Bcl-2 pathway and ameliorating BBB permeability in rat. *Brain Res Bull.* 96, 45-53.
- Zhang,M., Niu,W., Zhang,J., Ge,L., Yang,J., Sun,Z., Tang,X. (2015). Peroxiredoxin 1 suppresses apoptosis via regulation of the apoptosis signal-regulating kinase 1 signaling pathway in human oral leukoplakia. *Oncol Lett.* 10, 1841-1847.
- Zhang,Q.G., Wu,D.N., Han,D., Zhang,G.Y. (2007). Critical role of PTEN in the coupling between PI3K/Akt and JNK1/2 signaling in ischemic brain injury. *FEBS Lett.* 581, 495-505.
- Zhang,X.P., Li,F., Cheng,Z., Wang,W. (2009). Cell fate decision mediated by p53 pulses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 12245-50.
- Zhao,D. (2007). Protein kinase Cdelta-mediated CREB activation regulates ghrelin-induced cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human colonic epithelial cells. *J Cell Biochem.* 102, 1245-55.

Bibliografía

Zheng,Y., Qin,H., Frank,S.J., Deng,L., Litchfield,D.W., Tefferi,A., Pardanani,A., Lin,F.T., Li,J., Sha,B., Benveniste,E.N. (2011). A CK2-dependent mechanism for activation of the JAK-STAT signaling pathway. *Blood*. 118, 156-66.

Zou,W., Chen,S., Liu,X., Yue,P., Sporn,M.B., Khuri,F.R., Sun,Y. (2007). c-FLIP downregulation contributes to apoptosis induction by the novel synthetic triterpenoid methyl-2-cyano-3, 12-dioxooleana-1, 9-dien-28-oate (CDDO-Me) in human lung cancer cells. *Cancer Biology and Therapy*. 6, 1614-1620.

Zuluaga,S., Alvarez-Barrientos,A., Gutiérrez-Uzquiza,A., Benito,M., Nebreda,A.R., Porras,A. (2007). Negative regulation of Akt activity by p38alpha MAP kinase in cardiomyocytes involves membrane localization of PP2A through interaction with caveolin-1. *Cell Signal*. 19, 62-74.